



HAL
open science

Détection des mutations de /TP53/ et /CTNNB1/ dans l'ADN tumoral ou plasmatique: signification comme biomarqueurs de l'hépatocarcinogénèse

Emilie Le Roux - Goglin

► To cite this version:

Emilie Le Roux - Goglin. Détection des mutations de /TP53/ et /CTNNB1/ dans l'ADN tumoral ou plasmatique: signification comme biomarqueurs de l'hépatocarcinogénèse. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT: . tel-00194209

HAL Id: tel-00194209

<https://theses.hal.science/tel-00194209>

Submitted on 5 Dec 2007

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

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

THESE

présentée devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention du **DIPLÔME DE DOCTORAT**
(arrêté du 7 août 2006)

Détection des mutations de *TP53* et *CTNNB1* dans l'ADN tumoral ou plasmatique : signification comme biomarqueurs de l'hépatocarcinogénèse

présentée et soutenue publiquement le 11 Juillet 2007 par

LE ROUX Émilie

Directeur de thèse : Dr HAINAUT Pierre - CIRC, Lyon

JURY :	M. LE GUELLEC Dominique,	Président
	M. ROSENBAUM Jean,	Rapporteur
	M. WILD Christopher,	Rapporteur
	Mme CHEMIN Isabelle	Examinatrice
	M. HAINAUT Pierre,	Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaque membre de mon jury pour avoir accepté de juger mon travail. Merci à Chris Wild qui a bien voulu se remettre au français (et je tiens à préciser qu'il parle un français excellent !) à la fois pour relire ma thèse en tant que rapporteur et pour participer à ma soutenance. J'ai été ravie de répondre à ses remarques, ses corrections et ses questions, qui m'ont permis d'aller plus loin dans ma réflexion. Merci également à Jean Rosenbaum pour avoir accepté d'être rapporteur. Je le remercie aussi pour m'avoir permis de rencontrer des chercheurs à Bordeaux et ainsi de trouver mon post-doctorat actuel. Merci à Isabelle Chemin d'avoir traversé le cours Albert Thomas pour venir à ma soutenance. Merci pour son aide sur les virus des hépatites, pour le temps qu'elle m'a accordé durant ma thèse. Merci à Dominique Le Guellec, qui a d'abord été mon professeur de TP de bio cell, puis un collègue enseignant de TP et de TD de bio cell, et finalement mon président de jury de thèse. J'ai été ravie d'avoir pu le choisir. Et enfin, un grand merci à Pierre de m'avoir accueillie dans son équipe. Je suis arrivée un jour de juillet à la recherche d'une thèse en urgence, il m'a trouvé une place au sein de son équipe dès septembre, et m'a permis de travailler sur un sujet que j'ai beaucoup apprécié.

Merci à mes anciens maîtres de stage qui m'ont permis d'avancer jusqu'à la thèse, et notamment Marc Castelazzi qui m'a orientée vers le CIRC. Merci au Centre International de Recherche sur la Cancer d'avoir un nom qui fait rire tout le monde, et qui pour certaines personnes fait penser à l'autre CIRC, le Collectif d'Information et de Recherche Cannabique. Merci à Emmanuelle Gormally qui m'a encadrée au début de ma thèse et m'a fait découvrir l'ADN plasmatisque, et à toute l'équipe de cancérogenèse moléculaire, notamment Michelle, une secrétaire hors pair, et Ghyslaine, une technicienne irremplaçable. Merci à toutes les 2 pour leur accueil et leur aide. Je voudrais également remercier tous ceux dans l'équipe ou en dehors qui m'ont permis un moment ou un autre de ma thèse d'avancer mon projet : Olivier, Aurore, Maimuna, Ebrima, Marianne, Iris, Aurélia, Audrey, Agnès, Elodie, Doriane, Ann, et j'en oublie sûrement beaucoup. Un grand merci à Philippe Merle pour avoir relu et corrigé la partie médicale de mon manuscrit.

Un grand merci tout particulier à Stéphanie qui s'est battue avec la CapLC, le spectromètre de masse et qui a dû supporter David plus souvent. Même enceinte jusqu'aux dents, elle a réussi à jouer les MacGyver avec un morceau de scotch pour réparer le spectromètre et essayer de finir les analyses. Beaucoup de prises de tête, de stress, d'envie de passer les machines par la fenêtre,... elle a réussi à animer ma fin de thèse et je sais que je lui dois beaucoup ! Une pensée chaleureuse pour les 2 zigotos qui m'ont entendue râler tous les jours, qui ont dû relire mon manuscrit, et avec qui j'ai passé de formidables moments : Dom et Virginie.

Je tiens également à remercier tous ceux qui ont rendu mon monitorat de biologie cellulaire aussi agréable et enrichissant, et plus particulièrement Dominique Baas et Francis.

Merci à tous les amis qui m'ont soutenue, à tous les geeks de #sos, et un merci particulier pour les 7 nains : Grincheux (Loulou), Prof (Francis), Simplet (gonnet), Joyeux (Jean-Yves), Timide (Beegee), Dormeur (Tri), et Atchoum (Dom).

Pour finir, j'aimerais remercier ma famille, et surtout mes parents qui ont tout fait pour que je puisse arriver là où j'en suis, ainsi que mes 2 frères Grégory et Vincent. Mon tout dernier remerciement sera pour celui qui a dû le plus me supporter (dans tous les sens du terme !) pendant toute ma thèse, auprès de moi comme de l'autre côté de l'Atlantique, Brice mon futur mari.

Table des matières

Préambule.....	9
Introduction.....	11
I.Mutations et cancérogenèse moléculaire.....	12
A.Qu'est-ce que le cancer ?.....	12
B.Capacités acquises par les cellules tumorales.....	14
B.1.Auto-suffisance en signaux de croissance.....	14
B.2.Insensibilité aux signaux d'inhibition de la croissance.....	16
B.3.Inhibition de l'apoptose.....	17
B.4.Potentiel prolifératif infini.....	20
B.5.Promotion de l'angiogenèse.....	21
B.6.Invasion des tissus et métastases.....	21
B.7.Instabilité chromosomique et génique.....	23
<i>B.7.a.Instabilité chromosomique.....</i>	<i>23</i>
<i>B.7.b.Instabilité génique.....</i>	<i>24</i>
B.8.Échappement à la réponse immunitaire.....	25
C.Mutations et cancer.....	26
C.1.Définition.....	26
C.2.Mutations et "gènes du cancer".....	28
<i>C.2.a.Qu'est-ce qu'un "gène du cancer" ?.....</i>	<i>28</i>
<i>C.2.b.À la découverte des "gènes du cancer".....</i>	<i>28</i>
<i>C.2.c.Intérêts des "gènes du cancer".....</i>	<i>31</i>
C.3.Types de mutations dans le cancer et signature des agents cancérogènes.....	31
II.Le carcinome hépatocellulaire.....	33
A.Un problème de santé majeur : données épidémiologiques descriptives.....	33
B.Diagnostic et traitement du CHC.....	35
B.1.Un diagnostic souvent tardif.....	35
<i>B.1.a.Méthodes de diagnostic usuelles.....</i>	<i>35</i>
<i>B.1.b.Développement de nouvelles méthodes de diagnostic.....</i>	<i>36</i>
B.2.Des options de traitement réduites.....	37
<i>B.2.a.Modalités curatives.....</i>	<i>38</i>
<i>B.2.b.Modalités palliatives.....</i>	<i>38</i>
C.Facteurs de risque du carcinome hépatocellulaire.....	39
C.1.Cirrhose.....	40
C.2.Virus de l'hépatite B.....	41
<i>C.2.a.Données épidémiologiques.....</i>	<i>41</i>
<i>C.2.b.Modes de transmission.....</i>	<i>43</i>
<i>C.2.c.Données moléculaires.....</i>	<i>43</i>
<i>C.2.d.Cycle de réplication du VHB.....</i>	<i>45</i>
<i>C.2.e.Infection et pathologie.....</i>	<i>46</i>
<i>C.2.f.Variabilité génétique et génotypes.....</i>	<i>48</i>
<i>C.2.g.Mutations courantes du VHB.....</i>	<i>50</i>
<i>C.2.h.Mécanismes moléculaires de l'hépatocarcinogénèse par le VHB.....</i>	<i>52</i>
C.3.Virus de l'hépatite C.....	54
<i>C.3.a.Données épidémiologiques.....</i>	<i>54</i>
<i>C.3.b.Modes de transmission.....</i>	<i>56</i>

C.3.c.	Données moléculaires.....	56
C.3.d.	Infection et pathologie.....	59
C.3.e.	Mécanismes moléculaires de l'hépatocarcinogénèse par le VHC. .	60
C.4.	Autres facteurs viraux et co-infections.....	62
C.4.a.	Co-infection VHB/VHC.....	62
C.4.b.	Co-infection avec le VIH.....	62
C.4.c.	Co-infection VHB et VHD.....	63
C.5.	Aflatoxine B1.....	64
C.5.a.	Données épidémiologiques.....	64
C.5.b.	Métabolisation de l'aflatoxine B1.....	66
C.5.c.	Mutagenèse par l'aflatoxine B1.....	66
C.5.d.	Marqueurs d'exposition.....	68
C.5.e.	Facteurs génétiques.....	69
C.5.f.	Interactions avec le VHB.....	69
C.6.	Alcool.....	70
C.7.	Obésité et diabète.....	72
C.8.	Facteurs hormonaux endogènes et exogènes.....	72
C.9.	Autres facteurs.....	73
C.9.a.	Tabagisme.....	73
C.9.b.	Facteurs génétiques.....	74
C.9.c.	Bilharziose.....	75
C.9.d.	Arsenic.....	75
C.9.e.	Thorotraste.....	75
D.	Prévention du carcinome hépatocellulaire.....	75
D.1.	Prévention des risques dus au VHB.....	76
D.1.a.	Campagnes de vaccination.....	76
D.1.b.	Traitements anti-viraux.....	77
D.1.c.	Prévention de la transmission.....	78
D.2.	Prévention des risques dus au VHC.....	78
D.2.a.	Traitements anti-viraux.....	78
D.2.b.	Prévention de la transmission.....	79
D.3.	Prévention des risques dus à l'AFB1.....	79
D.3.a.	Prévention avant récolte.....	80
D.3.b.	Prévention après récolte.....	80
D.3.c.	Changement de régime alimentaire.....	81
D.3.d.	Chimio-prévention.....	81
D.4.	Prévention des autres risques.....	83
III.	Mécanismes moléculaires du carcinome hépatocellulaire : un espoir dans le diagnostic précoce ?.....	84
A.	Deux grands mécanismes de l'hépatocarcinogénèse.....	85
A.1.	Relation entre p53 et β -caténine dans le CHC.....	85
A.2.	Stabilité vs instabilité génomique.....	86
B.	TP53.....	87
B.1.	Organisation génomique.....	87
B.2.	Fonctions de la protéine p53.....	89
B.2.a.	Régulation basale par Mdm2.....	89
B.2.b.	Induction de p53.....	90
B.2.c.	Réponse au stress.....	90
B.3.	TP53 et hépatocarcinogénèse.....	92

C.β-caténine.....	94
C.1.Données structurales.....	95
C.2.La protéine β-caténine dans la voie Wnt.....	96
C.3.La β-caténine dans le complexe d'adhésion cellulaire.....	97
C.4.β-caténine et hépatocarcinogénèse.....	98
D.Autres voies dérégulées dans le CHC.....	99
D.1.a.Régulation du cycle cellulaire.....	100
D.1.b.Inhibition de la croissance cellulaire et apoptose.....	100
D.1.c.Instabilité génétique et génomique.....	101
E.L'ADN circulant et son utilisation en cancérologie.....	101
E.1.Définition de l'ADN circulant.....	101
E.2.Utilisation de l'ADN circulant comme matériel de substitution.....	103
E.3.ADN circulant et cancer du foie : application dans le contexte d'une région de haute incidence, la Gambie.....	104
Objectifs du travail.....	109
A.La mutation Ser249 dans l'ADN circulant de sujets asymptomatiques exposés à l'aflatoxine B1.....	110
B.Criblage de mutations dans les gènes TP53 et CTNNB1 dans des CHC dans différentes régions.....	111
Résultats.....	112
I.La mutation Ser249 dans l'ADN circulant de sujets asymptomatiques exposés à l'aflatoxine B1.....	113
A.Contexte.....	113
B.Étude préliminaire par une méthode qualitative, la RFLP.....	114
C.Résultats de l'étude quantitative.....	115
D.Méthodes de détection des mutations.....	118
D.1.RFLP.....	118
D.2.SOMA.....	119
E.Article.....	122
II.Criblage de mutations dans les gènes TP53 et CTNNB1 dans des CHC de différentes régions.....	139
A.Contexte de l'étude.....	139
B.Criblage des mutations de TP53 et CTNNB1 par DHPLC.....	139
C.Résultats.....	141
D.Mise au point des méthodes de criblage des mutations de l'exon 3 du gène CTNNB1.....	143
E.Article 1.....	146
F.Article 2.....	172
Discussion et perspectives.....	193
I.Les mutations des gènes TP53 et CTNNB1 sont-elles des biomarqueurs du CHC ?.....	194
A.Les mutations sont-elles associées aux étiologies ?.....	194
B.Les mutations sont le résultat d'un mécanisme complexe d'hépatocarcinogénèse.....	195
C.Activation de la voie Wnt et marqueur précoce d'hépatocarcinogénèse.....	198
D.Mutation Ser249 et ADN circulant.....	199

D.1.Un marqueur d'exposition à l'AFB1 et au VHB.....	199
D.2.Un marqueur d'hépatocarcinogénèse ?.....	203
D.3.Utilisation en tant que marqueur précoce.....	205
II.Perspectives.....	207
A.Développement d'études prospectives.....	207
B.Développement d'un modèle d'étude mécanistique de l'interaction VHB/AFB1.....	209
C.Développement d'études cliniques.....	210
Bibliographie.....	211
Annexes.....	230

Liste des principales abréviations utilisées

ADN	acide désoxyribonucléique
AFB1	aflatoxine B1
AFB1-FAPY	AFB1-formamidopyrimidine
AFB1-N7-Guanine	8,9-dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB1
AFP	alpha-fétoprotéine
Ag	antigène
ARN(m)	acide ribonucléique (messager)
CHC	carcinome hépatocellulaire
CIRC	centre international de recherche sur le cancer
CYP	cytochrome P
DHPLC	denaturing high performance liquid chromatography
IFN	interféron
pb	paire de base
PCR	polymerase chain reaction
Rb	gène du rétinoblastome
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SOMA	short oligonucleotide mass analysis
TGF β	Transforming growth factor β
UV	ultra violet
VHB	virus de l'hépatite B
VHC	virus de l'hépatite C
VHD	virus de l'hépatite D

Préambule

Le Carcinome Hépatocellulaire (CHC) est le troisième cancer mondial en terme de mortalité. Cette très forte mortalité est essentiellement due à un diagnostic tardif et à l'inefficacité des traitements proposés pour des stades avancés de la maladie.

Avant de devenir cancéreuse, une cellule fait l'objet de nombreuses altérations de ses voies de contrôle. Ces altérations apparaissent de façon séquentielle jusqu'à l'acquisition du phénotype malin. Certaines de ces altérations sont des mutations de gènes, souvent causées par des agents mutagènes. La détection des premières altérations dans les hépatocytes pourraient alors permettre de détecter beaucoup plus précocément l'évolution vers un CHC, et permettre de proposer des traitements évitant la progression vers le cancer. Nous nous sommes intéressés à la détection de marqueurs du CHC sous deux aspects.

La première partie de mon travail a consisté à étudier une mutation connue et spécifique au CHC dans les régions de forte incidence, où l'endémicité du Virus de l'Hépatite B (VHB) est forte et l'exposition à l'aflatoxine B1 (AFB1) très élevée. Différentes études ont montré que cette mutation au codon 249 du gène suppresseur de tumeur *TP53* (Ser249) pouvait être détectée dans l'ADN circulant chez des patients sains et qu'elle pourrait être un marqueur de la mutagenèse due à l'exposition à l'AFB1, ou un marqueur de tumorigenèse. Nous avons donc étudié la présence de cette mutation dans une cohorte de sujets asymptomatiques afin de déterminer les facteurs influençant la présence de cette mutation dans l'ADN circulant.

La seconde partie de mon travail a consisté à cribler des altérations dans des CHC afin d'étudier un lien possible avec leur étiologie. Nous avons choisi deux gènes intervenant chacun dans les deux mécanismes potentiels de l'hépatocarcinogénèse décrits par Laurent-Puig et Zucman-Rossi (2006) : *TP53* et *CTNNB1*. Nous avons ainsi étudié la présence de mutations dans ces deux gènes dans des tissus tumoraux ainsi que sur des tissus sains adjacents, d'étiologies différentes. Le but de ce travail était de faire un bilan des mutations rencontrées et de les relier à des étiologies du CHC afin de trouver des marqueurs moléculaires potentiels.

Introduction

I. Mutations et cancérogenèse moléculaire

A. Qu'est-ce que le cancer ?

Le cancer est une maladie dite complexe, qui regroupe sous ce terme une multitude de maladies différentes. Le cancer se caractérise par la présence de cellules dont la prolifération est anarchique, incontrôlée. Le cancer est une maladie évolutive et peut conduire au développement d'un phénotype malin lorsque les cellules cancéreuses deviennent capables de se propager dans l'organisme. Il peut atteindre de nombreux sites chez un individu et se présenter sous des formes variées. En 2000, plus de 10 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués, plus de 6 millions de décès ont été causés par un cancer, et plus de 22 millions de personnes vivaient avec un cancer. Le cancer se place au deuxième rang mondial en terme de cause de mortalité derrière les accidents cardio-vasculaires. Une personne sur 3 environ développera un cancer au cours de sa vie, et une personne sur 4 en mourra.

Les nombreuses études menées jusqu'à présent sur différents cancers, montrent que la tumorigenèse chez l'Homme est un processus multi-étapes. Ces étapes correspondent à des altérations génétiques ou épigénétiques conduisant à la transformation progressive de cellules normales en cellules cancéreuses. Ces altérations (de la mutation ponctuelle aux changements chromosomiques) impliquent de nombreux sites et provoquent la dérégulation de voies de régulation des fonctions cellulaires, notamment la fonction proliférative. La complexité des voies impliquées est partiellement montrée figure 1, où l'on peut également constater les nombreuses interconnexions entre ces voies. Ce schéma est bien évidemment simplifié, il faudrait ajouter de nombreuses molécules n'y figurant pas, et intégrer les voies extra-cellulaires.

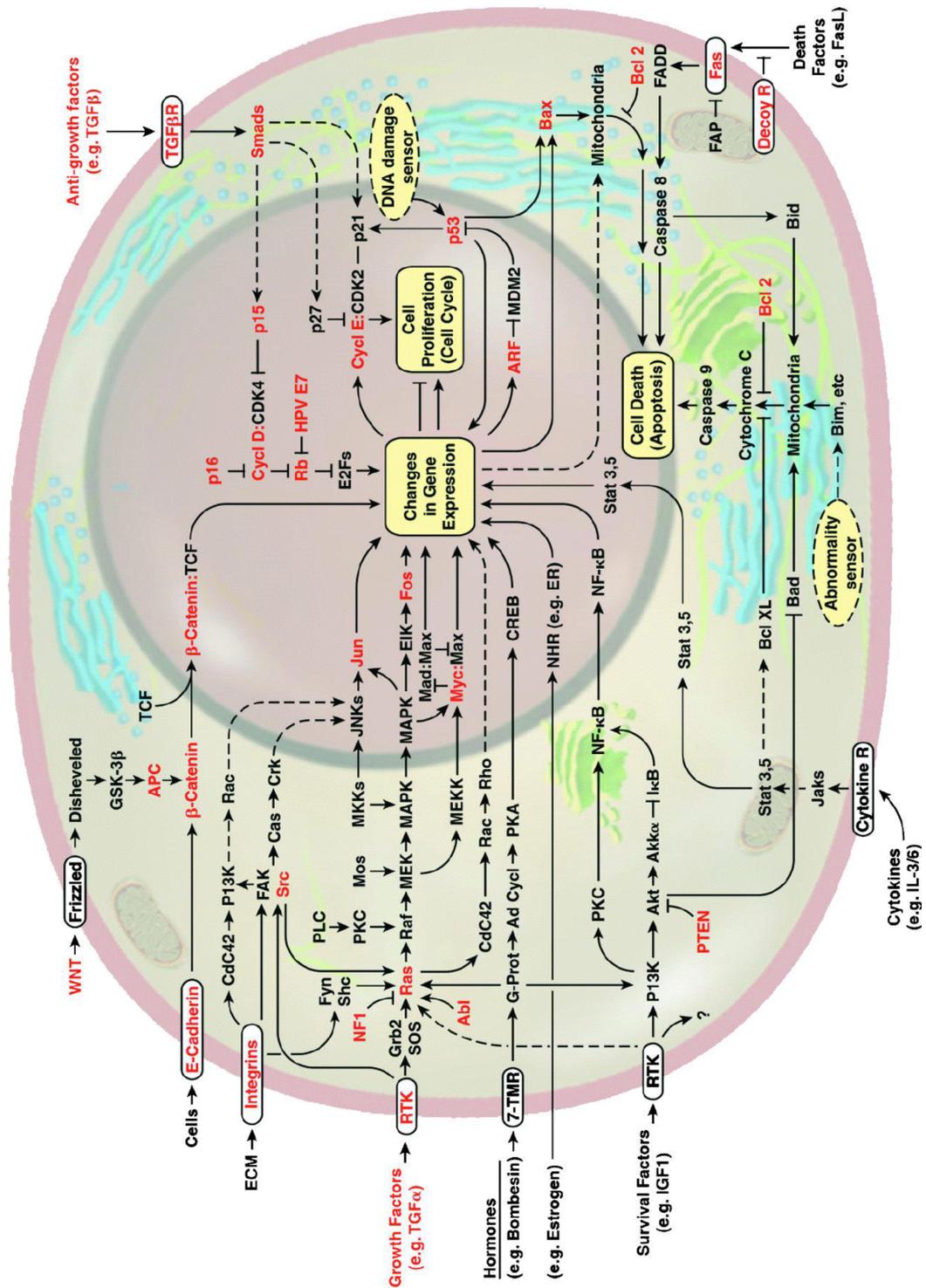


Figure 1 : Représentation des principales voies connues impliquées dans la cancérogenèse. Ce schéma montre la complexité des interactions entre les différentes voies. Certains des gènes connus pour être altérés dans les cancers sont marqués en rouge. Tiré de Hanahan et Weinberg 2000.

Les combinaisons d'altérations aboutissant au cancer se comptent par centaines, en fonction notamment du type de tumeur et de l'organe touché. Hanahan et Weinberg (2000) ont suggéré une classification de ces différentes altérations et ont dégagé 6 capacités que les cellules acquièrent et qui permettent d'aboutir à une prolifération aberrante de cellules dites malignes : (1) l'auto-suffisance en signaux de croissance, (2) l'insensibilité aux signaux d'inhibition de la croissance, (3) l'inhibition de l'apoptose, (4) le potentiel prolifératif infini, (5) la promotion de l'angiogenèse, et (6) l'invasion des tissus et la capacité métastatique. Une septième capacité favorise l'acquisition des 6 autres : (7) l'instabilité génique et génomique. Étant donné qu'une tumeur croît non seulement au sein d'un tissu mais a fortiori au sein d'un organisme, un niveau de complexité s'ajoute. En effet, la tumeur doit acquérir une 8ème capacité qui est (8) l'échappement à la réponse immunitaire (Kim *et al.* 2006).

Les cellules cancéreuses développent différentes stratégies qui leur permettent d'acquérir le phénotype malin. Elles peuvent notamment impliquer l'activation ou surexpression de gènes qui vont favoriser la tumorigenèse, on parle alors d'oncogènes; ou l'inhibition ou l'inactivation de gènes défavorisant la tumorigenèse, on parle alors de gènes suppresseurs de tumeur (cf. figure 1). Nous détaillons ci-après les principales altérations menant à l'acquisition des 8 capacités listées ci-dessus.

B. Capacités acquises par les cellules tumorales

B.1. Auto-suffisance en signaux de croissance

Une cellule "normale" a besoin de recevoir des signaux de croissance pour passer d'un état quiescent à un état actif prolifératif. Ces signaux de croissance sont émis sous différentes formes : facteurs de croissance circulants, composants de la matrice extracellulaire, et molécules d'adhésion ou d'interaction cellule-cellule. Ils sont reçus par la cellule à l'aide de récepteurs situés à leur surface qui captent les molécules signal. Ces récepteurs transmettent l'information reçue en activant des voies de signalisation intra-cellulaires qui à terme permettent la mobilisation d'effecteurs.

Les cellules tumorales montrent une certaine dépendance vis-à-vis des stimulations extérieures de leur croissance. Elles sont capables de contourner le mécanisme de régulation exogène de leur prolifération par différentes stratégies, qui consistent en l'altération d'un des composés permettant la transmission du signal : (1) signaux extracellulaires de croissance, (2) récepteurs trans-membranaires, et (3) voies intracellulaires de signalisation.

(1) Alors que la plupart des facteurs de croissance circulants sont produits par un type cellulaire différent du type cellulaire receveur (activation paracrine ou endocrine), la majorité des cellules cancéreuses acquiert la capacité à synthétiser des facteurs de croissance auxquels elles sont sensibles. Elles mettent ainsi en place une boucle d'auto-stimulation appelée aussi stimulation autocrine. Une tumeur n'est généralement pas constituée que de cellules cancéreuses, mais aussi de cellules de soutien "normales". Certaines cellules cancéreuses sont capables de coopérer avec les cellules qui les entourent et de leur faire produire les signaux de croissance dont elles ont besoin.

(2) Les récepteurs de surface, qui permettent la transduction des signaux de croissance et la transmission aux voies intracellulaires, sont également altérés lors de la cancérogenèse. Ces récepteurs, qui ont souvent une activité de tyrosine kinase au niveau cytoplasmique, sont surexprimés dans beaucoup de cancers. Les cellules deviennent ainsi hypersensibles à des niveaux de facteurs de croissance qui sont habituellement insuffisants pour induire la prolifération. Certaines altérations structurales des récepteurs peuvent également aboutir à une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance. En effet, la suppression ou la modification d'une partie du domaine cytoplasmique des récepteurs peut entraîner une activation constitutive des voies en aval. Les cellules cancéreuses peuvent également changer la composition de leurs intégrines en favorisant celles qui transmettent des signaux prolifératifs. Ces protéines hétérodimériques ont deux fonctions : dans la liaison physique à des structures extracellulaires comme la matrice extracellulaire, mais aussi dans l'activation de voies cellulaires comme la voie SOS-Ras-Raf-MAP kinase. Lors de la liaison d'une intégrine à certains composants de la matrice extracellulaire, un signal est transduit dans le cytoplasme et influence le comportement de la cellule :

quiescence chez une cellule "normale", et motilité, résistance à l'apoptose, et entrée dans le cycle cellulaire, pour les cellules cancéreuses.

(3) D'autres mécanismes plus complexes d'altération impliquent les voies en aval des récepteurs et des intégrines, et notamment la voie SOS-Ras-Raf-MAPK. Dans près de 25% des cancers, la protéine Ras se trouve sous une forme altérée qui induit un flux constant de signaux mitogéniques, sans activation préalable en amont.

B.2. Insensibilité aux signaux d'inhibition de la croissance

Dans un tissu normal, de nombreux signaux anti-prolifératifs permettent de maintenir la plupart des cellules en quiescence, et donc de conserver la structure des tissus. Comme pour les signaux de croissance, ils peuvent être sous forme de molécules circulantes, de composants de la matrice extracellulaire ou de molécules d'adhésion/d'interaction à la surface des cellules voisines. Ces signaux sont reçus par des récepteurs transmembranaires qui transduisent et transmettent l'information aux voies de signalisation cytoplasmiques. Ces signaux agissent essentiellement sur le cycle cellulaire par l'intermédiaire de la voie pRb (protéine du Rétinoblastome) et ont deux effets principaux : (1) mettre la cellule dans un état de quiescence ou phase G₀, état dont elles peuvent sortir sous l'impulsion de signaux de croissance; (2) faire perdre à la cellule son potentiel prolifératif, phénomène généralement accompagné d'une différenciation cellulaire.

La protéine pRb activée se retrouve dans un état hypophosphorylé et bloque la prolifération en séquestrant le facteur de transcription E2F. Il s'agit d'un facteur qui contrôle l'expression de différents gènes essentiels à la progression de la phase G₁ à la phase S du cycle cellulaire. La phosphorylation de pRb induit la libération de E2F, ce qui permet à la cellule de proliférer (Weinberg 1995). Le facteur soluble TGFβ (Transforming Growth Factor β) fait partie des signaux antiprolifératifs les plus connus. Il permet le maintien de pRb dans un état hypophosphorylé (Pardali et Moustakas 2006).

Les cellules cancéreuses doivent empêcher les deux effets des signaux anti-prolifératifs (entrée en quiescence et perte de la fonction proliférative). Elles peuvent changer la composition des intégrines à leur surface et promouvoir celles qui transmettent des signaux prolifératifs au détriment des intégrines transmettant des signaux antiprolifératifs. L'extinction de la voie pRb permet aux cellules de ne pas entrer en quiescence. La voie de signalisation pRb peut être éteinte à différents niveaux : (1) par la réduction du nombre de récepteurs au TGF β ou la disposition de récepteurs mutés non fonctionnels à la surface de la cellule; (2) par mutation ou délétion du gène codant pour un des composants de la voie d'activation de pRb; (3) par perte de fonction de la protéine pRb (mutation du gène correspondant) ou sa séquestration par certaines oncoprotéines virales.

Les mécanismes qui contraignent les cellules à se différencier ne sont pas encore élucidés. Toutefois certaines stratégies adoptées par les cellules cancéreuses pour contrecarrer la différenciation terminale sont partiellement connues. L'une d'elles implique l'oncogène *c-myc* qui code pour un facteur de transcription. La protéine c-Myc peut s'associer au facteur Max, et le complexe ainsi formé stimule la croissance cellulaire. Cependant, le facteur Max peut également s'associer au facteur de transcription Mad, et le complexe Mad-Max induit la différenciation cellulaire. La surexpression de l'oncoprotéine c-Myc permet de faire pencher la balance Myc-Max/Mad-Max en faveur des complexes Myc-Max et donc permet d'empêcher la différenciation et de favoriser la croissance (Grinberg *et al.* 2004). Une autre stratégie consiste à inactiver la voie de signalisation APC/ β -caténine (cf. paragraphe III.C.4), notamment dans le cas des cancers du colon, ce qui empêche par exemple les entérocytes situés au niveau de la crypte d'entrer dans une phase post-mitotique de différenciation.

B.3. Inhibition de l'apoptose

La capacité d'une tumeur à croître dépend non seulement du taux de prolifération de ses cellules, mais aussi de leur taux de mortalité. La mortalité des cellules dépend à la fois de la réponse immunitaire de l'hôte (cf. paragraphe I.B.8) mais aussi du phénomène de mort cellulaire programmée ou apoptose. Une fois l'apoptose activée, les membranes cellulaires, le cytosquelette et le nucléosquelette se

désorganisent, le cytoplasme est expulsé et le noyau se fragmente, le tout en 30 à 60 minutes. Les débris cellulaires ainsi formés sont alors phagocytés.

Il existe deux manières de décrire les voies conduisant à l'apoptose. La première, qui est celle que nous adopterons, consiste en l'organisation des voies selon le modèle de transmission du signal avec 3 catégories de composés : (1) les capteurs, (2) les adaptateurs et (3) les effecteurs. La seconde différencie les voies intrinsèque et extrinsèque. Dans la voie intrinsèque, la mitochondrie sert de senseur, à la suite d'un stress oxydatif par exemple, et induit directement la machinerie apoptotique. Dans la voie extrinsèque, des molécules réceptrices captent des signaux pro-apoptotiques et déclenchent l'apoptose, généralement par l'intermédiaire de la mitochondrie; qui sert de relai.

(1) Les capteurs ont la capacité de reconnaître un environnement intracellulaire ou extracellulaire anormal. Les signaux transmis par les capteurs permettent de réguler les effecteurs de la mort apoptotique. Parmi les capteurs, des récepteurs situés à la surface cellulaire peuvent lier des facteurs de survie ou de mort. Ces récepteurs dits "de mort cellulaire" font partie de la superfamille de gènes du récepteur TNF (Tumor Necrosis Factor). Ils possèdent un domaine cytoplasmique appelé domaine de mort et qui se lie à des adaptateurs, ce qui permet la transmission du signal de mort cellulaire aux effecteurs. Les récepteurs de mort cellulaire les plus connus sont Fas (qui a pour ligand FasL) et TNFR1 (qui a pour ligand TNF α) (revue de Ashkenazi et Dixit 1998). Les capteurs intracellulaires activent l'apoptose en réponse à certains stress internes comme le dommage à l'ADN ou l'activation anormale de certaines voies de signalisation par un oncogène, et certains stress externes comme l'insuffisance en facteur de croissance ou l'hypoxie (Evan et Littlewood 1998). Il existe également une régulation qui permet de maintenir l'architecture du tissu par l'intermédiaire des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice. Ces interactions sont couplées à l'envoi de signaux de survie dont la disparition induit l'apoptose.

(2) Les adaptateurs font le lien entre les capteurs et les effecteurs. La plupart des signaux apoptotiques convergent vers la mitochondrie qui répond à ces signaux en

relarguant du cytochrome C, un catalyseur de l'apoptose (revue de Green et Reed 1998). La présence de cytochrome C dans le cytoplasme induit l'activation de la procaspase 9 en caspase 9, qui va à son tour activer les effecteurs. La voie du suppresseur de tumeur p53 (cf. paragraphe III.B) est également activée par des capteurs intracellulaires et induit l'apoptose, notamment par l'intermédiaire de la protéine pro-apoptotique Bax. Cette dernière fait partie de la famille Bcl-2 dont les membres ont à la fois des propriétés anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) ou pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bid, Bim). Le mécanisme d'activation des membres de cette famille n'est pas totalement élucidé, mais leur rôle dans l'apoptose est certain (revue de Adams et Cory 1998).

(3) Les effecteurs ultimes de l'apoptose sont les caspases (des protéases à cystéines). Les caspases 8 et 9 sont activées respectivement par les voies en aval des récepteurs de mort cellulaire et des capteurs intracellulaires. Elles induisent l'activation d'une douzaine d'autres caspases qui exécutent le programme de mort cellulaire en lysant spécifiquement leurs protéines cibles. Ce programme conduit à la rupture des contacts avec les cellules voisines, la réorganisation du cytosquelette, l'inhibition des mécanismes de réplication et de réparation de l'ADN, la destruction de l'ADN, la rupture de la membrane nucléaire, la destruction de toute structure subcellulaire, et le marquage de la cellule comme cible des cellules phagocytaires (revue de Thornberry et Lazebnik 1998).

La stratégie la plus commune d'inhibition de l'apoptose dans les cellules cancéreuses implique le gène suppresseur de tumeur *TP53* (cf. paragraphe III.B). Ce gène est muté dans plus de 50% des cancers humains. La protéine p53 codée par le gène *TP53* joue un rôle de garde-fou. Elle est normalement activée suite à différents stress comme le dommage à l'ADN, la surexpression d'oncogènes ou l'hypoxie, et peut induire l'apoptose. Les protéines p53 mutées perdent généralement leur capacité d'induction de l'apoptose (Levin 1997).

Un autre mécanisme d'inhibition de l'apoptose repose sur la dérégulation du signal de mort cellulaire FAS (cf. paragraphe I.B.8). Certaines cellules cancéreuses acquièrent la capacité de synthétiser en grande quantité un récepteur FAS qui ne transmet pas de signal. Ce récepteur sert de leurre et capte les ligands FASL qui ne

vont pas se fixer sur les récepteurs normaux, ce qui empêche la transmission du signal ciblant l'apoptose (Pitti *et al.* 1998).

Certains récepteurs de la famille du TNF transmettent non pas des signaux de mort mais des signaux de survie. Certaines cellules cancéreuses activent ces voies anti-apoptotiques, ce qui réduit le phénomène d'apoptose.

B.4. Potentiel prolifératif infini

À part les cellules embryonnaires ou germinales, toutes les cellules d'un individu ont un potentiel répliatif limité. En culture, les cellules cessent de se répliquer au bout d'un nombre fini de passages, elles entrent en sénescence. L'ajout d'oncogènes ou l'inhibition de suppresseurs de tumeur permettent aux cellules de reprendre leur prolifération jusqu'à un nouveau stade appelé crise, qui se caractérise par une mort massive des cellules et par l'apparition de fusions chromosomiques (revue de Shay et Wright 2005).

Cette limitation du potentiel de croissance cellulaire vient de la perte progressive des télomères. En effet, les extrémités des chromosomes sont protégées par la présence de séquences répétées de 6 paires de base (TTAGGG) d'une longueur totale d'environ 15 kilobases à la naissance, et formant une structure particulière en boucle. Au cours des divisions cellulaires se pose le problème de la répliation de l'extrémité 3' des chromosomes. Une ribonucléoprotéine, la télomérase, est capable de rajouter séquentiellement les fragments de 6 paires de base. Cependant, au cours de leurs divisions, les cellules expriment de moins en moins la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) qui n'a plus une activité suffisante pour maintenir la totalité des télomères qui raccourcissent donc à chaque mitose. Lorsque qu'un télomère devient trop court, il ne peut plus former de boucle, ce qui est reconnu par la cellule comme un dommage à l'ADN. Les voies p53 et pRb sont alors activées et arrêtent le cycle cellulaire, la cellule entre en sénescence.

Une cellule pré-cancéreuse qui a activé un ou plusieurs oncogènes peut ne pas entrer en sénescence et continuer sa croissance. Lorsque certains télomères deviennent trop courts, les extrémités non protégées des chromosomes peuvent fusionner, ce qui conduit à une forte instabilité génomique (cf. paragraphe I.B.7.a). Cette instabilité peut être profitable aux cellules cancéreuses puisqu'elle peut entraîner

des modifications favorables à la tumorigenèse. Cependant, la plupart des cellules meurent suite à cette crise. Un événement rare (environ 1 cellule sur 10 millions) peut intervenir et permettre à la cellule de survivre à la crise : la réactivation de la sous-unité catalytique de la télomérase hTERT. Cette réactivation est observée dans la majorité des cellules cancéreuses. Un second mécanisme consiste à recombinaison spécifiquement certaines chromatides soeurs, ce qui permet à la cellule de ne plus avoir besoin de la télomérase.

B.5. Promotion de l'angiogenèse

La survie d'une cellule dépend de son alimentation en oxygène et en nutriments, ainsi que de sa capacité à éliminer ses déchets. Ces fonctions sont assurées par l'intermédiaire de la circulation sanguine. Les cellules cancéreuses n'échappent pas à cette dépendance. L'oxygène ne diffusant des capillaires qu'à une distance de 150-200 μm , une tumeur a besoin de nouveaux vaisseaux pour grossir et s'alimenter. La formation de nouveaux vaisseaux ou capillaires est possible par le phénomène d'angiogenèse (revue de de Castro Junior *et al.* 2006).

L'hypoxie, les stress oxydatifs ou mécaniques stimulent les cellules tumorales qui vont induire l'angiogenèse. Les voies impliquées ne sont pas bien connues mais la plupart aboutit à la sécrétion de glycoprotéines de la famille du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Le VEGF-A notamment stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que la perméabilité des petits vaisseaux.

L'induction de l'angiogenèse par les cellules tumorales implique également l'inhibition de molécules anti-angiogéniques comme la thrombospondine-1, et le changement de composition des intégrines à la surface cellulaire. En effet, l'interaction entre certaines intégrines et des molécules d'adhésion peuvent induire ou inhiber l'angiogenèse.

B.6. Invasion des tissus et métastases

Au cours du développement d'un cancer, des cellules peuvent se détacher de la tumeur dite "primaire" et aller coloniser un autre site via la circulation sanguine. Les nouvelles tumeurs ainsi formées sont appelées métastases et seraient responsables de 90% des morts par cancer (revues de Weigelt *et al* 2005, et Mehlen et Puisieux 2006).

La formation de métastases dépend de la capacité d'une cellule à envahir le tissu adjacent, à entrer dans la circulation sanguine, à s'arrêter au niveau d'un capillaire sur un site distant et à envahir ce dernier.

Une cellule métastatique doit d'abord pouvoir se détacher de son support et donc perdre son adhésion aux autres cellules et surtout à la matrice extracellulaire. Cette capacité fait intervenir notamment les molécules d'adhésion cellule-cellule, les intégrines et les protéases extracellulaires. Les altérations les plus courantes dans les tumeurs métastatiques concernent l'E-cadhérine (Christofori et Semb 1999), une molécule d'adhésion intervenant dans les jonctions intermédiaires (cf. figure 43). La perte de la jonction intermédiaire peut être obtenue par l'inactivation des gènes codant l'E-cadhérine ou la β -caténine (qui fait le lien entre l'E-cadhérine et le cytosquelette), par la répression transcriptionnelle de l'E-cadhérine ou par la protéolyse de son domaine extracellulaire.

Les intégrines sont à la fois des molécules de signalisation et de liaison à la matrice extracellulaire. Les cellules métastatiques modifient la composition de leurs intégrines, ce qui leur permet d'inhiber les liaisons au niveau du site primaire et d'adapter leurs liaisons à la spécificité du site secondaire.

Les protéases extracellulaires dégradent la matrice extracellulaire et permettent à une cellule de se détacher de son support. Les gènes codant les protéases peuvent être activés alors que les gènes codant leurs inhibiteurs sont inactivés. Au niveau protéique, les protéases inactives stockées dans les grains de zymogène peuvent être activées et sécrétées à la surface des cellules cancéreuses.

Une cellule métastatique, une fois détachée de son support doit pouvoir entrer dans un vaisseau et y survivre. Les cellules les plus petites et très élastiques sont les plus aptes à survivre. De plus, dans la circulation sanguine, la cellule est soumise à de nombreux stress mécaniques et immunitaires (cf paragraphe I.B.8). La survie à ces stress implique souvent l'expression de protéines anti-apoptotiques comme les HSPs (Heat-Shock Proteins), ainsi que de l'inactivation de l'apoptose p53-dépendante.

La sortie du vaisseau ainsi que la survie au site secondaire dépendent essentiellement des autres capacités acquises, notamment au niveau des molécules de surfaces qui vont permettre à la cellule d'adhérer au nouveau support et de proliférer.

La tumeur primaire n'étant pas toujours à proximité de vaisseaux sanguins, la formation de métastases est dépendante de l'angiogenèse, mais également de la

formation de vaisseaux lymphatiques ou lymphangiogenèse. Cette dernière est induite par des membres de la famille VEGF comme pour l'angiogenèse, mais plus particulièrement par les VEGF-C et -D. Les cellules métastatiques qui entrent dans le système lymphatique vont plus particulièrement former des métastases au niveau des ganglions.

B.7. Instabilité chromosomique et génique

B.7.a. Instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique ou génomique est le gain ou la perte de chromosomes entiers ou de fragments de chromosomes, à des taux plus importants que dans une cellule normale. Les altérations chromosomiques peuvent être numériques (aneuploïdie) ou structurales (translocations, amplifications, insertions, délétions). Les cellules tumorales sont caractérisées par une grande instabilité génomique, qui leur permet d'acquérir leurs différentes capacités tumorales. Le caryotype d'une cellule tumorale est donc souvent différent du caryotype des cellules normales adjacentes. Une fois le génotype tumoral optimisé, le caryotype tend à se stabiliser (Albertson *et al.* 2003).

Le mécanisme principal conduisant à des remaniements génomiques est le défaut de ségrégation des chromosomes lors de la mitose. Différents gènes sont impliqués dans ce défaut, et notamment les kinases Aurora A, B et C, qui sont souvent surexprimées dans les cancers, et BUB1 (Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1 homolog) (revue de Gollin 2005).

Les cassures chromosomiques peuvent avoir différentes origines, notamment tout ce qui cause des dommages à l'ADN comme les radiations UV (Ultra-Violet), les radiations ionisantes, certains mutagènes, des erreurs de mésappariements, le blocage de la fourche de réplication, ou des défauts dus à des composés oxydatifs réactifs. Parmi ces dommages à l'ADN, les cassures double brin induisent une réponse cellulaire qui consiste en une réparation de l'ADN ou l'apoptose. Lorsque le système de réparation des cassures double brin ne fonctionne pas correctement, l'instabilité génomique augmente. Lorsque qu'une cassure double brin a lieu, le complexe MRN (MRE11, RAD50/NSB1, aussi appelé complexe MRE11) se lie à la cassure et active ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-

related). Ces kinases activent de nombreuses protéines dont p53, BRCA1 ou BRCA2. Ces protéines interviennent notamment dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. L'altération ou la perte de fonction d'un des gènes impliqués dans la réponse aux cassures double brin induit des mutations, des amplifications géniques et des aberrations chromosomiques (revue de Mills *et al.* 2003).

Le raccourcissement des télomères au cours des divisions implique également une instabilité chromosomique lorsque les télomères ne sont plus protégés et qu'ils peuvent fusionner (cf paragraphe I.B.4).

B.7.b. Instabilité génique

L'instabilité génique ou génétique se caractérise par une accumulation de mutations dues à un défaut des systèmes de réparation de l'ADN. Ces systèmes sont au nombre de 5 : le BER (Base Excision Repair), le NER (Nucleotide Excision Repair), le MMR (MisMatch Repair), le NHEJ (Non-Homologue End-Joining), et la recombinaison homologue. Le mauvais fonctionnement d'un de ces systèmes peut entraîner la non-réparation de lésions causées par différents mutagènes ou dues à des erreurs des polymérases lors de la réplication de l'ADN, ce qui induit une instabilité génique. Les mutations conférant à la cellule un avantage prolifératif sont sélectionnées lors de la transformation cellulaire. Les défauts des systèmes de réparation peuvent être dus à un défaut de reconnaissance de la lésion ou un défaut de la réparation propre.

Le NER implique une trentaine de protéines dont 7 (XP-A à G) ont été associées à des pathologies humaines. Il peut être subdivisé en deux sous-systèmes : le GG-NER (Global-Genome NER) qui répare des dommages partout sur le génome, et le TCR (Transcription-Coupled NER) qui est impliqué lors des blocages de la transcription par l'ARN polymérase II (revue d'Andressoo *et al.* 2006).

Des mutations de gènes impliqués dans le MMR, ainsi que leur répression par méthylation de leur promoteur, ont été associés à des cancers du colon héréditaires et sporadiques (revue de Jacob et Praz 2002). La spécificité du site du cancer associé à ce défaut n'est pas élucidée, mais cela n'exclut pas d'autres associations entre défaut de réparation de l'ADN et cancer.

B.8. Échappement à la réponse immunitaire

Les cellules cancéreuses ont une croissance anormale et expriment à leur surface un ensemble de molécules dont la composition est anormale. Elles peuvent donc être reconnues par le système immunitaire et détruites. Pour survivre, elles doivent développer un système d'échappement à la réponse immunitaire. Elles peuvent acquérir la capacité (1) de recruter et de contrôler certaines cellules immunitaires, (2) de sécréter des facteurs immunosuppresseurs, (3) de former un "réseau immunosuppresseur", et (4) de détruire directement des cellules immunitaires effectrices (revue de Kim *et al.* 2006).

(1) Une cellule tumorale en sécrétant du VEGF peut non seulement induire l'angiogenèse mais aussi le recrutement de macrophages et de cellules dendritiques immatures. Une fois recrutées, ces cellules immunitaires sont sélectionnées par un mécanisme encore inconnu : elles se mettent alors au service des cellules tumorales ou sont ciblées vers l'apoptose.

(2) Les cellules tumorales, ainsi que les macrophages associés peuvent sécréter de la phosphatidylsérine qui inhibe la maturation des cellules dendritiques et donc le mécanisme de présentation de l'antigène. Les macrophages associés à la tumeur peuvent également sécréter différents facteurs, notamment le TGF β , inhibiteurs de la maturation des cellules dendritiques ou du phénomène de présentation de l'antigène.

(3) Les cellules immunitaires recrutées et les facteurs inhibiteurs sécrétés peuvent passer dans la circulation lymphatique et agir au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Au niveau de la rate notamment, le TGF β et les cellules dendritiques immatures modifiées peuvent activer des cellules naturellement immunosuppressives, les Tregs. Ces dernières inhibent les lymphocytes T, indispensables à la réponse immunitaire spécifique et à la destruction des cellules tumorales. L'extension de l'effet immunosuppresseur des cellules tumorales permet de former un réseau protecteur étendu qui favorise l'apparition de métastases.

(4) Certaines cellules tumorales sont capables de détourner les systèmes de signalisation de mort cellulaire. Une cellule normale possède des récepteurs de mort cellulaire Fas à sa surface, et les cellules immunitaires NK (Natural Killer) peuvent présenter à leur surface le ligand FasL. L'interaction Fas/FasL induit l'envoi d'un signal de mort à la cellule possédant les récepteurs. Certaines cellules tumorales sont capables d'inhiber la production de récepteurs Fas à leur surface, ou de produire du Fas soluble servant de leurre. Elles peuvent également produire du ligand FasL modifié qui va cibler les cellules NK et induire la mort de ces cellules immunitaires. Il existe d'autres mécanismes semblables induisant la mort des lymphocytes T.

Les cellules cancéreuses subissent donc tout un panel de modifications. Certaines de ces modifications consistent en un changement de profil d'expression des protéines cellulaires, et d'autres modifications induisent la production de protéines anormales. Ces dernières sont le résultat de mutations des gènes correspondant, et permettent d'acquérir de nouvelles capacités ou d'inhiber certaines fonctions cellulaires.

C. Mutations et cancer

C.1. Définition

Une mutation se définit comme une modification d'une ou plusieurs bases d'une séquence d'ADN, et qui apparaît au cours de la vie d'un individu et de façon rare (moins d'1% des individus). L'apparition d'une mutation est le résultat d'un processus multi-étape :

- (1) une modification apparaît à la suite d'une erreur lors de la réplication de l'ADN, ou suite à l'exposition à un agent mutagène qui va par exemple former un adduit, modifier une base ou induire des liaisons anormales entre différents nucléotides;
- (2) les systèmes de réparation de l'ADN ne fonctionnent pas correctement et ne réparent pas les erreurs ou les lésions présentes sur l'ADN;
- (3) au cours de la division cellulaire, l'ADN est répliqué et les lésions sont incorrectement remplacées, la modification devient irréversible.

Les mutations peuvent être classées selon leur type et/ou leur effet. Il existe deux grands types de mutation (substitution et insertion/délétion) et dans chacun de ces types différents effets peuvent être distingués.

(1) Parmi les substitutions de bases (changement d'une base en une autre), on distingue :

- les mutations faux-sens : le changement de base a lieu dans une séquence codante et entraîne un changement d'acide aminé dans la protéine correspondante. Ce changement peut avoir un effet plus ou moins important sur la fonction de la protéine.

- les mutations non-sens : la substitution a lieu dans une séquence codante et entraîne l'apparition d'un codon stop anormal. La protéine correspondante est alors tronquée et généralement dégradée.

- les mutations silencieuses : la substitution n'entraîne aucun changement au niveau protéique, dû à la redondance du code génétique.

- des substitutions peuvent également avoir lieu hors d'une séquence codante. Si elles interviennent au niveau d'un promoteur, elles peuvent changer l'expression de protéines. Si elles interviennent au niveau d'un site d'épissage, les protéines synthétisées peuvent être modifiées (plus longues ou tronquées en fonction de la séquence des introns impliqués). Ces mutations peuvent également n'avoir aucun effet.

(2) Il existe des modifications par insertions ou délétions. Ces modifications peuvent avoir des conséquences identiques aux substitutions en fonction du site où elles interviennent. Dans une séquence codante, si les nucléotides délétés ou insérés ne sont pas un multiple de 3, le cadre de lecture est décalé, ce qui induit généralement la production de protéines tronquées ou aberrantes.

Dans les cancers, les propriétés acquises par les cellules sont souvent des mutations, mais il existe également des remaniements chromosomiques ou des modifications épigénétiques (qui ne changent pas directement la séquence de l'ADN mais l'expression des protéines) comme les méthylations de l'ADN et les acétylations de la chromatine.

C.2. Mutations et "gènes du cancer"

C.2.a. Qu'est-ce qu'un "gène du cancer" ?

Un "gène du cancer" est défini comme un gène dont la dérégulation structurale (au niveau génétique) ou fonctionnelle (au niveau épigénétique) induit l'initiation et/ou la progression de l'oncogenèse. Dans chaque cellule cancéreuse, un panel de ces "gènes du cancer" est altéré, et est le résultat d'une sélection des propriétés qu'elles confèrent à la cellule (cf. partie I.B).

Trois catégories de "gènes du cancer" peuvent être distinguées.

(1) Les oncogènes promeuvent la croissance cellulaire. Dans les cancers, la mutation de ces gènes induit la production des protéines correspondantes constitutivement ou anormalement actives. L'effet des mutations sur les oncogènes est généralement dominant, la modification d'un allèle du gène est suffisante.

(2) Les gènes suppresseurs de tumeur agissent comme des contrôleurs négatifs du cycle cellulaire. Les mutations dans ces gènes dans le cas de cancers induisent une répression ou une suppression de leur rôle de contrôleur. L'effet des mutations est généralement récessif, et tous les allèles du gènes doivent être modifiés.

(3) Les gènes de maintien de l'homéostasie cellulaire contribuent à la régulation des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur. Les gènes codant les protéines intervenant dans les différents mécanismes de réparation de l'ADN font partie de cette catégorie. Dans les cancers, la mutation de ces gènes induit une dérégulation des contrôles de la croissance cellulaire et parfois une instabilité génomique qui favorise la cancérogenèse.

C.2.b. À la découverte des "gènes du cancer"

L'identification de marqueurs moléculaires d'un cancer permet de comprendre les mécanismes qui sont à l'origine du cancer, c'est-à-dire comment les cellules cancéreuses ont acquis leurs capacités tumorales. Elle peut également permettre de déterminer des cibles thérapeutiques potentielles. Différentes méthodes ont permis l'identification de gènes actuellement reconnus comme pouvant être à l'origine de cancers. De nouvelles techniques ouvrent aujourd'hui d'autres perspectives quant à l'identification massive de gènes liés au cancer (revue de Benvenuti *et al.* 2005).

(1) L'étude des rétrovirus a permis l'identification de gènes clés comme s-src. En effet, certains rétrovirus sont capables de transformer des cellules en culture rapidement après infection (Rous 1979). Lors du cycle de réplication virale, le génome du virus est incorporé au génome de l'hôte, et lorsqu'il se "détache" il emporte avec lui des versions de gènes de l'hôte qui vont être modifiées. Lorsque que le génome viral contient un oncogène modifié, il devient capable d'induire la transformation cellulaire. Certains rétrovirus sont capables de transformer des cellules de façon plus lente. Dans ce cas, c'est l'insertion du génome viral qui va induire des modifications lorsqu'il se situe près d'un "gène du cancer" (Neel *et al.* 1981).

(2) Au début des années 1980, un autre type d'essai a été mis au point. De l'ADN tumoral est fractionné et introduit dans des fibroblastes de souris. Lorsque les fibroblastes se transforment, l'ADN introduit est analysé, ce qui permet d'identifier le ou les gènes responsables de cette transformation (Shih *et al.* 1979). C'est ainsi que la mutation au codon 12 du gène *Ras* qui induit le remplacement de la glycine par une valine a été identifiée.

(3) L'analyse des caryotypes dans les tumeurs permet de trouver des gènes impliqués dans le développement du caractère tumoral, au niveau des cassures dues aux translocations et aux inversions, et dans les régions amplifiées ou délétées (Falini et Mason 2002).

(4) Des expériences de fusions de cellules tumorales avec des cellules non-tumorales ont permis d'identifier des gènes supresseurs de tumeur (Harris 1988). En effet, dans certains cas, la fusion permet la suppression de la croissance anormale des cellules transformées qui ont perdu des fragments de chromosome contenant un gène supresseur de tumeur. Cette technique a permis notamment la découverte du gène du rétinoblastome : *Rb*.

(5) Les techniques actuelles utilisent le séquençage direct à grande échelle pour déterminer des profils de mutations, ou des puces d'expression pour déterminer des profils d'expression de gènes. De nombreuses études systématiques ont été

publiées. La comparaison de l'expression des gènes entre différents tissus tumoraux ou entre un tissu tumoral et le tissu sain adjacent permet de déterminer des gènes dérégulés dans le cancer (anormalement activés ou réprimés). Par exemple, l'analyse de profils d'expression de carcinomes hépatocellulaires (CHC) a permis de différencier deux profils qui sont corrélés avec la survie des patients (cf. figure 2).

L'analyse plus précise des gènes différemment exprimés dans ces deux profils pourrait permettre d'identifier des gènes du cancer. Cependant, certaines dérégulations ne sont pas la cause de la transformation cellulaire mais la conséquence de nombreux changements dans la cellule. L'interprétation des résultats est donc délicate et les études doivent s'effectuer sur de nombreux patients pour éviter ce genre de biais. Le séquençage à grande échelle permet de séquencer de très nombreux gènes et de déterminer les mutations à l'origine du cancer, c'est-à-dire celles qui confèrent un avantage sélectif à la cellule et qui se produisent donc dans un "gène du cancer". De même que pour les profils d'expression, les patrons de mutations peuvent présenter des biais dus à des mutations opportunistes qui ne sont pas sélectionnées mais qui sont présentes par hasard dans une cellule sélectionnée (Futreal *et al.* 2004). Le séquençage à grande échelle est un des défis du "Cancer Genome Project" (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/>).

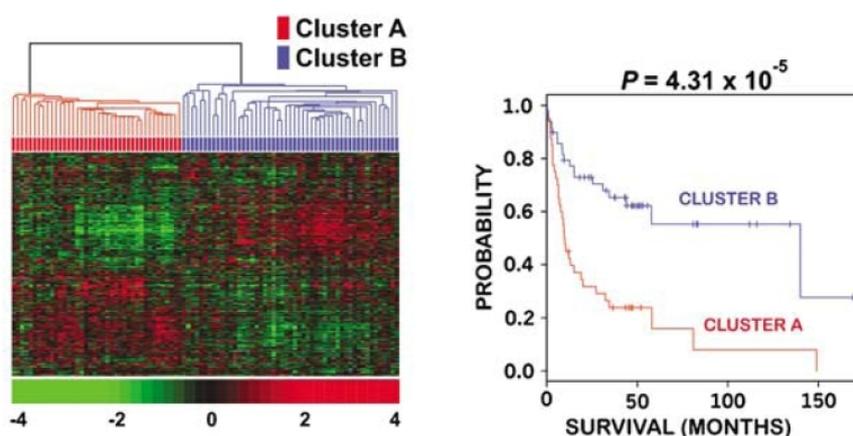


Figure 2 : Exemple de profils d'expression dans des cas de CHC. L'analyse de ces profils a permis de différencier deux types de profil fortement associés avec la survie des patients correspondants. Tiré de Lee et Thorgerirsson 2006.

C.2.c. Intérêts des "gènes du cancer"

L'étude des "gènes du cancer" et de leurs altérations est très prometteuse. Elle pourrait permettre d'élucider des mécanismes de cancérogenèse, de définir des marqueurs moléculaires spécifiques de certains cancers, de prédire ou suivre leur progression, d'établir un pronostic, de prédire la réponse à certaines thérapies ou le risque de rechute, et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. Les résultats récents montrent qu'il est possible de mieux cibler les thérapies et surtout de les personnaliser, de choisir pour chaque patient une thérapie "sur-mesure". Cette nouvelle vision de la thérapie pourrait permettre une meilleure prise en charge des patients et d'en réduire le coût.

C.3. Types de mutations dans le cancer et signature des agents cancérogènes

L'apparition d'une mutation est un processus multi-étape (cf. paragraphe I.C.1). La première étape est une modification due à un agent cancérogène. Certains cancérogènes peuvent induire des mutations spécifiques. L'intérêt de l'étude des mutations est alors de détecter des profils de mutations spécifiques de certains agents cancérogènes afin de remonter à la cause du cancer, et donc aux mécanismes impliqués dans la cancérogenèse, et d'adapter le traitement.

Parmi les "signatures" connues, il y a les double mutations CC vers TT dans les cancers de la peau dus aux radiations UV (Ultra-Violet), la transversion G vers T au codon 249 du gène *TP53* dans les cancers du foie dus à l'AFB1 (aflatoxine B1), et les transversions G vers T aux codons 157, 158, 248 et 273 du gène *TP53* dans les cancers du poumon dus à la cigarette (cf. figure 3).

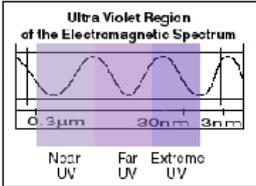
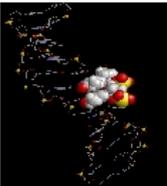
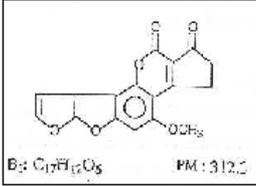
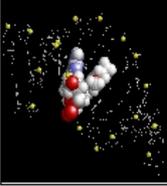
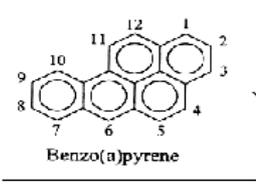
	Source	Mutagène	Adduit	Profil <i>TP53</i>
Radiations UV				<u>CC vers TT</u> Divers codons Cancer de la peau 7% Autres cancers: 0%
Aflatoxines				<u>G toT</u> Codon 249 Cancer du foie: >50% Autres cancers: <2%
Cigarette				<u>G toT</u> Codons 157, 158, 248, 273 Cancer du poulmon: 30% Autres cancers: <10%

Figure 3 : Exemples de signatures dans le gène *TP53* dus à 3 mutagènes : radiations UV (Ultra-Violet), aflatoxine B1 (AFB1) et cigarette. Sur la droite, prévalence des mutations liées à ces cancérigènes dans le cancer associé, comparé aux autres cancers. Tiré de Shi *et al.* 2005.

Le cancer est donc une maladie à différentes facettes. Il peut être causé par divers facteurs de risques, qui vont induire la dérégulation de différentes voies cellulaires de façon plus ou moins spécifique. Par la suite, nous nous focaliserons sur le carcinome hépatocellulaire, la forme majeure de cancer du foie, et nous essayerons de définir des éléments plus caractéristiques de ce cancer, et les implications au niveau de l'amélioration de la santé publique.

II. Le carcinome hépatocellulaire

A. Un problème de santé majeur : données épidémiologiques descriptives

Le carcinome hépatocellulaire (ou CHC) représente 95% des tumeurs malignes primitives du foie. Avec plus de 600 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année (d'après les données de 2002, Parkin *et al.* 2005), c'est le 5ème cancer dans le monde en terme d'incidence, représentant plus de 5% de tous les cas de cancers diagnostiqués (7,5% chez les hommes et 3,5% chez les femmes). Sa répartition géographique n'est pas uniforme et dépend de la répartition des différents facteurs de risque, notamment les virus hépatiques (cf. paragraphe II.C). Les pays les plus touchés sont des pays en voie de développement situés en Afrique sub-saharienne et en Asie du Sud-Est (plus de 20 nouveaux cas par an et par 100 000 habitants) avec environ la moitié des cas recensés en Chine. En Europe et en Amérique de Nord, l'incidence du CHC faible (moins de 5 nouveaux cas par an et par 100 000 habitants) (cf. figures 4 et 5).

Les chiffres de l'incidence du CHC sont certainement largement sous-estimés (certains auteurs parlent d'1 million de nouveaux cas chaque année), à cause d'un manque de diagnostic dans les pays les plus pauvres. La tendance actuelle est à la hausse de l'incidence, due à un meilleur diagnostic dans les pays en voie de développement qui sont les plus touchés, et à l'augmentation de l'infection par le virus de l'hépatite C en Europe et en Amérique du Nord (El-Serag *et al.* 2003).

Le CHC est un cancer de mauvais pronostic (cf. figure 6). Il est au 3ème rang en terme de mortalité par cancer avec plus de 500 000 décès chaque année (d'après les données de 2002, Parkin *et al.* 2005); et dans certains pays d'Asie il passe au premier rang. Dans 80% des cas, il est diagnostiqué à un stade avancé et la survie du patient est alors inférieure à 1 an. Les traitements proposés ne sont pas efficaces sur les stades avancés, et dans les pays en voie de développement où l'incidence du CHC est la plus forte, aucun traitement n'est disponible.

Liver, Males
Age-Standardized incidence rate per 100,000

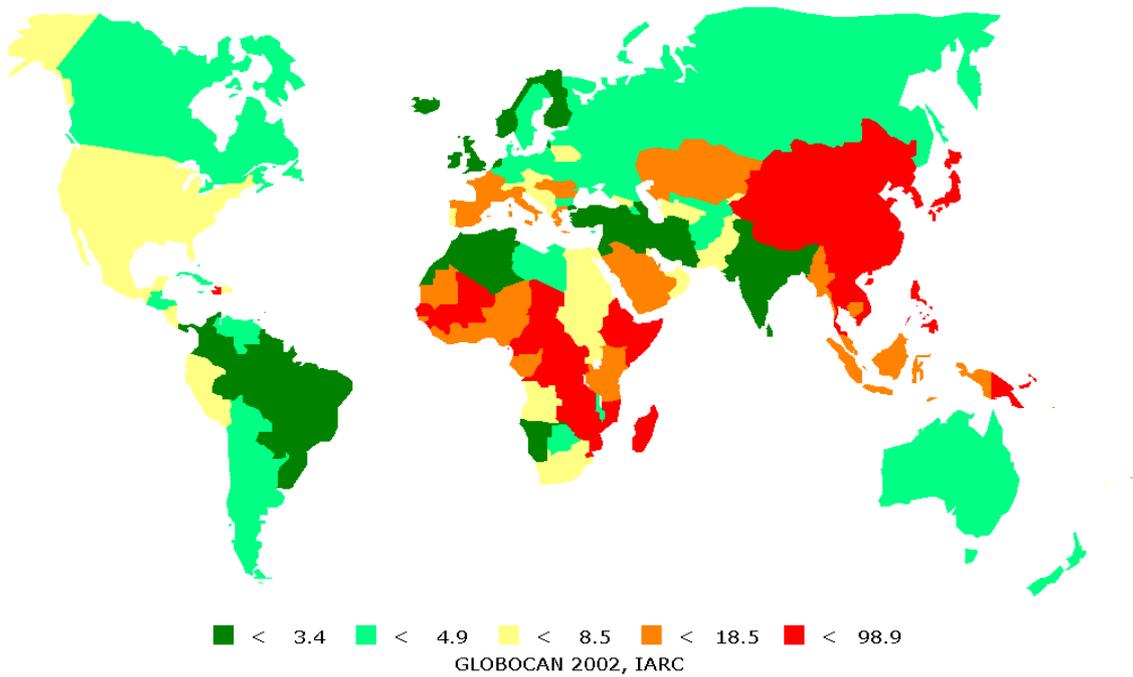


Figure 4 : Carte du monde des incidences du cancer du foie chez l'homme standardisées sur l'âge/100 000 hommes. Les deux régions les plus touchées sont l'Afrique subsaharienne et l'Asie du Sud-Est. GLOBOCAN 2002, <http://www-dep.iarc.fr/>.

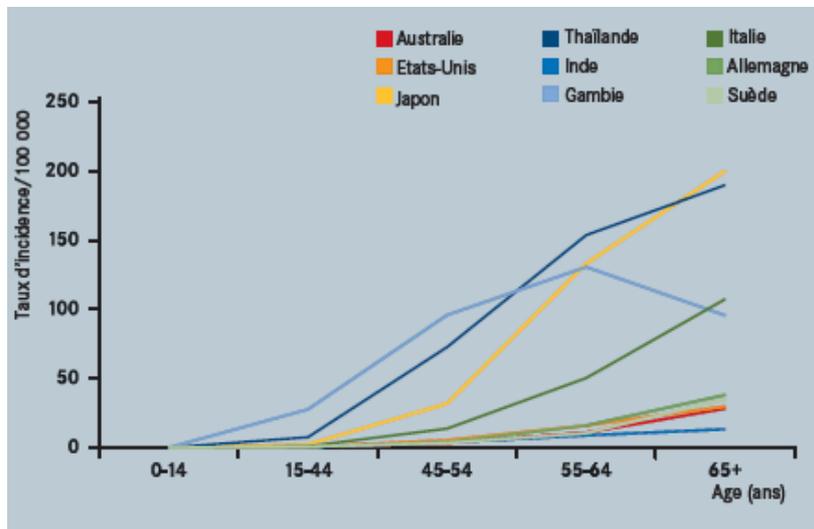


Figure 5 : Taux d'incidence/100 000 hommes par tranches d'âge dans différents pays du globe. Tiré de Stewart et Kleihues 2003.

B. Diagnostic et traitement du CHC

B.1. Un diagnostic souvent tardif

B.1.a. Méthodes de diagnostic usuelles

Le diagnostic d'un CHC est basé sur 3 types d'analyse : des méthodes d'imagerie, la mesure de l'AFP (Alpha-FétoProtéine) dans le sérum, et l'analyse de biopsies (revue de Talwalkar et Gores 2004).

Un CHC est diagnostiqué chez un patient cirrhotique (définition de la cirrhose paragraphe II.C.1) lorsqu'une lésion de plus de 2 cm de diamètre est détectée par deux méthodes d'imagerie, et qu'une hypervascularisation artérielle est observée par au moins une méthode d'imagerie. Un niveau d'AFP supérieur à 400 ng/mL dans le sérum d'un patient atteint de cirrhose est également suffisant pour poser le diagnostic d'un CHC.

L'AFP est une glycoprotéine produite à l'origine par le foie du fœtus. Sa production chute après la naissance et est réprimée chez l'adulte. Cependant, plus de 70% des patients atteints de CHC ont une dose d'AFP élevée dans le sang. La concentration en AFP est considérée comme normale lorsqu'elle est inférieure à 20 ng/mL. Ce seuil varie fortement selon les ethnies : par exemple 30 ng/mL pour la population sicilienne (avec une sensibilité de 65% et une spécificité de 89%, pour le diagnostic d'un CHC) et 200 ng/mL pour la population birmane (avec une sensibilité de 70% et une spécificité de 100% pour le diagnostic d'un CHC). Bien que la concentration en AFP dans le sang soit une méthode beaucoup utilisée pour détecter la présence d'un CHC, cet outil est limité. En effet, des patients non cancéreux atteints d'une hépatite virale aiguë peuvent présenter une concentration forte en AFP dans le sang, ce qui limite l'utilisation de la méthode (Daniele *et al.* 2004).

Le diagnostic d'un CHC est délicat lorsque les lésions sont petites (< 2 cm de diamètre). Les lésions de taille inférieure à 1 cm de diamètre ont un risque de 50% d'être malignes. Dans ce cas, un suivi de la croissance de la lésion est recommandé tous les 3 mois par ultrasonographie, jusqu'à ce que la lésion dépasse 1 cm de diamètre. Lorsque la lésion a un diamètre compris entre 1 et 2 cm, une biopsie est effectuée afin de connaître la nature histologique de la lésion. Cependant, le résultat de l'analyse histologique donne des faux négatifs dans 10 à 20% des cas. De plus,

lorsqu'une tumeur est présente, elle peut se propager le long du chemin emprunté par l'aiguille.

Même si les patients cirrhotiques, les plus à risque de développer un CHC, sont suivis régulièrement dans les pays développés, le diagnostic reste difficile et tardif. Dans les pays en voie de développement les plus touchés, le suivi est rarement assuré, et les patients sont diagnostiqués très tardivement, après l'apparition de symptômes. Dans ces pays, il manque souvent du matériel d'imagerie et du personnel qualifié. Cependant, parmi toutes les méthodes d'imagerie permettant le diagnostic du CHC, l'ultrasonographie reste la moins chère et donc la plus utilisée.

B.1.b. Développement de nouvelles méthodes de diagnostic

Afin d'améliorer le diagnostic du CHC, tant au niveau de la sensibilité, de la spécificité, que de la précocité, des marqueurs sanguins ont été analysés (revue de Zhou *et al.* 2006). Ils sont de nature différente : (1) glycoprotéines, (2) enzymes, (3) ARN messagers et (4) cytokines.

(1) Le glypican 3, une protéoglycane de la membrane plasmique, peut être détecté dans le sang de 40 à 53% de patients atteints de CHC et ayant une concentration sanguine nulle en AFP. La combinaison de l'AFP et du glypican 3 permet d'augmenter la sensibilité de la détection du CHC (Capurro *et al.* 2003).

(2) La gamma glutamyl transférase est une enzyme normalement sécrétée par le foie, mais dont l'activité augmente dans le cas d'un CHC. Elle est formée de 13 isoenzymes dont certaines ne sont détectables que dans le sérum de patients atteints de CHC (Cui *et al.* 2003). L'alpha-1-fucosidase est une enzyme qui hydrolyse les liaisons du fucose dans les glycoprotéines et les glycolipides. Son activité augmente de façon significative chez un patient atteint de CHC comparé à une personne saine, atteinte de cirrhose ou d'hépatite chronique. L'augmentation de cette activité chez des patients cirrhotiques semble être prédictive du développement d'un CHC dans les années suivantes et cette augmentation est détectable 6 mois avant la détection du CHC par des méthodes d'imagerie (Ishizuka *et al.* 1999). La DCP (Des-Gamma-Carboxyprothrombine) est un produit anormal du foie qui agit comme un mitogène. Il

semblerait que sa détection soit plus efficace que l'AFP pour différencier un foie cancéreux d'un foie présentant une autre maladie (Marrero *et al.* 2003).

(3) La présence d'ARNm dans le sang peut être détectée. La présence de l'ARNm de l'AFP signifie la présence de cellule de CHC dans le sang, et est associée à un fort risque de développer des métastases (Ijichi *et al.* 2002). La présence d'ARNm de la gamma glutamyl transférase est normale dans le sang. Cependant, il existe plusieurs types de cet ARNm et l'un d'entre eux est un indicateur de la présence de CHC avec un mauvais pronostic (Sheen *et al.* 2003). L'expression de l'ARNm de la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) est significativement plus importante chez un patient atteint de CHC que chez une personne saine ou atteinte d'une autre maladie du foie (Miura *et al.* 2005).

(4) L'expression du VEGF est plus importante dans les tissus cancéreux présentant des invasions veineuses microscopiques, que dans les tissus normaux ou cancéreux sans invasion. Les plaquettes semblent être les transporteurs du VEGF produit par la tumeur, un fort ratio VEGF/plaquettes est associé avec une étape avancée de CHC, une thrombose de la veine porte, une mauvaise réponse aux traitements et une survie plus courte (Kim *et al.* 2004). Les concentrations en interleukine-8, TGF β 1, et en facteurs de croissance tumeur-spécifiques sont plus élevées chez des patients atteints de CHC que chez des personnes saines.

Il existe donc de nombreux marqueurs sanguins qui pourraient être utilisés dans la détection du CHC. Pris à part, chacun de ces marqueurs ne donne pas une sensibilité et une spécificité assez élevées, mais la combinaison de plusieurs de ces marqueurs donne de meilleurs résultats pour la détection du CHC ainsi que dans certains cas pour le pronostic.

B.2. Des options de traitement réduites

Il existe deux grands types de modalités de traitement des patients atteints d'un CHC : les modalités curatives, et lorsque les patients ne peuvent pas en bénéficier, des modalités palliatives (revues de Motola-Kuba *et al.* 2006, Bruix et Sherman 2005).

B.2.a. Modalités curatives

La résection chirurgicale peut être effectuée sur un foie ayant conservé de bonnes fonctions hépatiques et porteur d'un CHC unifocal pas trop volumineux (≤ 5 cm de diamètre), sans envahissement vasculaire ou dissémination métastatique. Lorsque ces conditions sont remplies, la survie post-résection est bonne : entre 50 et 100% à 5 ans. Chez des patients ne remplissant pas ces conditions, d'autres prises en charges thérapeutiques peuvent être tentées, comme la transplantation hépatique ou les destructions partielles.

La transplantation hépatique est très efficace pour les CHC de petite taille, comme la résection chirurgicale, et peut profiter aux patients cirrhotiques. Les patients qui sont sélectionnés pour la transplantation ont un CHC constitué d'un nodule unique de diamètre $\leq 6,5$ cm, ou de 2-3 nodules de diamètre $\leq 4,5$ cm avec la somme de tous les nodules ≤ 8 cm. Cependant, ce traitement est lourd et coûteux, et la pénurie de greffons rend l'attente longue.

Les traitements locaux de CHC consistent en la destruction du tissu tumoral par injection d'une substance chimique nécrosante (de l'alcool absolu par exemple) ou par application d'un moyen physique comme l'hyperthermie par radiofréquences. Ils peuvent être réalisés par voie percutanée sous contrôle échographique ou à ventre ouvert après laparotomie. Les traitements locaux permettent de stériliser des nodules de CHC de petites tailles ($\leq 3-4$ cm de diamètre) mais n'ont aucun intérêt dans les formes métastatiques ou évoluées.

B.2.b. Modalités palliatives

Il existe 3 principales modalités palliatives. L'embolisation artérielle hépatique a pour but d'ischémier et de nécroser le tissu tumoral, en utilisant généralement des particules de Spongel. La chimioembolisation lipiodolée artérielle hépatique consiste en l'injection intra-artérielle d'un agent antimitotique (cisplatine ou doxorubicine) et d'un vecteur comme le Lipiodol. L'injection intra-artérielle hépatique de substances radioactives peut avoir un impact anti-tumoral.

Ces trois principales modalités palliatives n'ont pas démontré de bénéfice au niveau de la survie des patients même si elles ont un effet anti-tumoral.

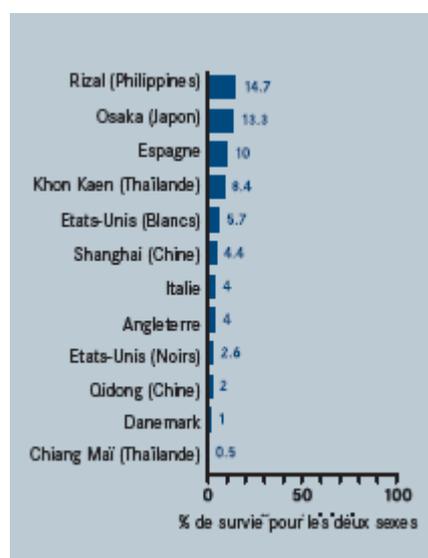


Figure 6 : Taux de survie à 5 ans après diagnostic du cancer du foie dans différentes régions du globe. Tiré de Stewart et Kleihues 2003.

Le CHC est un cancer difficilement traitable, et la survie des patients diagnostiqués est faible (cf. figure 6). En effet, le diagnostic est souvent tardif, ce qui limite fortement l'application de traitements curatifs ainsi que leur efficacité, et donc les chances de survie. De plus, la plupart des CHC est diagnostiquée dans des pays en voie de développement qui ne possèdent pas les infrastructures, le personnel et les moyens nécessaires au dépistage et au traitement du CHC. Il semble donc difficile de réduire sensiblement la mortalité par CHC dans ces conditions. Puisqu'il vaut mieux prévenir que guérir, la baisse d'incidence du CHC paraît plus plausible à réaliser en analysant les facteurs de risque qui provoquent ce cancer et en insistant sur la prévention des risques évitables.

C. Facteurs de risque du carcinome hépatocellulaire

Les facteurs de risque du CHC sont nombreux et leur importance varie géographiquement (cf. figure 7). Le facteur de risque du CHC le plus important est la cirrhose (cf paragraphe II.C.1). Elle peut être causée par les mêmes facteurs de risque

que ceux du CHC, mais ce n'est pas un stade obligatoire. Parmi les facteurs de risques à l'origine du CHC ou de la cirrhose, les virus hépatiques sont considérés comme responsables de 70 à 80% des cas de CHC. L'importance relative des virus de l'hépatite B et C (VHB et VHC) dépend des régions de forte endémicité. Parmi les facteurs importants dans les régions de l'Afrique sub-saharienne et de l'Asie du Sud-Est, l'aflatoxine B1, une mycotoxine, est co-responsable avec le VHB de la majorité des cas de CHC. Le Japon occupe une place particulière en Asie, puisque le facteur de risque dominant est le VHC.

Facteurs de risque	VHC	VHB	Alcool	Autres facteurs
Europe	60-70%	10-15%	20%	10%
Amérique du Nord	50-60%	20%	20%	10%
Asie et Afrique	20%	70%	10%	<10%
Japon	70%	10-20%	10%	<10%

Figure 7 : Tableau récapitulatif des facteurs à l'origine des CHC dans 4 régions du globe. Adapté de Llovet *et al.* 2003.

C.1. Cirrhose

80 à 90% des CHC se développent sur un foie cirrhotique, même si ce n'est pas une étape obligatoire (revue de Fattovich *et al.* 2004 et Okuda 2007). La cirrhose est une maladie chronique du foie qui se définit de façon histologique. C'est une fibrose intra-hépatique extensive qui devient annulaire autour de troubles architecturaux de la régénération hépatocytaire qui mène à la formation de micro-et/ou macro-nodules de régénération.

La cirrhose en elle-même peut entraîner la mort du patient, mais la majorité des cirrhoses évolue en CHC. Les facteurs de risque pour les deux pathologies sont les mêmes. Par la suite, nous décrirons la relation entre ces facteurs de risque et le CHC sans détailler pour chacun la relation avec la cirrhose.

C.2. Virus de l'hépatite B

C.2.a. Données épidémiologiques

Le virus de l'hépatite B (VHB) a été découvert en 1967 par Krugman *et al.* qui ont montré qu'il existait une forme d'hépatite transmise par voie veineuse. Deux équipes ont également mis en évidence la présence d'un antigène (aujourd'hui connu sous le nom d'antigène HBsAg) qui permettait de détecter la présence du virus (Blumberg *et al.* 1965 et Prince *et al.* 1964).

Le VHB est un membre de la famille des Hepadnaviridae (virus à ADN hépatotrope), qui infecte essentiellement les hépatocytes. Cependant, il est possible de trouver de l'ADN viral dans des cellules rénales, pancréatiques ou dans des cellules mononucléées du sang périphérique. Les virions ou particules de Dane, sont des particules enveloppées d'un diamètre d'environ 40-42 nm. L'enveloppe de lipides externe contient des glycoprotéines virales ou antigènes de surface. La capside contient l'ADN viral d'une longueur d'environ 3,2 kilobases, sous forme circulaire relâchée partiellement double brin, la polymérase virale, et quelques protéines de l'hôte (cf. figure 8).

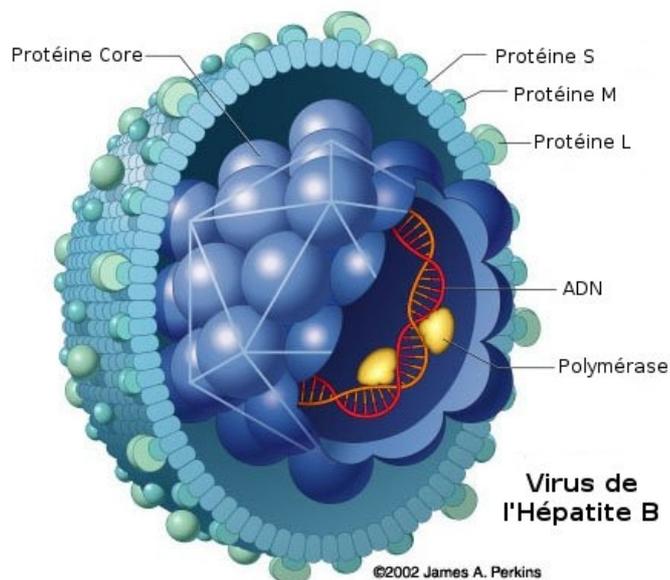


Figure 8 : Représentation "écorchée" d'un virion de l'hépatite B.

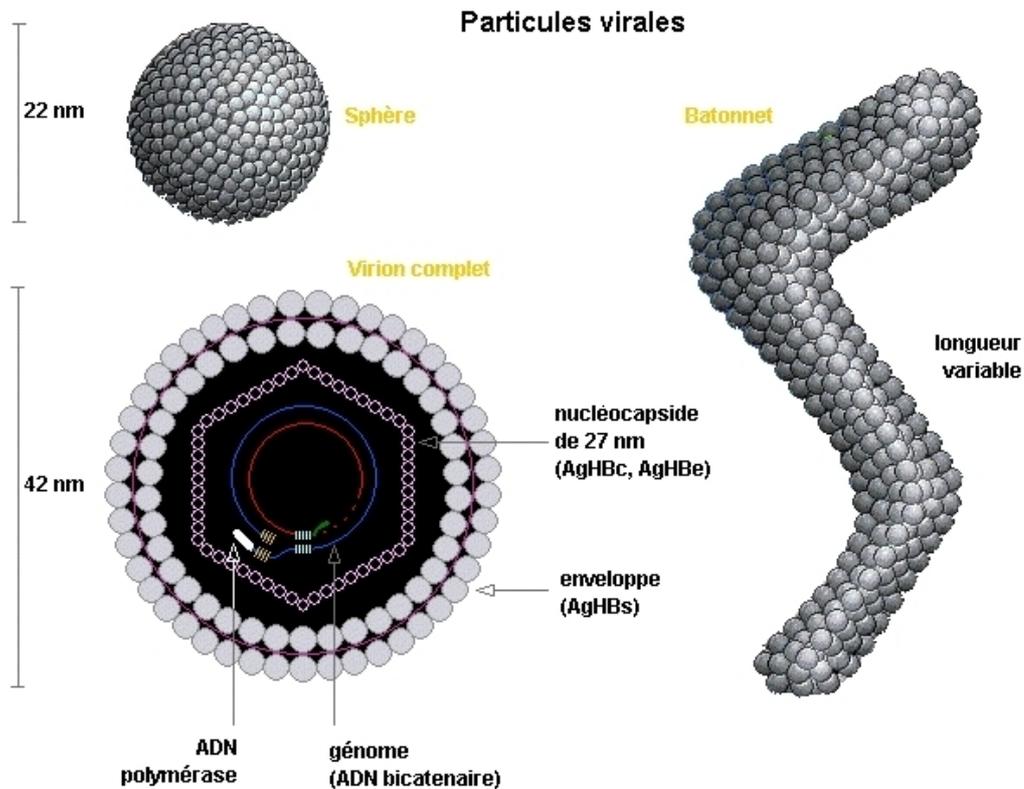


Figure 9 : Représentation schématique des 3 types de particules du VHB. INSERM U271.

Les cellules infectées par le VHB produisent également des particules sphériques ou filamenteuses d'un diamètre d'environ 20 nm, qui ne contiennent pas d'ADN viral et qui ne sont donc pas infectieuses (cf. figure 9). Ces particules sont largement en excès dans le sang par rapport aux particules infectieuses.

Le VHB n'est pas présent uniformément dans le monde. Il existe deux grandes régions de forte endémicité : l'Afrique sub-saharienne et l'Asie du Sud-Est (cf. figure 10). Il a été évalué comme cancérigène du groupe 1 par le CIRC en 1994 (IARC, Monographies volume 59).

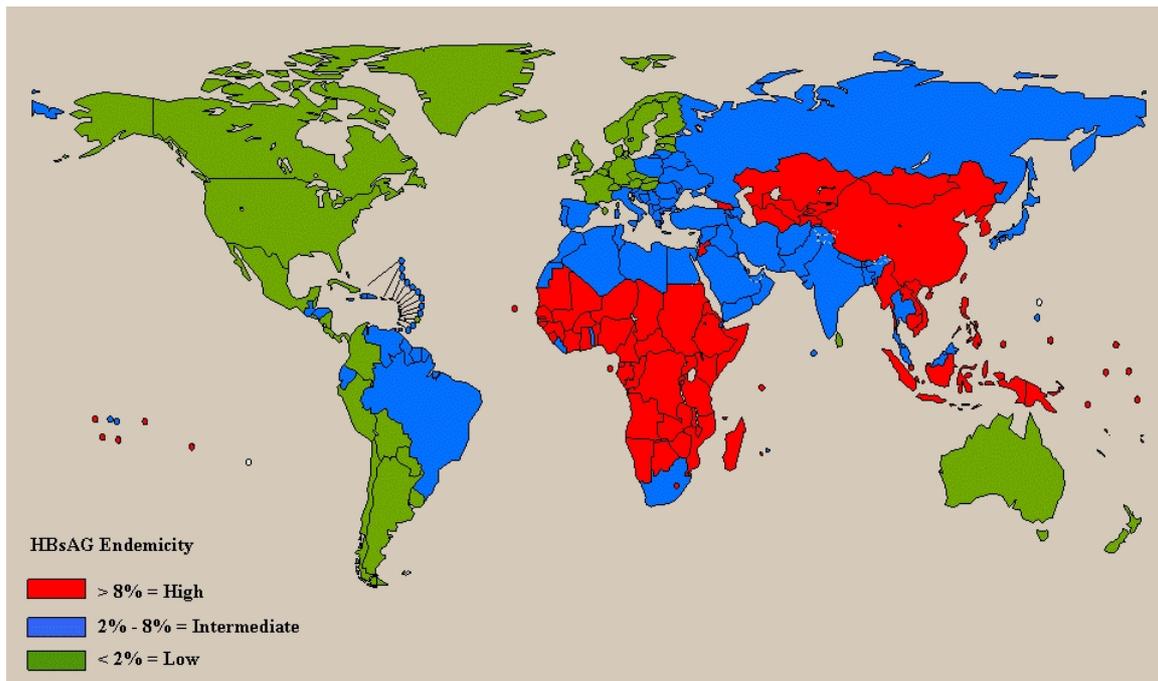


Figure 10 : Carte mondiale du portage chronique du VHB. En rouge les 2 grandes régions où le portage chronique est le plus fort et atteint plus de 8% de la population. Données OMS.

C.2.b. Modes de transmission

Le VHB est transmis par contact avec le sang ou les liquides biologiques d'une personne infectée. Les principales voies de transmission sont : la transmission de la mère à l'enfant lors de l'accouchement, la transmission d'enfant à enfant, les injections et transfusions à risque, et les contacts sexuels.

Les voies principales de transmission sont différentes dans les deux grandes régions à risque. En effet, en Asie du Sud-Est, les mères sont souvent porteuses d'un virus actif et elles le transmettent à leur enfant à la naissance. En Afrique, les mères sont souvent porteuses d'un virus peu répliatif et les enfants sont infectés durant l'enfance et non à la naissance.

C.2.c. Données moléculaires

Le génome du VHB contient 4 cadres ouverts de lecture chevauchants (ORF : Open Reading Frame) : Pré-S1/Pré-S2/P, S, PréC/C et X, qui codent les différentes protéines virales à partir du brin (-) d'ADN (cf. figure 11).

- L'ORF P est le plus long des ORF, il couvre environ 80% du génome et code la polymérase virale (Pol).
- L'ORF Pré-S1/Pré-S2/S chevauche partiellement l'ORF P mais avec un cadre de lecture différent. Il code les différentes protéines de surface ou HBs : S (Small), M (Middle ou S+Pré-S2), et L (Large ou S+Pré-S2+Pré-S1).
- L'ORF Pré-C/C contient deux sites d'initiation qui permettent la synthèse de la protéine précore ou HBe et la protéine de capsid core ou HBc.
- L'ORF X code la protéine X, qui intervient dans la régulation de la transcription.

Durant le cycle de réplication virale (cf. ci-après paragraphe II.C.2.d), le génome du VHB est transcrit en différents ARN. Le plus long est appelé ARN pré-génomique (ARNpg) : il fait environ 3,5 kilobases et sert de matrice pour la réplication du génome viral par la polymérase virale. Il sert également à la traduction des protéines core, précore et à la polymérase virale. Trois autres ARN de 2,4 kilobases, 2,1 kilobases et 0,7 kilobases sont également transcrits. Ils servent à la traduction des protéines d'enveloppe et de la protéine X.

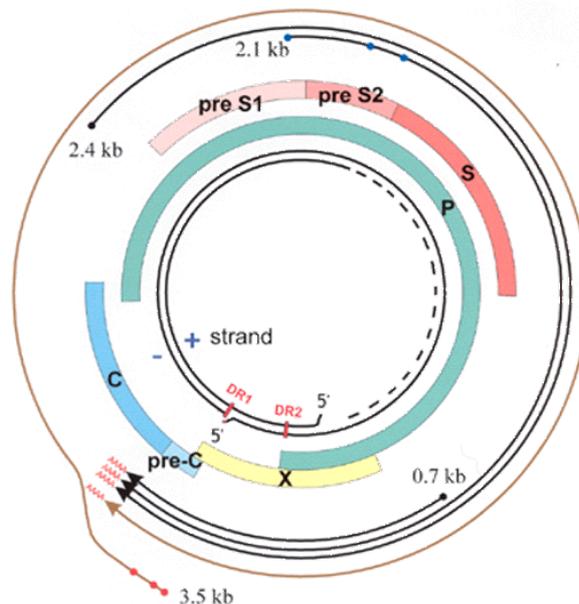


Figure 11 : Représentation schématique du génome du VHB. À l'extérieur, les 4 transcrits dont l'ARN pré-génomique le plus long. Les pointillés représentent la zone partiellement double brin du génome qui a une longueur variable. Entre le génome et les transcrits sont représentés les 4 cadres ouverts de lecture. Tiré de Kidd-Ljunggren *et al.* 2002.

C.2.d. Cycle de réplication du VHB

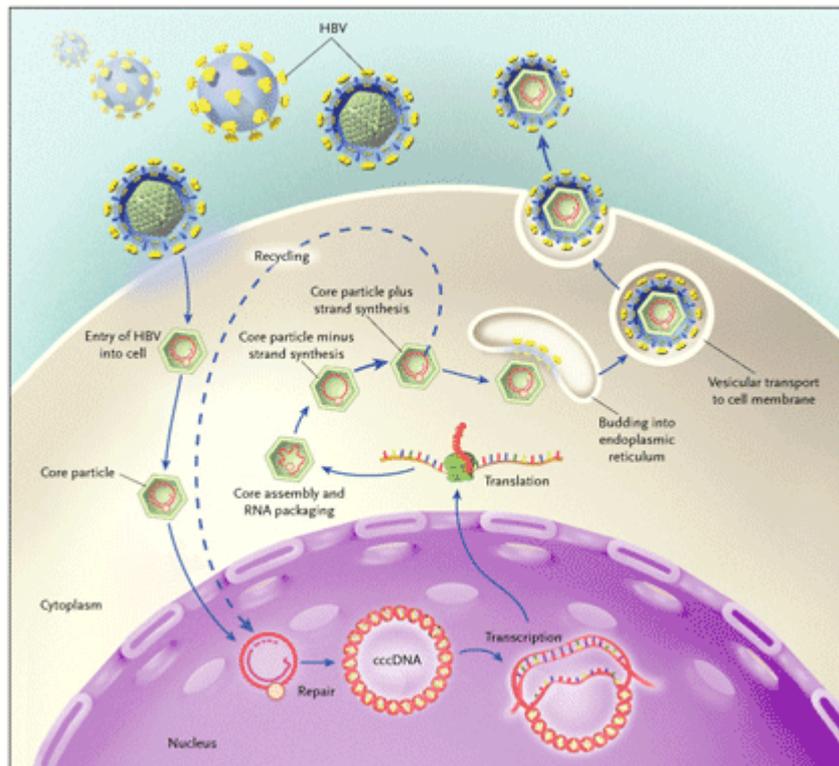


Figure 12 : Schéma représentant le cycle de réplication du VHB. Tiré de Ganem et Prince 2004.

Le cycle de réplication du VHB passe par une étape ARN-dépendante (cf. figure 12, Summers et Mason 1982). Les virions se lient à des récepteurs de surface (inconnus à ce jour) et la fusion de l'enveloppe avec la membrane plasmique permet l'entrée de la capside virale dans la cellule. La capside virale est ensuite acheminée vers le noyau et seul l'ADN viral y pénètre. Le brin positif est alors complété et l'ADN est converti en un ADN superenroulé ou ADNccc (covalently closed circular DNA), qui va servir de matrice à la polymérase à ARN de l'hôte (Tuttleman *et al.* 1986). Les différents ARN sont alors synthétisés et vont migrer dans le cytoplasme où les protéines virales sont produites. Les protéines de capsides sont assemblées et l'ARNpg est encapsidé avec la polymérase virale (Pollack et Ganem 1994). Une fois encapsidé, l'ARN viral sert de matrice à la polymérase virale qui va synthétiser le brin d'ADN(-) puis une partie du brin d'ADN(+) en dégradant l'ARN. Cet ADN nouvellement synthétisé peut être recyclé vers le noyau pour alimenter la réserve

d'ADNccc ou est enveloppé par les antigènes de surface synthétisés dans le réticulum endoplasmique. Les virions ainsi formés sont exportés dans la circulation sanguine par exocytose.

C.2.e. *Infection et pathologie*

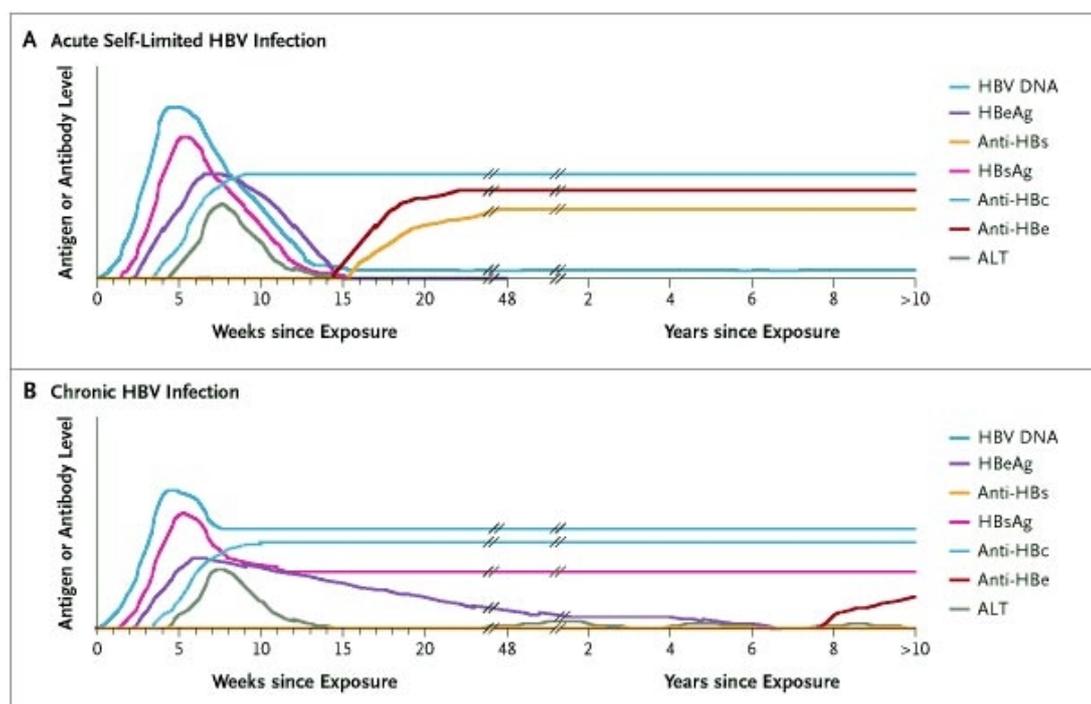


Figure 13 : Profils sérologiques et marqueurs moléculaires après une infection par le VHB. En A : infection limitée, le patient élimine le virus. En B : infection qui devient chronique. Tiré de Ganem et Prince 2004.

Suite à une première infection, les antigènes HBsAg deviennent détectables dans le sang après une période d'incubation de 4 à 10 semaines environ, suivie rapidement par l'apparition d'anticorps anti-HBc. La quantité de virions circulant dans le sang devient quantifiable, et peut atteindre 10^9 à 10^{10} virions/mL de sang dans le cas d'infections aiguës. L'antigène HBe devient également détectable. Une fois que l'infection est bien installée, des anticorps dirigés contre les antigènes HBc sont sécrétés et sont responsables de la destruction des hépatocytes infectés et donc des dommages au niveau du foie. Ces dommages peuvent être mesurés par le taux d'ALT (Alanine Transférase) qui augmente dans le sang. La plupart des primo-infections

chez les adultes, qu'elles soient symptomatiques ou non, est résolue et l'hôte élimine le virus dans le sang et le foie, et conserve une immunité persistante par la sécrétion d'anticorps anti-HBs notamment (cf. figure 13 A). Lorsqu'un antigène est éliminé et que l'anticorps correspondant apparaît, on parle de séroconversion (par exemple pour les antigènes HBs et HBe).

Certains adultes développent une infection persistante. Le virus continue à se répliquer, et reste détectable dans le sang, même si sa concentration peut être variable (cf. figure 13 B). Si la présence d'antigènes HBs est détectée dans le sang plus de 6 mois après l'infection, ces individus sont appelés porteurs chroniques. Ils peuvent ne pas développer de symptôme particulier. Les porteurs chroniques ont environ 100 fois plus de risque de développer un CHC qu'une personne non infectée. Le CHC se développe généralement après une cirrhose (cf. figure 14).

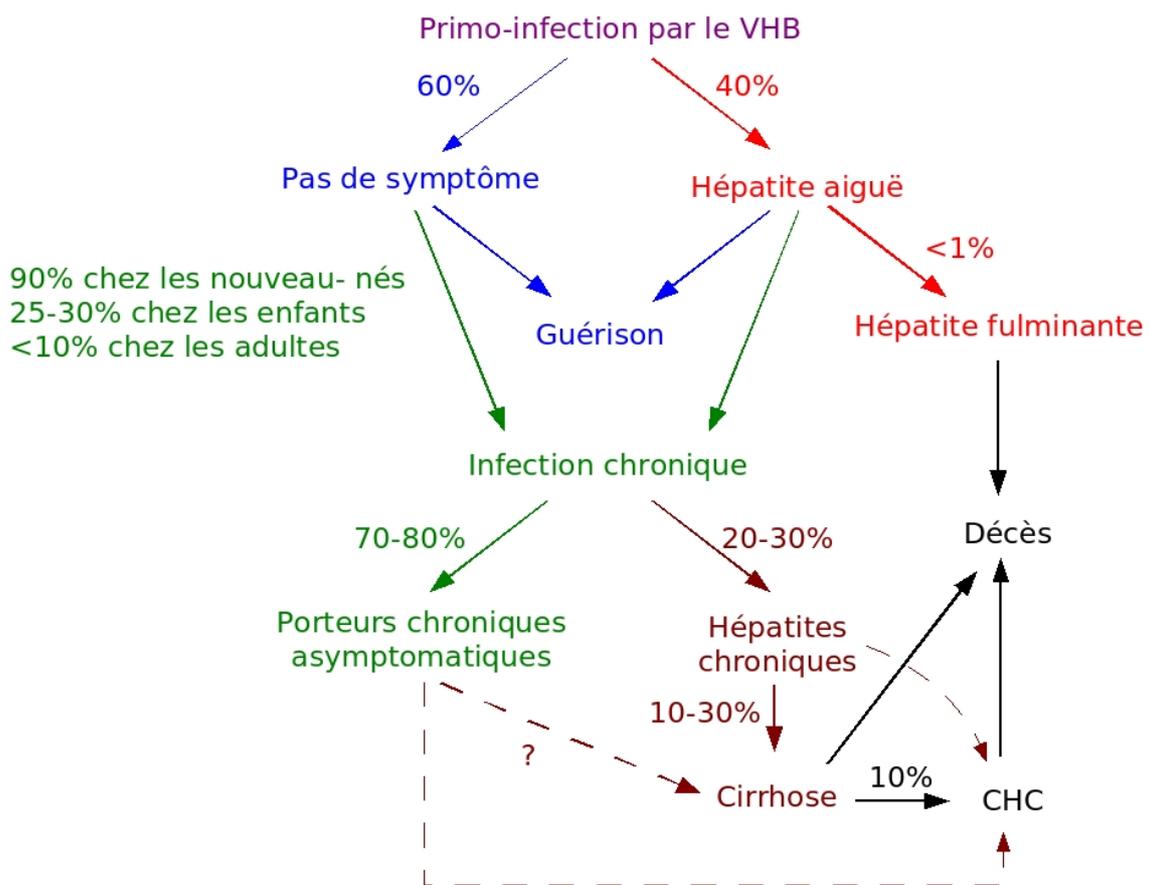


Figure 14 : Évolution pathologique après une primo-infection par le VHB. Les pourcentages représentent le pourcentage total de patients qui évoluent vers l'état suivant.

C.2.f. Variabilité génétique et génotypes

La réplication du VHB passe par une étape ARN-dépendante, ce qui confère à son génome une forte variabilité. En effet, la polymérase virale ne possède pas de fonction d'édition. Il est très courant de trouver de nombreux variants minoritaires chez un même individu, on parle même de "quasi-espèces". Cependant, les 4 cadres ouverts de lecture étant chevauchants, la moindre modification peut atteindre simultanément deux gènes, ce qui limite la variabilité génétique du virus.

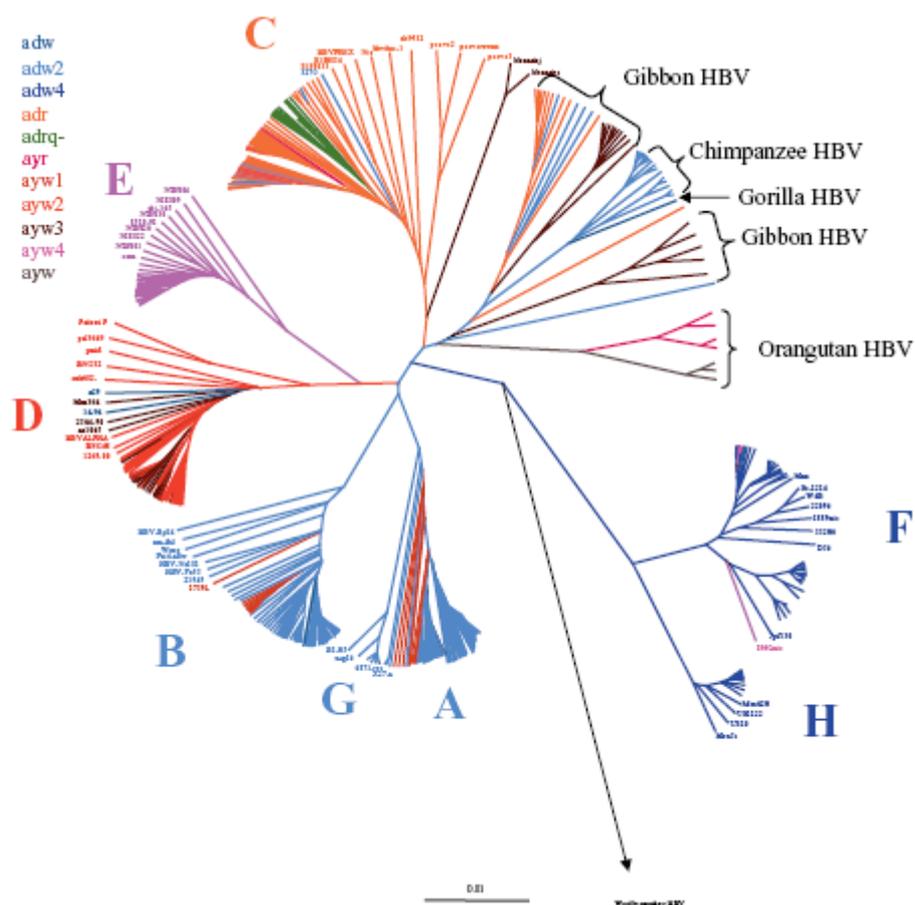


Figure 15 : Dendrogramme représentant la filiation entre les différents génotypes du VHB infectant l'Homme, ainsi que certains Primates. Les séquences utilisées sont des séquences du gène S. Tiré de Norder *et al.* 2004.

Huit génotypes sont connus à ce jour. Ils sont déterminés comme ayant chacun au moins 8% de différence de séquence avec les autres. Les 4 premiers génotypes (A à

D) ont été déterminés dans les années 1980 (Okamoto *et al.* 1988). Les 4 génotypes suivants (E à H) ont été identifiés plus récemment (Norder *et al.* 1994, Stuyver *et al.* 2000, Arauz-Ruiz *et al.* 2002, cf. figure 15). Ces différents génotypes sont divisés en 4 sous-types (adw, adr, ayw et ayr) qui sont classés en fonction de déterminants antigéniques de la protéine HBsAg. L'acide aminé 122 détermine les sous-types d (Lysine) et y (Arginine) et l'acide aminé 160 détermine les sous-types w (Lysine) et r (Arginine). Il existe une corrélation entre les génotypes et les sous-types. Les génotypes A peuvent être de sous-types : adw et ayw, le génotype C : adr, adw et ayr, les génotypes D et E : ayw, et les génotypes F, G et H : adw.

Les différents génotypes sont inégalement répartis géographiquement. Les génotypes A et D sont fréquemment retrouvés en Afrique, Europe et Inde, les génotypes B et C en Asie, le génotype E en Afrique de l'Ouest, le génotype F en Amérique centrale et du Sud. Les génotypes G et H ont une distribution moins connue (cf. figure 16).

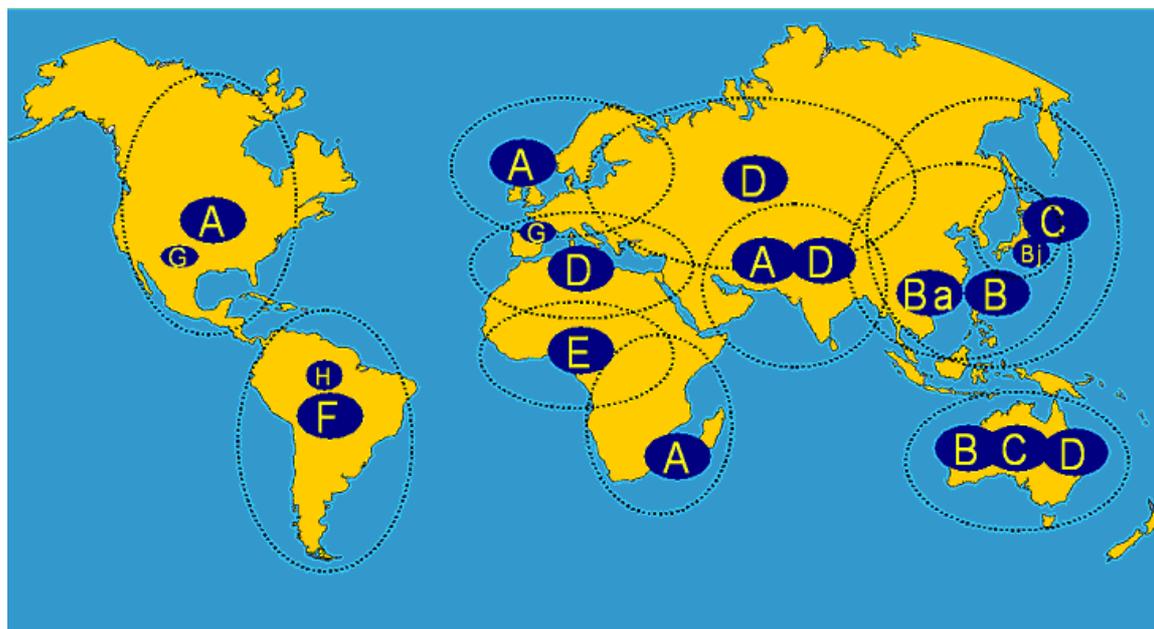


Figure 16 : Carte du monde de la répartition des différents génotypes du VHB. INSERM U271.

Plusieurs études ont montré que les virus de différents génotypes avaient des caractéristiques variables au niveau de l'infection, de l'aspect clinique et de la réponse

aux traitements. En Asie et en Afrique de l'Ouest, les différences de comportement des génotypes expliquent les différences de transmission. Lorsqu'un enfant est infecté par un virus de génotype E, la présence d'ADN viral dans le sang et de l'antigène HBeAg décroît rapidement et à un âge assez jeune. Les mères sont donc généralement peu infectieuses et la transmission se fait entre enfants. En Asie du Sud-Est où les génotypes dominants sont B et C, la décroissance de la présence d'ADN viral dans le sang est plus tardive et les mères sont fortement infectieuses. La transmission du VHB se fait alors essentiellement de mère à enfant.

Les différences entre génotypes ont été étudiées essentiellement entre les génotypes B et C prévalents en Asie du Sud-Est, et entre les génotypes A et D prévalents plus à l'Ouest. Par exemple, les virus de génotype B induisent une progression plus lente des maladies du foie (CHC et cirrhose), présentent un taux de présence de HBeAg plus faible, un meilleur taux de séroconversion et offrent une meilleure réponse aux thérapies anti-virales que ceux du génotype C. De même, les virus de génotype A causent des maladies du foie moins sévères, plus persistantes, mais qui répondent mieux aux thérapies que les virus de génotype D. Cependant, les mécanismes qui expliquent les différences entre génotypes au niveau de l'infection et de la réponse aux traitements ne sont pas connus (revues d'Okanoue et Minami 2006, Liu *et al.* 2005).

C.2.g. Mutations courantes du VHB

Trois types de mutations du VHB sont courantes : (1) une mutation ponctuelle dans la région précore, (2) un couple de mutations dans le promoteur de la région core et (3) de nombreuses mutations dans le gène S.

(1) Une mutation ponctuelle dans la région précore à la position 1896 (substitution d'une Guanine par une Adénosine) a été identifiée chez des porteurs chroniques du VHB empêchant la production de l'antigène HBeAg (Carman *et al.* 1989). La présence de la mutation dépend du génotype du virus. En effet, l'ARNpg forme une structure en boucle au niveau de la région précore (Lok *et al.* 1994, cf. figure 17). Les nucléotides 1896 et 1858 forment un couple dans cette boucle. La mutation est rarement présente dans les génotypes A, F, et certains C puisque la Cytosine à la position 1858 stabilise la Guanine à la position 1896. Au contraire, le

résidu Uranine à la position 1858 dans les génotypes B, D, E, G et la plupart des C, favorise la mutation vers une Adénosine à la position 1896. Habituellement, la perte de l'antigène HBeAg ou séroconversion, est associée à une baisse de la réplication virale, ce qui n'est pas le cas chez les patients infectés pas un virus contenant la mutation à la position 1896 (Kidd-Ljunggren *et al.* 2002, revue de Weber 2005).

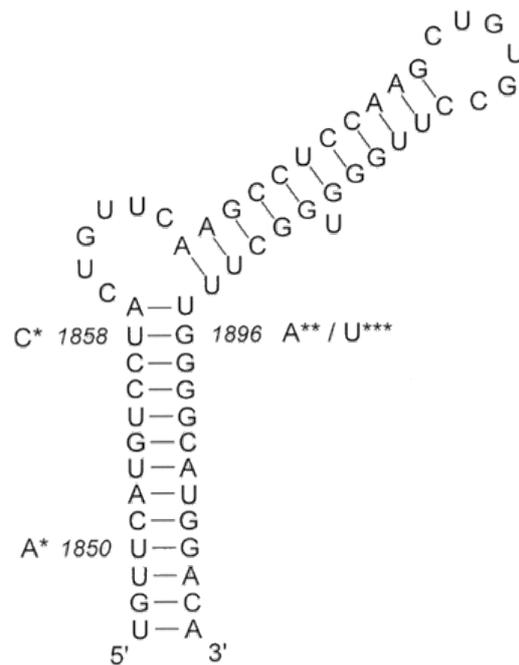


Figure 17 : Structure en boucle d'une portion d'ARN du VHB. * : changements spécifiques à certains génotypes; ** : mutation conduisant à un codon stop, * : nucléotides dans des virus de l'hépatite B infectant les Primates ou la Marmotte (Tiré de Kidd-Ljunggren *et al.* 2002).**

(2) Diverses mutations dans le promoteur de la région core affectent également la production de l'HBeAg et la réplication virale. Parmi elles, les plus courantes sont le couple de mutations aux positions 1762 (Adénosine vers Thymine) et 1764 (Guanine vers Adénosine) (Buckwold *et al.* 1996). Ces deux mutations affectent également le gène X aux codons 130 et 131. Il existe une association entre la présence de ces mutations et des maladies du foie plus sévères. Cependant, il n'a pas été démontré si cela était dû à des propriétés particulières de la protéine X mutée ou au fait que les patients dont le virus acquiert ces mutations développent une réponse immunitaire précoce.

(3) La région S code pour un épitope majeur contre lequel les lymphocytes B produisent des anticorps. Cet épitope est appelé "déterminant a" (déterminant antigénique) (Carman *et al.* 1990). De nombreux mutants pour cet épitope ont été identifiés, affectant notamment les codons 120, 123, 124, 126, 129, 131, 133, 141, 144 et 145 du gène S. Les mutations glycine vers arginine au codon 145, lysine vers acide glutamique au codon 141, thréonine vers isoleucine au codon 131, et l'insertion de 3 acides aminés entre les résidus 123 et 124, affectent fortement la structure antigénique de l'antigène HBs. L'impact clinique de ces mutants n'est pas bien caractérisé, mais ils apparaissent souvent sous la pression immunitaire de l'hôte (chez des hôtes vaccinés). Les mutations au niveau du "déterminant a" permettent au virus d'échapper à la réponse immunitaire puisque les anticorps produits par l'hôte ne sont plus capables de reconnaître la nouvelle structure de l'épitope (revue de Weber 2005). De plus, ces mutants posent problème au niveau du diagnostic, puisque les anticorps commerciaux sont souvent incapables de les reconnaître. Les patients n'ont donc pas d'antigène HBs détectables alors qu'ils produisent des anticorps anti-HBs et que de l'ADN viral peut être détecté. On parle alors d'infection occulte ou silencieuse. Le problème clinique majeur de ces infections occultes est le manque de diagnostic et donc de suivi ou de traitement de ces infections, ainsi qu'un manque de détection de l'infection lors d'un don de sang ou un don d'organe, et donc un risque de transmission (Chemin et Trépo 2005).

C.2.h. Mécanismes moléculaires de l'hépatocarcinogénèse par le VHB

À quelques exceptions près, la répartition géographique du portage chronique du VHB et celle de l'incidence du CHC sont similaires (cf. figure 18).

Le VHB pourrait induire un CHC par deux voies principales : (1) par l'intégration de son génome ou (2) par l'effet de la protéine HBx.

(1) Le génome du VHB peut s'intégrer et provoquer une instabilité génomique qui favorise le développement d'un CHC. De même, l'intégration peut se faire sur des sites très spécifiques à proximité de gènes contrôlant la prolifération, la viabilité ou la différenciation cellulaire, et le phénomène d'intégration peut provoquer des microdélétions dans l'ADN de l'hôte (Tokino *et al.* 1991). L'insertion du génome du

VHB ne semble que partiellement aléatoire, puisqu'il est possible de distinguer des catégories de gènes touchés. Le gène codant hTERT semble être une cible récurrente de l'intégration du VHB. D'autres gènes sont impliqués : le récepteur β à l'acide rétinolique, la cycline D1, des gènes liés à la voie de signalisation du calcium, les gènes codant des peptides ribosomiaux, des familles de facteurs de croissance, des gènes associés à l'apoptose ou des gènes suppresseurs de tumeur (Pang *et al.* 2006 et Murakami *et al.* 2005).

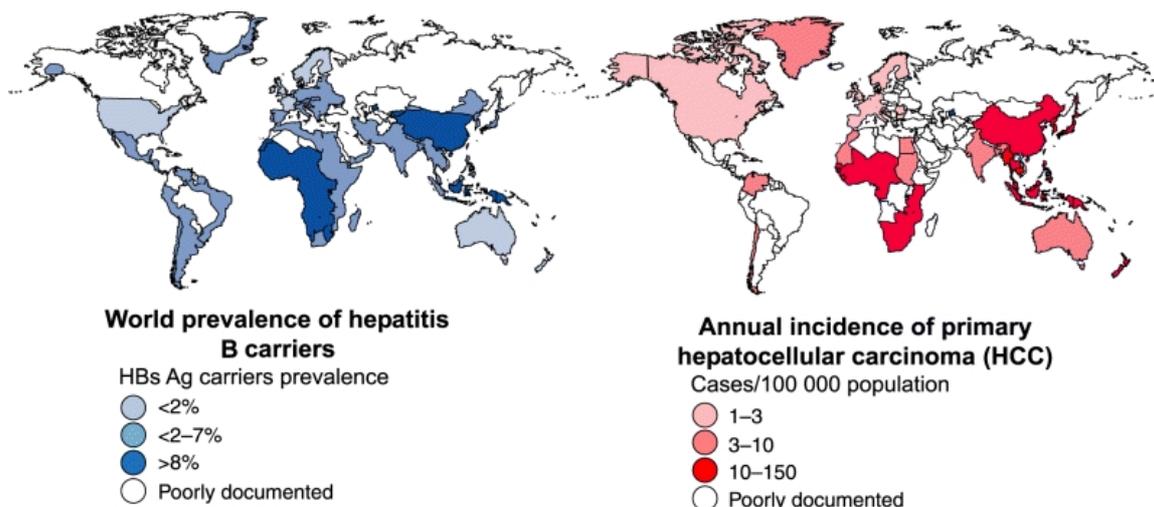


Figure 18 : Répartition géographique du portage chronique du VHB et de l'incidence annuelle du CHC : ces deux cartes sont quasiment superposables. Tiré de Lavanchy 2004.

(2) La protéine HBx est une protéine transactivatrice qui peut activer, au moins *in vitro*, des oncogènes (*c-myc* ou *c-jun*), des facteurs de transcription (NF κ B, AP-1, ATF/CREB), des gènes liés à la prolifération cellulaire (*IL-8*, *TNF*, *TGF- β 1*, *EGFR*), ou des kinases activées par des signaux extracellulaires (ERKs) ou par le stress (SAPK/JNKs). Elle peut également activer la voie Ras, les voies de signalisation JAK/STAT, p21 (indépendamment de p53), Wnt (ce qui permet la stabilisation de la β -caténine), VEGF (ce qui permet une activation de l'angiogenèse), et inhiber le phénomène de réparation de l'ADN (Pang *et al.* 2006 et Bouchard et Schneider 2004). HBx agit aussi par l'intermédiaire d'interactions protéine-protéine, notamment avec le domaine C-Terminal de p53, ce qui a pour effet d'inhiber certaines des activités de p53 (cf. paragraphe III.B.2.c). La fonction de la protéine X a

beaucoup été étudiée dans des modèles cellulaires mimant la réplication virale mais non infectables par le VHB. Il existe des modèles de souris exprimant le VHB avec une protéine X fonctionnelle ou non, et un modèle récent dans lequel un plasmide imitant l'infection virale est injecté à des souris. Les études sur les souris ont permis de confirmer l'effet de la protéine X sur l'activation de la réplication virale et son rôle de facteur de transcription (Xu *et al.* 2002, Keasler *et al.* 2007).

Il semblerait que l'intégration du génome viral ait lieu plutôt lors de la phase aiguë de l'infection, et qu'ensuite l'activité oncogénique des gènes de l'hôte et du virus éventuellement modifiés par l'intégration confère peu à peu un avantage sélectif à la cellule, durant la phase d'infection chronique (Murakami *et al.* 2005).

Les interactions entre l'hôte et le virus contribuent au développement du CHC. En effet, l'hôte développe une réponse immunitaire dépendante des lymphocytes T afin d'éliminer les cellules infectées par le virus. Cette réponse induit des cycles de nécrose, d'inflammation et de régénération des hépatocytes, ce qui favorise la propagation de lésions et l'érosion des télomères (et donc l'instabilité génomique). Le virus est également capable d'interagir avec le réticulum endoplasmique des hépatocytes, ce qui peut induire un stress oxydatif, la génération de radicaux libres et l'activation des cellules stellaires (Block *et al.* 2003). Le stress oxydatif active notamment les MAPKinases (Mitogen Activating Protein Kinases) qui régulent de nombreux gènes impliqués dans la croissance et la différenciation ainsi que l'apoptose. Les cellules stellaires sont des cellules du foie qui stockent la vitamine A et sont dans un état quiescent. Elles sont activées lors d'un stress oxydatif par des cytokines, et produisent de façon anormale des composants de la matrice extracellulaire comme le collagène, favorisant ainsi l'apparition d'une fibrose.

C.3. Virus de l'hépatite C

C.3.a. Données épidémiologiques

Le virus de l'hépatite C (VHC) a été découvert en 1989 par Choo *et al.* dans le plasma d'un patient atteint d'une hépatite et non infecté par les virus hépatiques connus. Ce virus est un membre de la famille des Flaviviridae, c'est un virus à ARN

enveloppé, et c'est le seul membre du genre *Hepacivirus*. Les virions ont un diamètre d'environ 55-65 nm et sont constitués d'une enveloppe entourant la capsid contenant l'ARN viral (cf.figure 19). Il a été évalué comme cancérogène du groupe 1 par le CIRC en 1994 (IARC, Monographies volume 59).

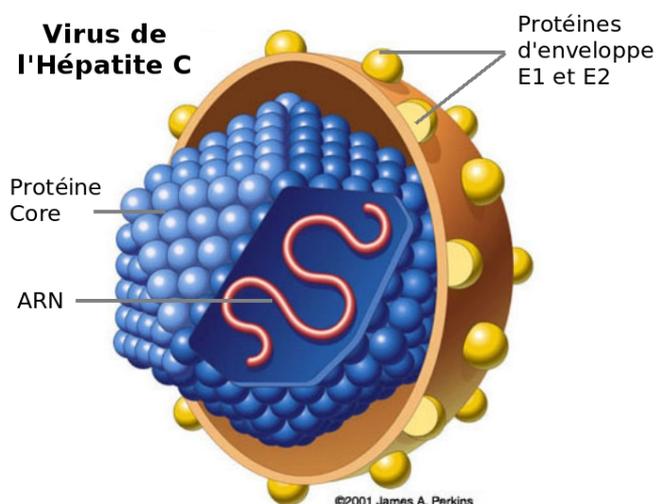


Figure 19 : Représentation "écorchée" d'un virion de l'hépatite C.

Région OMS	Population totale (millions)	Prévalence du VHC (%)	Population infectée (millions)	Nombre de pays dont les données sont manquantes
Afrique	602	5,3	31,9	12
Amériques	785	1,7	13,1	7
Méditerranée Orientale	466	4,6	21,3	7
Europe	858	1,03	8,9	19
Asie du Sud-Est	1500	2,15	32,3	3
Pacifique Ouest	1600	3,9	62,2	11
Total	5811	3,1	169,7	57

Figure 20 : Tableau récapitulatif de la répartition géographique du nombre de personnes infectées par le VHC. Les estimations ont été effectuées par l'OMS. (Tiré de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/index.html>)

En 2000, l'OMS estimait qu'environ 170 millions de personnes étaient des porteurs chroniques du VHC, et que 3 à 4 millions de personnes étaient nouvellement infectées chaque année (cf. figures 20 et 21).

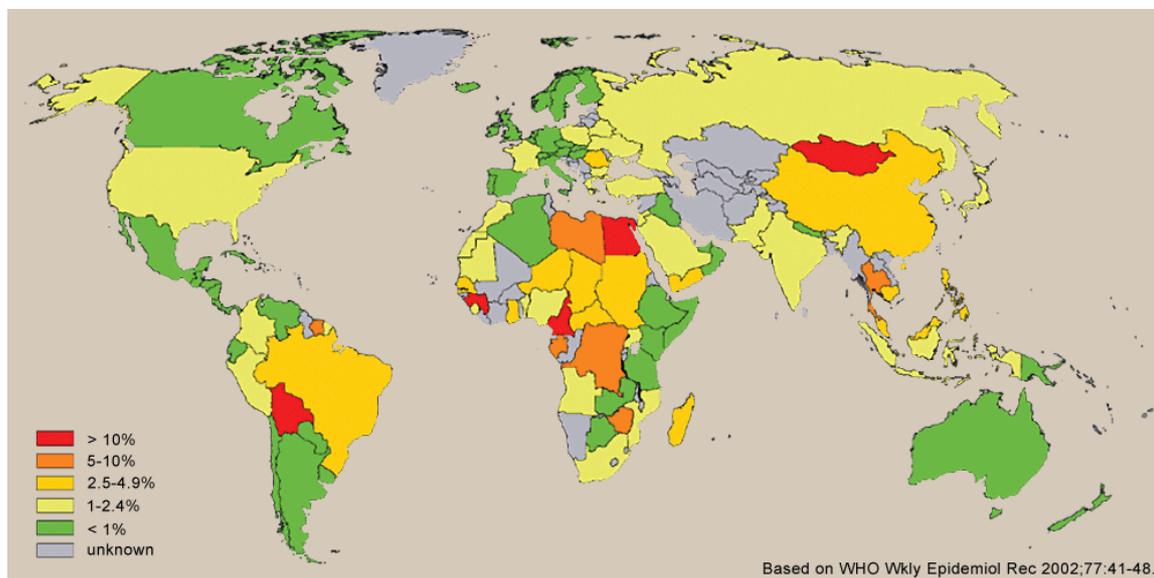


Figure 21 : Carte du monde de la répartition géographique du taux de personnes infectées par le VHC. Données de l'OMS.

C.3.b. Modes de transmission

Le VHC est transmis par contact direct avec du sang humain. Les conditions de transmission les plus courantes sont : les transfusions de sang dans lequel la présence du VHC n'a pas été cherchée, la réutilisation de matériel médical (seringues et aiguilles mal stérilisées par exemple), le partage de seringue chez les consommateurs de drogue, certaines pratiques comme le piercing, la circoncision, le tatouage. La transmission peut également se faire par voie sexuelle ou périnatale, mais de façon beaucoup plus rare.

C.3.c. Données moléculaires

Le génome du VHC consiste en une molécule d'ARN d'environ 9,6 kilobases qui contient un cadre ouvert de lecture très long, entouré de deux régions non transcrites en 5' et en 3' (cf. figure 22). Les protéines virales sont traduites en une polyprotéine à partir d'un site d'initiation de la traduction situé dans la région non

transcrite en 5'. Les différentes protéines sont ensuite clivées à la fois par autocatalyse et par des enzymes de la cellule hôte (cf. figures 22 et 23, Tellinghuisen et Rice 2002, et Levrero 2006).

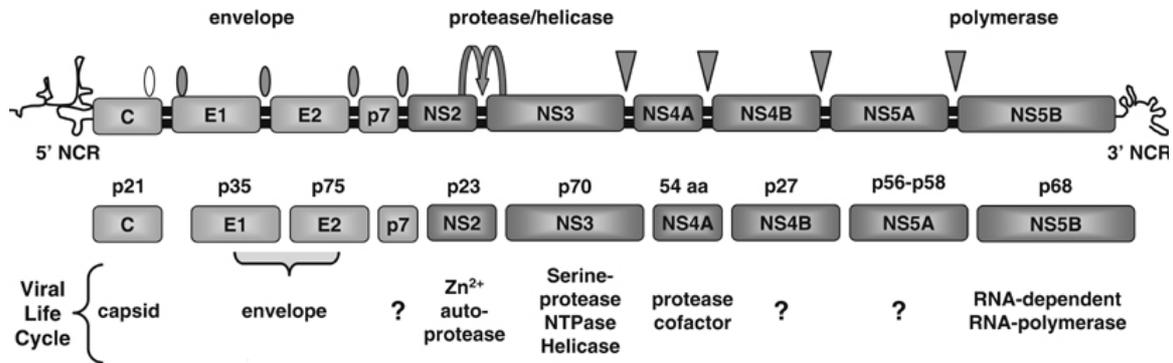


Figure 22 : Organisation du génome du VHC et les différentes protéines synthétisées à partir de la polyprotéine. Tiré de Levrero 2006.

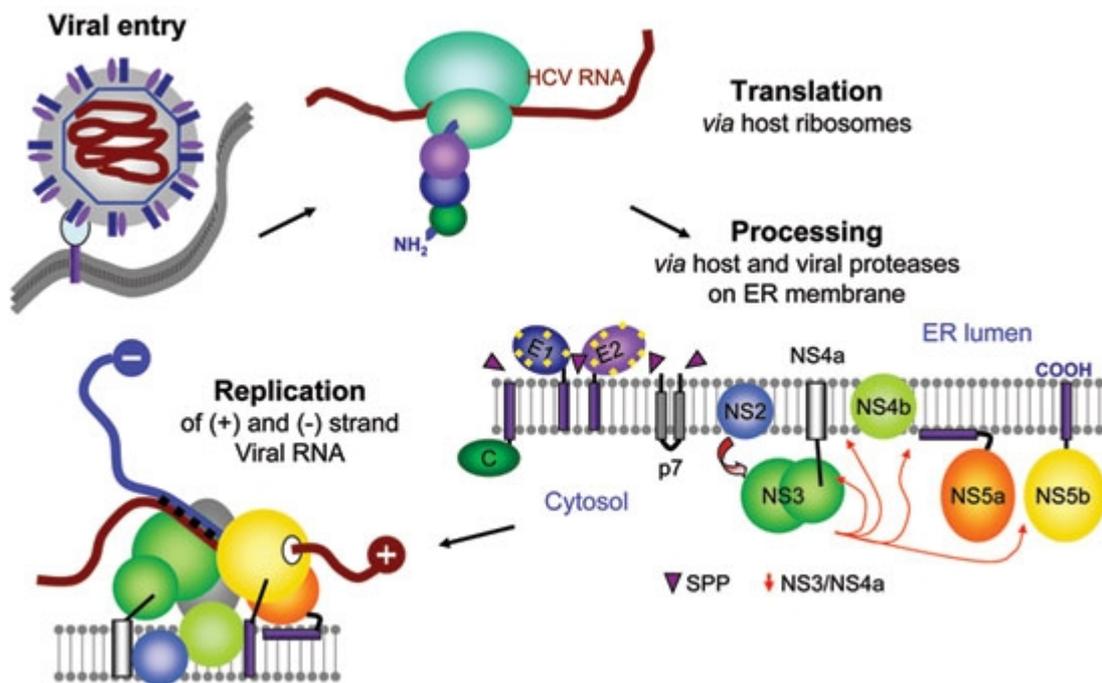


Figure 23 : Cycle de réplication du VHC. Tiré de Levrero 2006.

Les protéines structurales (cf. figure 23) sont la protéine core (C), et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. Ces protéines sont clivées de la polyprotéine par

les peptidases signal du réticulum endoplasmique. Après maturation dans le réticulum, elles sont assemblées pour former des virions.

Les protéines non structurales (cf. figures 22 et 23) sont :

- le polypeptide p7 dont la fonction n'est pas connue et qui se trouve dans le polypeptide à la jonction entre protéines structurales et non structurales. Les protéines suivantes forment le complexe de la réplicase virale.
- l'autoprotéase constituée par les protéines NS2 et 3, qui autocatalyse le clivage entre NS2 et NS3;
- une fois séparée de NS2, NS3 a une activité de protéase spécifique aux sérines et d'hélicase à ARN dans sa région C-terminale;
- le polypeptide NS4 agit comme un co-facteur de NS3;
- les protéines NS4B et NS5A sont des protéines hydrophiles associées à la membrane;
- la polymérase à ARN ARN-dépendante NS5B.

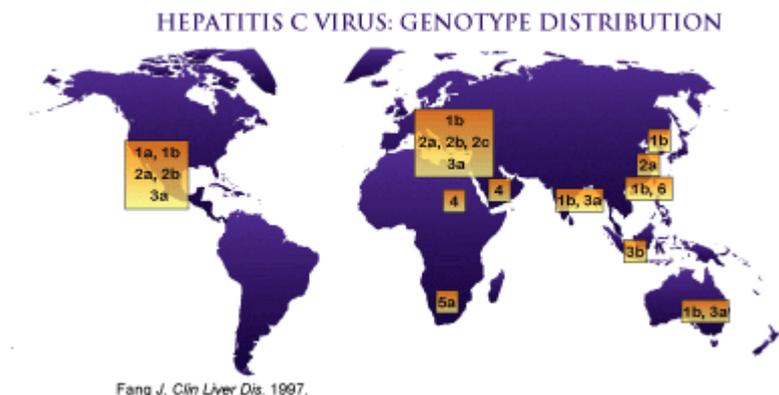


Figure 24 : Répartition géographique de différents génotypes du VHC. Tiré de Fang *et al.* 1997.

Le génome du VHC présente une très forte variabilité (que l'on retrouve de façon générale chez les virus à ARN) d'environ 10^{-3} substitutions/base/année, ce qui explique sa capacité à induire des infections chroniques en échappant au système immunitaire. Le VHC est classé en 6 génotypes (1 à 6) dont les séquences peuvent varier entre elles jusqu'à 30%, et en plus de 100 sous-types, répartis inégalement dans le monde (cf. figure 24).

C.3.d. *Infection et pathologie*

Les virions du VHC sont capables de se lier à des lipoprotéines de très faible ou faible densité, et les récepteurs de ces lipoprotéines pourraient servir de voie d'entrée du virus dans la cellule hôte (Monazahian *et al.* 1999). L'association entre stéatose/obésité et portage chronique du VHC dans les cas de CHC est un autre argument en faveur d'un rôle des récepteurs à lipoprotéine dans l'infection par le VHC.

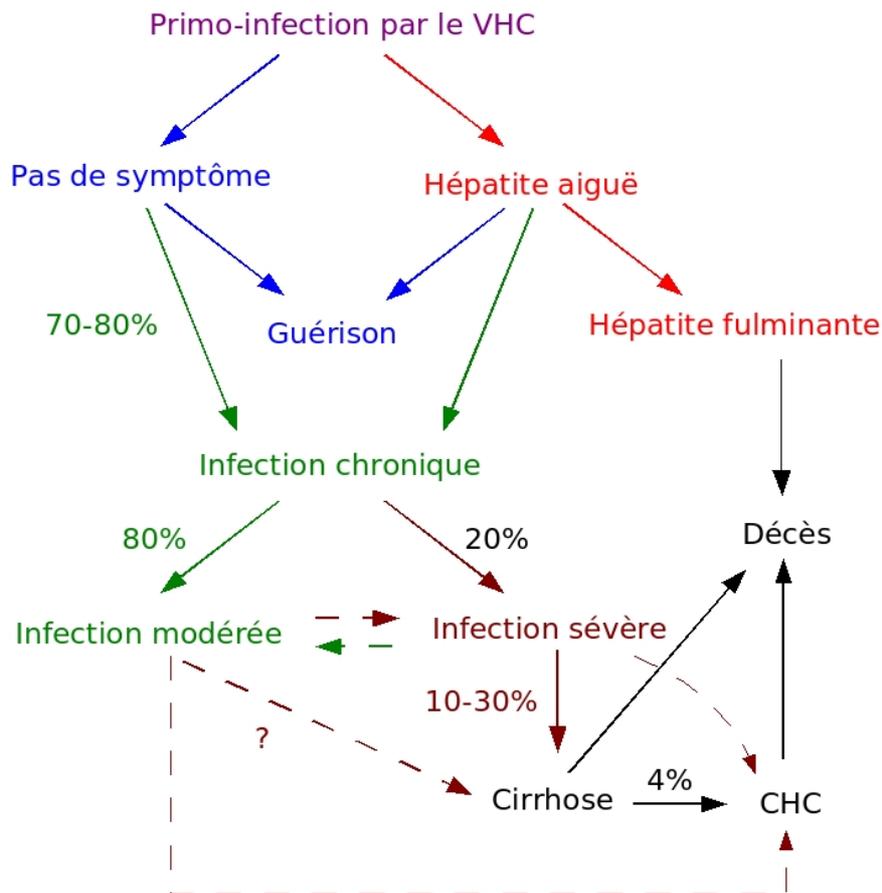


Figure 25 : Évolution pathologique après une primo-infection par le VHC. Les pourcentages représentent le pourcentage total de patients qui évoluent vers l'état suivant.

Suite à une infection par le VHC, les symptômes apparaissent après une période d'incubation allant de 15 à 150 jours. Lors d'une infection aiguë, les symptômes sont en général de la fatigue et une jaunisse. Cependant, la majorité des personnes infectées (60 à 70%) est asymptomatique. Environ 80% des personnes

infectées développent des infections chroniques. Une cirrhose apparaît chez 10 à 20% des porteurs chroniques (cf. figure 25).

Les méthodes de détection de l'infection par le VHC sont essentiellement basées sur la détection d'anticorps spécifiques dirigés contre le virus. Lorsque la sérologie est positive, la détection d'ARN viral circulant permet de savoir si le virus est en phase active.

Le VHC infecte essentiellement les hépatocytes, mais il est également retrouvé dans les cellules mononucléées du sang périphérique. L'infection de ces cellules pourrait constituer un réservoir de virus permettant la sélection de variants et la persistance du virus. C'est aussi un réservoir d'ARN lors d'infections occultes (Carreño 2006).

C.3.e. Mécanismes moléculaires de l'hépatocarcinogénèse par le VHC

De manière générale, le virus induit une inflammation du foie et un stress oxydatif qui induit des dommages à l'ADN, ce qui facilite l'accumulation de mutations et d'altérations épigénétiques, comme dans le cas d'une infection chronique par le VHB. Contrairement à ce dernier, le VHC est un virus à ARN qui ne s'intègre pas au génome de la cellule hôte. L'action du virus sur l'hépatocarcinogénèse se fait donc essentiellement par l'intermédiaire de ses protéines et notamment les protéines core, NS3 et NS5A (revues de Farazi et DePinho 2006, Levrero 2006, Pang *et al.* 2006, Giannini et Bréchet 2003, Tellinghuisen et Rice 2002). De très nombreuses interactions ont été montrées *in vitro*, nous ne résumerons que quelques interactions susceptibles d'intervenir dans la transformation cellulaire des hépatocytes infectés.

La protéine core serait capable d'interagir avec les protéines suppresseurs de tumeur p53, p73 (une protéine de la famille de p53 qui aurait un rôle dans l'apoptose suite à un stress) et pRb. Elle serait également capable de moduler l'expression de p21, une cible de p53 qui intervient dans la régulation du cycle cellulaire, et de différents gènes impliqués dans l'apoptose. La protéine core pourrait également réguler la transcription de gènes en activant les MAPKinases, pourrait interagir avec NF- κ B, activer la voie Wnt, et inhiber le TGF- β .

La protéine NS3 pourrait agir par l'intermédiaire de p53 et p21, inhiber la PKA (Protéine Kinase A), ainsi que l'effet de la PKC (Protéine Kinase C) par compétition avec ses substrats.

La protéine NS5 inhiberait la PKR (Protéine Kinase R) et modifierait les imports-exports nucléaires. Elle pourrait également inhiber l'action de p53 en l'empêchant de se lier à l'ADN et en séquestrant ses co-facteurs. NS5A serait capable d'activer la voie de survie Akt et l'accumulation de la β -caténine.

La présence du VHC induirait la réduction de l'expression du gène *hPMS2* impliqué dans la réparation des mésappariements de l'ADN (système MMR), ce qui permet l'accumulation de mutations dans les hépatocytes. Les protéines NS5A et Core seraient capables d'inhiber la réponse immunitaire par l'intermédiaire du TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et de l'IFN α (Interféron α). Le virus interagit également avec le réticulum endoplasmique et induit un stress oxydatif comme le VHB.

Cependant, la plupart des études menées sur les interactions et les effets des différentes protéines virales sur les protéines de la cellule hôte a été effectuée sur des modèles peu représentatifs des conditions *in vivo*, où les protéines virales sont fortement surexprimées. Outre les modèles cellulaires, il existe des modèles de souris génétiquement modifiées chez lesquelles une ou plusieurs des protéines du VHC sont exprimées. Cependant, les effets observés dépendent du promoteur utilisé, et jusqu'à présent, tous les promoteurs utilisés sont constitutifs. Seul le rôle de la protéine Core a été prouvé dans un modèle de souris transgéniques. Les études de la protéine NS5A par exemple ont montré de très nombreuses interactions avec les protéines de l'hôte, mais les souris exprimant constitutivement NS5A ne présentent pas de phénotype particulier. Il pourrait y avoir une adaptation épigénétique chez les embryons de souris (Majumder *et al.* 2003). Avec les modèles existants, de nombreuses interactions ont donc été montrées, mais d'autres études sont nécessaires pour les valider *in vivo* et comprendre les mécanismes de l'hépatocarcinogénèse due au virus.

C.4. Autres facteurs viraux et co-infections

C.4.a. Co-infection VHB/VHC

Le nombre total de patients infectés à la fois par le VHB et le VHC n'est pas connu mais les voies de transmission étant communes, le portage des deux virus n'est pas négligeable (de 9 à 80% des porteurs du VHB selon les régions). Aux co-infections, c'est-à-dire à l'infection simultanée par les deux virus, s'ajoutent les sur-infections, c'est-à-dire l'infection par un des deux virus chez un patient déjà porteur chronique de l'autre virus (revue de Crockett et Keeffe 2005).

Le VHB et le VHC sont capables d'interférer chacun sur la réplication de l'autre et de s'inhiber mutuellement, mais dans la plupart des cas, le VHC reste le virus dominant et le VHB se réplique peu.

Différentes études menées sur des cas de patients infectés par le VHB et le VHC ont montré que la double infection impliquait un plus fort risque de développer une hépatite sévère, une cirrhose ou un CHC, par rapport à un patient infecté par un seul des deux virus. Pour le CHC, une étude longitudinale a montré que ce risque était de 6,4% par an comparé aux 2% pour l'infection par le VHB seul et 3,7% pour l'infection par le VHC seul (Chiaramonte *et al.* 1999).

C.4.b. Co-infection avec le VIH

Le VIH ou Virus de l'Immunodéficience acquise Humain est transmis par les mêmes voies que les virus hépatiques (transmission sanguine, sexuelle). Parmi les 40 millions de porteurs du VIH, il est donc courant de trouver des co-infections avec le VHB (10% des porteurs du VIH, et au moins autant avec une infection occulte du VHB) ou le VHC (30% des porteurs du VIH).

Différentes études ont montré qu'il n'existait pas d'augmentation significative du risque de développer un CHC due à la co-infection avec le VIH. Cette absence d'effet pourrait être due au fait que les patients atteints du VIH développent rapidement des infections opportunistes et ne vivent pas assez longtemps pour développer un cancer du foie (qui met plusieurs décennies avant de se déclarer). Or, les nouveaux traitements aux anti-viraux permettent aux patients atteints de VIH de survivre plus longtemps, et il semblerait que les co-infections deviennent un problème

de plus en plus important vis-à-vis du CHC (revues de Bruno *et al.* 2006, et Smukler et Ratner 2002).

Les patients infectés par le VIH développent une résistance à l'insuline, ce qui augmente leur risque de développer une maladie du foie. De plus, la protéine virale HIV-1 Tat est connue pour favoriser l'apparition de cancers du foie chez la Souris, et pourrait également être impliquée chez l'Homme.

Les patients co-infectés par le VIH et le VHC, développent une cirrhose ou un CHC plus précocement que les patients infectés par le VHC seulement, et ces maladies sont plus agressives (revues de Bruno *et al.* 2006, et Smukler et Ratner 2002).

C.4.c. Co-infection VHB et VHD

Le Virus de l'Hépatite D (VHD) est un virus satellite du VHB (revue de Hsieh *et al.* 2006). C'est un virus à ARN circulaire qui ne peut se multiplier sans la présence du VHB et qui est transmis par voie sanguine essentiellement. Le nombre de porteurs chroniques du VHD atteint environ 5% des porteurs chroniques du VHB c'est-à-dire entre 10 et 15 millions. La répartition géographique du portage chronique du VHD avec les fréquences les plus élevées n'est pourtant pas identique à celle du VHB, les zones de fortes incidences étant entre autre l'Europe de l'Est, l'Asie de l'Ouest, l'Amérique du Sud. Le VHD présente une forte variabilité génétique et 3 génotypes sont distingués. Ces génotypes semblent être associés au développement de maladies du foie plus ou moins sévères.

La co-infection avec le VHB est associée à des hépatites plus sévères, mais ne semble pas significativement associée avec un risque accru de développer un CHC. La sur-infection, c'est-à-dire l'infection par le VHD d'un porteur chronique du VHB, est capable de réactiver le VHB et d'augmenter les risques de développer des maladies du foie et notamment la cirrhose et le CHC. Cependant, le VHD semble décliner, et la prévention et le traitement contre le VHB (cf. paragraphe II.D.1) seraient suffisantes pour éviter les problèmes liés au VHD.

C.5. Aflatoxine B1

C.5.a. Données épidémiologiques

L'aflatoxine B1 (AFB1) est une mycotoxine produite par différentes variétés d'un champignon *Aspergillus* (et plus particulièrement *Aspergillus flavus*) qui contamine les arachides et le maïs, nourriture de base dans de nombreux pays en voie de développement (cf. figure 26). Ce champignon se développe dans des conditions chaudes et humides, essentiellement en Afrique sub-saharienne et en Asie. Les mauvaises conditions de stockage des récoltes favorisent son développement. *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) produit de l'AFB1 dont la fonction est inconnue. Une fois ingérée, cette toxine s'accumule dans les cellules du foie. Elle peut inhiber la synthèse d'ADN, l'activité ARN polymérase ADN-dépendante, la synthèse d'ARNm et la synthèse protéique (revue de Wang et Groopman 1999). Cependant, le rôle de l'AFB1 dans le développement du CHC passe essentiellement par l'induction de mutations. Les hépatocytes qui accumulent l'AFB1 vont la métaboliser en un composé qui peut être excrété. C'est lors de cette métabolisation qu'un composé pouvant former des adduits sur l'ADN est synthétisé. L'AFB1 a été évaluée comme cancérigène de groupe 1 par le CIRC en 1993 (IARC, Monographies volume 56).



Figure 26 : Photos d'arachides et de maïs infectés par *Aspergillus flavus*.

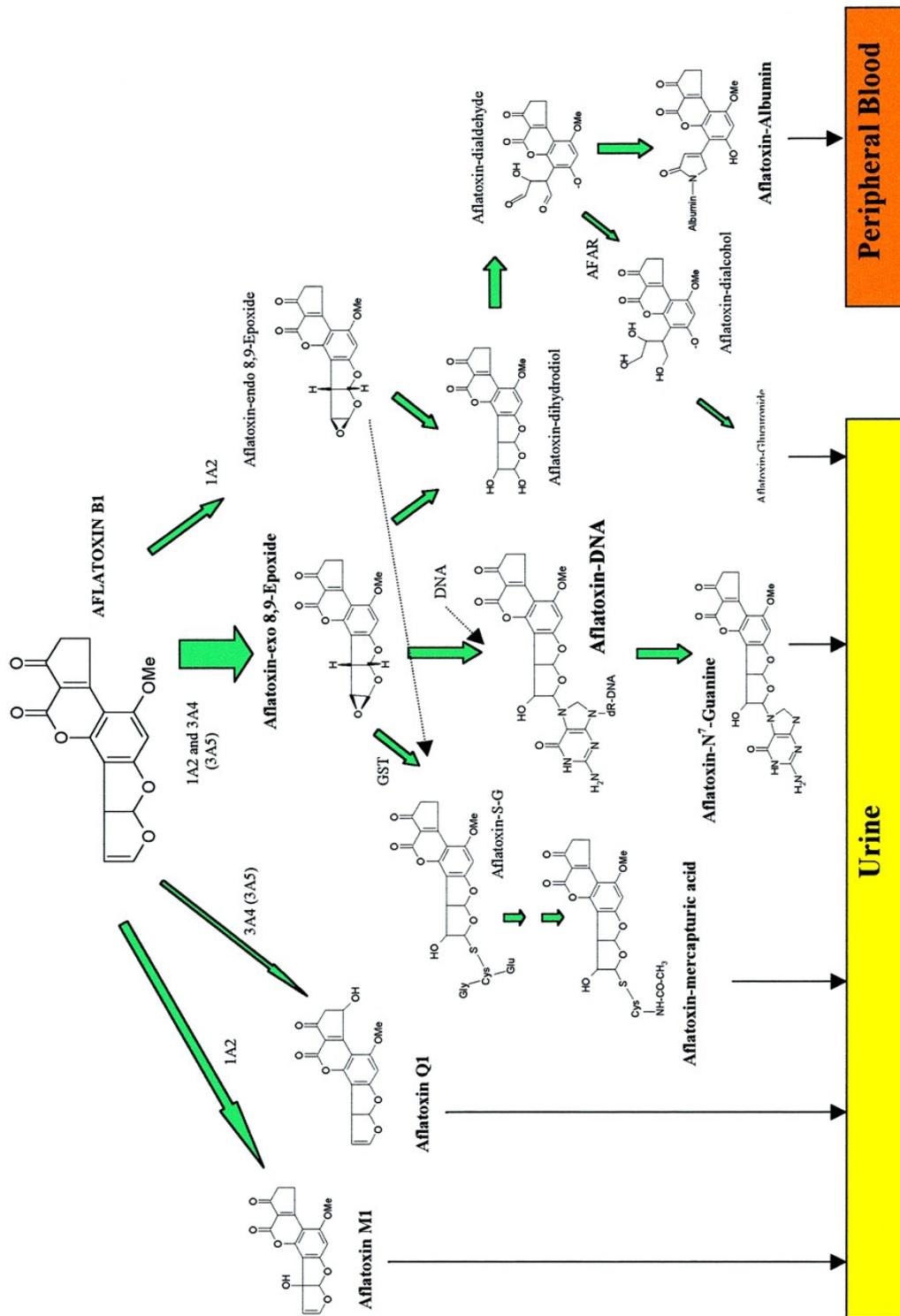


Figure 27 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de métabolisation de l'AFB1. 1A2 : CYP1A2, 3A4 : CYP3A4, 3A5 : CYP3A5, GST : Glutathion S-transférase, AFAR : Aflatoxine aldéhyde réductase, Aflatoxin-S-G : conjugué Aflatoxine-Glutathion. Tiré de Wild et Turner 2002.

C.5.b. Métabolisation de l'aflatoxine B1

L'AFB1 est activée par des cytochromes p450 (CYP450) 1A2 ou 3A4 en AFB1-8,9-*exo*-époxyde et en AFB1-8,9-*endo*-époxyde (cf. figure 27). L'AFB1-8,9-*exo*-époxyde peut se lier à l'ADN et former un adduit 8,9-dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB1 (AFB1-N7-Guanine). L'AFB1 peut également être métabolisée en aflatoxine M1 ou Q1. Ces composés donnent rarement des époxydes et sont donc beaucoup moins mutagènes. Ils sont généralement excrétés et retrouvés dans les urines. Les époxydes sont détoxifiés par différentes voies, essentiellement par la conjugaison des époxydes avec la glutathione par l'intermédiaire de la glutathione transférase (GST). Les époxydes peuvent également être hydrolysés en AFB1-dihydrodiol qui vont donner des dialdéhydes. Ces derniers peuvent réagir avec la lysine et donner des adduits sur des protéines comme l'albumine par exemple. Les dialdéhydes peuvent également être réduits par l'aflatoxine aldéhyde réductase (AFAR) en dialcools qui sont excrétés (Wild et Turner 2002, cf. figure 27).

C.5.c. Mutagenèse par l'aflatoxine B1

Les adduits AFB1-N7-Guanine sont peu stables et évoluent en adduits très stables AFB1-formamidopyrimidine (AFB1-FAPY), ou en sites apuriniques (Bailey *et al.* 1996). Lors de la réplication, si le système de réparation de l'ADN ne parvient pas à rétablir une Guanine à l'emplacement de l'adduit ou du site apurinique, il y a formation d'une mutation qui correspond généralement à une transversion Guanine vers Thymine.

L'AFB1 induit l'expression de la famille des gènes *Ras* et notamment *K-Ras*, ainsi que *c-myc*. Cependant, très peu de mutations ont été reportées sur ces gènes (revue de Smela *et al.* 2001). Par contre, plus de 50% des CHC diagnostiqués dans les régions de forte exposition à l'AFB1 présentent une transversion **AGG** (Arginine) vers **AGT** (Sérine) au codon 249 du gène *TP53* (mutation Ser249). Cette mutation est reconnue comme une "empreinte génétique" de la mutagenèse dépendant de l'AFB1, nous détaillerons ce point plus loin (cf. paragraphe III.B.3, et figure 28). Cependant, la réactivité théorique de la séquence d'ADN avec la troisième base du codon 249 est seulement moyenne et n'explique pas sa forte prévalence (Smela *et al.* 2001).

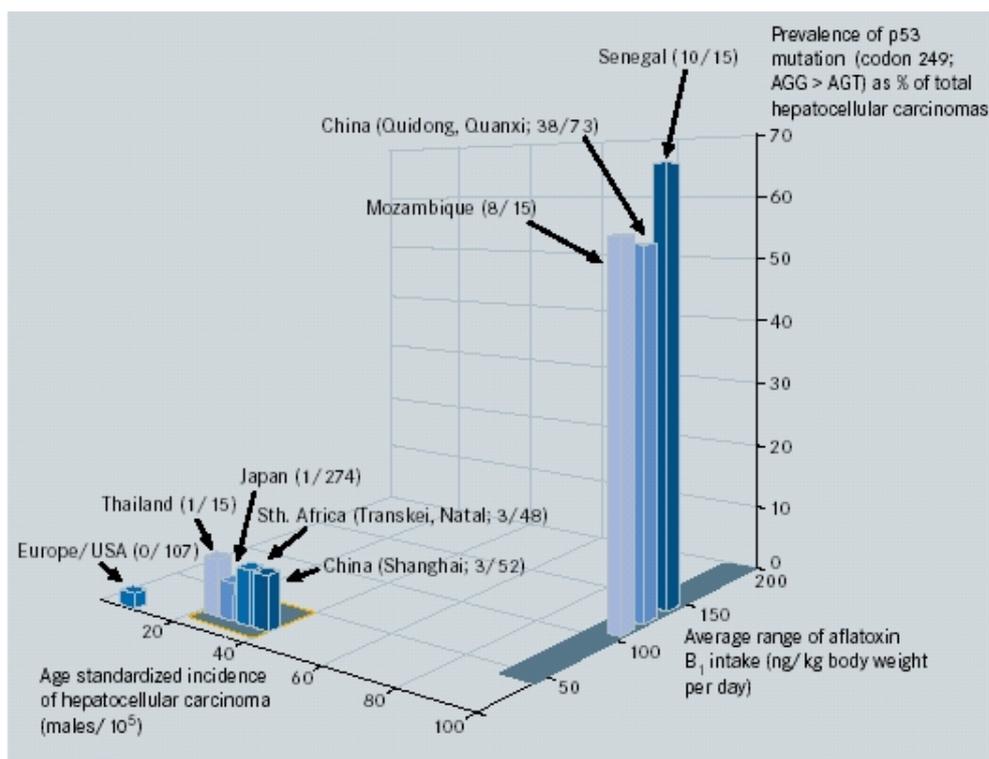


Figure 28 : Prévalence de la mutation Ser249 dans les cas de CHC, en fonction de l'exposition moyenne à l'AFB1 et l'incidence standardisé sur l'âge du CHC. Ce schéma montre clairement la corrélation entre l'exposition à l'AFB1, l'âge d'incidence et la présence de la mutation Ser249. Adapté de Montesano *et al.* 1997.

Smela *et al.* ont montré que les adduits AFB1-FAPY provoquent 6 fois plus de mutations que l'adduit AFB1-N7-Gua chez *Escherichia Coli* dû à la présence d'une polymérase qui permet de passer l'adduit mais en commettant plus d'erreurs (Smela *et al.* 2002). Ce système existe aussi chez l'Homme. En effet, la présence d'adduits change la conformation locale de l'ADN, ce qui entraîne une baisse de la fidélité de réplication par les polymérases (revue de Kunkel 2004).

Des souris normales ou Hupki (dont le domaine de liaison à l'ADN de *TP53* a été remplacé par son homologue humain) ont été exposées à l'AFB1. 19% des souris normales ont développé un CHC contre 44% des souris Hupki. Cependant, aucune mutation dans le domaine de liaison à l'ADN de *TP53* n'a été détectée dans les tumeurs, ce qui montre que le contexte de séquence ne suffit pas à la mutagenèse AFB1-dépendante (Tong *et al.* 2006).

C.5.d. Marqueurs d'exposition

Il existe une corrélation entre la quantité d'AFB1 ingérée et la quantité d'adduits mesurés sur l'albumine sérique, ainsi que la quantité d'AFM1 excrétée (Gan *et al.* 1988). La présence d'adduits sur l'albumine a servi de marqueur d'exposition dans diverses études. L'albumine ayant une demi-vie d'environ 20 jours, la mesure des adduits sur l'albumine permet d'estimer l'exposition à l'AFB1 des semaines précédentes. Wild *et al.* ont montré la présence de fortes quantités d'adduits dans du sérum provenant d'Afrique (jusqu'à 350 pg d'AFB1-lysine/mg d'albumine), des quantités moyennes en Thaïlande et pas d'adduits en Europe. Cette répartition de l'exposition à l'AFB1 correspond à la répartition de l'incidence du CHC. La mesure de ces adduits dans le sérum d'enfants de Gambie a montré que l'exposition est saisonnière et que les enfants sont exposés très tôt à l'AFB1, notamment par l'intermédiaire du cordon ombilical ou du lait maternel (Wild *et al.* 1990 et 1991).

Wild *et al.* ont également montré qu'en Gambie, dans un contexte de forte exposition à l'AFB1 et de forte endémicité du VHB, la quantité d'adduits sur l'albumine est corrélée à la quantité d'AFB1 ingérée, mais pas au statut de portage chronique du VHB (Wild *et al.* 1992). Une étude effectuée sur des échantillons de Chine et de Gambie ont montré que la quantité d'adduits AFB1-N7-Guanine dans l'urine est aussi un bon marqueur de l'exposition à l'AFB1 mais à court terme. Elle n'est également pas corrélée au statut de portage chronique du VHB (Groopman *et al.* 1993).

L'étude de ces marqueurs a permis de montrer que dans le contexte de la Gambie la présence d'adduits sur l'albumine chez les enfants dépend du mois de prélèvement comme chez les adultes. Mais contrairement aux adultes la présence de ces adduits chez les enfants est corrélée au statut de portage chronique du VHB. Ce résultat montre à nouveau que la mesure d'adduits est un bon marqueur de l'exposition saisonnière à l'AFB1, et que l'interaction avec le VHB dépend de l'intensité de l'infection (qui est plus forte chez les enfants en Gambie) et du métabolisme (Turner *et al.* 2000).

C.5.e. Facteurs génétiques

Une fois métabolisée, l'AFB1 forme des adduits sur l'ADN ou sur les protéines. Différents groupes ont donc étudié si des variations génétiques dans les gènes codant les enzymes intervenant dans la métabolisation et la détoxification de l'AFB1, ainsi que dans la réparation de l'ADN, avaient une influence sur la formation d'adduits et la mutagenèse. Les enzymes potentiellement impliquées sont : l'EPHX (Époxide Hydrolase, qui convertit les époxides en 1,2-dihydrodiols), la GST (Glutathione-S-Transférase, qui permet la conjugaison des époxides à la glutathione), le CYP450 (Cytochrome P450), la XRCC1 (X-ray Repair Complementing group, une enzyme intervenant dans la réparation de l'ADN).

McGlynn *et al.* ont montré que la présence d'un allèle EPHX2 et la délétion du gène codant la GSTM1 sont associées à la présence de plus d'adduits AFB1 sur l'albumine ainsi qu'à un risque plus élevé de développer un CHC (McGlynn *et al.* 1995). D'autres groupes ont montré l'association entre le CHC et certains polymorphismes de la *GSTM1*, de l'*EPHX*, et de *XRCC1*. Cette association est d'autant plus significative que les 3 polymorphismes "à risque" sont présents (Long *et al.* 2006, Kirk *et al.* 2005b).

Macé *et al.* ont exprimé différentes formes de CYP450 dans des hépatocytes transformés et ont montré que les formes 1A2 et 3A4 pourraient contribuer à la formation de mutations dues à l'AFB1 (Macé *et al.* 1997). Une étude effectuée en Gambie a montré que l'expression du CYP3A5 est associée à la quantité d'adduits d'AFB1 sur l'albumine, et donc potentiellement au risque de développer un CHC (Wojnowski *et al.* 2004).

C.5.f. Interactions avec le VHB

Les régions où l'exposition à l'AFB1 est forte sont aussi des régions de forte endémicité du VHB. Différentes études ont montré qu'il existe une synergie entre l'AFB1 et le VHB dans le développement du CHC, avec un risque multiplicatif. Différents mécanismes d'interaction ont été avancés (revue de Kew 2003, Sylla *et al.* 1999). Le VHB pourrait induire spécifiquement la métabolisation de l'AFB1 en époxide par les cytochromes. Le virus peut également provoquer l'induction de la nécrose et de la régénération du foie, et donc potentiellement favoriser la

multiplication des hépatocytes contenant des mutations induites par l'AFB1. Les maladies inflammatoires du foie induites par le VHB induisent une augmentation du stress oxydatif qui a été montré comme associé à la formation de la mutation Ser249. La protéine X du VHB pourrait interférer avec la voie de réparation de l'ADN par excision de nucléotide, ce qui favorise la persistance de mutations induites par l'AFB1.

C.6. Alcool

L'alcool contribue largement au développement du CHC en Amérique du Nord et en Europe de l'Ouest, et sa contribution augmente en Asie. Même si une consommation modérée d'alcool semble protéger contre le développement d'un CHC, une forte consommation régulière et prolongée est associée à une élévation du risque de développer un CHC (revue de Morgan *et al.* 2004).

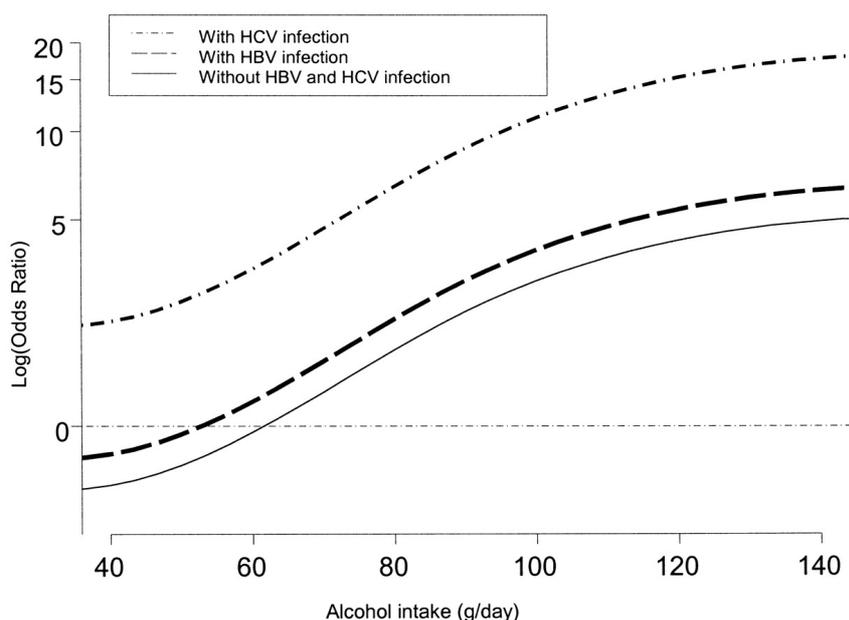


Figure 29 : Évolution des risques relatifs de développer un CHC chez les hommes et les femmes en fonction de la quantité journalière d'alcool ingérée et en fonction des infections virales par le VHB et/ou le VHC. Tiré de Donato *et al.* 2002.

Au delà d'une consommation d'environ 60-80g d'alcool par jour, l'élévation du risque est dose-dépendante. Même après l'arrêt de la consommation, ce risque ne diminue pas avant plusieurs années d'abstinence (au moins 10 ans). En effet, la

plupart des patients alcooliques ont déjà développé une cirrhose au moment de l'arrêt de la consommation, ou bien leur foie se régénère ce qui entraîne un risque accru de développer un CHC. Les boissons alcoolisées ont été classées comme cancérigène de groupe 1 par le CIRC en 1988 (IARC, Monographies volume 44).

La consommation d'alcool peut agir comme co-facteur chez des patients infectés par le VHC ou le VHB, ou ayant développé un diabète (cf. figure 29). Dans le cas d'une infection avec le VHB, non seulement le risque de développer un CHC est plus important chez des consommateurs d'alcool, mais le CHC se développe plus précocément.

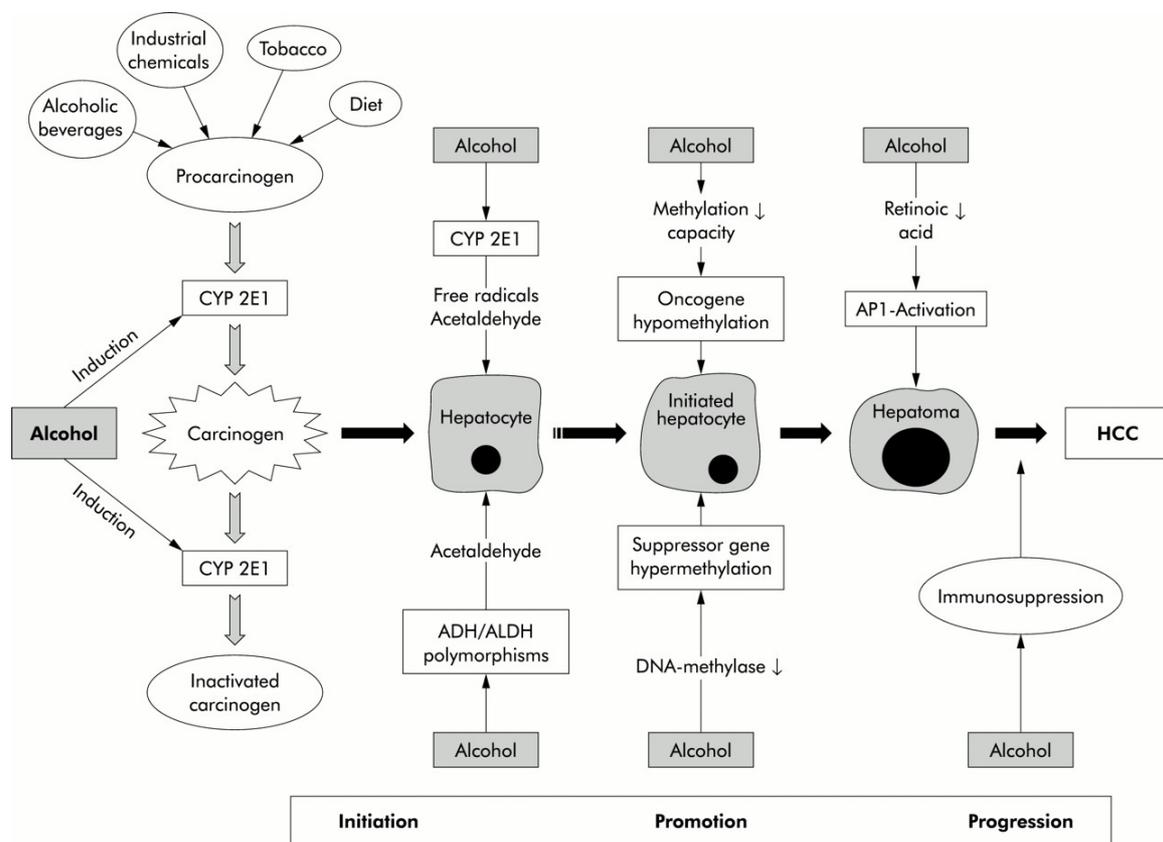


Figure 30 : Mécanismes potentiels d'action de l'alcool sur le développement du CHC. ADH : Alcool Déshydrogénase, ALDH : Aldéhyde Déshydrogénase, CYP 2E1 : CYP450 2E1. Tiré de Stickel *et al.* 2002.

Le mécanisme par lequel l'alcool induit le CHC n'est pas totalement connu, mais il impliquerait un stress oxydatif, des changements dans le métabolisme de l'acide rétinoïque et dans la méthylation de l'ADN, une répression de la surveillance immunitaire, et une susceptibilité génétique (cf. figure 30).

C.7. Obésité et diabète

Obésité et diabète sont reliés puisque l'obésité est le facteur de risque majeur pour le diabète. Ces deux facteurs ont été identifiés comme augmentant le risque de développer un CHC. Le mécanisme précis par lequel l'obésité et le diabète conduisent au développement d'un CHC est encore inconnu, mais il est possible qu'il implique l'inflammation du foie, le stress oxydatif et/ou la peroxydation, qui peuvent entraîner des dommages hépatiques, une fibrose, voire une cirrhose. L'obésité et le diabète sont deux facteurs de risque qui prennent de plus en plus d'importance aux États-Unis, étant donné que de plus en plus d'Américains qui atteignent l'âge critique où le risque de CHC est le plus haut développent aussi du diabète (Regimbeau *et al.* 2004, revue de Yu et Yuan 2004).

C.8. Facteurs hormonaux endogènes et exogènes

Il existe une différence frappante du nombre de cas de CHC entre hommes et femmes, avec un ratio hommes/femmes allant de 2/1 à 7/1, et surtout parmi les porteurs chroniques du VHB. Il a été démontré que cette différence pouvait impliquer la voie de signalisation des androgènes. Yeh *et al.* ont montré qu'il existe une association entre l'activité du récepteur aux androgènes et le risque de CHC (Yeh *et al.* 2002). Cette activité est dépendante du nombre de répétitions de trinuécléotides dans le premier exon du gène codant le récepteur. Plus le nombre de répétitions est petit, et plus l'activité du récepteur est grande. Lors de la tumorigenèse hépatique, la longueur des répétitions pourrait changer dans le tissu tumoral et donc aussi l'activité du récepteur. Dans les cas de CHC, il existe également une association entre une forte activité du récepteur aux androgènes et la présence du VHB. Chiu *et al.* ont montré que cette association pourrait être due à une activation du récepteur aux androgènes par la protéine X du VHB (HBx) (Chiu *et al.* 2007). Une fois activé par des androgènes, le récepteur serait modifié par HBx par l'intermédiaire de la voie c-Src, ce qui altère son activité transcriptionnelle. Le mécanisme par lequel l'activité de ce récepteur agit sur la tumorigenèse reste encore non élucidé.

Les œstrogènes et les progestogènes, dont ceux contenus dans les contraceptifs oraux, sont à la fois des inducteurs et des promoteurs du CHC chez les animaux (revues de Yu et Yuan 2004 et De Maria *et al.* 2002). Des études cas/contrôle ont également montré que l'utilisation de contraceptifs oraux augmente le risque de développer un CHC, et ce risque est d'autant plus important que l'utilisation des contraceptifs se fait sur une période longue. Ce résultat a été obtenu chez des populations à faible risque (femmes caucasiennes de l'Amérique du Nord et de l'Europe de l'Ouest), mais pas chez des populations à haut risque (femmes d'Asies et d'Afrique). Les contraceptifs oraux induisent également la formation d'hyperplasies nodulaires et d'adénomes hépatiques à partir desquels un CHC pourrait se développer plus facilement.

C.9. Autres facteurs

C.9.a. Tabagisme

De nombreux composés des cigarettes sont des cancérigènes hépatiques chez les animaux. Cependant, la forte corrélation entre consommation de cigarettes et d'alcool rend l'association tabagisme/CHC difficile à démontrer. Quelques études ont montré que parmi les patients atteints d'hépatite virale, les gros fumeurs ont plus de risque de développer un CHC que les non-fumeurs, et que les gros fumeurs en général présentent plus de dommages au niveau du foie et répondent moins bien aux thérapies par interféron (revue de Yu et Yuan 2004 et El-Zayadi 2006).

L'effet du tabagisme sur le foie pourrait être de différents ordres. Tout d'abord, la fumée de cigarette contient de nombreux cancérigènes potentiels, dont des hydrocarbures, de la nitrosamine, des goudrons, du vinyl chloride, ainsi que du 4-aminobiphenyle, un carcinogène hépatique connu pour induire le CHC. Les gros fumeurs présentent également un excès de fer qui s'accumule dans le foie (cf. paragraphe II.C.9.b). D'une manière plus générale, le tabagisme altère la réponse immunitaire du fumeur et augmente le stress oxydatif qui induit une inflammation et des dommages au niveau du foie (revue d'El-Zayadi 2006).

C.9.b. Facteurs génétiques

L'hémochromatose est une maladie génétique qui provoque une surcharge en fer. Elle est associée à un risque jusqu'à 200 fois supérieur à la normale de développer un CHC. Environ 10% des patients atteints d'hémochromatose développent un CHC en passant pour la plupart au préalable par une cirrhose. D'autres causes de surcharges en fer sont également associées au développement d'un CHC, comme la β -thalassémie, et certaines habitudes alimentaires observées en Afrique du Sud (consommation d'une bière artisanale brassée dans des tambours en acier non galvanisé : cette bière est pauvre en alcool et riche en fer). La surcharge en fer peut avoir un effet sur la prolifération cellulaire, provoquer des dommages à l'ADN, induire la formation de composés oxygénés actifs dans le foie, la peroxydation des lipides et inhiber la surveillance immunitaire (revue de Kowdley 2004).

La maladie de Wilson résulte d'une maladie génétique qui induit une surcharge en cuivre notamment dans le foie. Contrairement à l'hémochromatose, la relation avec le développement d'un CHC n'est pas claire, la présence de cuivre dans les hépatocytes étant potentiellement protectrice contre le développement de lésions néoplasiques (Walshe *et al.* 2003).

La déficience en α 1AT (alpha-1-AntiTrypsine) est la cause génétique la plus importante de maladie du foie chez les enfants. C'est également un facteur de risque de développement du CHC. Cette déficience est associée à l'homozygotie pour l'allèle α 1ATZ. L' α 1AT est une glycoprotéine de la super famille des inhibiteurs de protéases spécifiques à la sérine, et qui est sécrétée par les cellules du foie lors d'une inflammation. La protéine mutée ne peut pas être sécrétée et s'accumule dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes, ce qui entraîne la formation de globules dans le foie. Ces globules deviennent toxiques par un mécanisme qui pourrait passer par une réponse autophagique des hépatocytes, un accroissement des dommages aux mitochondries, une activation de caspases et de NF κ B (revue de Rudnick et Perlmutter 2005).

La porphyrie est une maladie due à une déficience dans les enzymes de la voie de synthèse du hème. Cette maladie augmente fortement le risque de développer un CHC (Linnet *et al.* 1999).

C.9.c. Bilharziose

L'infection par des schistosomes (des trématodes) est un facteur de risque de CHC dans des régions tropicales d'Afrique, d'Amérique du Sud, d'Asie et aux Caraïbes. Ces parasites provoquent une bilharziose qui atteint entre autre le foie (revue de McGlynn et London 2005).

C.9.d. Arsenic

Certaines régions de Taïwan ou du Japon ont une eau potable contaminée par de l'arsenic inorganique, et les résidents exposés ont un risque accru de développer différents cancers dont le CHC. L'action cancérigène de l'arsenic inorganique pourrait passer par l'induction d'un stress oxydatif (revue de Yu et Yuan 2004).

C.9.e. Thorotraste

Le thorotraste est un milieu de contraste utilisé pour des scanners aux rayons X. Ce produit augmente le risque de développer des cancers du foie essentiellement autres que le CHC. Cependant, la tendance montre que le thorotraste tend à induire de plus en plus de CHC (revue de McGlynn et London 2005).

D. Prévention du carcinome hépatocellulaire

Les facteurs de risque majeurs du CHC sont soit d'origine virale, soit d'origine comportementale. Ils sont donc théoriquement évitables. Pour les risques d'origine virale, il suffit d'éviter l'infection par l'intermédiaire d'une vaccination lorsqu'elle est disponible, ou d'éviter sa transmission par la prévention des comportements à risque. Chez les personnes déjà infectées, des traitements anti-viraux peuvent éviter les lésions hépatiques et donc le développement du CHC. Pour les risques d'origine

comportementale, des campagnes de prévention adaptées peuvent permettre de diminuer les risques de développer un CHC, et notamment en ce qui concerne la contamination de la nourriture par l'AFB1.

D.1. Prévention des risques dus au VHB

D.1.a. Campagnes de vaccination

Un vaccin contre le VHB a été développé dans les années 1980. Différentes études à grande échelle ont été mises en place afin de déterminer l'efficacité du vaccin contre le portage chronique du VHB et contre le développement du CHC, notamment dans des pays en voie de développement où le VHB est un problème majeur de santé publique : (1) en Chine, (2) à Taïwan, et (3) en Gambie. Ce vaccin a été développé à partir d'un virus de génotype D qui ne correspond pas au génotype présent dans les régions de fort portage chronique. Pourtant les campagnes de vaccination menées dans ces régions ont montré son efficacité.

(1) Après une étude pilote menée sur 80 000 nouveaux-nés dans la province de Qidong, une vaccination basée sur un dérivé de plasma (puis remplacé en 1993 par un vaccin d'ADN recombinant) a été introduite dans les villes puis les campagnes, c'est-à-dire sur environ 20 millions de nouveaux-nés chaque année. Malgré leur faible prix, les 3 doses du vaccin étaient facturées à la famille, la couverture passait donc de 96,9% en ville à 50,8% en zone rurale, entre 1993 et 1994. Chez les enfants de 5-6 ans et 10-11 ans, la vaccination avait une protection de 75% contre le portage chronique du VHB et contre les décès par maladie hépatique. Depuis 2002, la vaccination est intégrée dans un programme national, pris en charge par le gouvernement (Sun *et al.* 2002).

(2) Un programme de vaccination a été initialisé à Taïwan en 1984. Des nouveaux-nés dont la mère était porteuse de l'antigène HBeAg (et donc fortement infectieuse) ont reçus 3 ou 4 injections d'immunoglobuline du VHB. Même si la protection contre le portage chronique du VHB n'était que de 70-85%, cette étude a montré une diminution significative de l'incidence du CHC chez les enfants (Chang *et al.* 1997 et Chang *et al.* 2000).

(3) Une étude d'intervention a été initiée en Gambie en 1986 (GHIS : Gambian Hepatitis Intervention Study). Un vaccin dérivé de plasma a été introduit progressivement à la vaccination de routine dans différentes zones du pays entre 1986 et 1990. La protection contre l'infection par le virus est de 80% et contre le portage chronique de 90% (Montesano 2002). Le succès de la vaccination tient au fait que dans le contexte africain, la transmission du VHB se fait essentiellement entre enfants et non directement de la mère à l'enfant comme en Asie. En parallèle de l'introduction de la vaccination, un registre national du cancer a été mis en place avec une couverture nationale (Bah *et al.* 2001). L'influence de la vaccination sur l'incidence du cancer sera connue d'ici une dizaine d'années.

Ces 3 études ont montré la faisabilité et l'efficacité d'un programme de vaccination en masse contre le VHB dans des pays en voie de développement.

D.1.b. Traitements anti-viraux

Il existe une corrélation entre la quantité de virions du VHB circulants ou d'ADN viral, et le développement de cirrhoses et de CHC (Iloeje *et al.* 2006 et Chen *et al.* 2006). Le traitement antiviral classique contre le VHB était jusque peu le traitement à la lamivudine, un analogue de nucléoside. Ce traitement est efficace pour réduire la quantité de VHB circulant de plusieurs ordres de grandeur, mais des virus résistants apparaissent. En effet, ces virus développent des mutations dans le domaine YMDD (Tyrosine-Méthionine-Aspartate-Aspartate) de la polymérase virale. Ces mutations sont connues pour diminuer l'efficacité de la polymérase, mais elles permettent aux virus de devenir résistants à la lamivudine.

D'autres analogues de nucléotides ou nucléosides ont été développés et ont montré leur efficacité à la fois chez des patients non traités auparavant et chez des patients ayant développé une résistance à la lamivudine. La plupart d'entre eux n'ont pas montré d'apparition de virus résistants. Parmi les plus connus, il y a l'adéfovir, le ténofovir, ou l'entécavir (Yang *et al.* 2005).

D.1.c. Prévention de la transmission

Afin d'éviter la transmission du VHB, des campagnes de prévention peuvent être mises en place pour éviter certains comportements à risques. Cette prévention consiste à : tester le sang et les organes des donneurs, inactiver le virus dans les produits dérivés de plasma, contrôler les bonnes pratiques médicales dont la stérilisation correcte du matériel, mener des campagnes de sensibilisation et d'aide parmi les populations à risque afin d'éviter les injections à risque, et éviter les comportements sexuels à risque et non protégés.

La transmission verticale de mère à enfant peut être réduite en traitant la mère avec des anti-viraux, si possible avant la grossesse, ce qui réduirait l'incidence du VHB, en Asie notamment. En Afrique, la transmission est essentiellement horizontale, entre enfants. Cependant, le mode exact de transmission n'est pas connu. Des études ont émis l'hypothèse d'une transmission par des punaises. Cependant, l'utilisation d'insecticide dans les pièces où vivent les enfants n'a pas montré d'effet sur la transmission du virus (Silverman *et al.* 2001 et Mayans *et al.* 1994).

D.2. Prévention des risques dus au VHC

D.2.a. Traitements anti-viraux

Il n'existe pas de vaccin contre le VHC. La très forte variabilité génomique du virus rend difficile la mise en place d'un vaccin efficace. Afin de limiter le risque de développer un CHC lors d'une infection chronique par le VHC, le seul recours est le traitement anti-viral. Le traitement de base est l'IFN (Interféron) qui n'est efficace que sur 10 à 20% des patients. La combinaison d'une forme plus efficace d'interféron (PEG-IFN) avec la ribavirine permet d'atteindre de 40% à 80% d'efficacité selon les génotypes. Le traitement est estimé efficace lorsque l'ARN du VHC reste indétectable pendant plus de 24 semaines après la fin du traitement (Stribling *et al.* 2006).

Tous les VHC ne sont pas équivalents et la réponse au traitement dépend notamment du génotype du virus. Les génotypes les plus sensibles au traitement sont 2, 3 puis 5, 6, et enfin 4 et 1. Les génotypes 2 et 3 ont une réponse 3 à 6 fois plus importante que celle des autres génotypes (Scott et Gretch 2007). La durée du traitement doit également être adaptée au génotype : 48 semaines pour les génotypes 1

et 4, alors que 24 semaines sont suffisantes pour les génotypes 2 et 3 (Stribling *et al.* 2006).

La réponse au traitement se fait en deux phases. En 2-3 jours, la quantité d'ARN du VHC chute grâce à l'inhibition de la réplication virale. Ensuite, la réduction est beaucoup plus lente et correspond à l'élimination progressive des hépatocytes infectés, par le système immunitaire de l'hôte. Le traitement réduit également le phénomène de cirrhose et de fibrose dans le foie (Poynard *et al.* 2002, Cammà *et al.* 2004).

Le traitement antiviral comporte de nombreux effets secondaires et de nombreuses contre-indications. Cependant, lorsqu'il est efficace, il augmente significativement la survie des patients et réduit les complications. Différents agents sont actuellement en étude pour être utilisés en combinaison avec l'IFN et la ribavirine, et notamment des inhibiteurs de la polymérase virale NS5B ou de la protéase NS3.

D.2.b. Prévention de la transmission

En absence de vaccin contre le VHC, la prévention de la transmission du virus reste le meilleur moyen de lutter contre les infections. Cette prévention consiste à : tester le sang et les organes des donneurs, inactiver le virus dans les produits dérivés de plasma, contrôler les bonnes pratiques médicales dont la stérilisation correcte du matériel, mener des campagnes de sensibilisation et d'aide parmi les populations à risque afin d'éviter les injections à risque par exemple.

D.3. Prévention des risques dus à l'AFB1

Il existe de nombreux moyens de réduire l'exposition à l'AFB1 (revue de Wild et Hall 2000). Cependant, les pays les plus touchés sont en voie de développement et n'ont pas les moyens de payer pour cette prévention. Il faut donc mettre en place des moyens simples, efficaces et peu chers.

D.3.a. Prévention avant récolte

La contamination des cultures par l'*Aspergillus* est favorisée par les dommages causés à la plante par certains stress comme la sécheresse, la chaleur, les insectes. Il existe différentes solutions à ces problèmes. L'irrigation peut éviter les dommages dus à la sécheresse et à la chaleur. Cependant, l'eau n'est pas toujours disponible en Afrique. L'utilisation de fongicides ou d'insecticides a été proposée, mais ces produits sont trop coûteux pour des pays en voie de développement, et ils peuvent eux-mêmes être toxiques, ce qui ne fait que déplacer le problème.

L'introduction d'autres espèces ou sous-espèces d'*Aspergillus* ne produisant pas d'aflatoxine semble diminuer la contamination des cultures par un effet compétiteur. Différents tests ont été effectués, avec notamment *A. parasiticus*, *A. niger*, et ont montré une réduction de la contamination d'au moins 70% (Krishnamurthy et Shashikala 2006, Dorner *et al.* 1999).

Il existe des variétés de céréales ou d'oléagineux résistants à l'AFB1. Ces variétés pourraient être cultivées à la place des variétés non-résistantes. De nombreuses autres plantes produisent des anti-fongiques naturels. La culture de ces plantes pourrait permettre la fabrication d'huile ou de poudre à répandre sur les cultures sensibles afin de prévenir le développement d'*A. flavus* (Krishnamurthy et Shashikala 2006).

Les biotechnologies pourraient également permettre de créer des plantes résistantes à l'*A. flavus*, notamment en identifiant des gènes responsables de la résistance et en les clonant dans les plantes de culture traditionnelle. Cet effort devra être financé par des pays développés qui n'ont pas ces problèmes de contamination à l'AFB1 et donc qui ne sont pas particulièrement intéressés par ces plantes modifiées.

D.3.b. Prévention après récolte

Une fois la récolte infectée par *A. flavus*, l'AFB1 s'accumule durant la période de stockage, particulièrement dans des conditions de chaleur et d'humidité, ainsi qu'à cause des insectes qui favorisent la dissémination des spores et peuvent causer des dommages favorisant de nouvelles infections. Le triage de la récolte, le stockage après séchage sur des palettes permettant l'élévation par rapport au sol et donc la ventilation, l'utilisation de pesticides (peu recommandé pour la consommation), sont

des moyens simples de limiter la production d'AFB1. Une étude d'intervention a été menée en Guinée rurale et a montré l'efficacité de ces méthodes simples pour réduire l'exposition à l'AFB1 (Turner *et al.* 2005). Cependant, une fois l'équipe d'intervention partie, il semblerait que les villageois reprennent leurs anciennes méthodes et donc que la réduction de l'exposition soit cantonnée à la période d'intervention.

D.3.c. Changement de régime alimentaire

La contamination par l'AFB1 se fait essentiellement dans le maïs et les arachides. Le changement de régime alimentaire pourrait donc éviter l'exposition. Une étude menée en Chine a montré que le changement de régime alimentaire vers la consommation de riz entraînait une réduction conséquente de l'exposition à l'AFB1 (revue de Yu 1995). Cependant, cette culture est un peu plus coûteuse, il paraît donc difficile de changer l'alimentation dans de nombreux pays en voie de développement.

D.3.d. Chimio-prévention

Une fois les personnes exposées à l'AFB1, il est encore possible de limiter l'effet cancérogène de ce composé en limitant sa métabolisation. Il existe deux types de composés ayant cet effet : (1) des composés qui modulent l'activité des enzymes métaboliques, et (2) des "absorbants" qui empêchent l'AFB1 de s'accumuler dans les cellules du foie.

(1) L'Oltipraz (4-méthyl-5-[2-pyrazinyl]-3H-1,2-dithiole-3-thione) est un puissant inducteur des enzymes de détoxification. Il peut également inhiber certaines isoformes du CYP450 (cf. figure 31). Différentes études ont montré son efficacité à court terme chez l'Homme. Cependant, il n'a pas été démontré d'efficacité à long terme sur la modulation des enzymes du métabolisme et si cet effet peut réduire le risque de développer un CHC. De plus, cette drogue coûte cher et il semble improbable qu'elle soit utilisée à grande échelle. Des dithioléthiones de nouvelle génération 10 fois plus efficaces que l'Oltipraz sont en cours d'étude et pourraient bien être utilisés dans de futures campagnes de prévention (revue de Kensler *et al.* 2004).

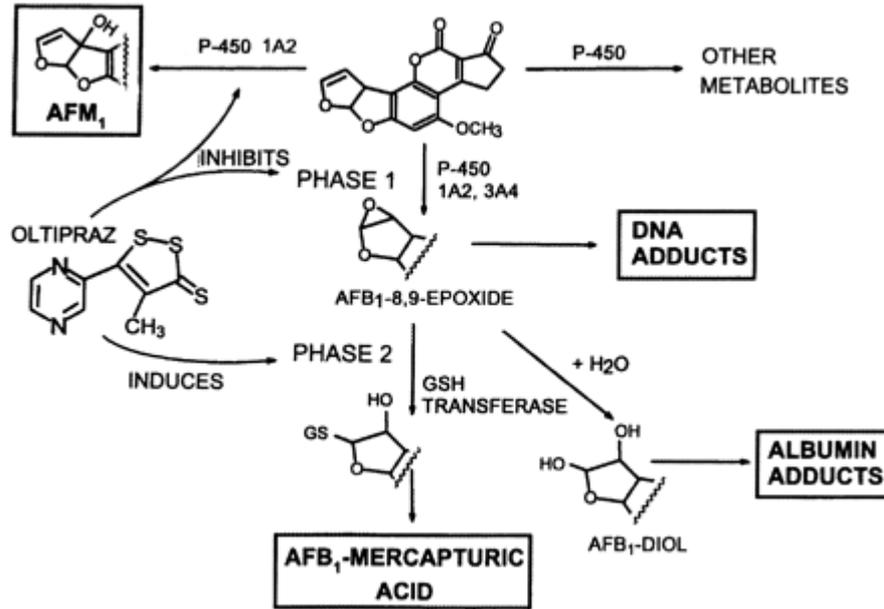


Figure 31 : Représentation schématique des étapes de métabolisation au niveau desquelles l'Oltipraz pourrait intervenir. Tiré de Wang *et al.* 1999.

(2) La chlorophylle, ou le sel soluble équivalent la chlorophylline, sont des molécules "interceptrices" qui forment des complexes moléculaires avec des cancérigènes comme l'AFB₁ (cf. figure 32). Les molécules cancérigènes prises dans ces complexes ne peuvent être assimilées et sont éliminées par voie rectale. La consommation de chlorophylline à chaque repas peut réduire le niveau d'exposition à l'AFB₁ de plus de moitié.

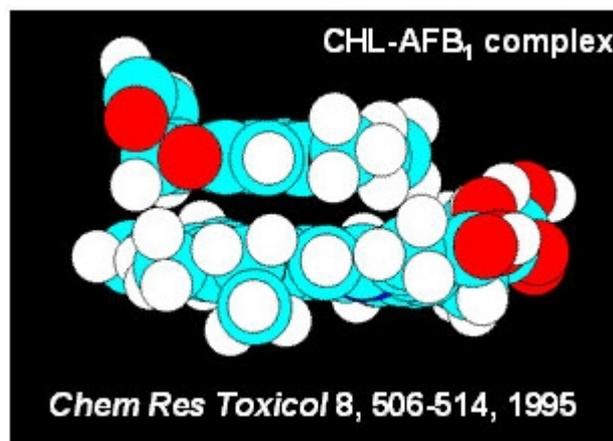


Figure 32 : Représentation de l'interaction entre une molécule d'AFB₁ et une molécule de chlorophylline. Tiré de Breinholt *et al.* 1995.

De nombreux légumes jaunes ou verts contiennent des glucosinolates et le thé vert des polyphénols. Ce sont des composés connus pour protéger contre le risque de développer divers cancers. L'introduction de ces composés dans l'alimentation des populations à risque pourrait prévenir le développement de CHC dû à l'exposition à l'AFB1 (revue de Kensler *et al.* 2004).

D.4. Prévention des autres risques

Il existe des campagnes contre la consommation abusive d'alcool, contre une alimentation non équilibrée, contre le tabagisme. En effet, ce sont 3 facteurs importants dans l'apparition de comportements à risque (accidents de la route, violence), le développement de maladies cardio-vasculaires et des cancers du poumon notamment. Ces campagnes peuvent avoir un impact sur le cancer du foie, mais faible étant donnée la proportion des cancers dus à ces facteurs. Les principaux risques à prévenir restent donc les virus hépatiques et la contamination de la nourriture par l'AFB1.

III. Mécanismes moléculaires du carcinome hépatocellulaire : un espoir dans le diagnostic précoce ?

Le CHC est un cancer qui met plusieurs décennies à se développer sur un foie qui est généralement soumis à une inflammation chronique voire à une cirrhose. L'évolution vers le CHC répond à un processus histologique multi-étape. Les différents facteurs de risque soumettent le foie à des cycles de dommages et de régénérations, favorisant l'apparition de nodules hyperplasiques. Ces derniers peuvent évoluer en nodules dysplasiques qui sont des lésions pré-tumorales présentant un éclaircissement des cellules dû à l'accumulation de glycogène ou de lipides, et une multiplication des nucléoles. L'architecture du foie devient anormale, et les nodules peuvent acquérir la capacité à envahir les vaisseaux (cf. figure 33).

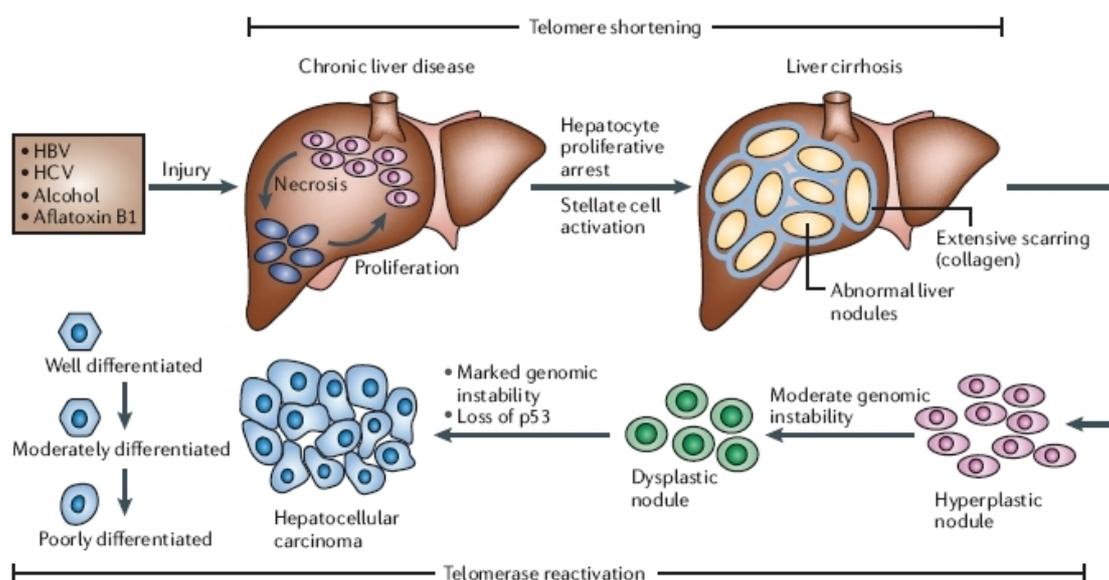


Figure 33 : Progression histopathologique du foie vers le CHC. Tiré de Farazi et DePinho 2006.

Cette évolution histologique du foie s'accompagne d'une accumulation d'altérations moléculaires. Ces altérations se font essentiellement au niveau d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur, et permettent l'acquisition des différentes capacités dont ont besoin les cellules cancéreuses pour former des

tumeurs. Il est possible d'identifier un ensemble d'altérations un peu plus spécifiques au CHC.

A. Deux grands mécanismes de l'hépatocarcinogénèse

A.1. Relation entre p53 et β -caténine dans le CHC

Les voies impliquant p53 (cf. paragraphe III.B.3) et la β -caténine (cf. paragraphe III.C.4) sont les deux voies principales dérégulées dans les CHC. Différentes études se sont attachées à la relation entre ces deux voies et les implications dans le développement du CHC. L'analyse des différents résultats montre qu'il existe une corrélation inverse entre la présence de mutations dans le gène *TP53* ou dans le gène *CTNNB1* (qui code la β -caténine) dans les CHC, même s'il est courant de trouver des mutations dans le gène *TP53* et une accumulation de la β -caténine (cf. figure 34). En effet, l'accumulation anormale de la β -caténine active la voie p53. Dans le cas où le gène *TP53* est muté et que la protéine produite n'est plus fonctionnelle, la β -caténine peut s'accumuler sans induire l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Dans ce contexte, cette accumulation de la β -caténine ne se fait pas par l'intermédiaire de mutations dans le gène *CTNNB1*. En effet, les mutations dans *CTNNB1* et dans *TP53* sont généralement mutuellement exclusives. Cependant, dans des conditions particulières de forte exposition à l'AFB1, des cas comportant une mutation dans les deux gènes ont été reportés, avec pour seule mutation de *TP53* la mutation Ser249 (Devereux *et al.* 2001). Ceci suggère qu'il existe au moins deux mécanismes différents d'hépatocarcinogénèse, l'un passant par la mutation du gène *TP53* et l'autre par la mutation du gène *CTNNB1*.

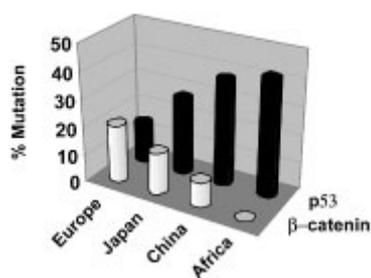


Figure 34 : Analyse comparative des taux de présence de mutations dans les gènes *TP53* et *CTNNB1* dans des cas de CHC en fonction de l'origine géographique. Tiré de Cagatay et Ozturk 2002.

A.2. Stabilité vs instabilité génomique

L'analyse de la stabilité génomique dans des CHC a montré que deux mécanismes d'hépatocarcinogénèse pouvaient être distingués, l'un passant par un phénomène d'instabilité génomique et l'autre de stabilité génomique (Laurent-Puig et Zucman-Rossi 2006, cf. figure 35).

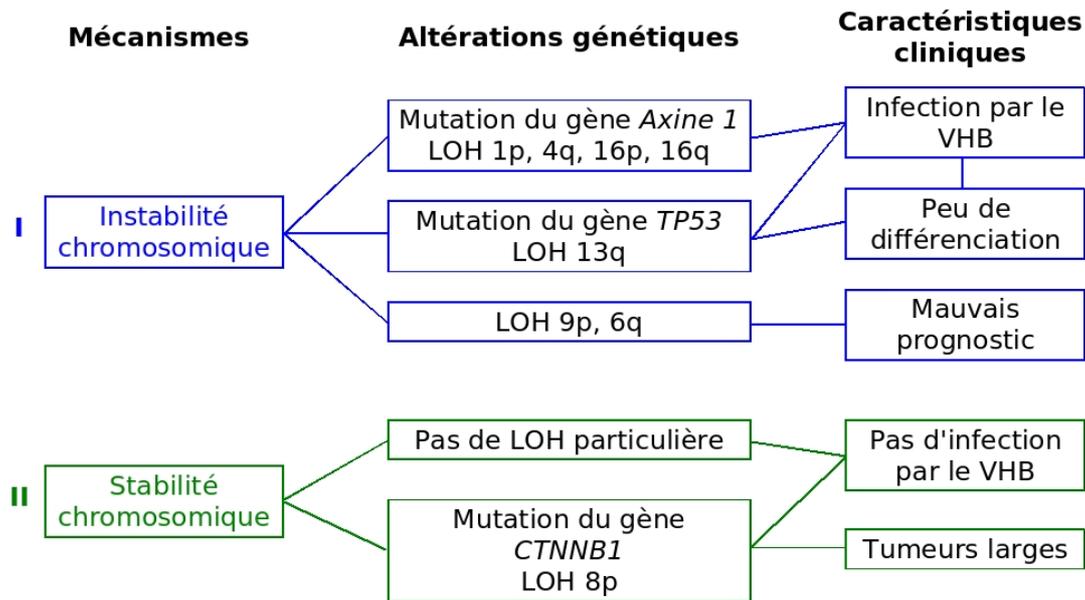


Figure 35: Mécanismes principaux de l'hépatocarcinogénèse, définis par les altérations génétiques et les caractéristiques correspondantes. Les lignes représentent des corrélations significatives. LOH : perte d'hétérozygotie. Adapté de Laurent-Puig et Zucman-Rossi 2006.

L'instabilité génomique détectée dans les tumeurs est associée à des pertes d'hétérozygotie des bras chromosomiques 1p, 4q, 13q et 16, et avec des mutations du gène de l'*Axine 1* et de *TP53*. Cette catégorie de CHC est associée à une infection par le VHB, et à des tumeurs peu différenciées.

La stabilité génomique est associée à la perte d'hétérozygotie du bras court du chromosome 8 et des mutations du gène *CTNNB1*. Cette catégorie de CHC est plutôt associée à une infection par le VHC et à la consommation excessive d'alcool, et à des tumeurs bien différenciées et développées.

B. TP53

La protéine p53 a été découverte en 1979 comme liant l'antigène T de SV40 (Lane et Crawford 1979). Cette protéine de 53 kilodaltons semblait pouvoir induire l'immortalisation de cellules et coopérer avec Ras pour induire la transformation cellulaire (Parada *et al.* 1984). Le gène *TP53* codant cette protéine a alors été classé dans les oncogènes. À la fin des années 80, des expériences de séquençage ont montré que l'induction de la transformation ou l'immortalisation cellulaires étaient associées à des mutations du gène *TP53*, qui a alors été reclassé parmi les gènes suppresseur de tumeur. Le gène *TP53* humain est localisé en position 17p13.1 (McBride *et al.* 1986).

B.1. Organisation génomique

Le gène *TP53* est composé de 11 exons (dont le premier est non-codant) et s'étend sur 20 kilobases. Il est sous le contrôle de 3 promoteurs, le premier se situe 240 paires de base en amont de l'exon 1, le second au sein de l'exon 1, et le troisième découvert récemment se situe dans l'intron 4 (Bourdon *et al.* 2005). La région promotrice principale ne contient pas de boîte classique TATA ou CAAT mais des sites de liaison à des facteurs de transcription comme c-Jun, CPEp53-BPI, CPEp53-BPII et HoxA5 (Reisman et Loging 1998).

Le gène *TP53* est exprimé sous plusieurs isoformes, actuellement au nombre de 10. Le transcrit majeur de 2,8 kilobases produit la protéine complète de 393 acides aminés, TAp53 ou plus simplement p53. Les autres isoformes conservent un domaine central mais présentent des variations en N- et C-terminal. Les isoformes ΔN sont tronquées en N-terminal et produites par l'utilisation d'un promoteur interne dans l'intron 4 ou par épissage alternatif. Ces isoformes semblent agir comme des dominants négatifs vis-à-vis de TAp53 (revue de Mills 2005, Courtois *et al.* 2002).

La protéine TAp53 est constituée de 5 domaines fonctionnels (cf. figure 36) : (1) un domaine de transactivation en N-terminal, (2) un domaine riche en prolines, (3) un domaine central de liaison à l'ADN, (4) un domaine d'oligomérisation, et (5) en C-terminal un domaine de régulation et de localisation nucléaire (Soussi et May 1996).

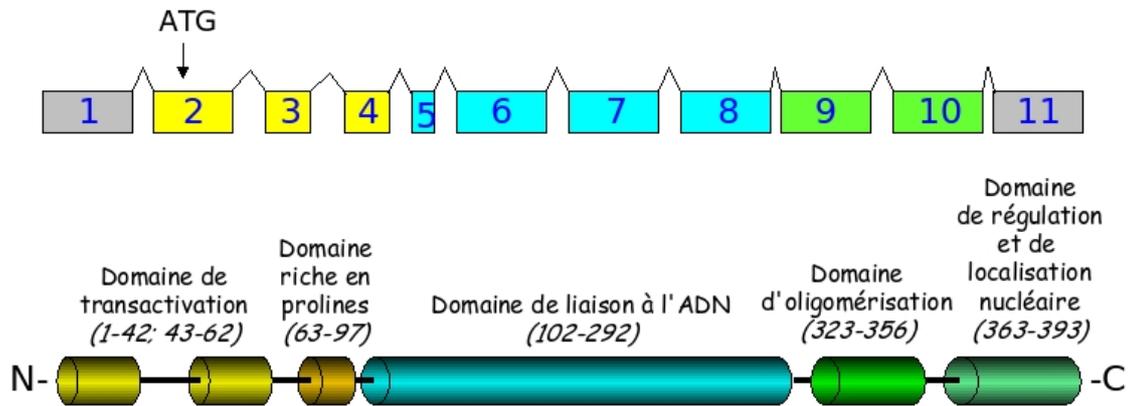


Figure 36 : Structure génomique de TP53 et structure de la protéine p53 correspondante.

(1) Le domaine de transactivation (acides aminés 1 à 62) permet la fonction transcriptionnelle de p53. Ce domaine permet l'interaction avec des composants de la machinerie transcriptionnelle, notamment TBP (TATA box Binding Protein), et des facteurs associés TAF (TBP-Associated Factors) (Truant *et al.* 1993). Il contient également un domaine de liaison à Mdm2 qui est un régulateur négatif de la stabilité de p53 (Chi *et al.* 2005). Ce domaine peut subir des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation qui permettent de stabiliser la protéine (Bode et Dong 2004).

(2) Le domaine riche en prolines (acides aminés 63 à 97) semble moduler l'activité transcriptionnelle de p53, notamment dans l'induction de l'apoptose (Venot *et al.* 1998).

(3) Le domaine de liaison à l'ADN (acides aminés 102 à 292) permet à la protéine de se lier à l'ADN sur des sites spécifiques composés de motifs répétés palindromiques du type PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy (où Pu = Purine et Py = Pyrimidine) (el-Deiry *et al.* 1992). Les éléments de réponse à p53 sont composés de deux tandems inversés pouvant lier 4 protéines p53 reliées en tétramères. Le domaine de liaison à l'ADN de p53 a été cristallisé et sa structure est bien connue (cf. figure 37).

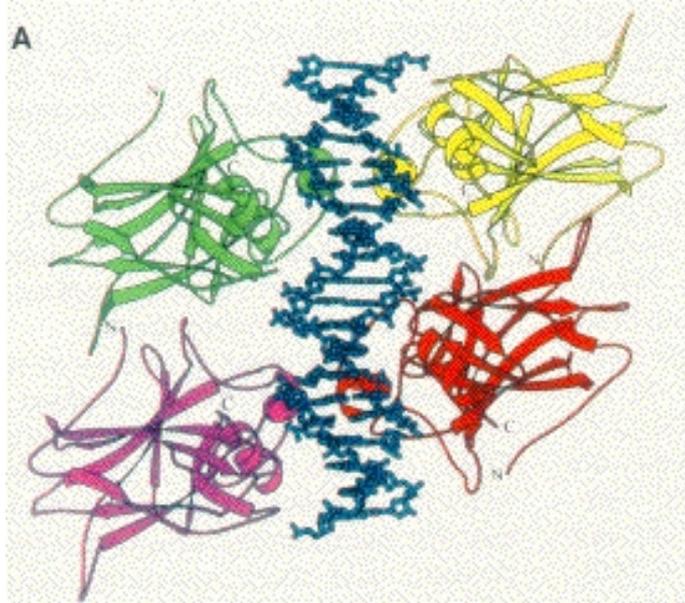


Figure 37 : Représentation de l'interaction entre les domaines de liaison à l'ADN d'un tétramère de p53 et une molécule d'ADN. Tiré de Jeffrey *et al.* 1995.

(4) Le domaine d'oligomérisation (acides aminés 323 à 356) permet la tétramérisation de p53, indispensable à ses fonctions transactivatrices et suppressives (Shaulian *et al.* 1993).

(5) Le domaine de régulation et de localisation nucléaire est composé d'une série de signaux de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localisation Signal) : NLS1 des acides aminés 316 à 325, NLS2 369 à 375 et NLS3 de 379 à 384. Ce domaine permet, avec le signal d'export nucléaire situé dans le domaine d'oligomérisation, de cibler p53 vers le noyau (Stommel *et al.* 1999). Il est le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles de type ubiquitinylation, phosphorylation, sumoylation et acétylation, c'est pour cela qu'il est aussi appelé domaine de régulation (Bode et Dong 2004).

B.2. Fonctions de la protéine p53

B.2.a. Régulation basale par Mdm2

La protéine p53 possède des signaux de localisation nucléaire, mais lorsque la voie p53 n'est pas activée, elle reste dans le cytoplasme à un niveau basal faible. En effet, p53 est produite en continu mais est aussitôt dégradée dans le cytoplasme. Le

mécanisme principal induisant la dégradation de p53 passe par son interaction au niveau de son domaine N-terminal avec Mdm2. Cette dernière induit la relocalisation cytoplasmique de p53 et son ubiquitinylation. p53 est alors ciblée vers le protéasome et dégradée. Il existe un autre mécanisme d'ubiquitinylation de p53, Mdm2-indépendant, mais beaucoup moins décrit et connu (Brooks et Gu 2006).

B.2.b. Induction de p53

p53 est une protéine inductible qui répond à différents stress génotoxiques (qui induisent des dommages à l'ADN) ou non-génotoxiques. Elle est stabilisée et s'accumule rapidement et de façon transitoire.

La première démonstration de l'inductibilité de p53 par un stress a été réalisée en 1984 après exposition de cellules aux radiations UV (Maltzman et Czyzyk 1984). Aujourd'hui, nous connaissons tout un panel de stress qui peuvent induire p53 : des radiations (rayons γ , rayons X, UV, particules alpha), des agents cancérigènes (hydrocarbures polycycliques aromatiques, mycotoxines, N-nitrosamines, métaux lourds, stress oxydatif, amines aromatiques), des médicaments chimiothérapeutiques, ainsi que des stress non génotoxiques comme l'hypoxie, l'épuisement en ribonucléotides, les agents de dépolymérisation des microtubules, ou l'activation d'oncogènes (revue de Pluquet et Hainaut 2001).

L'accumulation de p53 suite à un stress est possible grâce à deux mécanismes. (1) la traduction des ARNm augmente, la protéine est stabilisée par dissociation des complexes avec ses inhibiteurs, et elle est convertie en une forme ayant plus d'affinité avec l'ADN (Kastan *et al.* 1991). (2) La protéine p53 subit des modifications post-traductionnelles dans ses régions N- et C-terminales, qui permettent son induction et bloquent les systèmes de dégradation de p53.

L'accumulation nucléaire de p53 est généralement rapide et transitoire, mais dépend du type de stress subit, de son intensité et de sa durée.

B.2.c. Réponse au stress

Une fois activée, p53 peut avoir différents effets sur la cellule en fonction du type de stress impliqué : (1) arrêt du cycle cellulaire, (2) induction de l'apoptose, (3)

induction de la réparation de l'ADN, et (4) dans une moindre mesure l'inhibition de l'angiogénèse (cf. figure 38).

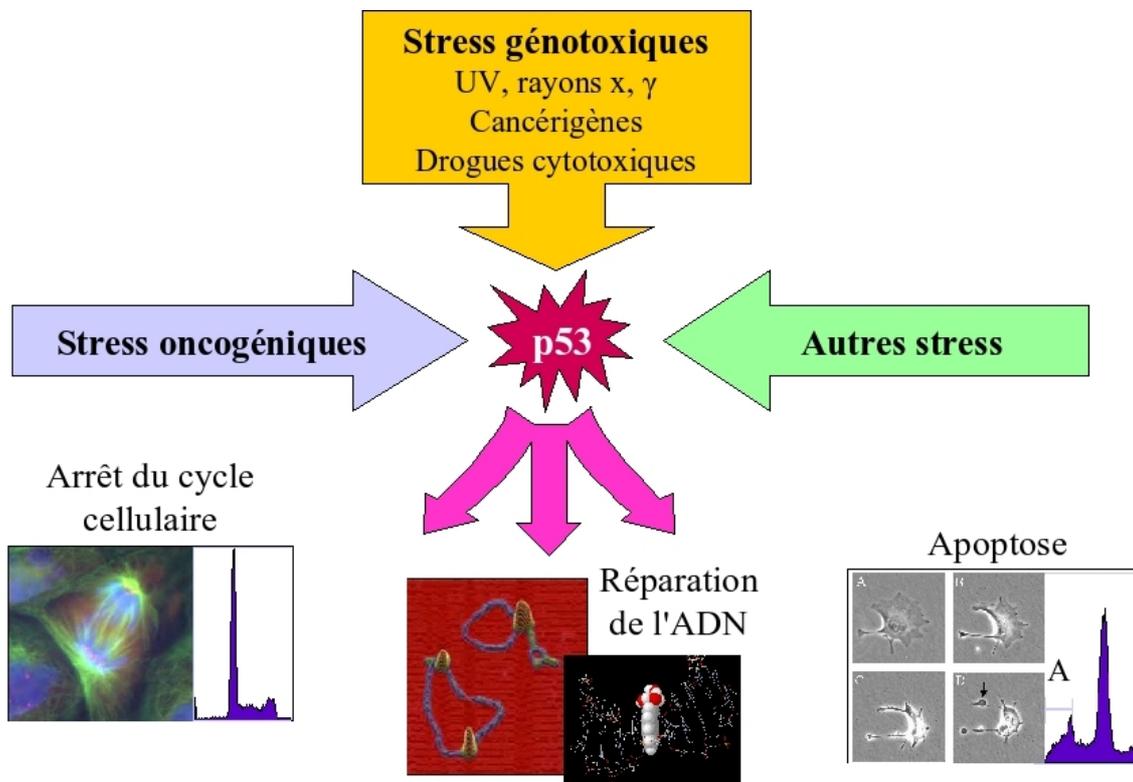


Figure 38 : Schéma simplifié de la voie p53. p53 est activée et stabilisée par différents stress et peut induire en retour l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose. Tiré de Le Roux *et al.* 2005.

(1) p53 est capable d'arrêter le cycle cellulaire en phases G1 ou G2, par l'intermédiaire de p21. En effet, p53 est capable d'activer le gène $p21^{WAF1/CIP1}$, qui code une kinase cycline-dépendante capable d'inhiber les transitions G1/S ou G2/M (Agarwal *et al.* 1995). D'autres gènes induits par p53 peuvent également provoquer un arrêt du cycle cellulaire : *GADD45* (G1-Arrest and DNA Damage) et *14-3-3-σ* (Taylor et Stark 2001).

(2) p53 est capable d'induire l'apoptose ou mort cellulaire par différentes voies. p53 peut induire des récepteurs de mort ainsi que les ligands correspondants, comme FAS/FASL et DR5/TRAIL. L'interaction entre ces récepteurs et leur ligand, provoque l'initiation du clivage des caspases et donc le déclenchement de l'apoptose (Ashkenazi et Dixit 1998). p53 est également un inhibiteur des signaux de survie émis

par les intégrines ou par l'IGF (Insulin-like Growth Factor) (Bachelder *et al.* 1999, Buckbinder *et al.* 1995). Lorsque la cellule ne reçoit plus suffisamment de signaux de survie, l'apoptose est déclenchée. p53 est aussi capable d'activer des gènes intervenant dans l'apoptose dépendant de Bax/Bak, et notamment *PUMA* et *Nova*, ainsi qu'un gène mitochondrial provoquant la disparition du potentiel membranaire de la mitochondrie : *AIP1* (revues de Vousden 2000 et Yu et Zhang 2005).

(3) p53 régule la réparation de l'ADN, et notamment les cellules dépourvues de p53 fonctionnelle sont déficientes pour les systèmes de réparation NER (Nucleotide Excision Repair) et BER (Base Excision Repair). De plus, la région C-terminale de p53 est capable de se lier spécifiquement à des lésions de l'ADN, ainsi qu'à des composés des machineries de réparation comme les hélicases XPB et XPD, RPA, Ref-1, TFIIH (revue de Balint et Vousden 2001) ou encore Rad51 qui intervient dans la recombinaison homologue (May et May 1999). p53 peut également réguler la transcription de certains gènes comme *GADD45*, qui est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire au profit de la réparation de l'ADN (Balint et Vousden 2001), *O⁶MGMT* (*O⁶-MethylGuanine-DNA MethylTransferase*) qui intervient dans la réparation de l'ADN et dans la résistance aux agents alkylants et qui est réprimé par p53 (Harris *et al.* 1996). p53 peut également réguler MSH2 qui intervient dans le système MMR (Mismatch Repair), à la fois de façon transcriptionnelle et non transcriptionnelle (Bertrand *et al.* 2004).

(4) p53 peut également inhiber l'angiogenèse en réprimant le VEGF ou en régulant des facteurs anti-angiogéniques tels que la thrombospondine (Zhang *et al.* 2000, Dameron *et al.* 1994).

B.3. TP53 et hépatocarcinogénèse

Au vu de la fonction de p53 en réponse à différents stress ou à la surexpression d'oncogènes, l'inhibition de la voie p53 est un passage quasi-obligé de la carcinogénèse. Parmi les différents moyens d'inactiver la protéine p53, les mutations du gène *TP53* occupent une place prédominante. Plus de 20 000 mutations sont actuellement recensées dans la base de données p53 hébergée par le CIRC

(<http://www-p53.iarc.fr/>) et 50% des cancers ont une mutation du gène *TP53*, dont 80% sont situées dans le domaine de liaison à l'ADN. La répartition des mutations dans le gène *TP53* et leur prévalence dépend du site du cancer (cf. figure 39).

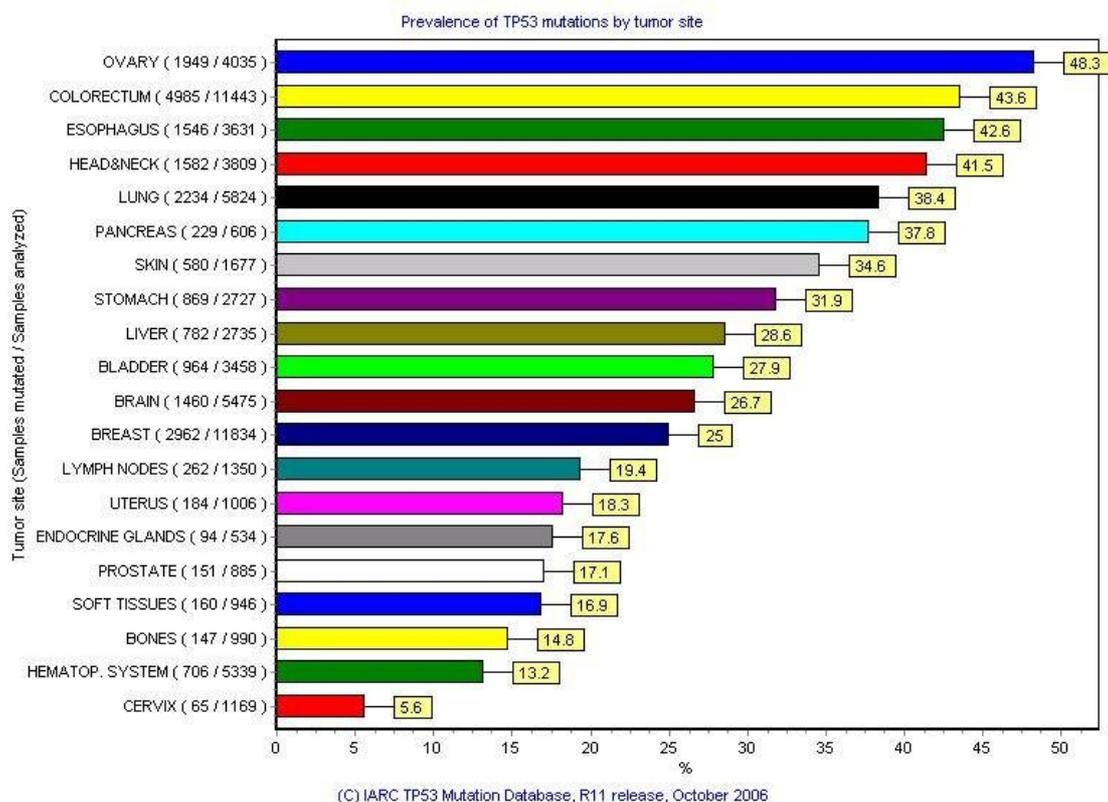


Figure 39 : Prévalence des mutations du gène *TP53* dans différents types de cancer. Tiré de <http://www-p53.iarc.fr/>.

TP53 est muté dans plus de 28% des cancers du foie. Cependant, ce chiffre dépend fortement de l'étiologie et donc de la région géographique considérée. Dans les régions de forte incidence du CHC, *TP53* est muté dans plus de 50% des cas. La répartition des différents types de mutations montre que les transversions G vers T sont majoritaires dans les régions de forte exposition à l'AFB1, et ces transversions sont presque exclusivement des mutations Ser249 (cf. figure 40).

Le contexte de séquence du codon 249 de *TP53* représente un site d'affinité intermédiaire pour la formation d'adduits AFB1 (Smela *et al.* 2001). Le traitement d'hépatocytes par de l'AFB1-8,9-époxyde montre que d'autres codons de *TP53* connus comme points chauds de mutation dans d'autres cancers (codons 245, 248 ou 273) ont

plus d'affinité pour l'AFB1 que le codon 249 (Denissenko *et al.* 1999). La sélection de la mutation Ser249 dans les CHC ne peut être expliquée par la réactivité de la séquence. Les avantages éventuellement acquis par les cellules comportant cette mutation ne sont pas clairs. Le rôle de la mutation Ser249 dans l'hépatocarcinogénèse n'est pas élucidé, mais cette mutation pourrait servir de marqueur moléculaire du CHC (cf. paragraphe III.D.2).

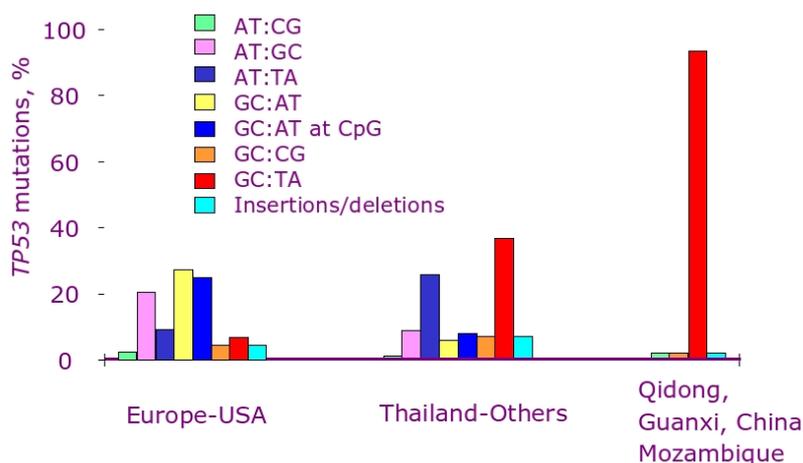


Figure 40 : Répartition des différents types de mutation du gène *TP53* dans des régions de faible exposition à l'AFB1 (Europe-USA), d'exposition moyenne (Thaïlande) et de forte exposition (Qidong, Guanxi, Chine, Mozambique). Les transversions G vers T dans les régions de forte exposition à l'AFB1 sont quasi exclusivement des mutations Ser249. Adapté de Montesano *et al.* 1997.

D'autres altérations de la voie p53 sont possibles, dont l'inactivation de p14^{ARF} par hyperméthylation de son promoteur. p14 active p53, et la perte de l'expression de p14 est un événement précoce et fréquent (entre 20 et 48% des CHC selon l'étiologie) dans le développement du CHC (Edamoto *et al.* 2003).

C. β -caténine

La protéine β -caténine a d'abord été isolée en tant que protéine pouvant s'associer au domaine intracellulaire de l'E-cadhérine (McCrea et Gumbiner 1991). Le gène humain correspondant *CTNNB1* a ensuite été localisé dans la région chromosomique 3p22-p21.3 (Kraus *et al.* 1994).

C.1. Données structurales

Nollet *et al.* ont déterminé la structure primaire du gène humain codant la β -caténine (*CTNNB1*). Le gène complet a une taille de 23,2 kilobases et contient 16 exons (Nollet *et al.* 1996).

Nollet *et al.* ont également montré qu'il existait un nucléotide initiateur majeur de la transcription situé à 214 nucléotides en amont du codon initiateur de la traduction ATG. L'ARNm ainsi obtenu mesure 3 362 pb : une région 5' non codante de 214 pb, 2 346 pb de séquence codante, et une région 3' non codante de 802 pb. Il existe une forme d'épissage alternatif réduite de 159 pb dans l'exon 16 (région 3' non codante). Les deux formes d'épissage alternatif sont exprimées dans les mêmes proportions dans différentes lignées cellulaires humaines.

La région 5' non codante du gène *CTNNB1* est très riche en GC et contient une boîte TATA, ainsi que de nombreux sites potentiels de liaison à différents facteurs de transcription comme : NF κ B, SP1, AP2 et EGFR1 (Nollet *et al.* 1996).

La protéine β -caténine est composée de 3 grandes régions (Willert et Nusse 1998) : (1) une région N-terminale de 134 acides aminés, (2) une région centrale de 550 acides aminés, et (3) une région C-terminale de 100 acides aminés (cf. figure 41).

(1) La région N-terminale contient une boîte de destruction. Cette boîte contient un site de reconnaissance et des résidus sérine/thréonine (acides aminés 33S, 37S, 41T et 45S) qui sont des sites de phosphorylation. Cette boîte joue un rôle déterminant dans la régulation de la destruction de la protéine (cf. paragraphe III.C.2).

(2) La région centrale contient 12 motifs imparfaits répétés appelés motifs armadillo, en référence à la protéine Armadillo homologue présente chez la *Drosophile*. Cette région contient des sites d'interaction avec différentes protéines comme l' α -caténine, l'APC (Adenomatous Polyposis Coli), l'axine, les facteurs de transcription TCF/LEF (T-Cell Factor et Lymphoid Enhancer Factor) et à l'E-cadhérine.

(3) La région C-terminale contient un domaine de transactivation.

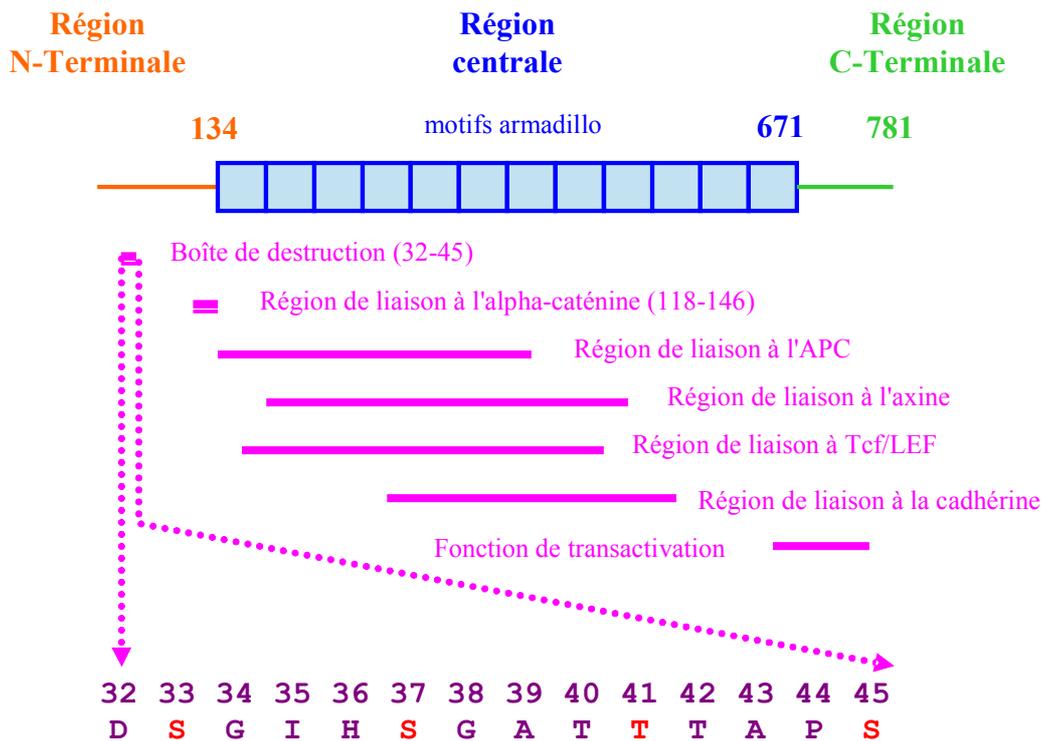


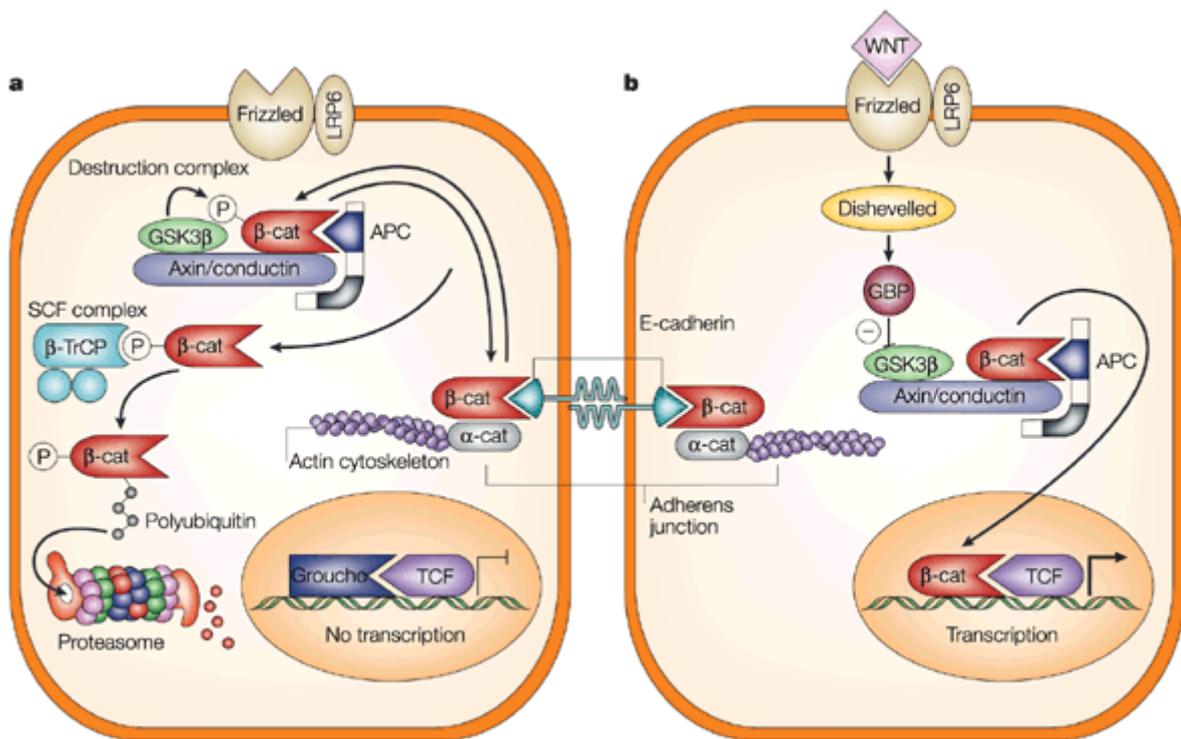
Figure 41 : Organisation structurale de la protéine β -caténine, ses régions d'interaction et la boîte de destruction. En rouge, les sites de phosphorylation de la boîte de destruction.

C.2. La protéine β -caténine dans la voie Wnt

Bien que la β -caténine ait d'abord été isolée comme s'associant au domaine cytoplasmique de l'E-cadhérine, cette protéine est aussi un composant essentiel de la voie de signalisation Wnt (ou Wingless). La voie Wnt est impliquée dans des processus de développement, comme la détermination de la polarité segmentaire chez la Drosophile, la spécification de l'axe dorso-ventral dans le développement précoce du Xénope, et dans l'induction du mésoderme chez C. Elegans (revue de Cadigan et Nusse 1997). La voie Wnt intervient également après le stade de développement et régule la transcription de nombreux gènes (Willert et Nusse 1998 et Gordon et Nusse 2006).

Lorsque la voie Wnt n'est pas activée, la β -caténine forme un complexe avec notamment l'APC, l'axine et la GSK3- β (Glycogène Synthase Kynase 3 β) qui phosphoryle la β -caténine. Cette dernière est alors ubiquitinée et ciblée vers le protéasome où elle est dégradée (cf. figure 42 a). Lorsqu'un ligand Wnt se lie à un

récepteur Frizzled, la protéine Dishevelled est alors phosphorylée, ce qui empêche la phosphorylation de la β -caténine par la GSK-3 β et lui permet de se dissocier du complexe. Une fois libérée, la β -caténine hypophosphorylée s'accumule dans le cytoplasme puis est transloquée dans le noyau où elle se lie à des facteurs de transcription comme TCF/LEF. La β -caténine active alors un panel de gènes dont *c-myc* (He *et al.* 1998) et la *cycline D1* (Shtutman *et al.* 1999) qui induisent la croissance cellulaire (cf. figure 42 b). L'activation anormale de la voie Wnt peut entraîner une prolifération anormale de la cellule.



Nature Reviews | Cancer

Figure 42 : Voie de signalisation Wnt. a : en absence de signal Wnt, b : en présence du ligand Wnt. Tiré de Fodde *et al.* 2001.

C.3. La β -caténine dans le complexe d'adhésion cellulaire

Les caténines ont été découvertes comme se liant au domaine cytoplasmique des protéines membranaires cadhérines (revue de Cowin 1994). Les cadhérines font partie d'une famille multigénique codant des glycoprotéines transmembranaires qui interviennent dans l'adhésion cellulaire dépendante du calcium, dans l'ancrage au cytosquelette et dans la signalisation.

L'E-cadhérine est un composant des jonctions intermédiaires qui interagit avec des caténines (α , β , et γ -caténine ou plakoglobine) qui elles-mêmes lient l'E-cadhérine au cytosquelette (cf. figure 43). Les jonctions intermédiaires, avec les jonctions serrées et les desmosomes permettent la cohésion des cellules épithéliales. La perte de cette cohésion peut affecter la différenciation cellulaire ou être à l'origine du développement de tumeurs. Or, la majeure partie des tumeurs humaines (80-90%) a pour origine des cellules épithéliales. L'intégrité des composants des jonctions est donc important, et notamment en ce qui concerne les cadhérines et les caténines (revue de Christofori et Semb 1999). La perte d'adhésion est une des propriétés des cellules cancéreuses qui leur permet de développer des métastases.

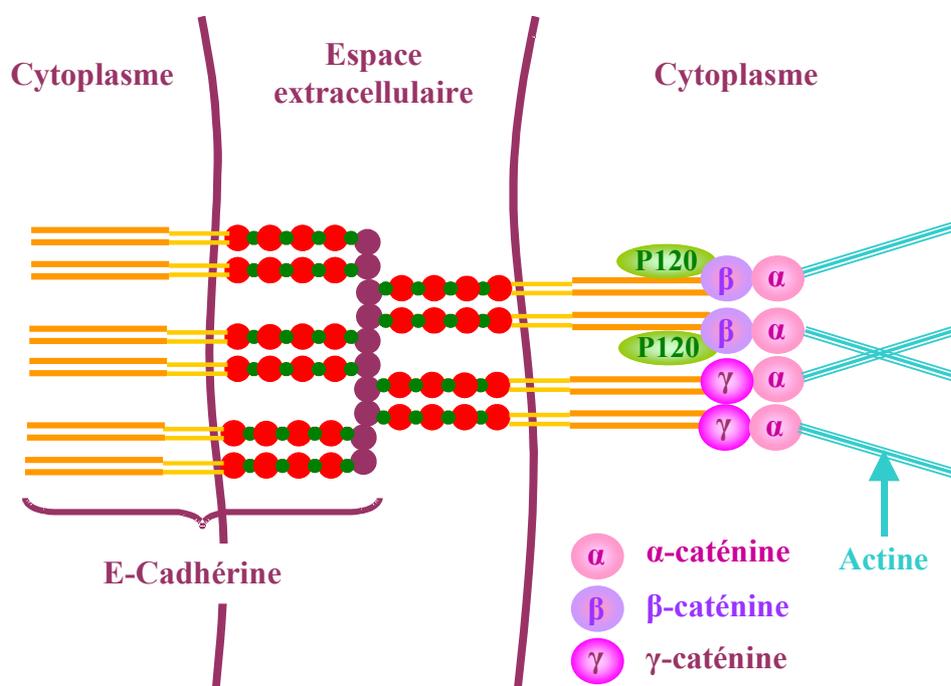


Figure 43 : Organisation d'une jonction intermédiaire. La β -caténine permet de faire le lien entre l'E-cadhérine et l' α -caténine, elle-même reliée au cytosquelette (filaments d'actine). Adapté de Christofori et Semb 1999.

C.4. β -caténine et hépatocarcinogénèse

Différentes études ont montré que la β -caténine peut s'accumuler dans des cellules de CHC. Cette accumulation est principalement nucléaire (de 33 à 69% des cas de CHC présentent une accumulation anormale de la β -caténine) et peut être expliquée par l'activation anormale de la voie Wnt. Cette dérégulation peut être due à

la présence de mutations dans l'exon 3 de la β -caténine (11 à 43% des CHC selon les études), surtout dans les cas associés à l'infection par le virus de l'hépatite C.

Les mutations observées ont lieu essentiellement au niveau de 6 points chauds de mutation, qui sont les codons 32, 33, 34, 37, 41 et 45. Ces codons codent les sites de phosphorylation de la β -caténine (codons 33, 37, 41 et 45) ainsi que des acides aminés de la boîte de reconnaissance (codons 32 et 34). Une mutation sur ces sites peut induire une absence de phosphorylation ou de reconnaissance de la boîte de destruction, et donc la stabilisation de la β -caténine qui n'est alors plus ciblée vers le protéasome. D'autres études ont montré la présence de délétions chevauchant tout ou partiellement l'exon 3 de la β -caténine, qui induisent son accumulation tout en conservant ses capacités transactivatrices (Wong *et al.* 2001, Hsu *et al.* 2000, Giles *et al.* 2003). Il semblerait que les patients atteints de CHC associés à de la β -caténine mutée aient un meilleur pronostic et un meilleur taux de survie. Lorsque la β -caténine n'est pas mutée, son accumulation est parfois expliquée par des mutations de l'axine, mais de nombreux cas d'accumulation ne sont pas expliqués.

Les jonctions cellulaires dans lesquelles la β -caténine est impliquée jouent également un rôle prépondérant dans le développement des CHC, notamment au niveau des stades avancés. En effet, la perte de ces jonctions affaiblit l'adhérence cellulaire et favorise l'apparition de métastases. Cependant, la β -caténine ne semble pas directement impliquée dans cette perte d'adhérence.

D. Autres voies dérégulées dans le CHC

Outre les voies p53 et Wnt, différentes voies de signalisation sont dérégulées dans le CHC. Le type d'altération le plus couramment rencontré est la perte d'hétérozygotie (Thorsteirsson et Grisham 2002). De nombreuses mutations et changements de profil de méthylation sont également observés.

D.1.a. Régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se décline en 4 phases : G1, S (durant laquelle l'ADN se réplique), G2 et M (mitose). Les transitions sont sous le contrôle de complexes Cycline/CDK (Kinases Cycline-Dépendantes). Ces complexes sont notamment capables de phosphoryler le gène suppresseur de tumeur du rétinoblastome (*Rb*), ce qui rend possible la transition critique G1/S. Dans les CHC des altérations sont trouvées à différents niveaux et permettent d'induire la progression du cycle cellulaire et donc de favoriser la croissance.

Les gènes codant les cyclines D et A sont amplifiés et surexprimés dans 10 à 20% des CHC (Zhang *et al.* 1993, Chao *et al.* 1998).

La perte du chromosome 13 se produit dans 30% des CHC. Le gène *Rb* qui se situe au locus 13q14 est atteint par cette perte qui est corrélée avec une absence totale d'expression de la protéine pRb. Or, peu de mutations ont été reportées sur le gène *Rb*, ce qui suggère une inhibition par l'intermédiaire de mécanismes épigénétiques (Zhang *et al.* 1994).

Le gène *p16^{INK4}* code deux protéines différentes : un inhibiteur de kinase CDKN2 (Cyclin-D-Dependent Kinase Inhibitor 2) et ARF qui est impliquée dans l'apoptose p53-dépendante. Ces deux protéines agissent comme des suppresseurs de tumeur dans la voie pRb. Le gène *p16^{INK4}* est rarement invalidé par des mutations, mais plutôt par des pertes d'hétérozygotie du bras court du chromosome 9 (environ 20% des CHC) et par la méthylation du promoteur qui inhibe son expression (Jin *et al.* 2000).

Le gène *p21^{WAF1/CIP1}* est un inhibiteur du cycle cellulaire qui peut être activé par p53. Dans des cas de CHC, ce gène est réprimé, et cette répression est corrélée avec la présence de mutations dans le gène *TP53* (Furutani *et al.* 1997).

D.1.b. Inhibition de la croissance cellulaire et apoptose

La voie du TGF β , qui inhibe la croissance cellulaire et induit l'apoptose, est altérée dans 10 à 30% des CHC. Les membres de la famille des récepteurs à tyrosine kinase ErbB, qui inhibent le TGF β sont souvent surexprimés (Ito *et al.* 2001) : ERBB1 ou EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), ERBB3 et ERBB2 (ou HER2) sont fortement surexprimés, et ERBB4 est faiblement surexprimé. La

surexpression de EGFR et ERBB3 est corrélée avec une maladie plus agressive. De même, le récepteur M6P/IGF2R (Mannose-6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor 2 Receptor) peut être inactivé par des mutations faux-sens ou non-sens ainsi que les gènes *MADH2/Smad2* et *MADH4/Smad4* qui interviennent dans la transmission du signal (Oka *et al.* 2002, Yakicier *et al.* 1999).

La voie JAK/STAT est également dérégulée dans les CHC par hyperméthylation du promoteur de *SOCS-1*. SOCS-1 interagit avec la kinase Janus (JAK) pour inhiber les signaux médiés par les cytokines. L'hyperméthylation du promoteur réprime l'expression du gène (Yoshikawa *et al.* 2001).

D.1.c. Instabilité génétique et génomique

Au début de la cancérogenèse, le raccourcissement des télomères induit une instabilité chromosomique qui favorise l'hépatocarcinogénèse. Une fois les télomères fortement raccourcis, la télomérase est réactivée (90% des cas de CHC) ce qui permet la viabilité cellulaire (Shimojima *et al.* 2004).

Des défauts de la ségrégation des chromosomes durant la mitose induisant des aneuploïdies ont été observés dans divers cancers. Parmi les facteurs impliqués, la kinase Aurora peut être surexprimée dans les CHC (Yu *et al.* 2005).

Les voies de réponse aux dommages à l'ADN peuvent aussi être dérégulées, ce qui destabilise le génome et favorise la cancérogenèse. Outre le gène *TP53*, le gène *BRCA2* est aussi réprimé notamment par perte d'hétérozygotie (revue de Gollin 2005).

E. L'ADN circulant et son utilisation en cancérologie

E.1. Définition de l'ADN circulant

La présence d'ADN extracellulaire dans la circulation sanguine est connue depuis une soixantaine d'années, et des quantités anormalement élevées ont ensuite été détectées chez des patients cancéreux (Leon *et al.* 1977). La concentration de cet ADN circulant varie de 0 à 100 ng/mL de sang avec une moyenne de 30 ng/mL chez un individu sain (Anker et Stroun 2000), et de 0 à 1000 ng/mL avec une moyenne de 180 ng/mL chez un patient cancéreux (Shapiro *et al.* 1983). L'ADN circulant est

essentiellement composé de fragments double brin d'une longueur de 0,18 à 21 kilobases, et a une demi-vie de 16,3 minutes en moyenne chez un individu sain (Stroun *et al.* 1987, Lo *et al.* 1999). Cependant, la majorité de ces fragments serait incluse dans des complexes nucléo-protéiques qui pourraient augmenter leur stabilité.

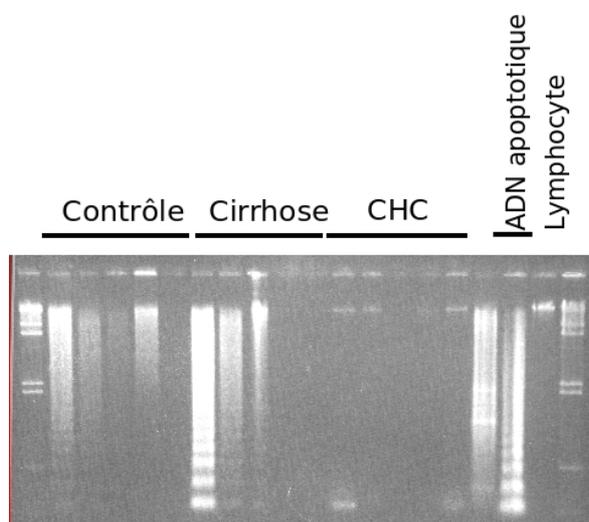


Figure 44 : Profils de migration d'ADN circulant provenant de sujets sains ou atteints de cirrhose ou de CHC. Tiré de Gormally *et al.* 2007.

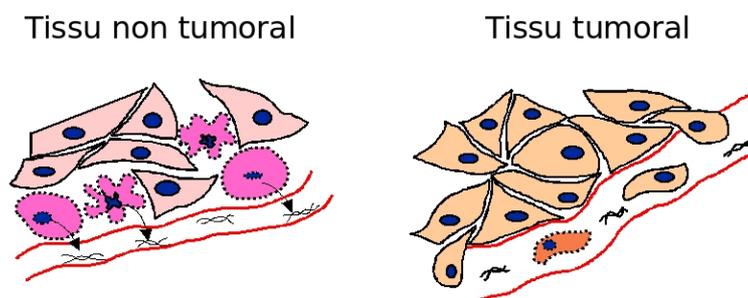


Figure 45 : Deux modèles de libération d'ADN dans la circulation sanguine. Dans le tissu non tumoral, les cellules entrent en nécrose ou apoptose et leur ADN passe dans le sang. Dans le tissu tumoral, des cellules se détachent et entrent dans la circulation sanguine où elles sont lysées. Tiré de Gormally *et al.* 2007.

L'origine exacte de l'ADN circulant n'est pas connue. Cependant, différentes études ont montré qu'il possédait des caractéristiques communes avec l'ADN tumoral chez un patient atteint d'un cancer (Stroun *et al.* 1989). Deux principaux mécanismes ont été proposés basés notamment sur les profils de migration d'ADN circulant provenant de sujets sains ou malades (cf. figure 44). Certains échantillons d'ADN circulant présentent des profils identiques à ceux de cellules apoptotiques ou

nécrotiques (Jahr *et al.* 2001) et d'autres un profil identique à celui d'ADN génomique. L'ADN de cellules apoptotiques ou nécrotiques pourrait passer dans la circulation sanguine, ou des cellules intactes pourraient passer dans la circulation sanguine avant d'être lysées, relarguant ainsi leur ADN (cf. figure 45).

E.2. Utilisation de l'ADN circulant comme matériel de substitution

La concentration sanguine en ADN circulant est corrélée de façon significative à la présence ou non chez un individu d'une lésion cancéreuse ou pré-cancéreuse, mais cette corrélation ne suffit pas à en faire un marqueur de cancérogenèse (Chang *et al.* 2002). Cependant, différentes études ont montré que l'évolution de la quantité d'ADN circulant chez un patient ayant reçu un traitement anti-cancéreux corrélait avec la réponse au traitement et la rechute (Sozzi *et al.* 2001).

Dans une étude cas/contrôle récente effectuée en Gambie, la mutation Ser 249 a été détectée dans l'ADN circulant de 40% de patients atteints de CHC avec 88,5% de concordance avec les tumeurs correspondantes (Szymanska *et al.* 2004), ainsi que dans l'ADN circulant de 15% de patients cirrhotiques et 3% d'individus sains (Kirk *et al.* 2005a). L'analyse quantitative des mêmes échantillons a montré qu'il existait une forte corrélation entre le statut du foie et la quantité d'ADN circulant présentant la mutation Ser249 (Leonart *et al.* 2005). Une étude prospective réalisée à Qidong (République Populaire de Chine) sur des sujets sains présentant un risque de développer un CHC (car exposés au VHB et à l'AFB1) a montré que la mutation Ser249 était détectable dans l'ADN circulant de 21,7% des sujets un an avant le diagnostic, et de 44,6% des sujets au moment du diagnostic (Jackson *et al.* 2003).

L'ADN circulant semble donc un matériel prometteur tant sur le plan du diagnostic précoce, que sur celui du suivi des patients ou du pronostic. En effet, la détection d'altérations dans l'ADN circulant avant le diagnostic par des méthodes conventionnelles pourrait permettre de mieux cibler les populations ayant des risques importants de développer un cancer, et de diagnostiquer ces cancers précocement, notamment en détectant la mutation Ser249 chez des individus exposés au VHB et à l'AFB1 qui présentent donc un risque important de développer un CHC.

L'obtention de biopsies est souvent techniquement difficile et parfois risquée pour le patient. L'ADN circulant pourrait fournir un bon marqueur pour suivre l'évolution de cancers sans avoir à pratiquer d'acte invasif, puisqu'une simple prise de sang suffit.

Cependant, la présence d'altérations dans l'ADN circulant n'est pas en soi informative sur le site d'origine de l'altération, et un même type d'altération peut avoir plusieurs sites potentiels d'origine puisqu'il n'existe pas d'altération 100% spécifique d'une tumeur. De plus, tous les types de cancer ne relarguent pas dans le sang le même taux d'ADN altéré. L'intérêt de l'analyse de l'ADN circulant pourrait dépendre du type de cancer, du site, des facteurs de risque impliqués, du stade de la tumeur... D'autres études sont donc nécessaires pour explorer plus avant les possibilités et les limites de l'utilisation de l'ADN circulant comme matériel de substitution aux tumeurs.

E.3. ADN circulant et cancer du foie : application dans le contexte d'une région de haute incidence, la Gambie

La Gambie est le plus petit pays d'Afrique, situé à l'Ouest et entouré par le Sénégal, et se trouve dans la zone de forte incidence du CHC (cf. figure 46). C'est le cancer le plus fréquent en Gambie chez l'homme avec plus de 58% des cas et un taux standardisé sur l'âge de 35,7/100 000. Chez les femmes, le CHC représente 19,4% des cas de cancer et se trouve au 2ème rang avec un taux standardisé sur l'âge de 11,2/100 000 (Bah *et al.* 2001). Le CHC est un cancer qui se développe chez des sujets jeunes avec une moyenne d'âge au diagnostic de 45 ans. Les données proviennent d'un registre national du cancer qui enregistre de façon active les cas diagnostiqués. Dans le cas du cancer du foie, un diagnostic par ultrasonographie est possible dans deux hôpitaux de référence et un laboratoire permet de doser l'AFP sur demande des hôpitaux ou des centres de soin.



Figure 46 : Carte d'Afrique et détail de l'Afrique de l'Ouest. La Gambie est entourée en rouge.

15% environ des adultes sont porteurs chroniques du VHB. La transmission du VHB est essentiellement horizontale, entre enfants. En effet, la présence d'ADN viral dans le sang et de l'antigène HBeAg décroît rapidement à un âge assez jeune. Les mères sont donc généralement faiblement infectieuses. À l'âge de 2 ans, 40% des enfants ont été infectés par le virus et 15% sont devenus porteurs chroniques; à l'âge de 10 ans, 90% ont été infectés et 20% sont devenus porteurs chroniques. Les données sur le VHC sont récentes et la prévalence semble être de 1 à 2%. L'âge de l'infection par le VHC et le mode de transmission ne sont pas connus en Gambie. L'exposition à l'AFB1 est l'une des plus fortes au monde et est assez homogène sur le pays (Montesano *et al.* 1997). La présence d'adduits d'AFB1 sur l'albumine est détectée chez plus de 95% des Gambiens. L'exposition commence *in utero* et se poursuit par l'intermédiaire du lait maternel, puis la consommation d'arachides contaminées (Wild *et al.* 1991).

Entre 1997 et 2001, 216 patients atteints de CHC et 408 contrôles ont été recrutés pour participer à une étude sur le cancer du foie : GLCS (Gambia Liver Cancer Study). Cette étude a montré que le ratio homme/femme chez les patients

atteints de CHC est d'environ 4/1. 61% des cas de CHC sont porteurs chroniques du VHB et 19% du VHC, contre 16% et 3% des contrôles respectivement. Les co-infections VHB/VHC sont peu communes, et le VHB est associé à des cas de CHC chez des patients jeunes alors que le VHC l'est avec des patients plus âgés. Au total, le CHC est associé au VHB dans 57,2% des cas, au VHC dans 19,9% des cas, et aux 2 dans 3,5% des cas (Kirk *et al.* 2004). Les CHC associés au VHB sont diagnostiqués environ 10 ans plus tôt que ceux associés au VHC.

La Gambie est le lieu d'une étude d'intervention, le GHIS (Gambia Hepatitis Intervention Study). Un programme de vaccination contre le VHB a été introduit progressivement à l'agenda des vaccinations de routine à partir de 1986. Le pays est divisé en 17 régions et la vaccination contre le VHB a été introduite région par région jusqu'à couverture complète du pays. La vaccination complète consiste en l'administration de 4 doses de vaccin dérivé de plasma en intra-musculaire (The Gambia Hepatitis Study Group 1987) (cf. figure 47).

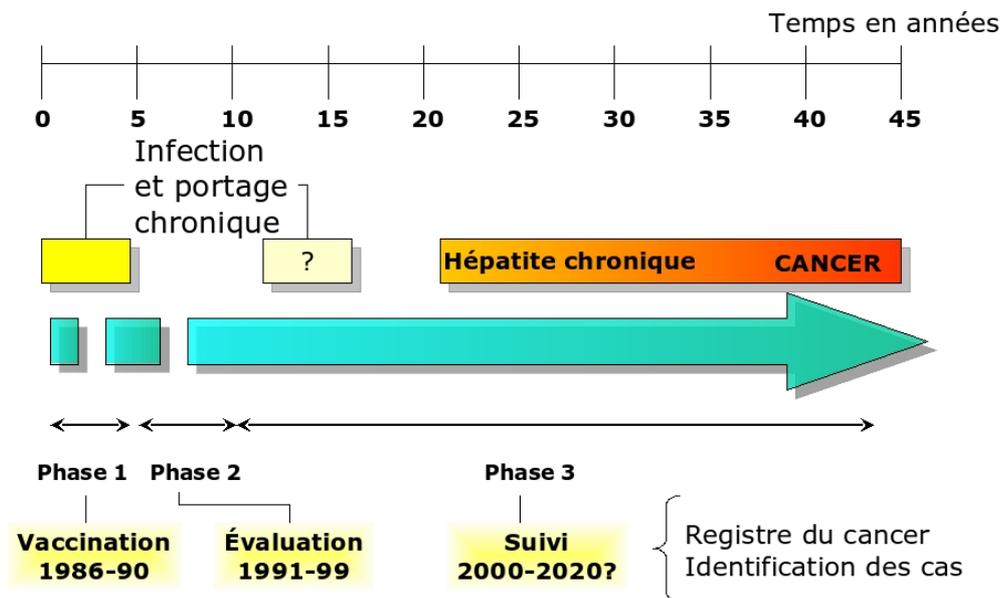


Figure 47 : Conception de l'étude GHIS.

Le but de cette étude est (1) d'évaluer la protection fournie par la vaccination dans la première année de vie contre l'infection primaire par le VHB et le développement du portage chronique et du CHC d'une part, et (2) de démontrer la

faisabilité de l'introduction de la vaccination en Afrique (Montesano 2002). En marge de cette étude d'intervention, le registre national du cancer a été créé avec une couverture de la population urbaine et rurale. Les résultats après 4 ans et 9 ans ont montré que la vaccination protège de la primo-infection à 80% et du portage chronique à 90% (cf. figure 48). L'efficacité de la vaccination contre le développement du CHC devrait être analysée dans les années à venir.

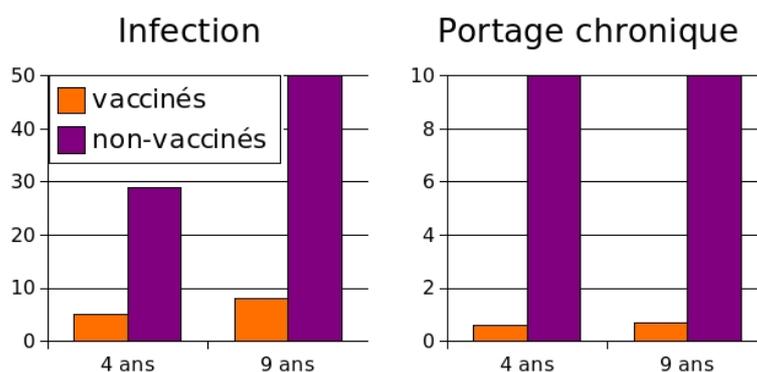


Figure 48 : Pourcentage des enfants inclus dans le GHIS infectés par le VHB (à gauche) et devenus porteurs chroniques du VHB (à droite), 4 ans et 9 ans après l'introduction de la vaccination.

Une étude effectuée sur 29 tumeurs de Gambie et 17 échantillons d'ADN circulant associés a permis de montrer une prévalence de la mutation Ser249 de 35% et une concordance entre la présence de la mutation dans la tumeur et dans l'ADN circulant correspondant de 88,5%. Dans les deux paires discordantes, la mutation a été détectée dans les tumeurs mais pas dans l'ADN circulant (Szymańska *et al.* 2004). Une autre étude portant sur 186 cas de CHC, 98 cas de cirrhose et 348 contrôles, a montré la présence de la mutation Ser249 dans l'ADN circulant de 39,8% des cas de CHC, 15,3% des cas de cirrhose et 3,5% des contrôles (Kirk *et al.* 2005a). Cette étude a été effectuée par une méthode essentiellement qualitative, la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Le risque relatif de développer un cancer a été estimé à 10 (Intervalle de confiance à 95% = IC : 5,16-19,6) chez les porteurs chroniques du VHB, à 13,2 (IC : 4,99-35,0) pour les porteurs de la mutation Ser249. Un seul contrôle était à la fois porteur chronique du VHB et porteur de la mutation Ser249 contre 24,6% des patients cancéreux, ce qui donne un risque relatif de 399 (IC : 48,6-3 270) pour la présence de ces deux facteurs simultanément.

Les mêmes échantillons ont été analysés par une méthode plus sensible et quantitative : le SOMA (Short Oligonucleotide Mass Analysis). Cette méthode utilise la spectrométrie de masse et permet de détecter de faibles quantités de la mutation Ser249. 16% des contrôles, 26% des patients cirrhotiques et 52% des patients atteints de CHC possèdent plus de 2 500 copies d'ADN contenant la mutation Ser249 par mL de plasma. Le risque relatif de développer un CHC est de 3,5 (IC : 1,7-7,2) pour une concentration de la mutation Ser249 dans l'ADN circulant compris entre 2 500 et 9 999 copies mutées/mL de plasma, et de 20 (IC : 5,6-6,9) pour un niveau supérieur à 10 000 copies mutées/mL de plasma (Leonart *et al.* 2005).

Ces résultats montrent que la mutation Ser249 pourrait servir de marqueur moléculaire du CHC en Gambie, et que la détection de ce marqueur dans le sang pourrait servir à des méthodes de diagnostic précoce dans ce contexte particulier.

Objectifs du travail

Le Carcinome Hépatocellulaire (CHC) est le troisième cancer mondial en terme de mortalité. Cette très forte mortalité est essentiellement due à un diagnostic tardif et à l'inefficacité des traitements proposés pour des stades avancés de la maladie. Il existe trois voies principales de recherche afin de remédier à ce problème : prévenir les risques de développer un CHC, améliorer l'efficacité des traitements, et permettre un diagnostic plus précoce de la maladie.

Mon travail entre dans le cadre de la troisième catégorie. Pour permettre la mise en place d'un diagnostic précoce, il faut identifier des marqueurs moléculaires spécifiques au CHC, détectables de façon précoce (bien avant l'arrivée des premiers symptômes) et par des moyens simples. Dans ce cadre, j'ai développé deux types d'études qui traitent de deux aspects différents de la recherche de marqueurs moléculaires du CHC.

A. La mutation Ser249 dans l'ADN circulant de sujets asymptomatiques exposés à l'aflatoxine B1

La première partie de mon travail a consisté à étudier un marqueur potentiel déjà identifié. La mutation au codon 249 du gène suppresseur de tumeur *TP53* (Ser249) est associée à des CHC se développant dans les régions de forte incidence, où l'endémicité du Virus de l'Hépatite B (VHB) est forte et l'exposition à l'aflatoxine B1 (AFB1) très élevée. Les différentes études menées en Gambie, située dans la zone de forte incidence du CHC, nous ont appris que la présence de la mutation dans l'ADN circulant de patients atteints de CHC concorde avec la présence de la mutation dans la tumeur. Nous savons également que la mutation est détectable dans l'ADN circulant de patients atteints de cirrhose, ainsi que chez des sujets sains dans une moindre mesure. La mutation Ser249 pourrait donc être soit un marqueur de la mutagenèse due à l'exposition à l'AFB1, soit un marqueur de tumorigenèse.

Afin de distinguer ces deux hypothèses, nous avons mesuré la quantité de copies d'ADN contenant la mutation Ser249 dans le sérum d'une cohorte de sujets asymptomatiques porteurs chroniques ou non du VHB. Ces sujets ont été identifiés dans des villages de la Gambie rurale où une étude pilote de vaccination contre le VHB a été menée. Le but de ce travail a été d'étudier les facteurs influençant la

présence de la mutation chez des sujets n'ayant pas été diagnostiqués pour une maladie du foie afin d'établir la signification de la présence de la mutation Ser249 dans l'ADN circulant.

B. Criblage de mutations dans les gènes *TP53* et *CTNNB1* dans des CHC dans différentes régions

La seconde partie de mon travail a consisté à cribler des altérations dans des tumeurs de CHC afin d'étudier un lien possible avec l'étiologie du cancer. En effet, avant de déterminer la temporalité de l'apparition de marqueurs et la faisabilité de leur détection précoce, il faut tout d'abord les identifier. La première étape est donc d'étudier les marqueurs potentiels dans les tumeurs. Nous avons choisi deux gènes intervenant chacun dans les deux mécanismes potentiels de l'hépatocarcinogénèse décrits par Laurent-Puig et Zucman-Rossi (2006) : *TP53* et *CTNNB1*. Nous avons mis en place des méthodes de détection de mutations dans l'exon 3 du gène *CTNNB1* et utilisé des méthodes de détection de mutations déjà appliquées au laboratoire pour les exons 4 à 9 du gène *TP53*. Nous avons ainsi étudié la présence de mutations dans ces deux gènes dans des tissus tumoraux ainsi que sur des tissus sains adjacents, d'étiologies différentes et provenant de France et de Thaïlande. Ces deux régions diffèrent par leur contexte d'exposition à l'AFB1, ainsi que par le contexte des infections par les virus des hépatites. Le but de ce travail était de faire un bilan des mutations rencontrées, de confirmer l'exclusion mutuelle des mutations dans les deux gènes, et de relier ces mutations à l'étiologie du CHC afin de trouver des marqueurs moléculaires potentiels.

Résultats

I. La mutation Ser249 dans l'ADN circulant de sujets asymptomatiques exposés à l'aflatoxine B1

A. Contexte

Nous avons vu qu'en Gambie, la mutation Ser249 est détectable dans l'ADN circulant de patients atteints de CHC, et dans une moindre mesure chez des patients cirrhotiques et chez des sujets sains. La présence de la mutation Ser249 a été analysée dans l'ADN circulant de patients de la République Populaire de Chine ayant développé un CHC. Ces patients étaient inclus dans une étude prospective où des échantillons sanguins ont été prélevés chaque année. Pour les patients ayant développé un CHC, les échantillons prélevés antérieurement ont été analysés. Dans environ la moitié des cas, la mutation Ser249 était détectable au moins un an avant le diagnostic, ce qui suggère que la présence de la mutation dans l'ADN circulant pourrait servir de marqueur moléculaire du développement du CHC (Jackson *et al.* 2003). Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons étudié la présence de cette mutation dans de l'ADN circulant provenant de Gambie et nous avons cherché à identifier les facteurs influençant la présence de cette mutation.

Une étude préalable à la campagne de vaccination initiée par le GHIS a été effectuée sur deux villages de la Gambie, Keneba et Manduar (cf. figure 49). La vaccination a été initiée en 1984 dans ces deux principaux villages, ainsi qu'un 3ème plus petit (Katong-Kunda). Des prélèvements sanguins y sont effectués sur toute leur population tous les 4 ans environ, et les facteurs viraux sont contrôlés. Après 14 ans de suivi, la vaccination a montré une efficacité de 82% contre l'infection par le VHB et de 94% contre le portage chronique du virus. Nous avons utilisé du sérum du dernier prélèvement effectué en 2002-2003.

240 échantillons de sérum de porteurs chroniques asymptomatiques ont été identifiés, ainsi que 237 échantillons de non porteurs chroniques appariés sur la date de prélèvement, l'âge et le sexe. Nous avons les données concernant la date de naissance des individus, leur sexe, la date du prélèvement sanguin, le village d'origine, la présence des antigènes viraux HBsAg et HBeAg, et la vaccination.

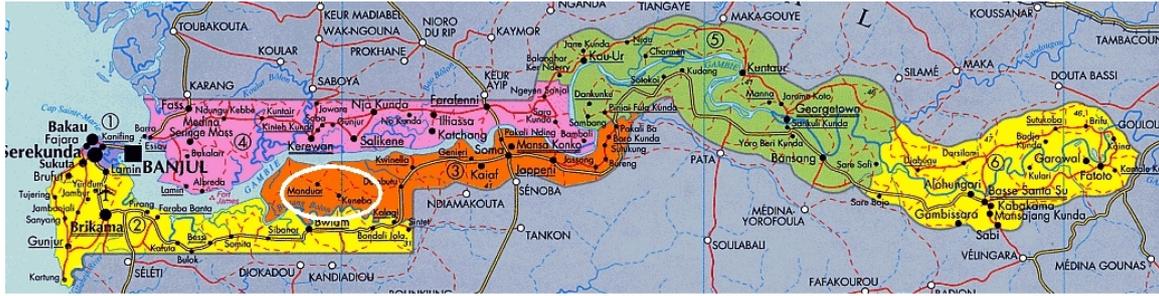


Figure 49 : Carte de la Gambie. Les villages Keneba et Manduar sont entourés en blanc.

B. Étude préliminaire par une méthode qualitative, la RFLP

L'ADN circulant a été extrait à partir du sérum, l'ADN circulant total quantifié par fluorimétrie, l'ADN viral quantifié par PCR en temps réel. Une étude préliminaire a permis de détecter la présence de la mutation Ser249 par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). La RFLP est basée sur la présence d'un site de restriction GGCC aux codons 249 et 250 de *TP53* et qui est modifié par la mutation Ser249 (cf. paragraphe Résultats I.D.1).

L'analyse des échantillons d'ADN circulant de Gambie par cette méthode a permis de montrer que la mutation était présente dans l'ADN circulant de 16% des porteurs chroniques du VHB, alors qu'elle n'a pu être confirmée dans aucun des échantillons provenant des contrôles non porteurs chroniques. De plus, tous les échantillons contenant la mutation ont été prélevés entre les mois de mars et juillet.

Il existerait donc une saisonnalité dans la détection de la mutation Ser249 dans l'ADN circulant, et une synergie entre la présence de la mutation et le portage chronique du VHB.

Afin de vérifier la spécificité de la mutation Ser249 dans ce contexte de forte exposition à l'AFB1 et au VHB, nous avons analysé la présence de mutations au codon 248 du gène *TP53* (souvent muté par des transversions G vers T dans les cancers) et au codon 12 du gène *KRAS* (souvent muté dans les cancers mais rarement dans les CHC).

La présence de mutations au codon 248 du gène *TP53* a été détectée par RFLP. Nous avons mis au point cette méthode, basée sur la restriction de l'enzyme MspI reconnaissant le site constitué par la troisième base du codon 247 et par les 3 bases du codon 248. Sur les 240 échantillons provenant de porteurs chroniques du VHB, 11 ont été trouvés mutés, mais aucun par une transversion G vers T. Huit de ces échantillons mutés possédaient également la mutation Ser249. La présence de mutation au codon 12 du gène *KRAS* a été détectée par ME-PCR (Mutant Enriched PCR), une méthode couramment utilisée au laboratoire et qui consiste en une double RFLP. La modification d'une base au codon 11 permet l'introduction d'un site de restriction reconnu par l'enzyme MvaI et altéré par la présence d'une mutation au codon 12. L'analyse de 62 échantillons provenant des porteurs chroniques prélevés en avril et en décembre, n'a montré aucune mutation. Cette analyse montre que les transversions G vers T au codon 249 du gène *TP53* dans un contexte d'exposition à l'AFB1 sont spécifiques.

C. Résultats de l'étude quantitative

Étant donné que nous avons à disposition au laboratoire une méthode sensible et quantitative, le SOMA (Short Oligonucleotide Mass Analysis), pour la détection de la mutation Ser249, et que la concentration en Ser249 dans l'ADN circulant est corrélée au statut hépatique, nous avons ré-analysé tous les échantillons par SOMA (cf. paragraphe Résultats I.D.2).

Cette analyse a montré la présence de la mutation Ser249 dans 44% des échantillons d'ADN circulant des porteurs chroniques du VHB et 24% des contrôles. Elle a confirmé la variation saisonnière de la concentration en ADN circulant comportant la mutation Ser249 (représentée par le nombre de copies Ser249 par μL de sérum). Chez les porteurs chroniques, la présence de la mutation est détectée entre mars et juillet en plus grande concentration et chez un pourcentage plus important d'individus. Chez les non-porteurs chroniques, la présence de la mutation est essentiellement détectée chez plus d'individus entre mars et juillet mais la quantité

détectée reste faible tout l'année (cf. figure 50). Cette analyse confirme donc qu'il existe une synergie avec le VHB.

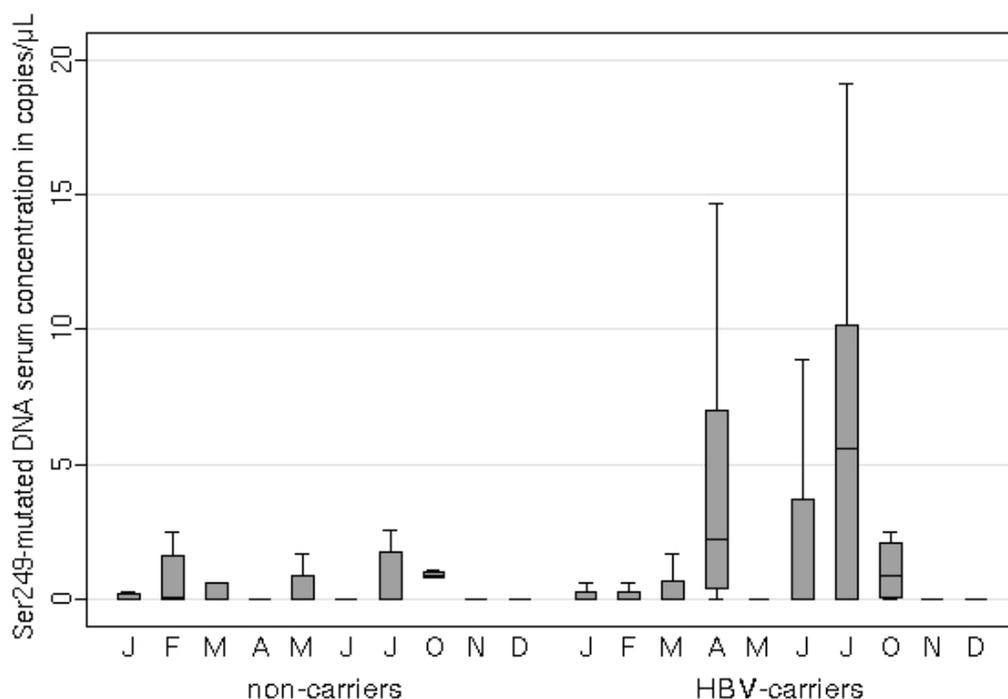


Figure 50 : Concentration en mutation Ser249 dans le sérum en fonction du mois de prélèvement; à gauche chez les non-porteurs chroniques; à droite chez les porteurs chroniques du VHB.

Cependant, aucune corrélation n'a été montrée entre la concentration en mutation Ser249 dans l'ADN circulant et la présence de l'antigène HBeAg, ou la quantité d'ADN viral présent dans le sang. Nous nous sommes alors intéressés à l'effet du génotype des virus. Nous avons séquencé le gène S des virus lorsque l'amplification était possible. Les 99 séquences obtenues et ne contenant aucune ambiguïté ont été alignées avec les séquences publiées du gène S de différents génotypes du VHB. Nous avons trouvé 95 virus de génotype E et 4 de génotype A. Parmi les virus du génotype E, nous avons pu distinguer 3 groupes de variants ayant exactement la même séquence du gène S. Nous avons effectué une analyse statistique afin de déterminer s'il y avait corrélation entre certains variants du VHB et la quantité de mutation Ser249 dans le sérum. En plus des 3 groupes de variants, nous avons regroupé tous les variants contenant une mutation dans la région du "déterminant antigénique a", nous avons également regroupé les variants de génotype A, et finalement, tous les variants qui n'étaient dans aucun autre groupe. Le test statistique

effectué sur ces 5 groupes a montré qu'il existait une corrélation entre les groupes de variants et la concentration en Ser249 dans le sérum ($p=0,019$). Selon le variant majoritaire par lequel un individu est infecté, l'effet synergique entre l'AFB1 et le virus n'est pas le même dans l'acquisition de la mutation Ser249 ou le relargage d'ADN muté.

Afin de confirmer la saisonnalité dans la détection de la mutation Ser249 dans l'ADN circulant, nous avons étudié une cohorte de porteurs chroniques du VHB ayant été traités par différents anti-viraux. Plusieurs prélèvements sanguins ont été effectués sur ces individus afin de suivre l'évolution des marqueurs viraux. Nous avons utilisé des échantillons de sérum de cette étude. Après extraction, nous avons quantifié l'ADN circulant par fluorimétrie et nous avons effectué une étude préliminaire par RFLP de la présence de la mutation Ser249. Cependant, aucune mutation n'a pu être confirmée par cette méthode. Nous avons donc commencé à analyser ces échantillons par SOMA. Les premiers résultats obtenus sur 5 individus montrent qu'il existe bien une variation intra-individuelle de la concentration en Ser249 dans le sérum. Pour ces 5 individus, la plus forte concentration a été enregistrée à une date comprise entre le mois de mars et le mois de juillet.

Nos résultats montrent donc que la concentration en mutation Ser249 dans le sérum de sujets asymptomatiques dépend du portage chronique du VHB, et décrit des variations saisonnières qui suivent le profil d'exposition à l'AFB1. La mesure de cette concentration et de ses variations pourraient servir d'indicateurs de l'exposition du sujet à ces deux facteurs de risque, ainsi que d'indicateur du statut hépatique. Des concentrations faibles et transitoires de la mutation Ser249 dans le sérum pourraient indiquer une exposition transitoire à l'AFB1, alors que des concentrations plus fortes et stables dans le temps pourraient indiquer une forte probabilité d'avoir développé une lésion cancéreuse ou pré-cancéreuse du foie.

D. Méthodes de détection des mutations

D.1. RFLP

Après amplification de l'exon 7 de *TP53*, le produit PCR est digéré par HaeIII qui reconnaît et coupe spécifiquement les sites GGCC. Lorsque le fragment n'est pas muté, on obtient 4 fragments de 11, 12, 92 et 62 pb, et lorsque le fragment est muté sur le site de restriction situé sur les codons 249 et 250, on obtient des fragments de 11, 12 et 154 pb (cf. figure 51). Le fragment non digéré de 154 pb est alors récupéré et séquencé afin de confirmer la présence d'une mutation. Cette méthode permet de détecter la présence de la mutation Ser249 à un taux de 3 à 6% dans un contexte d'ADN sauvage. Chaque échantillon est analysé au moins deux fois afin de confirmer les résultats. Lorsque les résultats sont discordants, les échantillons sont ré-analysés une troisième fois.

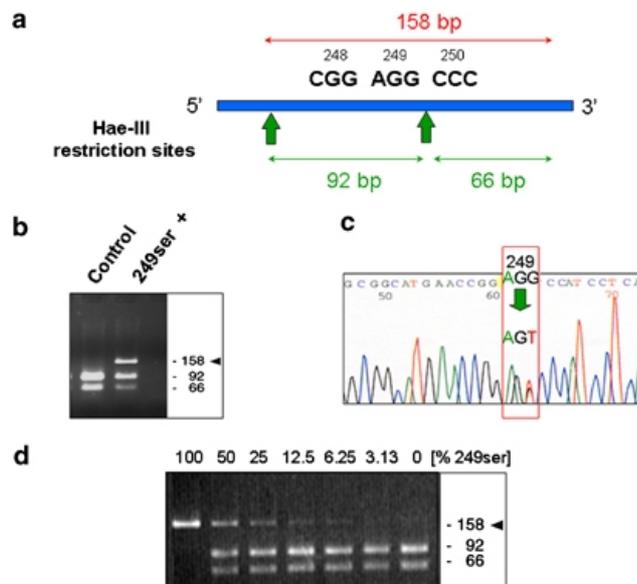


Figure 51 : Méthode de détection de la mutation Ser249 par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). (a) Schéma représentant les fragments obtenus après PCR et digestion par HaeIII lorsque que le codon 249 est sauvage (en bas) ou muté (en haut). (b) Photo de gel d'agarose sur lequel ont été déposés les produits de digestion d'un contrôle sauvage et d'un échantillon d'ADN circulant contenant un mélange d'ADN sauvage et d'ADN muté. (c) Chromatogramme issu du séquençage d'un échantillon d'ADN contenant la mutation Ser249. (d) Résultat de la digestion d'un test de sensibilité de la méthode; le pourcentage de départ d'ADN contenant la mutation Ser249 est indiqué en haut. Tiré de Kirk *et al.* 2005a.

D.2. SOMA

Cette technique consiste en une première amplification par PCR d'un fragment de l'exon 7 du gène *TP53* avec des primers auxquels on ajoute le site de restriction CTGGAG. On amplifie ainsi de l'ADN circulant et une quantité connue d'un plasmide standard contenant les exons 4 à 9 du gène *TP53* et contenant la mutation Ser249 ainsi qu'une transversion G vers T au codon 248. Le produit obtenu est alors digéré par HaeIII, ce qui permet d'éliminer les fragments sauvages au codon 249. Le produit de digestion est alors ré-amplifié par PCR et digéré par GsuI, une enzyme de restriction de type II qui reconnaît le site inséré CTGGAG. On obtient ainsi des fragments de 8 pb contenant les codons 248 et 249 (cf. figure 52). Après purification par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), ces fragments sont analysés par un spectromètre de masse en tandem (cf. figure 53). La méthode a été décrite précédemment par Lleonart *et al.* (2005).

La comparaison des proportions de fragments contenant uniquement la mutation Ser249 et des fragments de standard permettent une quantification précise de la mutation Ser249 de l'ADN circulant.

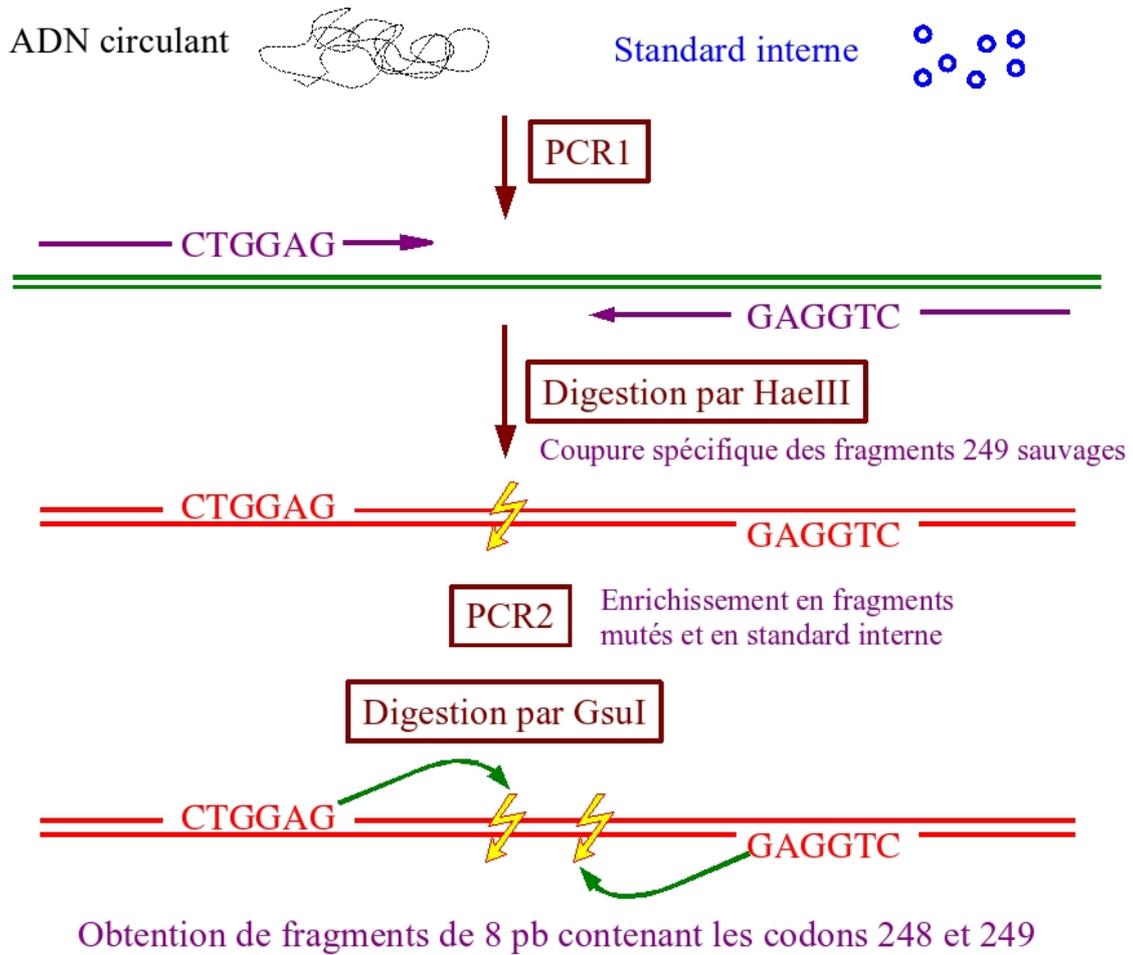


Figure 52 : Principe de la préparation des oligonucléotides à partir d'échantillons d'ADN circulant pour l'analyse par spectrométrie de masse.

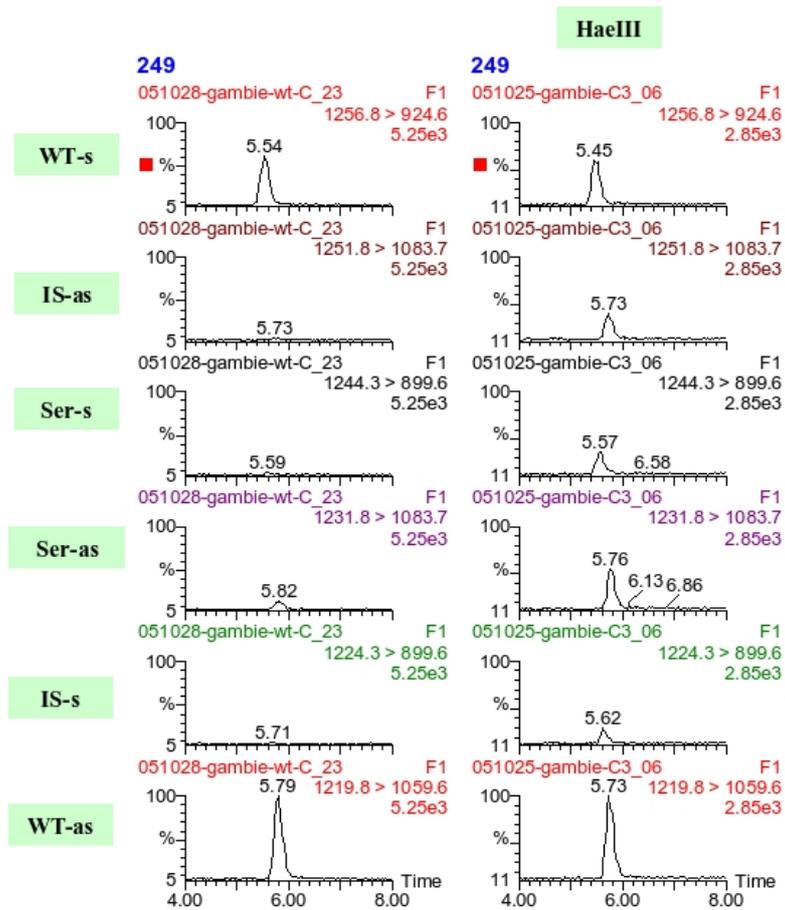


Figure 53 : Résultats bruts pour un échantillon avec ou sans l'étape de digestion par HaeIII. Dans cet exemple la digestion n'est pas complète mais a permis d'enrichir le mélange analysé en oligonucléotides mutés et standards. WT-s : fragment sauvage sens, WT-as : fragment sauvage anti-sens, Ser-s : fragment Ser249 sens, Ser-as : fragment Ser249 anti-sens, IS-s : fragment standard sens, IS-as : fragment standard anti-sens.

E. Article

En préparation.

Serum concentration of *TP53* Ser249-mutated cell-free DNA correlates with hepatitis B virus carrier status and seasonal exposure to aflatoxin B₁ in healthy individuals

Emilie Le Roux¹, Maimuna Mendy², Stéphanie Villar¹, Doriane Gouas¹, Ebrima Bah³, Marlin D. Friesen^{1,4}, Samuel J. McConkey⁵, Helene Norder⁶, Marianne van der Sande⁷, Hilton Whittle² and Pierre Hainaut¹

¹ International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

² Medical Research Council, Fajara, The Gambia.

³ International Agency for Research on Cancer-GHIS project, Fajara, The Gambia.

⁴ Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, USA.

⁵ Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin, Ireland.

⁶ Swedish Institute for Infectious Disease Control, Solna, Sweden.

⁷ National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands.

Hepatocellular Carcinoma (HCC) is common in parts of sub-Saharan Africa and south-east Asia, in a context of chronic infection by Hepatitis B virus (HBV) and dietary exposure to aflatoxins, that contaminate staple foods such as peanuts and maize. These tumours often contain a mutation (Ser249) at codon 249 of the *TP53* tumour suppressor gene (AGG to AGT, Arg to Ser). There is evidence that this mutation results from DNA damage by metabolites of aflatoxin. The mutation is often detected in cell-free DNA in the plasma or serum of HCC patients in areas of high incidence. We have measured serum concentrations of the Ser249-mutated DNA in 477 healthy subjects from a rural area in The Gambia, Western Africa, where exposure to aflatoxin is widespread. Ser249-mutated DNA concentrations were significantly higher ($p < 0.0001$) in chronic HBV carriers (mean 2.7 copies/ μ L, inter-

quartile range [0-1.5]), than in non-carriers (mean 0.8 copies/ μ L, inter-quartile range [0-0]), and exhibited a seasonal variation which followed known seasonal patterns of aflatoxin exposure. Moreover, levels of Ser249-mutated DNA correlated significantly ($p=0.019$) with HBV genotype variants as determined by S gene sequencing. Thus, mutated free circulating DNA is detectable in the serum of healthy subjects with quantitative variations compatible with a joint effect of aflatoxin and HBV, making it a sensitive and quantitative marker of concurrent exposure to both factors.

About 80% of the 600 000 estimated annual cases of HCC occur in low-resource, inter-tropical areas, mainly in Sub-Saharan Africa and South-East Asia¹. The major risk factors, chronic HBV carriage and exposure to Aflatoxin B1 (AFB1) have been classified as Group 1 carcinogens by IARC²⁻³ and exert a multiplicative effect on HCC risk. Both factors are preventable in principle⁴. However, the preventive efficacy of HBV vaccination or of AFB1 exposure control has not yet been fully assessed in high incidence areas. The presence of a specific mutation induced by AFB1 at codon 249 in *TP53* may provide a useful early marker of exposure to AFB1 and hepatocarcinogenesis. AFB1 is metabolized by CYP1A2 and 3A4 in hepatocytes to form an epoxide that binds to the N7 position of guanine, inducing G to T transversions⁵. Such transversions are observed at codon 249 of *TP53* in over 50% of liver tumors from HCC cases⁶. Worldwide, there is a remarkable ecological correlation between exposure to AFB1, incidence of HCC, and prevalence of the Ser249 mutation in liver tumours. We and others have shown that Ser249-mutated DNA is detectable in the plasma of HCC cases from high incidence areas⁷⁻⁸⁻⁹. The plasma of all individuals contains trace levels of free fragments of DNA released by tissues into the bloodstream. In cancer patients, these levels are often increased, providing a promising source of material for early detection of mutations associated with cancer¹⁰. In a prospective study in China, the Ser249 mutation was detected in the plasma of asymptomatic HBV carriers up to 5 years before HCC diagnosis⁹.

In the Gambia, West Africa, chronic HBV carriage is endemic ranging from 11% to 16% of the adult population¹¹. Exposure to AFB1 is widespread and the incidence of HCC peaks at 80/100 000 persons/year in 35-55 year-old males¹². Ser249-mutated DNA is detectable in the plasma of 40% of HCC patients, with a concordance of 88% between plasma and tumour DNA¹³. Plasma Ser249-mutated

DNA is also found in 15% of patients with liver cirrhosis and in 3% of control subjects⁷. The latter observation led us to explore whether the presence of Ser249-mutated DNA in the plasma might be a marker of early liver disease, or, alternatively, a marker of ongoing exposure to AFB1. To assess the significance of Ser249-mutated DNA in the plasma of healthy subjects, we have performed a survey in a cohort of inhabitants of 3 rural villages in The Gambia (Keneba, Manduar and Katong-Kunda). These villages are part of a long-term quadrennial survey program for HBV infection, initiated in the early 1980s as a pilot and sentinel program for the Gambian Hepatitis Intervention Study (GHIS)¹⁴. We have used serum specimens collected during the 2002-2003¹⁵ survey to develop a nested case-control study including 240 HBV carriers (HBV+) and 237 non-carriers (HBV-) matched by date of sampling, age and sex. HBV carriage was determined by persistence of HBsAg for more than six months in the serum. All participants provided informed consent and were asymptomatic for chronic liver disease at the time of sampling, although no detailed clinical assessment of their liver status was conducted. The study was approved by national and institutional ethical committees. DNA was extracted from serum and the serum DNA concentration, the HBV DNA concentration, and the Ser249-mutated DNA concentration were measured as previously described (see supplementary data).

Table 1 shows the characteristics of study participants. In line with previous surveys¹⁶, a higher proportion of HBV carriers was detected in Manduar, although this long history of higher carriage is not explained (data not shown). There was an inverse association between HBV vaccination and HBV carrier status. The replication activity of the virus (determined by the presence of HBeAg and by the quantity of viral DNA) was higher in younger carriers as well as in the few vaccinated subjects who nonetheless became carriers (data not shown). Higher viral loads in younger subjects is a well established characteristic of chronic infection by HBV genotype E, the predominant genotype in West Africa¹⁷. Moreover, serum DNA concentrations in HBV carriers tended to be higher than in non-carriers (\log_{10} of DNA concentration in ng/ μ L: mean of -1.78 and variance of 0.29 for HBV+, mean of -1.59 and variance of 0.29 for HBV-, p -value<0.0001), an observation that may reflect higher DNA release due to inflammation or damage in the liver caused by the virus.

Quantification of serum Ser249-mutated DNA (expressed in copies/ μ L) was performed using the quantitative SOMA (Short Oligonucleotide Mass Analysis)

method described previously⁸ (see supplementary data). Presence and mean serum concentrations of mutated DNA were significantly correlated (p -value <0.0001) with HBV carriage (Table 1), with 45% of HBV+ samples containing detectable levels of mutated DNA, compared to 25% of HBV- samples (33% and 17% above the limit of determination of the method, respectively). Figure 1 shows the distribution of mutant DNA concentration in HBV carriers and non-carriers over a 12-month sampling period (Samples could not be collected during August and September.). Seasonal variation was observed, with a higher proportion of subjects having detectable serum levels of Ser249-mutated DNA when sampled between March and July. This trend was significant in both HBV carriers and non-carriers, but was more marked in carriers (correlation test between Ser249-mutated DNA concentration and month of sampling: all samples: p -value=0.001; HBV+: p -value=0.0001; HBV-: p -value=0.032). There was no correlation between serum Ser249-mutated DNA levels and village of origin, age, sex, vaccination status, HBe status or serum concentration of viral DNA (data not shown). Furthermore, we found a correlation between serum Ser249-mutated DNA and serum DNA concentration, but when carriers and non-carriers were examined separately, there was no more correlation, indicating that the correlation seen for all subjects is solely due to HBV carriage (data not shown).

Exposure to AFB1 has been extensively documented in these villages. Surveys have shown that the exposure is high, widespread and homogeneous among villages. Furthermore, there is a seasonal variation in the level of AFB1-albumin adducts, reflecting the seasonal character of exposure to AFB1 through the diet (66.5 pg AFB1-lysine adducts equivalents per mg albumin for weeks 1 to 6, 57.2 for weeks 7 to 12, 43.3 for weeks 13 to 24 and 30.1 for weeks 25 to 31, data were not available for weeks 32 to 52)¹⁸. AFB1 accumulates in foodstuffs (principally groundnuts) after harvest in September-October to reach a peak in January-February. Levels of AFB1-albumin adducts decrease during spring to reach their lowest levels at the next harvest. This complex trend is thought to reflect both the pattern of consumption of groundnuts (which is the major component of the diet in the dry season) and their level of contamination by AFB1 (which increases with storage in hot, humid conditions)¹⁹ The seasonal variation we observe in the Ser249-mutated DNA serum concentration follows these trends and indicates that mutant DNA serum levels peak 2-3 months after the period of maximal exposure to AFB1. This lag is compatible

with the hypothesis that the presence of mutated DNA in the serum is the end-product of a process involving exposure, metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis, cell renewal and release into the blood of cell debris having acquired the Ser249 mutation. To verify whether substantial seasonal variations can occur in Ser249-mutated DNA serum levels of chronic carriers, we analysed specimens from 5 subjects out of 65 who were recruited and longitudinally followed-up for a mean of 15 months in the context of a trial of different modalities of anti-viral therapy²⁰. In these five subjects Ser249-mutated DNA was detected and the mutated DNA serum concentration showed strong seasonal variation. In 3 of these 5 subjects, the peak Ser249-mutated DNA serum concentration was observed in July, whereas it was in April and May in the two other subjects. These individual variations are consistent with the seasonal variation described in Figure 1.

The observation that Ser249-mutated DNA serum concentrations were substantially higher in HBV carriers indicates that a synergy occurs between viral infection and mutagenesis by AFB1. However, the viral replication activity or the viral load did not seem to influence the presence or level of Ser249-mutated DNA in the serum. To gain further insights in the viral factors that may affect the occurrence of Ser249-mutated DNA in the serum, we sequenced the entire S gene of the HBV DNA. The serum DNA of all carriers was amplified by PCR. Non-ambiguous sequences were obtained for 99 subjects. Among these sequences, 95 were of genotype E as expected, and 4 of genotype A. We further classified the genotype E sequences in 5 subgroups. All samples with exactly the same HBV S gene sequence were grouped together (giving subgroups 1, 2 and 3). One group was defined by samples with a strain mutated in the main antigenic determinant of HBV, and one with all the other strains (Table 2 and supplementary data). The distribution of individuals positive for serum Ser249-mutated DNA was significantly different among the sequence groups. In particular, group 3 sequences were associated with zero or very low levels of mutant DNA. This observation suggests that the nature and strength of the synergistic interaction between HBV infection and exposure to AFB1 may depend upon particular properties of viral strains. However, the mechanisms behind these differences remain to be elucidated.

Experimentally, the formation of DNA adducts and/or G to T transversions after exposure to AFB1 is not restricted to codon 249 of *TP53*. Therefore, we sought

to determine whether mutations could also be detected in the serum DNA at codon 248 in *TP53* (a common site for G to T transversions in several cancers) and at codon 12 in *KRAS* (a common oncogenic mutation rarely found in liver cancer). Specimens from carriers were analysed by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) for mutations at codons 248 or 249 by or Mutant-enriched (Me-) PCR for mutations at codon 12 of *KRAS*, and confirmed by direct sequencing (data not shown). In both cases, guanines of these codons are in a sequence context compatible with those known to be targeted by AFB1, and codon 248 in *TP53* has been shown to bind AFB1 metabolites *in vitro*²¹. No *KRAS* mutation was found in a subset of 62 carriers analysed. Mutations at codon 248 were detected in 11 carriers (5%), none were G to T transversions. Interestingly, 8 of these 11 carriers also harboured a mutation at codon 249 (72%). These results suggest that mutagenesis due to AFB1 exposure in a context of chronic HBV carriage is relatively specific for codon 249 of *TP53*.

This study is the first, large-scale analysis of *TP53* mutations in the serum of healthy subjects exposed to a specific mutagen. It demonstrates that Ser249, a mutation considered a “signature” of DNA damage induced by AFB1, is detectable in the serum of subjects who are HBV carriers, with seasonal variations reflecting exposure to AFB1. This conclusion is compatible with those of a recent study in which *TP53* mutation at codons 248 and 249 were quantified in plasma DNA from smokers with or without lung cancer, which showed a correlation between ratio of mutant DNA and smoking status in both healthy and cancer-bearing subjects²². The detection of high serum concentrations of mutant *TP53* DNA suggests that mutagenesis occurs at a high rate, illustrated by the release of several millions of genomes containing mutant *TP53* into the bloodstream. Thus, the occurrence of a Ser249 mutation in a given cell is in no way sufficient to initiate carcinogenesis, and additional events are required to allow cells carrying the mutant to survive and progress towards malignancy. Interestingly, Ser249-mutated DNA was detectable at much higher serum concentrations in HBV chronic carriers than in non-carriers, independently of the replication activity of the virus. This observation suggests that either liver cell DNA is released in the bloodstream at a higher rate in carriers than in non-carriers, or that the mutagenic activity of AFB1 is enhanced in the context of chronically infected liver cells. This second mechanism is consistent with studies

showing that HBV chronic status may enhance AFB1 metabolism, decrease detoxification and decrease DNA repair²³. Thus, the synergy between AFB1 and HBV carriage in causing HCC may occur through a mechanism that enhances the formation of Ser249 *TP53* mutations well ahead of the development of a neoplastic lesion.

In a recent case-control study, we have shown that Ser249-mutated DNA plasma concentrations were correlated with liver status⁸. High plasma concentrations (>10 copies/ μ L) were highly correlated with HCC status (crude OR [95% CI] = 20 [5.6-69]), whereas intermediate plasma concentrations showed a similar tendency for association with HCC or with cirrhosis. Together, the results of that case-control study and those presented here suggest that both the level and the temporal variations in Ser249-mutated DNA plasma concentrations may be useful as indicators of liver status and predictors of liver cancer. Low, transient plasma concentrations are likely to represent transient exposure to AFB1, whereas high and sustained plasma concentrations should be taken as indicative of a high probability of cancer or pre-cancer lesion. This hypothesis remains to be assessed in large, prospective cohort studies.

References

1. Stewart B.W., Kleihues P. World cancer report. *IARC press*, Lyon, France (2003).
2. IARC. Hepatitis viruses. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. **59**, 45-164 (1994).
3. IARC. Some naturally occurring substance: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. **56**, 245-395 (1993).
4. Wild C.P., Hall A.J. Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. *Mutat. Res.* **462**, 381-393 (2000).
5. Wild, C.P. *et al.* The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*. **17**, 471-481 (2002).
6. Smela M.E., Currier S.S., Bailey E.A., Essigmann J.M. The chemistry and biology of aflatoxin B1: from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*. **22**, 535-545 (2001).

7. Kirk, G.D. *et al.* 249^{ser} TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B viral infection, and risk of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. **24**, 5858-5867 (2005).
8. Lleonart, M.E. *et al.* Quantitative analysis of plasma TP53 249Ser-mutated DNA by electrospray ionization mass spectrometry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **14**, 2956-2962 (2005).
9. Jackson, P.E. *et al.* Prospective detection of codon 249 mutations in plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Carcinogenesis*. **24**, 1657-1663 (2003).
10. Gormally, E. *et al.* Amount of DNA in plasma and cancer risk: a prospective study. *Int J Cancer*. **111**, 746-749 (2004). Erratum in: *Int J Cancer* **119**, 476 (2006).
11. Kirk, G.D. *et al.* Molecular epidemiology of human liver cancer: insights into etiology, pathogenesis and prevention from The Gambia, West Africa. *Carcinogenesis*. **27**, 2070-2082 (2006).
12. Bah E., Parkin D.M., Hall A.J., Jack A.D., Whittle H. Cancer in The Gambia: 1988-97. *Br. J. Cancer*. **84**, 1207-1214 (2001).
13. Szymanska, K. *et al.* Ser-249TP53 mutation in tumour and plasma DNA of hepatocellular carcinoma patients from a high incidence area in The Gambia, West Africa. *Int J Cancer*. **110**, 374-379 (2004).
14. GHIS. The Gambia Hepatitis Intervention Study. The Gambia Hepatitis Study Group. *Cancer Res*. **47**, 5782-5787 (1987).
15. van der Sande M.A.B., Waight P., Mendy M., Rayco-Solon P., Hutt P., Fulford T., Doherty C., McConkey S.J., Jeffries D., Hall A.J., Whittle H.C. Long-term protection against carriage of hepatitis B virus after infant vaccination. *J. Infect. Dis*. **193**, 1528-1535 (2006).
16. Whittle H.C., Maine N., Pilkington J., Mendy M., Fortuin M., Bunn J., Allison L., Howard C., Hall A. Long-term efficacy of continuing hepatitis B vaccination in infancy in two Gambian villages. *Lancet*. **345**, 1089-1092 (1995).
17. Norder H., Couroucé A-M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S-D., Mushahwar I.K., Robertson B.H., Locarnini S., Magnius L.O. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. **47**, 289-309 (2004).
18. Wild, C.P. *et al.* Environmental and genetic determinants of aflatoxin-albumin

- adducts in The Gambia. *Int J Cancer*. **86**, 1-7 (2000).
19. Gan L.S., Skipper P.L., Peng X.C., Groopman J.D., Chen J.S., Wogan G.N., Tannenbaum S.R. Serum albumin adducts in the molecular epidemiology of aflatoxin carcinogenesis: correlation with aflatoxin B1 intake and urinary excretion of aflatoxin M1. *Carcinogenesis*. **9**, 1323-1325 (1988).
 20. Mendy M.E., Kaye S., van der Sande M., Rayco-Solon P., Waight P.A., Shipton D., Awi D., Snell P., Whittle H., McConkey S.J. Application of real-time PCR to quantify hepatitis B virus DNA in chronic carriers in The Gambia. *Virology*. **3**, 23-29 (2006).
 21. Denissenko, M.F. *et al.* Quantitation and mapping of aflatoxin B1-induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin B1-8,9-epoxide and microsomal activation systems. *Mutat Res*. **425**, 205-211 (1999).
 22. Hagiwara, N. *et al.* Quantitative detection of p53 mutations in plasma DNA from tobacco smokers. *Cancer Res*. **66**, 8309-8317 (2006).
 23. Kew, M.C. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver Int*. **23**, 405-409 (2003).

Acknowledgements

Blood samples and data collection was financed by MRC, Fajara, The Gambia. The longitudinal study was funded by the Wellcome Trust, London, through a grant to Oxford University. Emilie Le Roux was financed by Université Claude Bernard Lyon 1. We thank Mathieu Boniol for his help with statistical analysis, Dr. Isabelle Chemin (INSERM U271) for her help with HBV molecular analysis, and the following MRC staff: Pauline Wraight for data management, Adam Jeng-Barry and Alasana Bah for laboratory assistance and Pura Rayco-solon and field staff at Dunn Nutrition unit, Keneba.

Figures and Tables

Table 1 : Descriptive characteristics of participants of the study grouped by their HBsAg status, and Ser249-mutated DNA concentration results.

HBV carriage		Yes	No
Number of subjects		240	237
Mean age in years [Range]		30 [4-68]	30 [4-69]
Sex	Men (%)	111 (46)	108 (46)
	Women (%)	129 (54)	129 (54)
Marker of viral replication	HBeAg+ (%)	27 (11)	-
	HBeAg- (%)	213 (89)	-
	Unknown (%)	2 (1)	-
Vaccination	Yes (%)	17 (7)	105 (44)
	No (%)	221 (92)	132 (56)
Village	Keneba (%)	90 (37)	124 (52)
	Manduar (%)	97 (41)	66 (28)
	Katong-Kunda (%)	41 (17)	36 (15)
	Other (%)	12 (5)	11 (5)
Concentration of Ser249-mutated DNA in copies/ μ L of serum	Mean [IQR] (% of samples above determination level)	2.7 [0-1.5] (33)	0.8 [0-0] (175)

Table 2 : Serum concentrations of Ser249-mutated DNA by HBV genotype subgroup. Det 'a' group refers to the subgroup of Genotype E strains mutated in the determinant 'a' antigenic region.

HBV sub group	Number of samples	Median of Ser249 concentration in copies/ μ L of serum	Inter-Quartile Range
Genotype E Group 1	8	2.0	[0.3-16.5]
Genotype E Group 2	17	3.1	[0-5.2]
Genotype E Group 3	16	0	[0-0]
Genotype E Det 'a' group	8	0	[0-2.4]
Genotype E All other strains	46	0.2	[0-3.8]
Genotype A	4	0	[0-0.2]
Overall	99	0.2	[0-3.6]

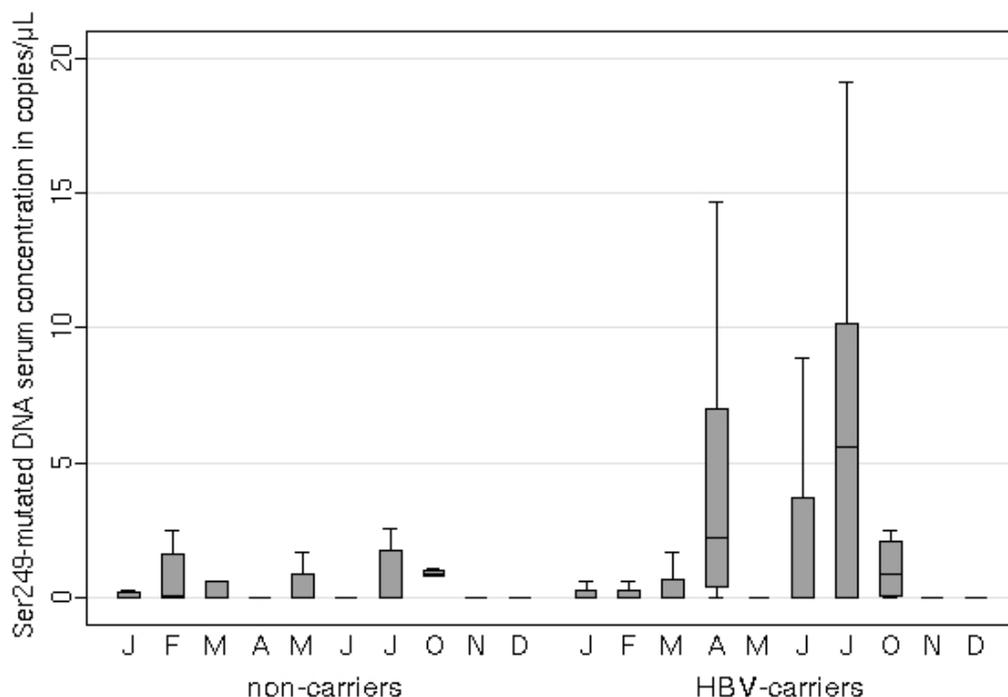


Figure : Monthly distribution of Ser249-mutated DNA serum concentrations (copies/ μ L) for HBV-carriers and non-carriers. Boxes represent inter-quartile range (IQR) from 25th percentile (Q1) to 75th percentile (Q3). Median is represented by a line in the box. Whiskers represent the first value under $Q3+1.5*IQR$, and the first value above $Q1-1.5*IQR$.

Supplementary data

Serology

Subjects were tested for HBV core antibody (anti-HBc) and, if indicated, HBV surface antigen (HBsAg) and HBV e antigen (HBeAg). Anti-HBc was measured by radio-immunoassay (RIA) (Sorin Biochemica) AB-COREK test kit. Anti-HBc positive samples were tested for HBsAg by reverse passive haemagglutination assay (RPHA) (Wellcotest®, Murex Diagnostics) and/or by Determine™ HBsAg (Abbott Laboratories), an immunochromatographic assay. HBsAg positive subjects were tested for HBeAg using an enzyme immunoassay (EIA) (Equipar Diagnostici).

DNA extraction and quantification

DNA was extracted from 300 μ L (for HBV-carriers samples) and 100 μ L (for non-carrier controls) of serum when the volume was available. Volumes were adjusted

with PBS when necessary. Extractions were performed using the QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) and corresponding protocol. DNA was eluted in 200 μ L of elution buffer and 100 μ L respectively.

Quantification of extracted DNA was performed by fluorimetry assay using picogreen (Interchim).

Quantification of Ser249-mutated DNA by SOMA

Internal standard

We have used an internal standard plasmid as described previously (Llenoart *et al.* 2006). This standard was prepared from a pBluescript SK (-) plasmid (Stratagene) into which a 5,765 base-pair segment of the human *TP53* gene delimited by the end of intron 3 and the beginning of intron 10 has been inserted. This segment contains two point mutations: a G to T transversion at the third base of codon 249 and a G to C transversion at the third base of codon 248.

PCR amplifications and digestions

228 copies of internal standard plasmid and 10 μ L of serum extract, were amplified for 38 PCR cycles in a total volume of 25 μ L containing 2.5 μ L of 200 mM Tris-HCl (pH 4.8), 0.6 μ L of 50 mM MgCl₂, 3 μ L containing 1.7 mM each of the 4 dNTPs, 0.3 μ L of 5 U/ μ L Taq-Platinum (Invitrogen), 0.5 μ L of forward and reverse primers at 350 ng/ μ L and water to complete up to 25 μ L. Primers used were: 5'-GGTGTGTTGTGGGGAGGGGGTTCTGGAGTTTAGGAAGTATAGTT-3' and 5'-AACCACTAAACACACAACCTACTGGAGAAAACCAATAAAAA-3' into which we have inserted CTGGAG recognition sequence for the type II restriction enzyme GsuI (Fermentas).

Thermal cycling conditions were 95°C for 2 min, followed by 38 cycles of 94°C for 30 sec, 65°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec.

The first restriction digestion was carried out with 10 μ L of the amplified DNA mixture and 1 μ L buffer M 10 X and 1 μ L of 10 U/ μ L HaeIII (Roche). The final volume of 12 μ L was incubated at 37°C overnight. This step preferentially digests wild-type DNA fragments, enriching the mixture in mutated and internal standard fragments.

10 μ L of the first digestion product were then re-amplified using the same conditions and number of cycles as for the first PCR amplification.

A second restriction digestion was carried out with the 25 μ L of amplified PCR product and 2 μ L of 5 U/ μ L GsuI, 5 μ L of a mixture of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL BSA and water to complete up to 55 μ L. The mixture was incubated at 30°C overnight. This procedure produces 8-mer DNA fragments containing both codons 248 and 249.

Purification of oligonucleotides

The GsuI digestion products were purified by Phenol/Chloroform and precipitated with ethanol and ammonium acetate (Sigma) (to minimize the level of sodium adduct ions) as described previously (Lleonart *et al.* 2006). Further purification was performed by HPLC (CapLC, Waters-Micromass) , coupled to the mass spectrometer, as previously described (see Lleonart *et al.* 2006).

Mass spectrometric analysis of oligonucleotides

Upon elution from the HPLC, 8-mer oligonucleotides were analysed by electrospray ionization/ tandem mass spectrometry (Waters-Micromass). The mass spectrometer was programmed to acquire data in the Selected Reaction Monitoring mode, monitoring six mass and sequence-specific Collision Induced Dissociation ion fragments corresponding to the sense and antisense wild-type, Ser249-mutated and internal standard oligonucleotides. A 7-point calibration curve was used to quantify the serum concentrations of the oligonucleotides. The limit of determination of the method was determined to be below 1 copy Ser249-mutated DNA/ μ L serum (Lleonart *et al.* 2006).

HBV DNA quantification

5 μ L of serum extract was added to a 25 μ L PCR reaction mixture and amplified using a commercial SYBR-Green protocol (Qiagen). The kit contains HotStarTaq polymerase. The primer sequences were 5'-GTGTCTGCGGCGTTTTATCA-3' (sense) and 5'-GACAAACGGGCAACATACCTT-3' (antisense) designed to amplify a 98 base pair product from positions 379 to 476 of the HBV genome. Thermal cycling

was performed in an ABI 5700 sequence detection system (PE Applied Biosystems). Reactions were: 95°C for 15 min followed by 40 cycles of 94°C for 15 sec, 55°C for 30 sec and 72°C for 30 sec. A four point standard curve (1.5×10^8 copies per mL(cpm), 1.5×10^6 cpm, 1.5×10^4 cpm, 1.5×10^2 cpm) was generated from a high titre plasma donation quantified by end point dilution PCR. The accuracy of this calibration curve was confirmed by analysis of an International HBV DNA standard (NIBSC). Test samples falling above the top of the standard curve were re-assayed at a dilution of 1:100. Each test run included positive and negative controls. The performance of the assay was evaluated by comparison with a commercial assay (HBV Monitor, Roche Molecular Systems) performed according to the manufacturer's instructions.

HBV S gene sequencing

For the first PCR reaction, we used Hotstar Taq (Qiagen). 1.5 μ L of Buffer 10 X, 3 μ L of Q solution 5 X, 0.6 μ L of dNTP 5 mM, 0.6 μ L of each primers Pol1 (5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTCA-3') and Por v2 (5'-AAAGCCCAAAGACCCACAAT-3') 10 μ M, 0.1 μ L of Hotstar Taq 5U/ μ L, 5 μ L of serum extract and water up to 15 μ L. Thermal cycling conditions were: 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 1 min.

When no amplification was detected, we performed a hemi-nested PCR. We used Hotstar Taq from Qiagen. 2,5 μ L of Buffer 10 X, 5 μ L of Q solution 5 X, 1 μ L of dNTP 5 mM, 1 μ L of each primers SHBV123s (5'-TCGAGGATTGGGGACCCTG-3') and Por v2 10 μ M, 0.2 μ L of Hotstar Taq 5 U/ μ L, 1 μ L of reaction products from first PCR amplification and water up to 25 μ L. Thermal cycling conditions were: 95°C for 15 min, followed by 30 or 45 cycles of 95°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, and 72°C for 1 min.

When amplification was detected, we purified the PCR products by mixing 5 μ L of PCR product with 1.5 μ L of ExoSAP-IT (Amersham) and incubating for 15 min at 37°C then 15 min at 80°C.

Purified DNA was mixed with 1.5 μ L of Big Dye (Big Dye Terminator v1.1 cycle sequencing kit, Applied Biosystems), 1.25 μ L of Buffer 5 X, 1 μ L of primer 5 μ M.

Conditions for the sequencing reaction (30 cycles) were as follows: 95°C for 10 sec, 50°C for 5 sec and 60°C for 4 min. We performed 3 different reactions with each of the primers: SHBV123s, Por v2, and SHBV778r (5'-GAGGTATAAAGGGACTCAAG-3').

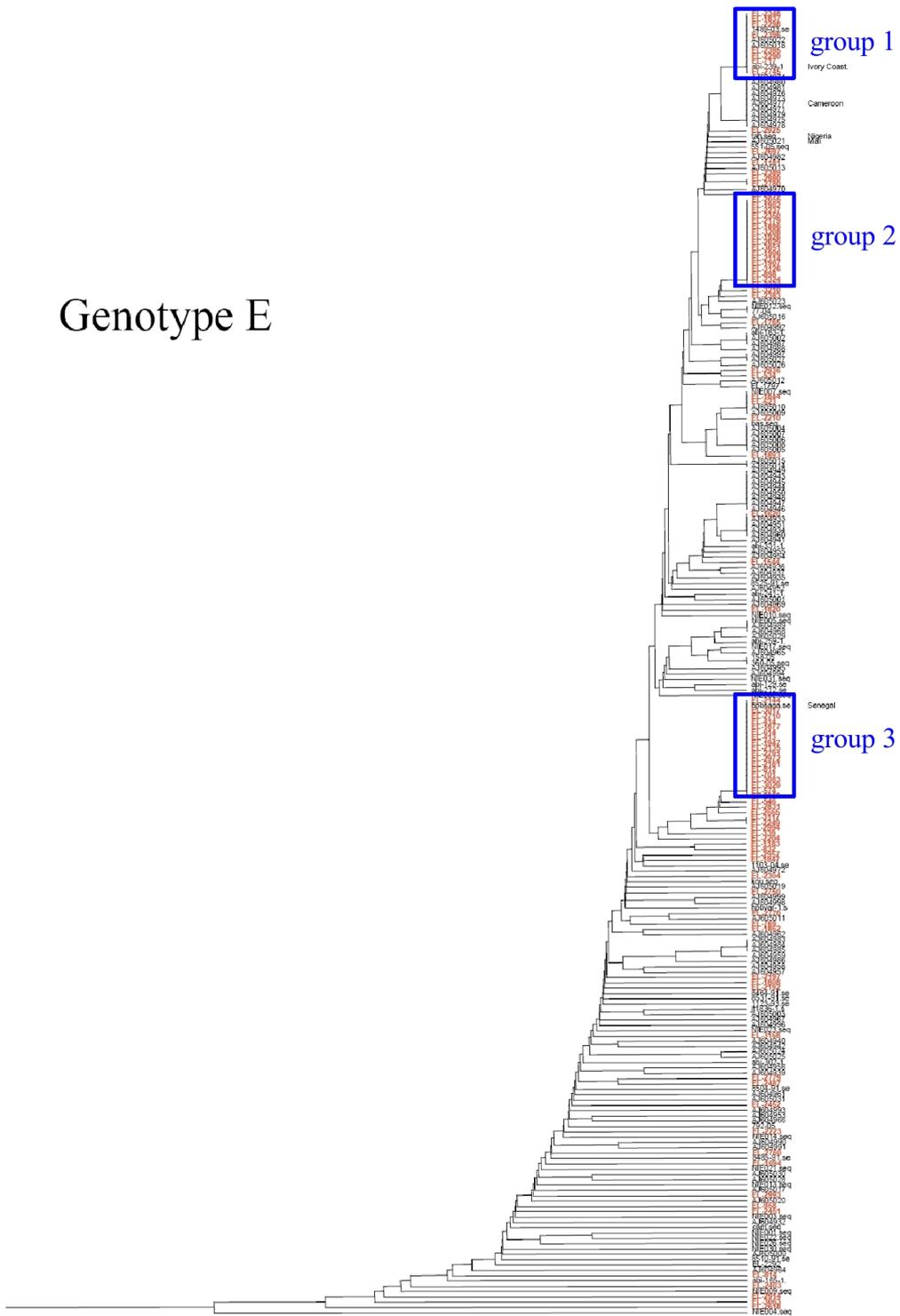
Sequencing reaction products were purified by filtration on G50 resin (Sephadex), then analysed by automatic sequencer (ABI PRISM, 3100 Genetic Instrument, 16 capillaries, Applied Biosystems).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using STATA™ 9.1. Correlation between serum concentration of Ser249-mutated DNA and other factors were tested by Kruskal-Wallis test for categorical variables (HBsAg status, month of sampling, sex, village, vaccination status, HBeAg status and HBV subgroup) and by Spearman test for continuous variables (age, DNA concentration, HBV DNA concentration).

HBV S gene sequences dendrograms

Genotype E



Genotype A



In red, our HBV S gene sequences. In blue, sub groups of sequences.

II. Criblage de mutations dans les gènes *TP53* et *CTNNB1* dans des CHC de différentes régions

A. Contexte de l'étude

Deux grands mécanismes d'hépatocarcinogénèse ont été proposés, dont l'un passe par la mutation du gène *TP53* et l'autre par la mutation du gène *CTNNB1* (cf. paragraphe III.A.2). La présence de mutations dans l'un ou l'autre de ces gènes dépend de l'origine géographique et de l'étiologie du CHC. Notamment, le contexte d'exposition à l'AFB1 joue un rôle prédominant quant à la présence de la mutation Ser249 du gène *TP53*.

Les mutations de ces deux gènes sont bien connues en France où l'exposition à l'AFB1 est nulle, mais leur spectre est inconnu en Thaïlande où l'exposition à l'AFB1 est moyenne (avec en moyenne 12 pg d'adduit AFB1 par mg d'albumine, Montesano *et al.* 1997, Hollstein *et al.* 1993).

Nous avons voulu établir le spectre des mutations des CHC provenant de Thaïlande, et confirmer celui des CHC provenant de France, et les relier aux différentes étiologies. Nous avons également voulu déterminer si les mutations des gènes *TP53* et *CTNNB1* sont mutuellement exclusives conformément au modèle de l'hépatocarcinogénèse décrit précédemment.

Le but de cette analyse est de dresser un bilan des différents spectres de mutations présentes dans les CHC de différentes provenances géographiques, et d'établir des relations notamment avec l'étiologie du cancer afin de déterminer si ces mutations pourraient être utilisées comme marqueurs spécifiques du CHC ou spécifiques d'un mécanisme d'hépatocarcinogénèse.

B. Criblage des mutations de *TP53* et *CTNNB1* par DHPLC

Nous avons participé à deux études. La première étude a porté sur des échantillons de tissus tumoraux provenant de 26 patients de Thaïlande atteints de CHC. Chez 22 de ces patients, un échantillon de tissu adjacent non tumoral était

également disponible. Parmi ces 26 patients, 19 (73%) étaient infectés par le VHB (dont 5 par une infection occulte), 4 (15,4%) par le VHC (dont 3 avaient une co-infection VHB/VHC). La seconde étude a porté sur des échantillons tumoraux et de tissu adjacent de 62 patients atteints de CHC, dont 10 provenaient de Thaïlande (et étaient déjà inclus dans la première étude) et 52 de France, et sur 9 tissus de foies normaux. Parmi les cas de CHC provenant de France, 9 (17%) étaient dus à une infection par le VHB et 20 (38%) par le VHC.

La première étude avait pour but de décrire les caractéristiques des principales étiologies virales à l'origine des CHC en Thaïlande et de relier ces étiologies à des mutations dans les gènes *TP53* et *CTNNB1*. La seconde étude avait pour but de décrire les dérégulations dans la voie Wnt en amont de la β -caténine et notamment des récepteurs Frizzled, des co-récepteurs, des activateurs et des inhibiteurs de la voie. Nous avons regardé plus précisément si ces dérégulations pouvaient être associées aux mutations des gènes *TP53* et *CTNNB1*.

Nous avons recherché des mutations dans les exons 4, 5-6, 7, et 8-9 du gène *TP53* ainsi que dans l'exon 3 de gène *CTNNB1* par DHPLC. Nous avons également recherché la présence de délétions entre les exons 2 et 4 de *CTNNB1*. Les méthodes de détection de mutations du gène *TP53* sont couramment utilisées au laboratoire. Pour le gène *CTNNB1*, nous avons mis au point les méthodes correspondantes (cf. paragraphe Résultats II.F).

La méthode de criblage utilisée pour des échantillons de tissu est la DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography). Cette méthode de chromatographie sur colonne est basée sur la différence de stabilité des homoduplexes (fragments PCR constitués de deux brins identiques) et des hétéroduplexes (fragments PCR constitués de deux brins dont l'un est sauvage et l'autre muté), qui ont des profils d'élution différents. Les échantillons ayant un profil muté ont été séquencés afin de déterminer la mutation.

C. Résultats

Dans les échantillons provenant de Thaïlande, des mutations dans le gène *TP53* ont été détectées dans 9 cas sur 26 (34,6%), dont 7 mutations Ser249, une au codon 278 (CCC vers CTC, Proline vers Arginine) et une au codon 331 (CAG vers CAT, Glutamine vers Histidine). Des mutations dans l'exon 3 du gène *CTNNB1* ont été détectées dans 6 cas (23%) au niveau des sites de phosphorylation (des sérines ou des thréonines des points chauds de mutation). Parmi tous les cas mutés, 4 contenaient des mutations dans les deux gènes (cf. figure 54). Les mutations dans le gène *TP53* sont associées à l'infection par le virus de l'hépatite B, alors que les mutations dans le gène *CTNNB1* ne sont associées à aucune étiologie particulière, ce qui peut être dû au faible nombre d'échantillons analysés. Aucune mutation n'a été détectée dans les échantillons non-tumoraux.

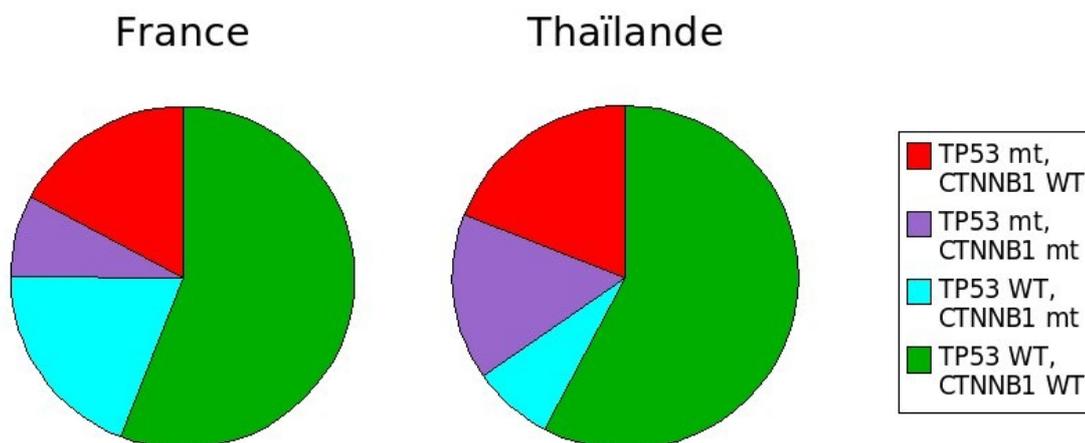


Figure 54 : Répartition des mutations des gènes *TP53* et *CTNNB1* dans les CHC de Thaïlande et de France.

Dans les échantillons provenant de France, des mutations dans le gène *TP53* ont été détectées dans 13 cas (25%) dont 44% des cas dus au VHB, 30% des cas dus au VHC et 13% des cas non dus à ces deux virus. Des mutations dans le gène *CTNNB1* ont été détectées dans 14 cas (26%), dont 11% des cas dus au VHB, 40% des cas dus au VHC et 21% des cas non dus à ces deux virus. Dans 4 cas, des mutations ont été détectées à la fois dans le gène *TP53* et dans le gène *CTNNB1* (cf figure 54).

Nous avons confirmé l'association entre pourcentage de CHC mutés au niveau des gènes *TP53* et *CTNNB1*, et le contexte d'exposition de l'AFB1. En effet, dans un contexte d'exposition moyenne (Thaïlande), on trouve plus de mutations dans le gène *TP53* que dans le gène *CTNNB1*, et les mutations du gène *TP53* sont essentiellement des mutations Ser249. Dans un contexte sans exposition à l'AFB1 (France), on trouve à peu près autant de mutations dans les deux gènes, et aucune mutation Ser249.

Nous avons également confirmé l'association entre mutation dans le gène *TP53* et présence du VHB dans les cas de CHC de Thaïlande. Pour les cas provenant de France, il n'y a pas d'association mutation de *TP53* et VHB, mais on trouve une association mutation *CTNNB1* et VHC. Cependant, ces associations ne sont pas exclusives, ce qui ne confirme pas le modèle des deux grands mécanismes d'hépatocarcinogénèse.

Nous avons trouvé 4 cas provenant de Thaïlande et 4 cas de France, ayant à la fois une mutation dans le gène *TP53* et dans le gène *CTNNB1*, ce qui constitue 15% des cas totaux, 27% des cas mutés pour *TP53*, et 67% des cas mutés pour *CTNNB1* dans les cas de CHC de Thaïlande, et 7% des cas totaux, 30% des cas mutés pour *TP53* et 28% des cas mutés pour *CTNNB1* dans les cas de CHC de France.

Ces résultats montrent donc que les mutations dans les gènes *TP53* et *CTNNB1* ne sont pas mutuellement exclusives, sans pour autant être associées. Ils ne confirment donc pas le modèle des deux grands mécanismes d'hépatocarcinogénèse proposé par Laurent-Puig et Zucman-Rossi (2006). Cependant, nous confirmons qu'il existe une variabilité du profil des mutations qui dépend de l'étiologie du CHC (étiologie virale ou exposition à l'AFB1).

L'étude des premiers composés de la voie Wnt (récepteurs Frizzled, co-récepteurs, activateurs et répresseurs) a montré que la dérégulation en amont de cette voie est commune dans les cas de CHC et atteint également les tissus adjacents non tumoraux, dans le sens d'une activation de la voie Wnt. Cette dérégulation pourrait donc être un événement très précoce dans la survenue d'un CHC. L'origine de l'activation de la voie Wnt est inconnue et ne semble pas liée à la présence de mutations dans les gènes *TP53* et *CTNNB1*.

D. Mise au point des méthodes de criblage des mutations de l'exon 3 du gène CTNNB1

Sur le modèle des méthodes de détection des mutations du gène *TP53*, nous avons mis en place une méthode de détection des mutations dans l'exon 3 du gène *CTNNB1* par DHPLC. La méthode a été mise au point à l'aide d'ADN contrôles provenant de diverses lignées cellulaires : H358S qui contient une mutation homozygote au codon 75 (ACT vers GCT, Thréonine vers Alanine), SW48 qui contient une mutation homozygote au codon 33 (TCT vers TAT, Sérine vers Tyrosine), et HCT116 dont le codon 45 est délété de façon homozygote. Ces ADN mutés ont été mélangés à de l'ADN de lymphocyte non muté.

Après amplification de l'exon 3 du gène *CTNNB1* à l'aide des amorces BCAT-GF (5'-ccaatctactaatgctaatactg-3') et BCAT-GR (5'-ctgcattctgactttcagtaagg-3'), les produits PCR sont chauffés à 95°C avant d'être refroidis progressivement jusqu'à température ambiante. Cette étape permet la déshybridation des deux brins de chaque fragment de PCR puis la formation de duplexes formés de deux brins identiques (homoduplexes) ou différents (hétéroduplexes).

Les produits sont ensuite passés dans une colonne préchauffée à phase inverse (DNASep Column, Transgenomic) équilibrée par du TEAA (Triéthylammonium acetate) 0,1 M. L'ADN est retenu par la colonne puis est élué dans un gradient d'acétonitrile (par un tampon contenant 0,1 M de TEAA et 25% d'acétonitrile). Le gradient et la température ont été déterminés par des tests sur les ADN contrôles. Deux températures ont été sélectionnées afin de détecter le maximum de mutations avec le maximum de sensibilité (60°C avec un gradient allant de 52 à 60% de tampon d'élution, et 63°C avec un gradient allant de 49 à 57% de tampon d'élution). À la sortie de la colonne, l'ADN élué est détecté par un détecteur à UV. Les hétéroduplexes étant moins stables que les homoduplexes, ils sont élués plus tôt, et on obtient un profil d'élution différent du contrôle non muté lorsqu'une mutation est détectée (cf. figure 55). Les produits PCR dont les profils sont anormaux sont ensuite séquencés afin de déterminer la mutation présente.

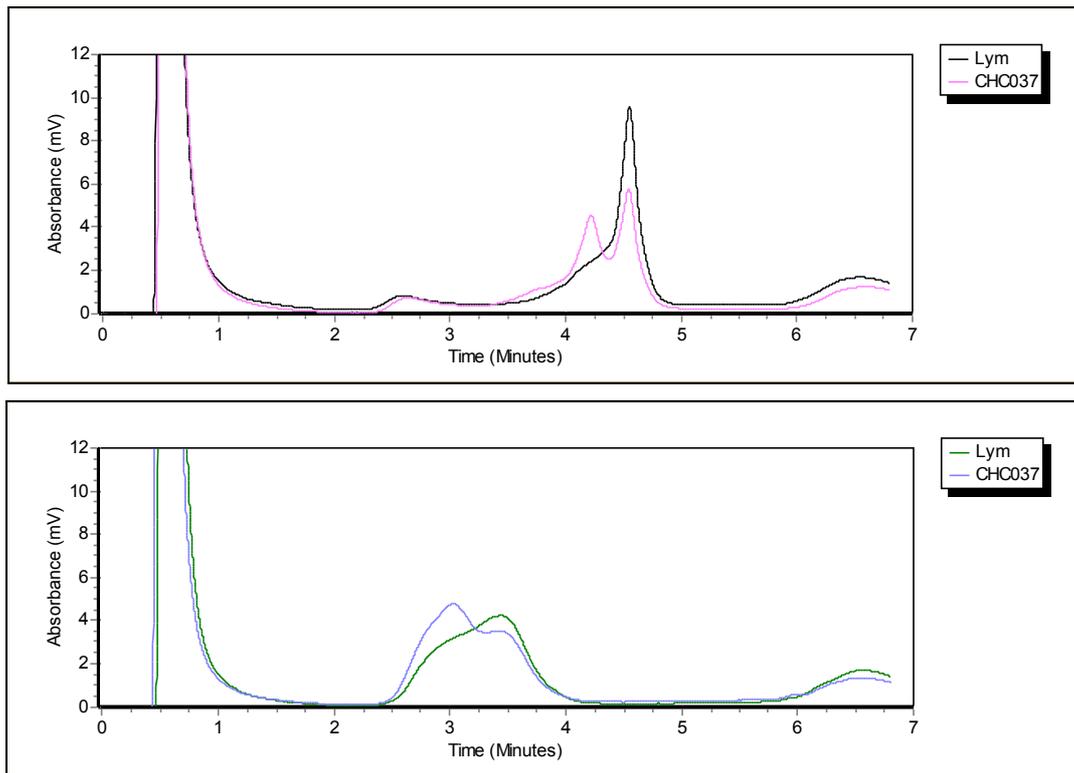


Figure 55 : Exemple de profils d'éluion d'un échantillon d'ADN de CHC. En haut, étude à 60°C, le profil normal est en noir et le profil anormal de l'échantillon en rose. En bas, étude à 63°C, le profil normal est en vert et le profil anormal de l'échantillon en bleu.

Des délétions partielles de l'exon 3 ou chevauchant l'exon 3 du gène *CTNBN1* ont été décrites dans des cas de CHC. Nous avons mis en place une méthode très simple permettant de détecter ces mutations lorsqu'elles ont une taille minimum de quelques dizaines de paires de base.

Après amplification (cf. tableau 1 ci-dessous pour la composition du mélange de PCR) d'un fragment contenant l'intron 2, l'exon 3 et l'intron 3 par PCR en utilisant les amorces BCAT-3F (5'-AAAATCCAGCGTGGACAATGG-3') et BCAT-4R (5'-TGTGGCAAGTTCTGCATCATC-3'), les produits sont déposés sur un gel d'agarose 3%. Tout fragment de taille inférieure à la taille attendue de 1 110 pb est séquencé. La lignée cellulaire HepG2 a été utilisée comme contrôle. Elle contient une délétion hétérozygote commençant au codon 25 et s'étalant sur 349 pb.

Tableau 1: Composition du mélange de PCR.

Réactifs	Quantités pour 1 réaction
Tampon 10 X	2.5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	0.75 µL
dNTP (5 nM chaque)	1 µL
Amorce BCAT-3F (10 mM)	1 µL
Amorce BCAT-4R (10 mM)	1 µL
Taq platinum (Invitrogen, 10 U/µL)	0.2 µL
ADN	
H ₂ O	Qsp 25 µL
Total	25 µL

La sensibilité de la DHPLC varie en fonction de la mutation présente. La sensibilité est déterminée en fonction du seuil de détection d'ADN muté en pourcentage d'ADN muté minimal détecté dans un contexte d'ADN sauvage. Elle varie entre 3 et 15% d'ADN muté détectable. Nous avons donc mis au point des RFLP plus sensibles, afin de pouvoir détecter des seuils inférieurs à 6%. Ces RFLP sont destinées à détecter des mutations au niveau des points chauds de mutation de l'exon 3 du gène *CTNNB1* dans des échantillons d'ADN circulant, elles ne permettent pas de faire du criblage comme la DHPLC. Ces RFLP n'ont pas été utilisées dans les études décrites ici, nous avons donc détaillé le protocole dans les annexes du manuscrit.

Toutes ces méthodes ont été testées sur différents échantillons d'ADN tumoral ou circulant. L'origine de ces échantillons n'étant pas correctement décrite, les résultats n'ont pas fait l'objet d'une publication, mais leur analyse a validé l'utilisation des méthodes pour la détection de mutations dans l'ADN circulant, et la plus grande sensibilité de la RFLP vis-à-vis de la DHPLC pour la détection des mutations au niveau des points chauds.

E. Article 1

En préparation.

Pattern of HBV/HCV infection and *TP53*/Beta-catenin mutations in HCC cases from Thailand

Olivier Galy¹, Isabelle Chemin¹, Emilie Le Roux², Stéphanie Villar³, Florence Le Calvez², Lereau Myriam¹, Michelle Chevalier⁴, Helen Norder⁵, Petcharin Srivatanakul⁶, Anant Karalak⁷, Christian Trépo¹, Pierre Hainaut*².

¹ INSERM U871, 151 Cours Albert THOMAS 69 003 Lyon France

² Unit of Molecular Carcinogenesis, IARC 150 Cours Albert Thomas 69372 Lyon Cedex 08, France

³ Unit of Nutrition and Cancer, IARC 150 Cours Albert Thomas 69372 Lyon Cedex 08, France

⁴ Pathology Laboratory, Marcel Merieux Laboratory 19 Av Tony GARNIER 69007 Lyon France

⁵ Virological Department, Swedish Institute for Infectious Disease, Solna, Sweden

⁶ Cancer Control Unit, National Cancer Institute 268/1 Rama VI Rd. Bangkok 10400, Thailand

Running Title: P53/BetaCatenin and HBV/HCV patterns in HCC from Thailand

Keywords: HCC, P53, Beta-catenin, HBV, HCV.

*Corresponding author

Pierre Hainaut: hainaut@iarc.fr

Olivier Galy was a recipient of a fellowship from « la Ligue Contre le Cancer de la Loire », (France)

Abstract

HBV and HCV play key roles in the etiopathogenesis of Hepatocellular carcinoma (HCC). Studies mostly based on cases from Western countries suggest distinct genetic pathways of carcinogenesis involving either *TP53* or *CTNNB1* mutations. We

have investigated the status of HBV and HCV infections and of genetic alterations in *TP53* and *CTNNB1* in 26 patients with HCC from Thailand. In tumors, HBV DNA was found in 19 cases (73%) and HCV RNA in 4 cases (15.4% cases), 3 of whom were co-infected. Among the 19 HBV positive cases, sequencing of S gene showed genotype C in 82% and genotype B in 18%. Furthermore, 5/19 cases were negative for HBsAg and were categorized as occult HBV specimen. *TP53* mutations were detected in 9 cases (34,6%) including 7 mutations at codon 249 (AGG to AGT, arginine to serine), considered as “fingerprint” of mutagenesis by Aflatoxin metabolites. All cases with 249^{ser} mutation had overt HBV infection. *CTNNB1* mutations were found in 6/26 cases (23%), 4 of whom also had *TP53* mutation. There was no significant association between *CTNNB1* mutations and viral infection status. These results suggest that mutagenesis by Aflatoxin may have an impact greater than recognized so far in the etiopathogenesis of HCC in Thailand. Furthermore, *TP53* and *CTNNB1* mutations do not appear as mutually exclusive, and *TP53* 249^{ser} mutation is associated with overt HBV infection. Thus, HCC in this context may develop according to a sequence of genetic events that includes both *TP53* and *CTNNB1* mutations.

INTRODUCTION

With over 500 000 annual deaths, Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common cancer worldwide and a leading cause of death in developing countries [1] where about 80% of the world cases arise. Risk factors include chronic hepatitis infections (hepatitis B, (HBV) and hepatitis C (HCV) viruses), alcohol and dietary contaminants such as Aflatoxin B₁ (AFB₁). The incidence shows important geographic variations, according to the presence of the different risk factors. In southern Asia, HCC development is mainly related to the endemicity of Hepatitis B Virus (HBV) infection, cases with hot spot mutation in codon 249 (249^{ser}) of *TP53* tumor suppressor gene were also described [2, 3] and associated to a low-intermediate exposure rate to AFB₁. Presence of Hepatitis C Virus (HCV) infection was also detected in 12 - 17% of HCC cases [4-7]. Despite the increasing number of studies identifying viral/host interactions in viro-induced HCC or describing potential

pathways for hepatocarcinogenesis, precise mechanism has not been identified so far. HBV was demonstrated to enhance hepatocarcinogenesis by different manners; HBV chronic infection is associated to active hepatitis and cirrhosis which are hepatic complications considered as early stage for HCC development. These complications mobilise the host immune response, the resulting inflammation initiates and selects the first genetic alteration at the origin of loss of cell control. Moreover, HBV can also promote carcinogenesis through genetic instability generated by its common integration in host DNA. HBV proteins, as HBx, was proven to interact with a variety of targets in the host cell including protein or host transcription factor [8]. Eventually, specific HBV mutations or distinct HBV genotypes were associated to higher risks factors for HCC or hepatic complications leading to HCC [9-12]. As a conclusion, active HBV replication potentially disrupts gene integrity, may lead to oncogenic activation and its proper molecular diversity encloses distinct potentialities. Human HCC is also associated to a specific spectra of genetic alterations, mutations in *TP53* tumor suppressor gene or deregulation of Wnt/Beta-catenin pathway are the most common [13-17]. The 249^{ser} hotspot mutation is a guanine to thymine transversion in codon 249 of *TP53* (arginine-to-serine substitution) observed in population exposed to dietary AFB₁ carcinogen [18] [19]. Inappropriate reactivation of Wnt pathway due to mutations in *CTNNB1* (Beta-Catenin) gene itself is also frequently reported [16]. Mutant Beta-catenin escapes to ubiquitination and down regulation by GSK3- β , it accumulates and trans-activates variety of oncogenes involved in neoplastic transformation [14, 20] mimicking Wnt pathway activation. Taking into consideration viral infection, chromosome instability and *TP53* /Beta-catenin alterations, Laurent-Puig *et al.* described two distinct HCC profiles in a serie of 137 HCC cases [21], the first one associates HBV infection with frequent chromosomal alterations and distributes with *TP53* mutations, the second would be observed in HBV negative large sized tumors and distributes with Beta-catenin mutations. Recent review [22] suggests that these data could “strongly support the notion that chronic HBV infection might trigger specific oncogenic pathways, thus playing a role beyond stimulation of host immune responses and chronic necro-inflammatory liver disease”.

In this study, we developed a systematic approach to determine rate and spectra of *TP53* and *CTNNB1* mutations in 26 cases of primary HCC from Thailand. We estimated HBV and HCV incidence among the cases and described virus

distribution with genetic alterations. We investigated the role of HBV infection in hepatocarcinogenesis through the study of virus molecular heterogeneity, focusing on occult and overt infection status, HBX protein expression, Basal Core Promoter (BPC), S gene mutations and HBV genotypes.

MATERIAL and METHOD

Tissue Samples

Bangkok National Cancer Institute and W.H.O. recruited patients with HCC. The case serie was constituted of 26 surgical resection pairs of tumor sample (T) and adjacent non tumor (NT) tissue (available for 22 patients). 18 were used in a previous study by Kaplansky et al. [23]. Samples were frozen immediately after collection and stored at -80°C, in the meantime patient blood was tested for HBsAg (Auszyme Monoclonal, Abbott, North Chicago, IL). Pathological examination and further investigation were achieved at IARC. Patient's clinicopathological data are summarized in Table 1.

DNA, RNA isolation

Simultaneous DNA/RNA extraction was performed from 10 mg of liver tissue according to TEBU Masterpure extraction kit specifications (TEBU Masterpure, TebuBio Epicentre, France). After last precipitation step, extracted DNA/RNA was re-suspended in 40µL of TE buffer. Nucleic acids were quantified and quality of RNA/DNA from resections was measured by performing a PCR with a set of primer located in one exon of Aldolase B gene that is constitutively expressed in adult liver. DNA/RNA extractions were stored at -20°C.

Immunohistochemistry

Deparaffinized tissue sections were labeled using standard protocols with CM1 antibody (ab) (rabbit polyclonal immunoglobulin G anti-human p53, 1/500, Novacastra Laboratories Ltd., Newcastle, United Kingdom) recognising all isoforms of p53 protein. HBV and/or HCV positive tumor sections were labelled independently with a set of antibodies rose against either anti-HBx Rabbit polyclonal ab [24] used at 5µg/ml or anti-E2 protein monoclonal ab [25] for HCV positive

sections. Fixed antibodies were detected using biotinylated immunoglobulin G, streptavidine-peroxidase, and diaminobenzidine-based detection (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA).

***TP53* and *CTNNB1* mutations**

We detected the codon 249 mutation by performing nested PCR/RFLP in exon 7 of *TP53* gene followed by direct sequencing as described elsewhere [26]. Mutations in other exons, including mutation in exon 7 other than 249, were detected by direct sequence analysis. We made 2 independent PCR in exon 5-6 and 8-9, of *TP53* using primer set R-236/R-256 (5'-acgtgaattctgttcactgtgccctgact-3' / 5'-tgcacctaggaggaggccactgacaacca-3') and R-314/ R-315 (5'-acgtgaattctgtggagtagatggagcct-3' / 5'-tgcacctaggagtgttagactggaaacttt-3') respectively. We performed an alternative PCR amplifying exon 4, 10 and 11 on samples that exhibited positive CM1 profile without mutation detected. 2µl of PCR products were purified and sequenced as described for HBV S gene sequencing.

For *CTNNB1* mutation analysis, exon 3 was amplified by PCR using Beta_f/Beta_r primers in a mixture containing 2 mM MgCl₂, 200 pmol/L deoxynucleotide triphosphates, 0.4 µM primers, 1.5 units of Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), 50 mM KCl, and 20 mM Tris-HCl. After amplification products were denatured (95°C for 4min) then cooled at room temperature for one hour. 3µl to 10µl were injected into a preheated reverse-phase column (DNASep Column, Transgenomic) equilibrated by an ion pairing agent TEAA 0.1M (Triethylammonium acetate). DNA was removed from the column by a linear gradient buffer A (TEAA 0.1M) at a constant flow rate of 0.9ml/min, achieved by mixing with buffer B (TEAA 0.1M and acetonitrile 25%) with 2% per minute gradient increase. The temperature for optimum separation of heteroduplex from homoduplex was calculated by Transgenomic software in a way that 75% of the length of PCR product remains in double stranded form. DHPLC conditions for analysing exon 3 are summarized in Table 1.

HBV and HCV detection

HBV DNA detection was performed using a multiplex PCR in highly conserved regions of Surface and Core genes. We amplified S and C fragments of 118 bp and

145 bp respectively as described elsewhere [27]. PCR products were analysed by electrophoresis on 2% Agarose gel and ethidium bromide staining followed by southern blotting and hybridization with genomic length [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP HBV probe. HCV RNA was detected by semi-nested RT-PCR (One step RT-PCR Kit, Qiagen, France) amplifying 5'UTR region of HCV as described elsewhere [27]. PCR products were analysed by electrophoresis on 2% Agarose gel and ethidium bromide staining followed by southern blotting and hybridization using HCV [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP oligo probe.

HBV genotyping, subtyping and detection of “a” loop variants.

Analysis of S gene provides genotype information significantly matching with analysis of the entire genome [28] [29]. We developed a new semi-nested PCR amplifying the entire S gene. First reaction was achieved with primers S_HBV123s (5'-tcgaggattggggaccctg-3') and S_HBV848r (5'-ggaatagcccatctttgg-3'), round settings were: 95°C(5min); 35 cycles of 95°C(30s), 51°C(30s), 72°C(1 min); then 72°C for 10 min. Second step used 2 μl of first reaction and primers HBV174 and S_HBV 778r (5'-gaggtataaagggactcaag-3') with similar settings than for first round. 2 μl of PCR products were purified using standard ExoSapI treatment and nucleotide sequence were determined for both strand by automated, dideoxy sequencing (sequencer AbiPrism 3100, Perkin Elmer). HBV Genotypes and subtypes were determined thanks to collaboration with the Virological Department of Swedish Institute for Infectious Disease.

HBV Basal Core Promoter variant detection

DNA extractions of HBV DNA positive patients including T and NT tissue were tested for HBV BCP variants by line probe assay (INNO-LiPA HBV Precore Research Version; Innogenetics NV). Samples with detectable HBV DNA after nested PCR amplification using manufacturer's instructions went forward to the reverse hybridization step [30]. The kit probes were designed to determine the nucleotide sequences at position 1762 (A versus T) and 1764 (G versus A and G versus T) in the BCP region. Determination of Pre Core (PC) mutation at HBV codon 1896 (G versus A) was achieved in the same reaction.

RESULTS

Patients and tumor characteristics

Table 2 lists the clinicopathological characteristics of the patients and tumors analysed. Age range was 17 to 73, with a majority of cases occurring before 50 years of age (62.5%) and a male/female ratio of 4:1. Available serological data indicated a HBsAg positivity of 54.2%. Edmonson and Stainer's grades of tumors were equally distributed between scores \geq G3 or \leq G3. In adjacent, non-tumor tissues (NT), most of samples showed an activity score <2 and a fibrosis score >2 (in the METAVIR scoring system). Most HCC were mainly trabecular (69.3%). Pleiomorphic or pseudo-glandular types represented 11.5% and 7.7%. In 3 cases, high level of necrosis or tissue degradation was present precluding the precise assessment of HCC morphology. Cirrhosis was present in 3 of the 22 NT tissues.

Mutations in *TP53* and *CTNNB1*

TP53 mutations were detected in 9/26 cases (34.6%), with a high proportion of mutation at codon 249 (AGG to AGT, Arg to Ser, present in 7 cases). This 249^{ser} mutation was associated with a low level of p53 protein nuclear accumulation in the tumor (10% of cells stained, 6 cases) or with retention of p53 in the cytoplasm (1 case) (Figure 3. A). The two other mutations were at codon 278 (CCC to CTC, Pro to Arg) and codon 331 (CAG to CAT, Gln to His). The 278^{arg} mutation falls within the DNA-binding domain and this mutant protein shows loss of transactivation activity towards 8 different p53-dependent promoters in yeast functional assays [31]. This mutation was associated with accumulation of the protein in 10-20% of the cells (Figure 3. B). In contrast, the 331^{his} mutation falls in exon 9, next to the p53 oligomerization domain, and does not appear to significantly suppress p53 transactivating capacity in a yeast functional assay [31]. This mutation does not result in p53 protein accumulation (data not shown). Three specimens exhibited p53 accumulation in presence of wt *TP53* sequences (Figure 3. C).

Six mutations in exon 3 of *CTNNB1* (27.3%) were found by DHPLC and by direct sequencing. Mutations were exclusively found in tumors, at codons specifying Serines or Threonines in the N terminus. These phosphorylation sites are part of the GSK3- β box. Four out of the six tumors with *CTNNB1* mutation also displayed a *TP53* mutation (3 at codon 249 and one at codon 278) (Table 3).

Molecular patterns of hepatitis viral infections

HBV DNA was detected in both T and NT specimens of 19 HCC patients (73%), whereas 4 HCC cases (15.4%) were positive for HCV RNA, 3 out of 4 being co-infected with HBV.

Two cases were HBsAg-positive in the absence of detectable HBV DNA. Overall, the prevalence of HBV infection markers (HBV DNA+ and/or HBsAg+) in the serie reached 80.7%. We observed a proportion of 26.3% (5/19) of occult hepatitis infection (detection of HBV DNA without hepatitis B surface antigen (HBsAg)) among HBV DNA+ cases. Occult infection was detected in all age groups, but was more represented in patients over 61 (50%) than under 50 (15%) (Figure 1).

Pre-amplification of Pre C/C region prior INNO-LIPA reverse hybridisation was successfully performed in 9/19 HBV DNA+ specimens. The BCP double variant A1762/T1764 was found in 7 cases (77.7%). Distribution of BCP double variant and wild type HBV populations was not restricted to tumor tissues. PC variant was detected in the NT tissue of one patient (data not shown, see supplementary material).

The entire S gene was sequenced in 11/19 HBV-positive specimens. The two main HBV genotypes were C and B, found respectively in 81.8% (9/11) and 18.2% (2/11) of the patients. Several mutations were detected in the region corresponding to the “a” loop determinant (residues 124 to 147) [32]. Two mutations have been described as “escape” mutations in vaccinated subjects (G145R and I126N) [33, 34]. Both were found in patients with occult HBV infection (Figure 2). In specimen 26, we detected a double mutation A126I/P127T, which has not been reported before.

HBx Ag was strongly expressed in 80% of HBV-positive cases. The pattern of HBx Ag accumulation differed between T and NT tissues. In the latter, we observed cytoplasmic accumulation in 15-60% of the cells, with nuclear accumulation in some hepatocytes. In the former, accumulation was stronger in regeneration nodules and

nuclear compartments were strongly stained (Figure 3. D,E). The same staining pattern was observed in both overt or occult HBV infection cases (Figure 3. F,G).

Concordance between Viral infection, tumor morphology and mutations in *TP53* or *CTNNB1*

Tumors were classified according to their HBV infection status as occult, overt, or negative. There was no difference between age, sex, tumor grade, activity/fibrosis scores and incidence of HCV infection between the three groups (Table 3). HBV genotypes and PC/BCP mutations were equally distributed within the 3 groups. However, trabecular morphology type was more common among HBV infected subjects, regardless of occult or overt status. With respect to mutations, Beta-catenin mutation rates did not differ between the 3 groups but the 249^{ser} *TP53* mutation was strongly associated with overt HBV infection (Table 3, Figure 4). Accumulation of p53 in tumors with wild-type *TP53* sequences was identified exclusively in HBV negative tumors, one of which was HCV RNA-positive (see supplementary table). Overall, these results do not substantiate that *TP53* and *CTNNB1* mutation fall in distinct sub-types of HCC; however, they confirm the strong concordance between *TP53* mutation at codon 249 and overt, chronic HBV infection.

DISCUSSION

Most of the current knowledge on the mechanisms of HCC pathogenesis is based on studies developed in Western Europe or in the US. However, these two regions hold less than 25% of the world annual cases of HCC. Given the strong geographic differences in the distribution of risk factors, studies in other areas are mandatory to obtain a more precise picture of the complexity of interactions between mutations and viral infections. In particular, countries such as Thailand represent interesting areas because of the co-existence of multiple viral, lifestyles, dietary and environmental risk factors. While detailed assessment of these factors is beyond the scope of this work and will require extensive case-case comparison studies, the present pilot study shows notable differences when compared with the results of

studies in Western countries. These differences are: (1) the high prevalence of *TP53* 249^{ser} mutation, which is unexpected in a country where exposure to Aflatoxin through the diet is considered as relatively low; (2) the high prevalence of HBV infections (82%), taking into account occult infections; (3) the relatively modest role of HCV infection, which is present in only a small proportion of the cases, mostly in conjunction with HBV infection; (4) the co-existence of *TP53* and *CTNNB1* mutations in a proportion of the cases (4 cases among the 11 with either *TP53* or *CTNNB1* mutations), inconsistent with a systematic mutual exclusion between two distinct pathways of carcinogenesis.

There is evidence that the 249^{ser} mutation is caused by direct adduction of Aflatoxin B1 metabolites on the third base of codon 249. This mutation is very specific for HCC in high incidence areas of China or sub-Saharan Africa and there is a good overall concordance between the prevalence of this mutation in HCC and the levels of exposure to Aflatoxin in the general population. In Thailand, the population exposure to AFB₁ is considered to be low to intermediate. In 1993, a study conducted on a series of 15 HCC cases from central Thailand reported only one 249^{ser} mutation (7%) [3]. However, in a more recent study, Kuang et al. [2] reported a prevalence of 249^{ser} mutations of 24% in HCC cases from Chiang Mai, in the Northern part of Thailand. Our results are compatible with those of Kuang et al. [2] and suggest that exposure to Aflatoxin B1 in the general population of Thailand may be higher than previously recognized. In line with this notion, a recent assessment of Aflatoxin contamination in Thailand in two basic dietary components, corn and peanuts, has shown mean Aflatoxin levels that are 3 to 5 times higher than the Thailand Regulation limit. Although these levels are about 4 times lower than those reported in populations where HCC has high prevalence, they suggest that AFB₁ may still play an important role as a co-factor with chronic HBV carriage in causing HCC in Thailand.

Patients with 249^{ser} mutations were all HBV carriers and their age at diagnosis tended to be lower than those without mutation or with mutation at other codons. Furthermore, these patients did not show cirrhosis in adjacent, peri-tumoral tissue. This pattern is similar to the one of HCC in areas of high HBV endemicity combined with high exposure to Aflatoxin.

In agreement with previous studies [35], HBV genotype C was predominant (83%), followed by genotype B (17%). The basal core promoter double mutation 1762T/1764A was detected in all of the 6 patients analysed, it was present in either the tumor (1 case), adjacent tissue (2 cases) or both (3 cases). Thus, despite published results suggesting that this mutation may be associated with increased severity of infection and cirrhosis; our results do not suggest selection of the mutation during tumor progression.

Interestingly, we noted that occult HBV infection represented 31 % of all HBV-positive cases, compatible with previous studies in China (26%, n=132) or Taiwan (29%, n=31) [36, 37]. There was no difference between occult and overt HBV infections regarding age, sex, tumor grade, activity/fibrosis scores and incidence of HCV infection, HBV genotypes and PC/BCP mutations. Trabecular morphology type was more common among HBV infected subjects, regardless of occult or overt status. With respect to mutations, Beta-catenin mutation rates did not differ between the 3 groups but the 249^{ser} TP53 mutation was strongly associated with overt HBV infection : none of occult HBV cases harboured a 249^{ser} mutation.

These observations are compatible with the hypothesis that occult HBV infection may play a causal role in the pathogenesis of HCC [38], [39].

Occult hepatitis may result from different mechanisms including defective HBsAg expression (due, for example, to structural or regulatory mutations in S gene [40] [27]), or to inhibition of HBV replication due to HCV co-infection [41, 42]. Of the S gene sequences analysed in the present study, two exhibited escape mutations in the antigenic determinant “a” (G145R + I126N for THAI₁₀ and G145R for THAI₂₇) while we did not detect any nucleotide change in the S sequence of the 7 cases with overt HBV infection (Figure 2). A third sequence (THAI₂₆) exhibited a double nucleotide substitution I126A + P127T that has not been reported so far. The consequences of this mutation are unknown, although the contiguous Isoleucine + Proline substitution may induce structural changes explaining the absence of HBsAg response.

In our study, HCV infection rate is 4-fold lower than for HBV, we so confirmed a low to intermediate contribution of HCV in HCC development in Thailand. However it is important to notice that a strong accumulation of HCV envelope protein was detected

in regeneration nodules of either mono or co-infected samples, suggesting active replication of the virus within tumor cells.

Studies on genetic alterations in HCC have led to the identification of two distinct pathways for hepatocarcinogenesis. The first one is characterized by chromosomal instability, *TP53* mutation, as well as mutations in *Axin1*. These tumors are generally HBV-positive. The second one corresponds to chromosomally stable, large tumors that often contain *CTNNB1* mutations. Thus, overall, it is considered that mutations in *TP53* and in *CTNNB1* rarely occur in the same liver tumors. However, this model is essentially based on results obtained on tumors from Western countries and it is unclear whether it also applies to HCC in a context of exposure to Aflatoxin. Indeed, our results suggest that *CTNNB1* mutations may be present in HBV-infected tumors with *TP53* 249^{ser} mutations. It should be considered that, in the context of exposure to Aflatoxin and chronic HBV infection, mutation in *TP53* at codon 249 is likely to occur as a very early event, which may contribute to genetic and chromosomal instability and facilitate cell proliferation and survival in the hostile conditions that result of the combined exposure. This, in turn, may increase the risk of acquisition of mutations in many other genes, including *CTNNB1*. In contrast, in a context of low exposure to Aflatoxin, events other than mutation in *TP53* are likely to take place as early steps. Mutation in *CTNNB1* may represent such an early event, which may be conditional for the entire sequence of subsequent events during tumor progression. In such a scenario, mutation in *TP53* will occur as a late event in a subset of cancers where the p53 protein is acting as a rate-limiting factor that prevents tumor growth. Thus, we would like to propose that HCC that arise in a context of exposure to Aflatoxin may develop according to a specific sequence of genetic events that may include both *TP53* and *CTNNB1* mutations. The identification of key steps in this sequence will require extensive, comparative studies on gene alteration and expression patterns from HCC from different geographic areas and etiological contexts.

Acknowledgements

We thank N. Lyandra for technical assistance, M. Wrizez for secretarial assistance, Dr A. Kay of INSERM U871 for expertise on HBV mutants and Dr MA Petit for gift of the Anti-E2 Antibody.

References

1. Kew MC. *Epidemiology of hepatocellular carcinoma*. Toxicology, 2002. **181-182**: p. 35-8.
2. Kuang SY, Lekawanvijit S, Maneekarn N *et al*. *Hepatitis B 1762T/1764A mutations, hepatitis C infection, and codon 249 p53 mutations in hepatocellular carcinomas from Thailand*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(2): p. 380-4.
3. Hollstein MC, Wild CP, Bleicher F *et al*. *p53 mutations and aflatoxin B1 exposure in hepatocellular carcinoma patients from Thailand*. Int J Cancer, 1993. **53**(1): p. 51-5.
4. Songsivilai S, Dharakul T, Kanistanon D. *Hepatitis C virus genotypes in patients with hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma in Thailand*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1996. **90**(5): p. 505-7.
5. Thaikruea L, Thongsawat S, Maneekarn N *et al*. *Risk factors for hepatitis C virus infection among blood donors in northern Thailand*. Transfusion, 2004. **44**(10): p. 1433-40.
6. Di Bisceglie AM, Simpson LH, Lotze MT, Hoofnagle JH. *Development of hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease due to hepatitis C viral infection*. J Clin Gastroenterol, 1994. **19**(3): p. 222-6.
7. Tangkijvanich P, Hirsch P, Theamboonlers A, Nuchprayoon I, Poovorawan Y. *Association of hepatitis viruses with hepatocellular carcinoma in Thailand*. J Gastroenterol, 1999. **34**(2): p. 227-33.
8. Nita ME, Alves VA, Carrilho FJ *et al*. *Molecular aspects of hepatic carcinogenesis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2002. **44**(1): p. 39-48.

9. Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. *Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection?* J Viral Hepat, 1999. **6**(4): p. 299-304.
10. Chu CM, Liaw YF. *Genotype C hepatitis B virus infection is associated with a higher risk of reactivation of hepatitis B and progression to cirrhosis than genotype B: a longitudinal study of hepatitis B e antigen-positive patients with normal aminotransferase levels at baseline.* J Hepatol, 2005. **43**(3): p. 411-7.
11. Orito E, Mizokami M, Sakugawa H *et al.* *A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C.* Japan HBV Genotype Research Group. Hepatology, 2001. **33**(1): p. 218-23.
12. Kuang SY, Jackson PE, Wang JB *et al.* *Specific mutations of hepatitis B virus in plasma predict liver cancer development.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3575-80.
13. Anthony PP. *Hepatocellular carcinoma: an overview.* Histopathology, 2001. **39**(2): p. 109-18.
14. Buendia MA. *Genetics of hepatocellular carcinoma.* Semin Cancer Biol, 2000. **10**(3): p. 185-200.
15. Tannapfel A, Wittekind C. *Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis.* Virchows Arch, 2002. **440**(4): p. 345-52.
16. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P *et al.* *Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8847-51.
17. Olivier M, Eeles R, Hollstein M *et al.* *The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users.* Hum Mutat, 2002. **19**(6): p. 607-14.
18. Aguilar F, Hussain SP, Cerutti P. *Aflatoxin B1 induces the transversion of G-->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8586-90.
19. Ming L, Thorgeirsson SS, Gail MH *et al.* *Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China.* Hepatology, 2002. **36**(5): p. 1214-20.

20. Ozturk M. *Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis*. Semin Liver Dis, 1999. **19**(3): p. 235-42.
21. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O *et al*. *Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis*. Gastroenterology, 2001. **120**(7): p. 1763-73.
22. Cougot D, Neuveut C, Buendia MA. *HBV induced carcinogenesis*. J Clin Virol, 2005. **34 Suppl 1**: p. S75-8.
23. Kaplanski C, Srivatanakul P, Wild CP. *Frequent rearrangements at minisatellite loci DIS7 (1p33-35), D7S22 (7q36-ter) and D12S11 (12q24.3-ter) in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinomas from Thai patients*. Int J Cancer, 1997. **72**(2): p. 248-54.
24. Vitvitski-Trepo L, Kay A, Pichoud C *et al*. *Early and frequent detection of HBxAg and/or anti-HBx in hepatitis B virus infection*. Hepatology, 1990. **12**(6): p. 1278-83.
25. Galy O, Petit MA, Benjelloun S *et al*. *Efficient hepatitis C antigen immunohistological staining in sections of normal, cirrhotic and tumoral liver using a new monoclonal antibody directed against serum-derived HCV E2 glycoproteins*. Cancer Lett, 2006.
26. Kirk GD, Lesi OA, Mendy M *et al*. *249(ser) TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B viral infection, and risk of hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2005. **24**(38): p. 5858-67.
27. Chemin I, Jeantet D, Kay A, Trepo C. *Role of silent hepatitis B virus in chronic hepatitis B surface antigen(-) liver disease*. Antiviral Res, 2001. **52**(2): p. 117-23.
28. Norder H, Courouce AM, Coursaget P *et al*. *Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes*. Intervirology, 2004. **47**(6): p. 289-309.
29. Norder H, Hammas B, Lee SD *et al*. *Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen*. J Gen Virol, 1993. **74 (Pt 7)**: p. 1341-8.
30. Hussain M, Chu CJ, Sablon E, Lok AS. *Rapid and sensitive assays for determination of hepatitis B virus (HBV) genotypes and detection of HBV*

- precore and core promoter variants*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(8): p. 3699-705.
31. Olivier M, Eeles R, Hollstein M *et al*. *The IARC TP53 Database: new online mutation analysis and recommendations to users*. Hum Mutat., 2002. **19**(6): p. 607-14.
 32. Stirk HJ, Thornton JM, Howard CR. *A topological model for hepatitis B surface antigen*. Intervirology, 1992. **33**(3): p. 148-58.
 33. Grethe S, Monazahian M, Bohme I, Thomssen R. *Characterization of unusual escape variants of hepatitis B virus isolated from a hepatitis B surface antigen-negative subject*. J Virol, 1998. **72**(9): p. 7692-6.
 34. Fujii H, Moriyama K, Sakamoto N *et al*. *Gly145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **184**(3): p. 1152-7.
 35. Theamboonlers A, Tangkijvanich P, Pramoolsinsap C, Poovorawan Y. *Genotypes and subtypes of hepatitis B virus in Thailand*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1998. **29**(4): p. 786-91.
 36. Zhang YY, Hansson BG, Kuo LS, Widell A, Nordenfelt E. *Hepatitis B virus DNA in serum and liver is commonly found in Chinese patients with chronic liver disease despite the presence of antibodies to HBsAg*. Hepatology, 1993. **17**(4): p. 538-44.
 37. Sheu JC, Huang GT, Shih LN *et al*. *Hepatitis C and B viruses in hepatitis B surface antigen-negative hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 1992. **103**(4): p. 1322-7.
 38. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D *et al*. *Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"?* Hepatology, 2001. **34**(1): p. 194-203.
 39. Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G *et al*. *Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection*. Gastroenterology, 2004. **126**(1): p. 102-10.
 40. Roque-Afonso AM, Ferey MP, Belkhir D, Dussaix E. *[HBs antigen mutants: prevalence, clinical and diagnostic implications]*. Pathol Biol (Paris), 2005. **53**(8-9): p. 563-8.

41. Liaw YF. *Role of hepatitis C virus in dual and triple hepatitis virus infection.* Hepatology, 1995. **22**(4 Pt 1): p. 1101-8.
42. Shih CM, Lo SJ, Miyamura T, Chen SY, Lee YH. *Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells.* J Virol, 1993. **67**(10): p. 5823-32.

TABLES

Table 1. DHPLC conditions for Exon 3 of the Beta-catenin gene. Temperature and gradient analyses were determined by Transgenomic software. Acetonitrile gradient raises from initial % of buffer B of 2%/min during 4 min. Primer sequences for PCR amplification of *CTNNB1* genes

Exon analyzed	Temperature (°C)	Acetonitril gradient (%B)	Cell line used as positives controls
3	60	52 - 60	H358S (codon 75 : <u>A</u> CT- <u>G</u> CT)
	60	52 - 60	HCT116 (codon 45 : deleted)
	63	49 - 57	SW48 (codon 33 : T <u>C</u> T-T <u>A</u> T)
Primer sequence for CTNNB1 amplification			
Beta_f:	5'-ccaatctactaatgctaataactg-3'		
Beta_r:	5'-ctgcattctgacttccagtaagg-3'		

Table 2. Clinicopathological data of HCC cases

	Frequency (%)	
Age (n=24)		
≥50	9	(37.5)
<50	15	(62.5)
Mean age ± SD	46 ± 13	
Sex (n=24)		
Gender, male	20	(83.3)
Virus Infection		
HBsAg+ (n=24)	13	(54.2)
Edmonson and Stainer's grade of T tissues (n=25)		
≥G3	12	(48.0)
<G3	13	(52.0)
METAVIR Scores of NT tissues (n=20)		
Activity < 2	16	(80)
Activity ≥ 2	4	(20)
Fibrosis < 2	5	(15)
Fibrosis ≥ 2	15	(75)
HCC morphology (n=26)		
Trabecular type	18	(69.3)
Pleiomorphic type	3	(11.5)
Pseudo-glandular type	2	(7.7)
Necrotic tissue	3	(11.5)
Cirrhosis in NT tissue (n=20)		
Yes	3	(15)
No	17	(75)

Table 3. Distribution of HBV/HCV infection, *CTNNB1* mutations and clinicopathological data according to *TP53* mutation status

	Mutant <i>TP53</i>		wt <i>TP53</i>	Total	
	249	Other			
<i>TP53</i>	7	2	17	26	
<i>CTNNB1</i>	3	1	2	6	
HBV	7	2	12	21	
HCV	1	1	2	4	
No HBV nor HCV	0	0	4	4	
Tumor grade	≥ 3	5	2	6	Grade missing for one P53 wt case
	< 3	2	0	10	
Cirrhotic NT tissue	0	2	1	3	
Age	37.6 ± 12.8	53	48.2 ± 12.41		
Sex	M	5	2	13	Age and Sex data are missing for two 249 ^{ser} cases
	F	0	0	4	

Table 4. Distribution of *TP53/CTNNB1* mutations and clinicopathological data according to HBV infection status

		overt HBV infections n=13*	Occult HBV infections n=5	Non HBV related cases n=5	Total
<i>TP53</i>	249 ^{ser}	7	0	0	7
	Other mutation	1	1	0	2
	wt	7	4	5	17
<i>CTNNB1</i> †	Mutation	3	2	0	5
	wt	7	3	4	18
HCV		2	1	1	4
Sex	M	13	4	3	20
	F	0	1	2	3
Grade	≥3	6	2	2	10
	<3	7	3	3	13
HCC morphology					
	Trabecular	11	5	2	18
	Pleiomorphic	2	0	1	3
	Pseudoglandular	1	0	1	2
	Necrosis	1	0	2	3
Age		43.2 ± 12.12	51.4 ± 15.2	49.4 ± 13.7	

*- Three HBV-DNA positive cases with missing data on serology were removed from this table.

†- *CTNNB1* was not amplified in four cases, three cases in overt HBV infection group and one in HBV negative infection group.

FIGURES

Number of cases

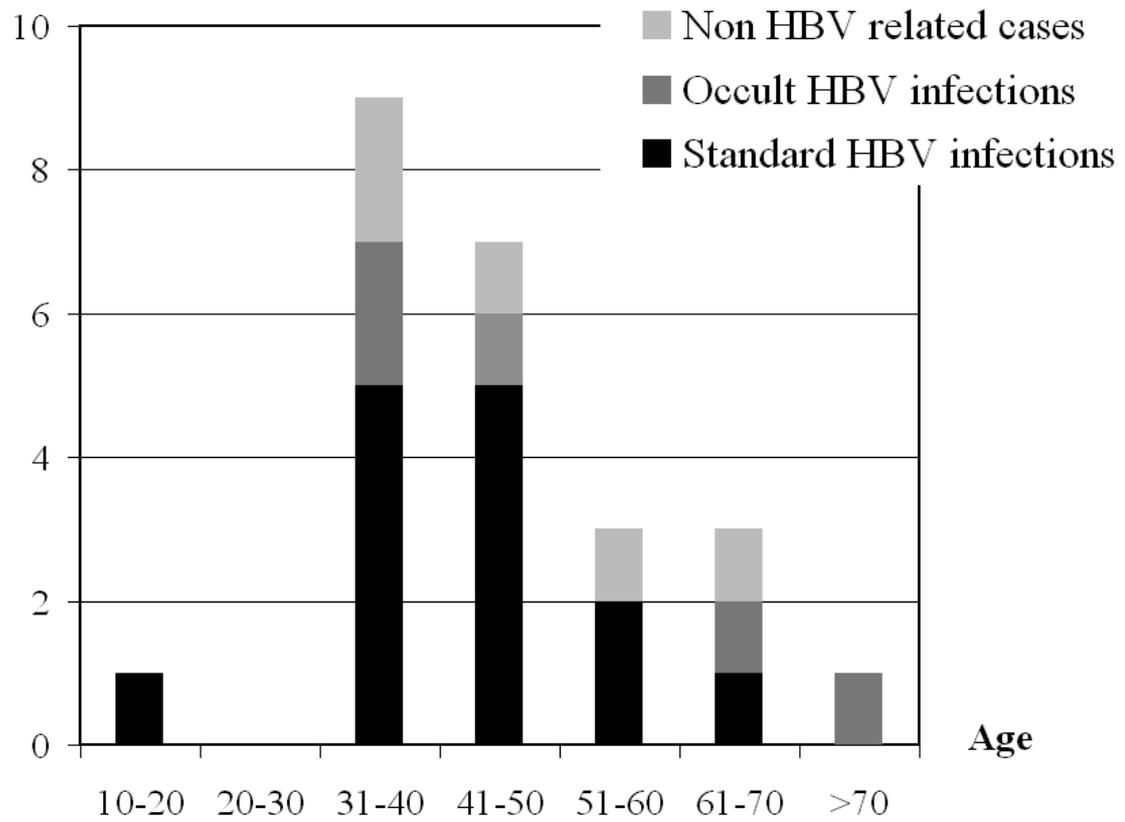


Figure 1. Age distribution and HBV infection status of HCC cases

	120	130	140	150
THAI 6	GPCKTCTI	PAQGTSMF	PSCCCTK	PSDGNCTCIPI
THAI 10	GPCKTCTI	NPAQNTSM	FPSCCCTK	PSDRNCTCTPI
THAI 26*	GPCKTCTI	ATAQGTSM	FPSCCCTK	PPTDGNCTCIPI
THAI 27	GPCKTCTI	PAQGTSMF	PSCCCTK	PSDRNCTCIPI
THAI 30	GPCKTCTI	PAQGTSMF	PSCCCTK	PSDGNCTCIPI
THAI 34	GPCKTCTI	PAQGTSMF	PSCCCTK	PSDGNCTCIPI
THAI 36	GPCKTCTI	PAQGTSMF	PSCCCTK	PSDGNCTCIPI
THAI 55	GPCKTCTI	PAQGTSMF	PSCCCTK	PSDGNCTCIPI
THAI 66	GPCKTCTI	PAQGTSMF	PSCCCTK	PSDGNCTCIPI
THAI 89*	GPCKTCTI	TPAQGTSM	FPSCCCTK	PPTDGNCTCIPI
THAI 96	GPCKTCTI	TPAQGTSM	FPSCCCTK	PSDGNCTCIPI

Figure 2. Alignments of antigenic S protein in determinant “a” region from 11 HBV patients (classified as genotype C except samples marked with stars which are genotype B). Samples 10, 26 and 27 are occult HBV samples. R145G is a common mutation causing false negative results for HBV serological testing using first generation antibodies. Double mutant A126I / T127P was detected in case 26.

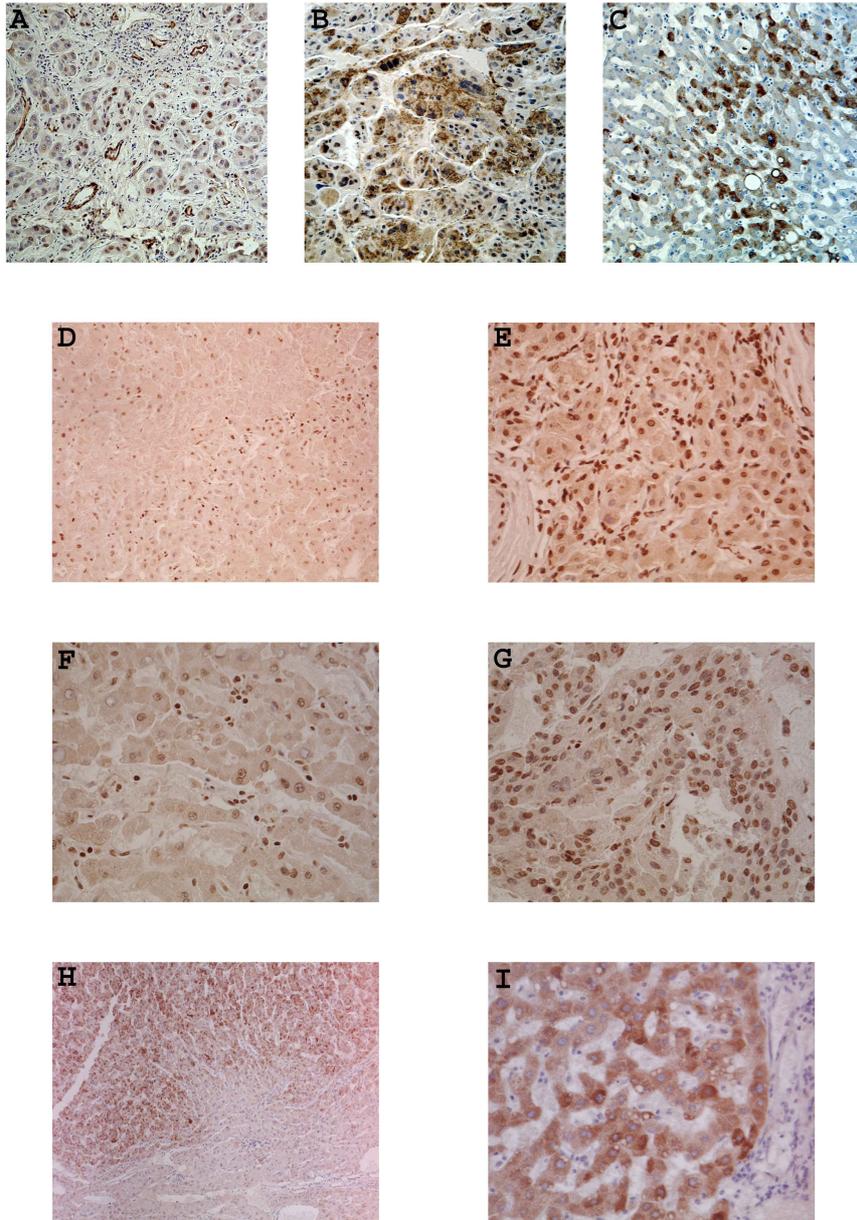


Figure 3. Immunostaining of HCC liver sections (A-H x200, I x400). Accumulation of CM1 ab in T cases with: 249^{ser} mutation (A), codon 278 mutation (B) and with wild type *TP53* gene (C). Accumulation of HBx in hepatocyte nucleus of NT and T pair of HCC case with overt HBV infection (D, E) or occult HBV infection (F, G). Accumulation of HCV E2 protein in tumor section of HBV/HCV (H) or occult HBV/HCV (I) co-infected HCC cases.

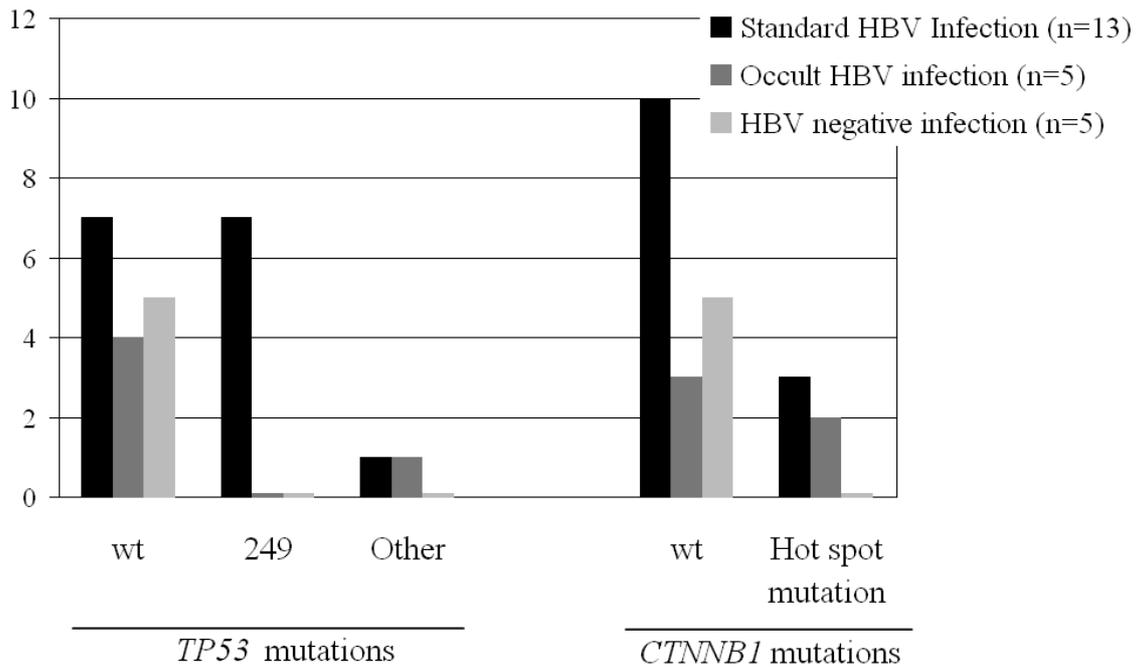


Figure 4. Distribution of *TP53* and *CTNNB1* mutations according to HBV infection status

SEX	AGE	PATHOLOGY		TP53 mutation codon	P53 Amino Acid substitution	CMI Profile	β-Catenin mutation codon	HCV RNA	HBV DNA	HBV Genotype Serotype	Pre Core mutation BCP 1764 A>C and 1762 T>A		Pre Core mutation NTIT tissue
		TUMOR GRADE	MEFAVIR SCORE								NT	T	
HBsAg+													
M	46	G4	A2 F4*	331	Gln→His		wt	+	+	C adr	wt + Dv	Dv	wt/wt
M	40	G1	A0 F2	wt			wt	-	+	Nd	wt + Dv	wt + Dv	wt/wt
F	37	G2	A0 F1	wt			wt	-	+	B adr2	Nd	Nd	Nd
M	61	G2-3	A2 F4*	wt			41	-	+	C adr	Nd	wt	wt/wt
M	73	G3	/	wt			37	-	+	Nd	Nd	Nd	Nd
HBsAg+													
M	34	G4	A1 F4	249	Arg→Ser	<10%	wt	+	+	C adr	Dv	Dv	wt/wt
M	43	G1-2	A2 F4	249	Arg→Ser	<10%	41	-	+	C adr	Nd	Nd	Nd
M	50	G3-4	A0 F1	249	Arg→Ser	<10%	wt	-	+	B adr2	Nd	Nd	Nd
M	44	G3	no NT tissue	249	Arg→Ser	<10%	wt	-	+	C adr	Nd	Nd	Nd
M	60	G3-4	A2 F4*	278	Pro→Arg	10-20%	33	-	+	C adr	Dv	wt + Dv	wt/wt
M	42	G2	A0 F2	wt			/	-	+	Nd	wt + Dv	wt + Dv	wt/wt
M	39	G2	A1 F4	wt			wt	+	+	Nd	Nd	Dv	wt/wt
M	62	G2-3	A1 F3	wt			wt	-	+	C adr	Dv	wt + Dv	MUT/wt
M	36	G4	A1 F2	wt			/	-	+	C adr	Nd	Nd	Nd
M	37	G3-4	A0 F1	wt			wt	-	+	C adr	Nd	Nd	Nd
M	57	G2-3	A1 F3	wt			wt	-	+	Nd	Nd	Nd	Nd
M	17	G3	no NT tissue	249	Arg→Ser	<10%	34	-	-	Nd	Nd	Nd	Nd
M	40	G2-3	no NT tissue	wt			/	-	-	Nd	Nd	Nd	Nd
No HBsAg status													
/	/	G3-4	A0 F2	249	Arg→Ser	<10%	/	-	+	Nd	Nd	Nd	Nd
/	/	G1	A0 F4	249	Arg→Ser	<10%	37	-	+	Nd	Nd	Nd	Nd
F	48	/	A0 F1	wt			wt	-	+	Nd	wt	wt	wt/wt
No HBV infection													
M	70	G2	/	wt			wt	-	-				
M	39	G3-4	A0 F3	wt			wt	-	-				
F	50	G2-3	A0 F1	wt		20-50%	wt	-	-				
F	35	G2-3	no NT tissue	wt		<10%	/	-	-				
M	53	G3	A0 F2	wt		10-20%	wt	+	-				

Supplementary figure. Sorting of the 26 HCC studied according to HBsAg Status.

Wt=wild type, Nd=Non detectable, Dv=Dual variant, /=missing data, *=Cirrhotic NT tissue, MUT=Mutant.

F. Article 2

En préparation.

Dysregulation of specific Wnt and Frizzled genes: a striking and common event in human hepatocellular carcinomas

Aurore Bengochea ^{1,‡}, Marcia Maria de Souza ^{1,‡}, Lydie Lefrançois ¹, Emilie Le Roux ², Olivier Galy ¹, Isabelle Chemin ¹, Miran Kim ³, Jack R. Wands ³, Christian Trepo ^{1,†}, Pierre Hainaut ², Jean-Yves Scoazec ^{4,†}, Ludmila Vitvitski ¹, and Philippe Merle ^{1,†,*}

¹ INSERM, U871, Physiopathologie moléculaire et nouveaux traitements des hépatites virales, 151 cours A. Thomas, Lyon, F-69424, France; Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de Médecine Laennec, IFR62, Lyon, F-69008, France; [†]Hospices Civils de Lyon, Hôtel Dieu, Service d'Hépatologie, Lyon, F-69002, France

² IARC, Carcinogénèse Moléculaire, Lyon, France

³ The Liver Research Center, Department of Medicine, Brown Medical School, Providence, Rhode Island, USA

⁴ Laboratoire d'Anatomopathologie, Hôpital Edouard Hériot, Lyon, France
Physiopathologie moléculaire et nouveaux traitements des hépatites virales

[‡] Aurore Bengochea and Marcia Maria de Souza contributed equally to this work.

* Address correspondence to:

Philippe Merle, M.D., Ph.D.

INSERM U871, Molecular Physiopathology and New Therapies in Viral Hepatitis

151 cours Albert Thomas

69424 Lyon cedex 03

France

Phone #: 33 4 72 68 19 54

Fax#: 33 4 72 68 19 71

e-mail: phmerle@lyon.inserm.fr

Running Title: Wnt/Frizzled signaling in human hepatoma

Key words: hepatocarcinogenesis, Wnt, Frizzled, TP53, β -catenin

Number of words = 2995

Number of text pages = 23

Number of tables = 4

Number of figures = 4

GRANT NUMBER AND SOURCES OF SUPPORT

This work was supported by French grants from Ligue du Rhône (#RAB03013CCA), ARC (#3676), ANRS (#RPF05032CSA), and an interface contract with INSERM for P. Merle as well as grants CA-35711, AA-02066 and P20-RR15578 from the National Institutes of Health (USA).

ABSTRACT

BACKGROUND/AIMS: Dysregulation of growth factors and their receptors is central to human hepatocellular carcinoma (HCC). We previously demonstrated that the Frizzled-7 receptor-mediating the Wnt signaling activates the Wnt/ β -catenin pathway and promotes malignancy in hepatitis B virus-related HCC. **METHODS:** We employed QRT-PCR to assess expression pattern of the 10 Frizzled membrane receptors in hepatocytes, and their extracellular soluble auto-paracrine regulators (19 WNT activators and 4 sFRP inhibitors) in 133 human liver tissues [62 HCCs and their matched peritumorous area (pT), and 9 normal livers]. **RESULTS:** We found that eight Frizzled-activating events were pleiotropically dysregulated in 95% HCCs and 68% pT (*Frizzled-3/6/7* and *WNT3/4/5A* upregulation, or *sFRP1/5* down-regulation), accumulating gradually with severity of fibrosis in pT and with aggressiveness in HCC, although without any correlation with the two most prevalent mutational events – i.e. within *CTNNB1* and *TP53* genes - as determined by PCR/DHPLC sequencing. Hepatocyte specificity of Frizzled overexpression was confirmed by immunohistochemistry in tissues, and QRT-PCR in hepatoma cell lines. **CONCLUSION:** This study provides an extensive analysis of the upstream Wnt-

signaling factors and revealed that activation of Frizzled may be one of the most common and earliest event described thus far during hepatocarcinogenesis. Therefore, Frizzled is an attractive target for therapy.

Number of words: 200

Key words: hepatocarcinogenesis, Wnt, Frizzled, TP53, β -catenin

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most frequent tumors worldwide. Progress has been made in the identification of HCC risk factors including chronic infection by hepatitis B and C virus (HBV and HCV), or nonviral etiologies [1,2]. Unfortunately, the cellular mechanisms of hepatocarcinogenesis remain poorly understood. Initially, a variety of genetic and epigenetic alterations were detected in HCCs and to a lesser extent in preneoplastic lesions. Later on, DNA microarray analysis led to an integrative approach to the cancer transcriptome, and more recent studies in both experimental and human HCCs identified clusters of HCC associated with patterns of gene expression that allow comparison between HCC phenotypes [3]. In the same way, there has recently been progress in understanding the essential role and function that represents dysregulation of pleiotropic growth factors – i.e. the Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Transforming Growth Factor- α (TGF- α), Transforming Growth Factor- β (TGF- β), and Wingless (Wnt) – in contributing to proliferation and anti-apoptotic behavior of tumor hepatocytes [4]. Strengthening the complexity of growth factor mechanisms in hepatocarcinogenesis, their respective receptors and downstream signaling molecules can be modulated by multiple cross-talk between the different signaling pathways in addition to tumor-relevant factors such as the mutated *TP53* and *CTNNB1* genes, well known as the most frequent gene mutations found in human hepatocarcinogenesis.

Focusing onto the Wnt signaling cascade, binding of one among the 19 extracellular soluble secreted WNT ligands to one or more among the 10 Frizzled (FZD) receptors in cooperation with one among the 2 LRP co-receptors [low-density lipoprotein receptor (LDLR)-related protein] can differentially lead to activation of either the canonical β -catenin or the noncanonical c-Jun N-terminal Kinase (JNK) and

Protein Kinase C (PKC) pathways controlling the tumor phenotype. In contrast, four sFRP (secreted Frizzled Related Proteins) which are extracellular soluble factors, may bind WNT ligands and thereby down-regulate their ability to activate FZD receptors [5]. Up-regulation of WNT and/or FZD elements has been found in many tumor types [6,8]. However, the expression patterns of all the WNT/FZD family members have not been extensively evaluated in human HCC so far.

We previously demonstrated activation of the Wnt/ β -catenin pathway by up-regulation of *FZD7* in human HBV-related HCCs as well as in several transgenic mouse models of HCC [9,10]. In the present study, we have determined the expression patterns of all *WNT*, *FZD*, *LRP* and *sFRP* genes in human HCCs of different etiologic and histological features. Here, we have revealed that *FZD3/6/7* were commonly up-regulated in cancerous hepatocytes and to a lesser extent in nontransformed hepatocytes of the matched peritumorous liver parenchymas, independently of both etiologic factors and *CTNNB1/TP53* mutation status. Concomitantly were found up-regulated *WNT3/4/5A* and/or down-regulated *sFRP1/5*. Strikingly, these eight different events accumulated with the fibrosis stage of peritumorous livers, and subsequently with aggressiveness of tumors.

MATERIAL AND METHODS

Human Liver Tissues

Sixty two frozen HCCs surgically resected from different individuals were obtained from Thailand (International Agency for Research on Cancer)($n=10$) and France (National Resource Biological Center)($n=52$), a written consent being obtained before surgery. Tissue samples were separately obtained and characterized as tumorous (T) or matched peritumorous liver parenchymas (pT). Normal livers (NL) came from parenchymas surrounding surgically resected focal nodular hyperplasia from different individuals ($n=9$). HCCs were due to HBV ($n=18$) or HCV ($n=20$) infection as defined by positivity for HBs antigen or anti-HCV antibodies in serum respectively, while others were presumed as nonviral-related (NBNC) tumors ($n=24$).

Histological Analysis

Histological analysis was performed on T to confirm the diagnosis of HCC and to classify them as to their differentiation status. Furthermore, histology served on pT as a method of assessing fibrosis stage using the Metavir criteria [11], and to further ensure the absence of microscopic tumor invasion.

Cell Lines

The human hepatoma cell lines Huh7, Focus, SK-Hep1, PLC/PRF/5, Hep3B, and HepG2 were grown in DMEM F-12, 1X-MEM non-essential amino acid solution, 200 mM L-glutamine, 1X-sodium-pyruvate, 1% (vol/vol) penicillin/streptomycin (Invitrogen), and supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum (Sigma). Human primary hepatocytes were cultured in HCM Bullet-kit hepatocytes culture medium (Cambrex).

Semi-Quantitative Real-Time RT-PCR

Total RNA extraction from cell lines and frozen tissues, as well as cDNA synthesis were prepared as previously described [9]. PCR reactions were performed by 35 cycles (95°C 15s, 60°C 1min) using the MyIQ™ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad) with a mix composed of 1X-Quantitech Sybr Green PCR Kit (Qiagen), primers at either 500 nM (*Wnt*, *sFRP*, *FZD* and *LRP*) or 800 nM (*18S RNA*), and 12.5 ng cDNA (equivalent total RNA) from unknown samples. Each PCR run included the unknown cDNAs and a non-template control (RNA sample treated with DNase without RT step) to check for absence of genomic DNA contamination. Regarding the specificity of reactions, melt curves were analyzed for each sample and the corresponding PCR products of the positive controls were cloned into the pCR®2.1 Vector (Invitrogen, Life Technology) and sequenced. Primers for *sFRP* genes were selected using the previously described strategy [9]. Primers for *FZD7* and *18SrRNA* were previously published [9], as well as those for *Wnt*, *FZD* (except *FZD7*) and *LRP* [12] with slight modifications to obtain identical annealing temperature and PCR amplification efficiency as for *FZD7*, *18S rRNA* and *sFRP* primers. The amount of specific mRNA was quantified in unknown samples by using the comparative Ct method; the Δ Ct values from each tissue were obtained by subtracting the values for 18S Ct from the Ct of each tested gene. One difference in Δ Ct represents a 2-fold

difference in the level of mRNA as described [12]. Following this method, the arbitrary value (A.V.) for expression of each gene per tissue was $10^{(-\Delta Ct/3.3)}$, that we finally formulated as $10^8 \times 10^{(-\Delta Ct/3.3)}$ due to the wide range of expression between 18SrRNA and *Wnt/FZD/sFRP/LRP* genes.

Immunostaining

Immunohistochemistry was used to localize FZD3/6/7 in T and pT tissues fixed in 10% neutral buffered formalin, and embedded in paraffin. After antigen unmasking by heating slices in a microwave oven in citrate buffer at pH 6.0 for 10 min, the 5 μ m sections were incubated overnight at 4°C with anti-FZD3 (1/150, LifeSpan, Biosciences, LS-A4454), anti-FZD6 (1/70, LifeSpan, Biosciences, LS-A4481) or anti-FZD7 (1/200, Sigma, F3679) rabbit polyclonal antibodies. Endogenous peroxidase activity was blocked with the Peroxidase-Blocking reagent (DakoCytomation) for 10 min and nonspecific antibody binding was blocked with 10% skimmed milk for 30 min at 20°C. The Antibody-Diluent reagent (DakoCytomation) served as a negative control under equivalent conditions in place of the primary antibody. A goat anti-rabbit IgG conjugated to peroxidase-labeled polymers diluted in Tris-HCl buffer (EnVision+ Dual Link System Peroxidase – DakoCytomation) was added according to the manufacturer's instructions. For amplification of the reaction, a soluble antigen-antibody of horseradish peroxidase anti-peroxidase developed in the rabbit (Sigma) was used at 1/200 dilution for 30 min at 20°C. Colorimetric reaction was developed with 3,3'-diaminobenzidine (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System-DakoCytomation) for 2 min. Slides were counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated, and coverslipped with EUKITT (O. Kindler GmbH & CO, Freiburg).

PCR/DHPLC Sequencing of *CTNNB1* and *TP53* Genes

Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) analysis requires heteroduplex formation to discriminate the presence of a mutation. In brief, crude amplification products were denatured by heating at 95°C then cooled to 25°C over one hour. DHPLC analysis were performed by injecting 5 to 8 μ l of PCR products of into a preheated reverse-phase column (DNASep Column, Transgenomic) equilibrated with an ion pairing agent TEAA 0.1M (Triethylammonium acetate). DNA was removed from the column by a linear gradient of eluting buffer containing 25%

of acetonitrile at a constant flow rate of 0.9ml/min and with 2%/min gradient increase. Transgenomic UV-detector identified the eluted DNA at 260nm. All amplimers with different profile shapes or retention times were sequenced to confirm the putative sequence variations.

Concerning PCR sequencing, primer pairs were designed for amplification of exons-4 to -9 for *TP53*, and exon-3 for *CTNNB1* genes (Table 2). Each PCR mix contained genomic DNA, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 0.4 μM each primer, 1X-PCR Buffer (Invitrogen) and 2U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) for a final reaction volume of 50μl. The PCR amplification for *TP53* exons was performed using the following conditions: initial denaturation at 94°C 2min, 20 cycles (94°C 45s, 63°C 30s and gradual decrease of 0.5°C/3 cycles, 72°C 45s) followed by 30 cycles (94°C 45s, 60°C 30s, 72°C 45s) and ending with an extension at 72°C 10min. The cycling profile for *CTNNB1* exon-3 amplification was the following: initial denaturation at 95°C 2min, 20 cycles (95°C 30s, 56°C 30s, and gradual decrease of 0.4°C/2 cycles, 72°C 30s) followed by 30 cycles (95°C 30s, 52°C 30s, 72°C 30s) and ending with extension at 72°C 7min.

Statistical Analysis

Dependent or independent *t*-tests were used for continuous data with StatView software Version 5.0 (SAS Institute Inc.), and CHI-2 test when necessary. Tests were considered significant when their *P* values were <0.05.

RESULTS

Quantitative Real-time RT-PCR Assays

We assessed expression of the 19 *WNT*, 4 *sFRP*, 10 *FZD* and 2 *LRP* genes in cell lines, and liver tissues (62 T and 62 pT) as determined by an arbitrary value (A.V.) (See *Material and Methods*). Additionally, a panel of 9 NL served as controls which gave the cut-off values for up- or down-regulation of the different genes as mean ± 2 SD ($\alpha=0.05$). We considered a gene as significantly up-regulated in any given tissue sample if its value was both above the cut-off value and superior to 20 A.V.; the later value corresponding approximately to a Ct value of 32 cycles (about 20

copies per reaction in a quantitative assay for the gene of interest as described previously)[9] taking account that the average Ct value for *18S rRNA* was about 9 cycles.

Expression Patterns of *FZD*, *LRP*, *WNT* and *sFRP* Genes in Liver Tissues by Quantitative Real-Time RT-PCR

In the 9 tested NLs, *FZD4/5*, *LRP5/6* and *sFRP1/5* genes were found significantly expressed at the mRNA level (i.e. ≥ 20 A.V.), while all others remained expressed at rather low levels (i.e. < 20 A.V.). By comparison, *FZD3/6/7* were found frequently and significantly up-regulated in HCCs (Fig. 1): *FZD3* (41% T, 23% pT), *FZD6* (31% T, 8% pT), and *FZD7* (33% T, 10% pT), with a gradual increase from pT to T (paired *t*-Student test: *FZD3*, $P=0.04$; *FZD6*, $P=0.001$; and *FZD7*, $P=0.01$) (Fig. 2). In contrast, *LRP* genes remained stable between NL, pT and T. By regard to the soluble regulators of the Frizzled/LRP membrane receptor complexes, *WNT3/4/5A* activators were strikingly found up-regulated and *sFRP1/5* down-regulated (Fig. 1 and 2): *WNT3* (39% T, 25% pT), *WNT4* (20% T, 16% pT), *WNT5A* (25% T, 7% pT), *sFRP1* (53% T, 21% pT), and *sFRP5* (28% T, 12% pT). Taken together, these results demonstrated that when pooling the eight following events – i.e. up-regulation of activators (*FZD3/6/7* or *WNT3/4/5A*) or repression of inhibitors (*sFRP1/5*) of the WNT/FZD signaling – one of them at least occurred in 95% T and 68% pT.

Determination of Cell Specificity Localization of Frizzled Receptors

Immunostaining staining identified specific cells overexpressing *FZD3/6/7* in liver tissues. As shown in Fig. 3, *FZD3/6/7* proteins were highly expressed by cancerous hepatocytes in T tissues, and at a lesser extent by nontransformed hepatocytes in pT tissues, while they were barely expressed by normal hepatocytes in NLs. These three receptors were not found expressed by non-hepatocytic cells. Furthermore, quantitative real-time RT-PCR assessment strengthened these data *in vitro* since clearly showing that all tested cancerous hepatocyte cell lines expressed *FZD3*, *FZD6* or *FZD7* at high level, while normal primary hepatocytes did not (Table 3).

Correlation of *WNT/FZD/sFRP* Expression in HCCs to Viral Etiology

Expression patterns of *FZD3/6/7*, *WNT3/4/5A* and *sFRP1/5* were compared to etiologic factors of HCCs (Fig. 1). With the notable exception of *FZD7* which showed a higher rate of up-regulation in HBV than in nonHBV-related HCCs (59% vs 23%, $P=0.035$), *WNT3/4/5A* and *FZD3/6* were statistically equally up-regulated, and *sFRP1/5* equally down-regulated between HBV, HCV and NBNC-related HCCs.

Correlation of *WNT/FZD/sFRP* Expression to Histopathological Features and Mutation Status of *CTNNB1* and *TP53* Genes in HCCs

Strikingly, among the eight dysregulated genes (*FZD3/6/7*, *WNT3/4/5A* and *sFRP1/5*), they accumulated with severity of fibrosis and presence of cirrhosis in pT tissues (0.6 ± 0.6 events per noncirrhotic F1/F2/F3 vs 1.4 ± 0.9 events per cirrhotic F4; $P=0.0063$). Subsequently, each of these events additionally accumulated with aggressiveness of HCC in T tissues (2.1 ± 0.9 , 2.9 ± 1.2 , and 4.0 ± 2.0 events per well, moderately and poorly differentiated HCCs respectively; $P<0.0001$)(Fig. 4). Importantly, we carefully evaluated by serial tissue sections that none of the pT tissues with elevated *WNT/FZD* or decreased *sFRP* expression levels had microscopic HCC tumor foci. Individually, only three *WNT/FZD* activator up-regulation rates significantly correlated with aggressiveness of HCCs: *FZD3* ($P=0.04$), *FZD7* ($P=0.002$), and *WNT5A* ($P<0.001$). The *CTNNB1* and *TP53* mutation status in HCC was determined and compared to *WNT/FZD/sFRP* expression patterns (Table 4). The *CTNNB1* gene was found mutated mainly in HCV-related HCCs (HBV 17%; HCV: 40%; NBNC: 21%), while *TP53* gene mutations were found independently of etiologic factors (HBV: 33%; HCV: 30%; NBNC: 13%). There was no correlation between these mutations and a specific *WNT/FZD/sFRP* expression pattern in HCCs.

DISCUSSION

This study has provided a comprehensive transcriptomic analysis of the *FZD/LRP* receptor complexes, and some of their potential auto-paracrine regulators in human HCCs. We have demonstrated for the first time that dysregulations of

WNT/FZD signaling elements are an overall common and early feature in human hepatocarcinogenesis.

Research on dysregulation of growth factors and their receptors has established the essential role and function of the corresponding signaling cascades in human hepatocarcinogenesis. For example, there is accumulating evidence that alterations of the Wnt/ β -catenin pathway is a common event in hepatocarcinogenesis since nuclear and/or cytosolic accumulation of β -catenin, as a generally accepted hallmark of activated β -catenin, occurs in many HCCs, and is associated with the clinical and pathological features of the disease [13-17]. Initially, *CTNNB1* gene mutations were shown as one of the major events leading to activation of the Wnt/ β -catenin pathway in human and experimental HCCs [18]. Subsequently, other mutations in the *AXIN-1* gene were also described [19]. More recently, our laboratory demonstrated that up-regulation of *FZD7* could play a key role too [9,10]. Other studies clearly showed up-regulation of WNT/FZD elements in different types of cancers, highlighting their direct role in carcinogenesis as witnessed by activation of oncogenic pathways and control of the cancerous phenotype: nasopharynx (*WNT5A*, *FZD7*), esophagus (*FZD7*), stomach (*FZD7*), colon (*FZD1*), melanoma (*WNT5A*), malignant hemopathies (*FZD1/3/6*, *WNT3/5A/6/10A/14/16*) [6-8,12,20-22]. Concerning human HCC, a few data have been available so far about WNT/FZD elements. Our group had previously shown the frequent up-regulation of *FZD7* [9], and others the common down-regulation of *sFRP1* due to promoter hypermethylation [23,24], as shown for colon cancer [25], both events leading to activation of β -catenin. It is noteworthy that recent studies in our laboratory suggest that *WNT3* may serve as a ligand for *FZD7*, and functionally activates the downstream β -catenin pathway, leading to or contributing to increased HCC cell migration and proliferation (Kim, Merle and Wands; unpublished observations). In the present study, we have extensively assessed the expression patterns of all WNT/FZD elements in human HCC, and we have clearly shown for the first time that several among them are very frequently dysregulated: *FZD3/6/7* and *WNT3/4/5A* up-regulation, or *sFRP1/5* down-regulation.

Importantly, our immunohistochemical approach showed a clear and almost exclusive *FZD3/6/7*-staining in hepatocytes. Furthermore, *in vitro* transcriptomic analysis in cultured hepatocytes confirmed that all the tested human HCC cell lines overexpressed *FZD3*, *6 or 7*, while human normal primary hepatocytes did not. These

data allowed us to consider the concept that the WNT/FZD signaling could be specifically carried by precancerous and cancerous hepatocytes in liver tissues through activation of FZD3, 6 and/or 7. In contrast, little is known about the cells secreting the WNT3/4/5 and sFRP1/5 factors within liver tissues, and additional studies would be warranted to identify WNT- and sFRP-secretion by active and/or resting states of various cell types within the liver – i.e. hepatocytes, biliary epithelial, sinusoidal endothelial, stellate and Kupffer cells - as previously described in normal mouse liver [26]. Although we have observed that WNT/FZD dysregulation is a common feature in viral and nonviral HCCs, interestingly *FZD7* up-regulation appeared more frequent in HBV-related ones, correlating with our previous findings [9]. There is no information available regarding the possible interactions between HBV and the regulatory elements of *FZD7*, which emphasizes the need for additional investigations.

Of interest was the progressive accumulation of FZD-activating events (*WNT3/4/5A* and *FZD3/6/7* up-regulation, and *sFRP1/5* down-regulation) during the different steps of hepatocarcinogenesis. This accumulation began in pT tissues, with a gradient between non-cirrhotic and cirrhotic livers, and afterwards amplified with development and aggressiveness of tumors. These results suggest that the FZD-activating events may contribute in aggregate, and lead to activation of the downstream pathways which control the cancerous phenotype. Noticeably, *FZD3/7* were found more closely related to the dedifferentiated status of tumors, indicating their possible involvement in the later steps of hepatocarcinogenesis. However, their role remains questionable in metastasis processes and epithelial-mesenchymal transition as recently reported for *FZD7* in colon tumors [27]. Finally, as the *WNT/FZD/sFRP* signaling elements are dysregulated in most HCCs, we have been unable to find a specific association between their expression pattern and the occurrence of either *TP53* or *CTNNB1* gene mutations which paradoxically were shown as defining different clusters of HCC tumors [16].

In summary, we have described for the first time the expression patterns of upstream elements of the Wnt pathway during human hepatocarcinogenesis – i.e. *FZD/LRP* receptor complex and *WNT/sFRP* soluble modulators - and observed that most HCCs have hallmarks of Wnt pathway activation. This appears to be an early event that is initiated in precancerous liver tissues, and subsequently amplifies during

tumor progression. These observations suggest that activations of different elements of the WNT/FZD signaling accumulate with time, and are necessary for progression of these tumors. However, based on our results, mechanistic investigations are now warranted in an attempt to demonstrate the pro-oncogenic role of the various *WNT3/4/5A* and *FZD3/6/7* combinations during the different steps of hepatocarcinogenesis. Therefore, the Wnt pathway could be an excellent target for therapeutic approaches in this devastating disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the French National Biological Resources Centre for providing us with the frozen human liver tissues which were obtained following approved consent from the French Liver Tumor Network *Scientific Committee*. The French Liver Tumor Network is funded by the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR).

REFERENCES

- [1] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003, 362:1907-1917
- [2] Bosch FX, Ribes J, Cleries R, Diaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2005, 9:191-211
- [3] Lee JS, Thorgeirsson SS. Comparative and integrative functional genomics of HCC. *Oncogene* 2006, 25:3801-3809
- [4] Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006, 25:3787-3800
- [5] Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *BioEssays* 2002, 24:811-820
- [6] Tanaka S, Akiyoshi T, Mori M, Wands JR, Sugimachi K. A novel Frizzled gene identified in human esophageal carcinoma mediates APC/ β -catenin signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:10164-10169

- [7] Holcombe RF, Marsh JL, Waterman ML, Lin F, Milovanovic T, Truong T. Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma. *Mol Pathol* 2002, 55:220-226
- [8] Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 2002, 3:279-288
- [9] Merle P, de la Monte SM, Kim M, Herrmann M, Tanaka S, von dem Bussche A, et al. Functional consequences of Frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004, 127:1110-1122
- [10] Merle P, Kim M, Herrmann M, Gupte A, Lefrançois L, Califano S, et al. Oncogenic role of the Frizzled-7/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005, 43:854-862
- [11] The French METAVIR Cooperative Study Group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994, 20(1Pt1):15-20
- [12] Lu D, Zhao Y, Tawatao R, Cottam HB, Sen M, Leoni LM, et al. Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:3118-3123
- [13] Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, Chu JS, Lai PL, Peng SY. β -catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol* 2000, 157:763-770
- [14] Devereux TR, Stern MC, Flake GP, Yu MC, Zhang ZQ, London SJ, et al. CTNNB1 mutations and β -catenin protein accumulation in human hepatocellular carcinomas associated with high exposure to aflatoxin B1. *Mol Carcinog* 2001, 31:68-73
- [15] Wong CM, Fan ST, Ng IO. β -catenin mutation and over-expression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer* 2001, 92:136-145
- [16] Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2001, 120:1763-1773
- [17] Inagawa S, Itabashi M, Adachi S, Kawamoto T, Hori M, Shimazaki J, et al. Expression and prognostic roles of β -catenin in hepatocellular carcinoma:

- correlation with tumor progression and postoperative survival. *Clin Cancer Res* 2002, 8:450-456
- [18] de la Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, et al. Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:8847-8851
- [19] Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 2000, 24:245-250
- [20] Zeng ZY, Zhou YH, Zhang WL, Xiong W, Fan SQ, Li XL, et al. Gene expression profiling of nasopharyngeal carcinoma reveals the abnormally regulated Wnt signaling pathway. *Hum Pathol* 2007, 38:120-33
- [21] Kirikoshi H, Sekihara H, Katoh M. Up-regulation of Frizzled-7 (FZD7) in human gastric cancer. *Int J Oncol* 2001, 19:111-115
- [22] Qiang YW, Endo Y, Rubin JS, Rudikoff S. Wnt signaling in B-cell neoplasia. *Oncogene* 2003, 22:1536-1545
- [23] Shih YL, Shyu RY, Hsieh CB, Lai HC, Liu KY, Chu TY, et al. Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2006, 107:579-590
- [24] Shih YL, Hsieh CB, Lai HC, Yan MD, Hsieh TY, Chao YC, et al. SFRP1 suppressed hepatoma cells growth through Wnt canonical signaling pathway. *Int J Cancer* 2007, 121: 1028-1035
- [25] Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 2004, 36:417-422
- [26] Zeng G, Awan F, Otruba W, Muller P, Apte U, Tan X, et al. Wnt'er in liver: expression of Wnt and Frizzled genes in mouse. *Hepatology* 2007, 45:195-204
- [27] Vincan E, Darcy PK, Smyth MJ, Thompson EW, Thomas RJS, Phillips WA, et al. Frizzled-7 receptor ectodomain expression in a colon cancer cell line induces morphological change and attenuates tumor growth. *Differentiation* 2005, 73:142-153

TABLES

Table 1. Primers used for semi-quantitative real-time PCR.

Gene	Forward primer sequences (5'→3')	Reverse primer sequences (5'→3')
<i>FZD1</i>	cacctgtgagccgaccaa	cagcactgaccaaagtccaat
<i>FZD2</i>	tttctggcgagcgtgat	aaacgcgtctcctcctgtga
<i>FZD3</i>	tggctatggtggatgatcaag	tggaggctgccgtggta
<i>FZD4</i>	ggcggcatgtgtcttcagt	gaatttgctgcagttcagactctct
<i>FZD5</i>	cgcgagcacaaccacatc	agaagtagaccaggaggaagacgat
<i>FZD6</i>	acaagctgaaggtcatttccaaa	gctactgcagaagtgccatgat
<i>FZD7</i>	caacggcctgatgtactttaagg	catgtccaccaggtaggtagaga
<i>FZD8</i>	gctcggatcaagcaacag	acgggtgtagagcacggfgaac
<i>FZD9</i>	gcgctcaagaccatcgtcat	atccgtgctggccacgta
<i>FZD10</i>	gcccctcagctccat	tcatgtgtgagccgatgtcctt
<i>LRP5</i>	cgatggtccgacgatctcc	tccggccgctagtctgtc
<i>LRP6</i>	ggtatgtccacaccaagtctt	ctgaggagctgatcattgattta
<i>WNT1</i>	cgaacctgctfacagactccaa	tcagacgccgctgtttgcg
<i>WNT2</i>	ggatgaccaagtgtgggtgaag	gtgcacatccagagctccag
<i>WNT2B</i>	ggcacgagtgatctgtgacaata	cgcatgatgtctggtaacgc
<i>WNT3</i>	acttcggcgtgtagtgcc	catttgagggtgatgtggtc
<i>WNT3A</i>	gcccgtgctggacaaagct	ttctgcacatgagcgtgctact
<i>WNT4</i>	ggaggagacgtgcgagaaac	ccaggttccgcttgcacatct
<i>WNT5A</i>	ttctcttcgcccaggttata	cttctgacatctgaacagggtattc
<i>WNT5B</i>	ccaactcctggtgtcattagc	ctgggcaccgatgataaacatc
<i>WNT6</i>	cttcgccgctggaattgc	aggccgtctcccgaatgct
<i>WNT7A</i>	cgacgccatcatcgtcatagga	ggccattgcggaactgaaactg
<i>WNT7B</i>	gtgaagctcggagcactgtca	aggccaggaatctgttgaga
<i>WNT8A</i>	cgagaggcggaaactgatctt	cgaccctctgtccatagatg
<i>WNT8B</i>	aatcgggagacagcatttgca	atctccaaggctgcagttctagt
<i>WNT10A</i>	ctgggtgctcctgttctccta	gaggcggaggtccagaatg
<i>WNT10B</i>	cctcggggtctcctgttc	aggccagaatctcattgcttag
<i>WNT11</i>	cggtgctatggcatcaagtgg	gcaggttgcgtctggttcag
<i>WNT14</i>	ggcagacggcaagcaag	cccagccttgatcacctcaca
<i>WNT15</i>	gcctgcttgagtccagttt	ctctctgagcaggcccatc
<i>WNT16</i>	gccaaattgcccgtgaacagc	cggcagcaggtacggtttc
<i>sFRP1</i>	aggcggatttccctgtagt	tagggcaaccacggactctt
<i>sFRP2</i>	atttctgctccggatctca	tggagcagctaggagtgtgc
<i>sFRP4</i>	gctcaatgaggtcacaacg	gttcgaggatgggtgatga
<i>sFRP5</i>	gtcaaatgcgatcaagga	ttctggctccaatcagctt
<i>18SrRNA</i>	ggacacggacaggattgaca	acccacggaatcgagaaga

Table 2. Primers and DHPLC conditions used for *TP53* and *CTNNB1*.

Gene	Exons	Primer sequences (5'→3')	Amplicon size (bp)	DHPLC gradient (% elution buffer)	DHPLC temperatures (°C)
TP53	Exon 4	tgaggacctggctcctgac (forward) agaggaatcccaaagtcca (reverse)	412	57, 52, 46 (start) 65, 60, 54 (stop)	62, 65, 68
	Exon 5-6	tggtcacttgccctgact (forward) ttaaccctcctcccagaga (reverse)	467	58, 52, 50 (start) 64, 60, 58 (stop)	62, 66, 68
	Exon 7	ctggcacaggtctcccaa (forward) aggggtcagcgcaagcaga (reverse)	237	53 (start) 61 (stop)	64
	Exon 8-9	ttgggagtagatggagcct (forward) agtgttagactggaaacttt (reverse)	445	56, 54, 49 (start) 64, 62, 57 (stop)	60, 62, 68
CTNNB1	Exon 3	ccaatctactaatgctaactg (forward) ctgcattctgacttccagtaagg (reverse)	310	52, 49 (start) 60, 57 (stop)	60, 63

Table 3. Steady state levels of mRNAs for *FZD3*, *FZD6* and *FZD7* genes as assessed by quantitative RT-PCR in different human hepatoma cell lines by comparison to normal human primary hepatocytes.

Hepatocytes	FZD3	FZD6	FZD7
Normal primary hepatocytes	+/-	+	+/-
Hepatoma HepG2	++	++++	+/-
Hepatoma Hep3B	+	+++++	+
Hepatoma PLC/PRF/5	++	+	++
Hepatoma Focus	++	++++	++
Hepatoma Huh7	++	+	+++
Hepatoma SK-Hep1	+	+++++	++++

Table 4. Correlations between HCC (T and NT) and their respective: etiologic factors (HBV, HCV, NBNC), histopathology of T (G1, well; G2, moderate; G3, poor differentiation status) and NT (F1 to F4 fibrosis stage following Metavir criteria), *CTNNB1* and *TP53* gene mutations (del, deletion), and the number of the following events per tissue (up-regulation of *FZD3*, 6, 7, *WNT3*, 4, 5A, or down-regulation of *sFRP1*, *sFRP5*). ND, not determined.

HCC ID T / NT	Etiology	T differentiation / NT fibrosis stage	<i>CTNNB1</i> mutations	<i>TP53</i> mutations	Number of <i>WNT3-4-5A/FZD3-6-7/sFRP1-5</i> events
T / NT #1	HBV	G1 / F2	- / -	- / -	4 / 0
T / NT #2	HBV	G2 / F4	codon 41 / -	- / -	2 / 1
T / NT #3	HBV	G2 / F3	- / -	- / -	2 / 0
T / NT #4	HBV	G3 / F2	- / -	- / -	3 / 0
T / NT #5	HBV	G3 / F4	- / -	codon 249 / -	5 / 0
T / NT #6	HBV	G1 / F1	- / -	- / -	1 / 1
T / NT #7	HBV	ND / F4	codon 33 / -	codon 278 / -	1 / 2
T / NT #8	HBV	G2 / ND	- / -	- / -	6 / 3
T / NT #9	HBV	G2 / F4	- / -	- / -	4 / 1
T / NT #10	HBV	G3 / F4	- / -	codon 246 / -	1 / 0
T / NT #11	HBV	G1 / F2	- / -	codon 108 / -	1 / 2
T / NT #12	HBV	G2 / F4	- / -	- / -	3 / 2
T / NT #13	HBV	G2 / F4	- / -	- / -	4 / 0
T / NT #14	HBV	G2 / F1	- / -	codon 294 / -	2 / 1
T / NT #15	HBV	G2 / F3	codon 32 / -	- / -	4 / 3
T / NT #16	HBV	G2 / F4	- / -	exons 5-6 del / -	1 / 1
T / NT #17	HBV	G2 / F2	- / -	- / -	4 / 2
T / NT #18	HBV	G1 / F4	- / -	- / -	2 / 1
T / NT #19	HCV	G1 / F4	- / -	- / -	3 / 3
T / NT #20	HCV	G1 / F4	- / -	codon 205 / -	0 / 1
T / NT #21	HCV	G1 / F4	- / -	- / -	6 / 2
T / NT #22	HCV	G2 / F4	- / -	- / -	2 / 1
T / NT #23	HCV	G1 / F4	- / -	- / -	3 / 3
T / NT #24	HCV	G1 / F4	- / -	- / -	1 / 2
T / NT #25	HCV	G2 / F4	- / -	codon 115 / -	3 / 1
T / NT #26	HCV	G2 / F4	codon 33 / -	- / -	1 / 2
T / NT #27	HCV	ND / F3	- / -	codon 248 / -	3 / 1
T / NT #28	HCV	ND / F2	codon 37 / -	codon 220 / -	3 / 1
T / NT #29	HCV	G2 / F4	exon 3 del / -	- / -	3 / 1
T / NT #30	HCV	G1 / F2	- / -	- / -	2 / 1
T / NT #31	HCV	G1 / F4	codon 45 / -	- / -	2 / 1
T / NT #32	HCV	G2 / F1	codon 32 / -	- / -	4 / 0
T / NT #33	HCV	G1 / F3	codon 34 / -	- / -	4 / 0
T / NT #34	HCV	G1 / F3	codon 34 / -	- / -	3 / 0
T / NT #35	HCV	G1 / F3	- / -	codon 161 / -	2 / 0
T / NT #36	HCV	G1 / F4	- / -	- / -	2 / 0
T / NT #37	HCV	G1 / F2	codon 32 / -	- / -	2 / 0
T / NT #38	HCV	G1 / F4	- / -	- / -	2 / 0
T / NT #39	NBNC	G2 / F4	codon 33 / -	- / -	4 / 4
T / NT #40	NBNC	G1 / F4	- / -	- / -	2 / 2
T / NT #41	NBNC	G1 / F4	- / -	- / -	4 / 2
T / NT #42	NBNC	G2 / F4	- / -	- / -	1 / 3
T / NT #43	NBNC	ND / ND	codon 45 / -	codon 33 / -	1 / 3
T / NT #44	NBNC	G2 / F4	codon 33 / -	- / -	4 / 3
T / NT #45	NBNC	G2 / F4	- / -	- / -	2 / 1
T / NT #46	NBNC	G1 / F4	codon 45 / -	- / -	1 / 3
T / NT #47	NBNC	G1 / F4	- / -	- / -	1 / 1
T / NT #48	NBNC	G1 / F4	- / -	- / -	2 / 0
T / NT #49	NBNC	ND / F2	- / -	- / -	0 / 0
T / NT #50	NBNC	G2 / F4	- / -	- / -	4 / 1
T / NT #51	NBNC	G2 / F4	- / -	codon 249 / -	0 / 0
T / NT #52	NBNC	G1 / F4	- / -	- / -	1 / 1
T / NT #53	NBNC	G3 / F4	exon 3 del / -	codon 280 / -	7 / 0
T / NT #54	NBNC	G1 / F4	- / -	- / -	1 / 1
T / NT #55	NBNC	ND / F4	- / -	- / -	2 / 2
T / NT #56	NBNC	G1 / F4	- / -	- / -	2 / 0
T / NT #57	NBNC	G1 / F4	- / -	- / -	1 / 2
T / NT #58	NBNC	ND / F4	- / -	- / -	4 / 1
T / NT #59	NBNC	G2 / F4	- / -	- / -	3 / 1
T / NT #60	NBNC	ND / ND	- / -	- / -	5 / 1
T / NT #61	NBNC	ND / ND	- / -	- / -	5 / 0
T / NT #62	NBNC	ND / ND	- / -	- / -	3 / 1

FIGURES

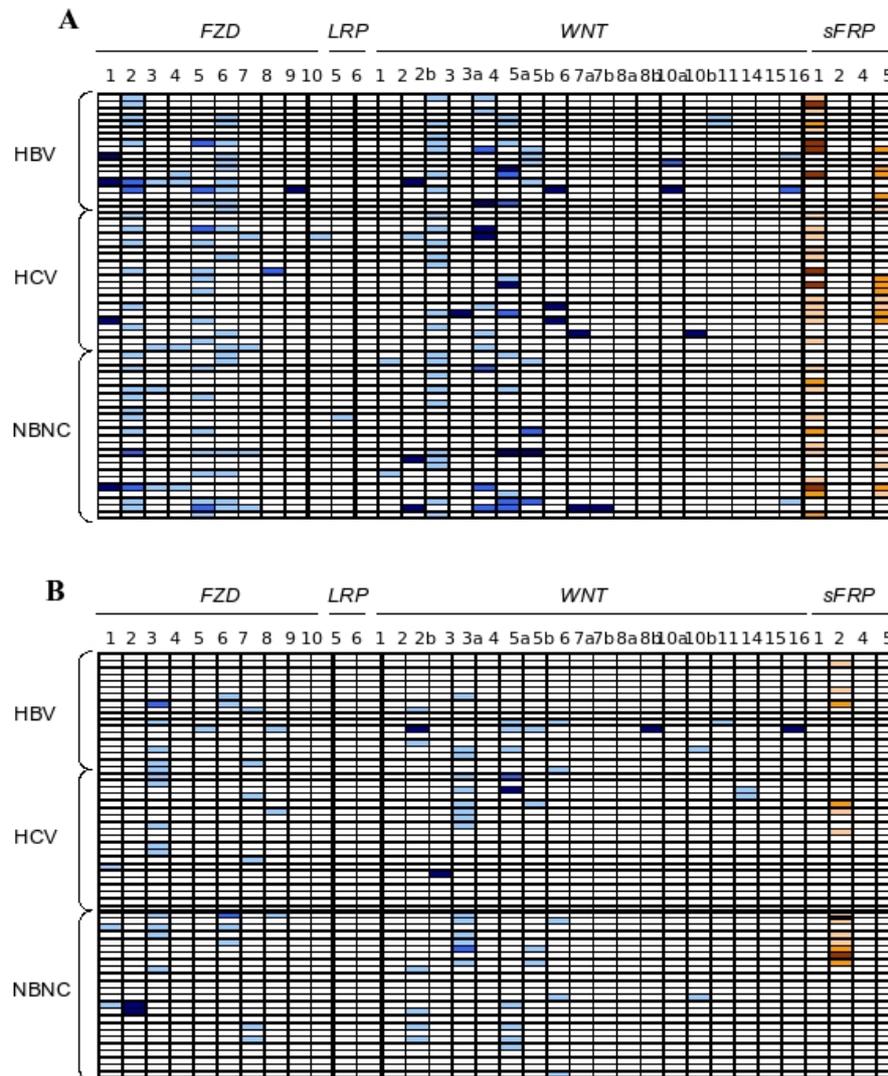


Figure 1. Expression patterns of *FZD*/*LRP*/*WNT*/*sFRP* genes in HCC tissues in tumor (A), and the surrounding nontumorous liver parenchyma (B). Each line represents a different HCC tissue depending on the etiologic factor (lines 1 to 18 for HBV, lines 19 to 38 for HCV, and lines 39 to 42 for NBNC). Up-regulation of genes are indicated as light blue (1-5 fold), medium dark blue (5-10 fold), or dark blue (> 10 fold). Down-regulation of genes are indicated in pink (1-1/5 fold), orange (1/5-1/10 fold), or brown (< 1/10 fold).

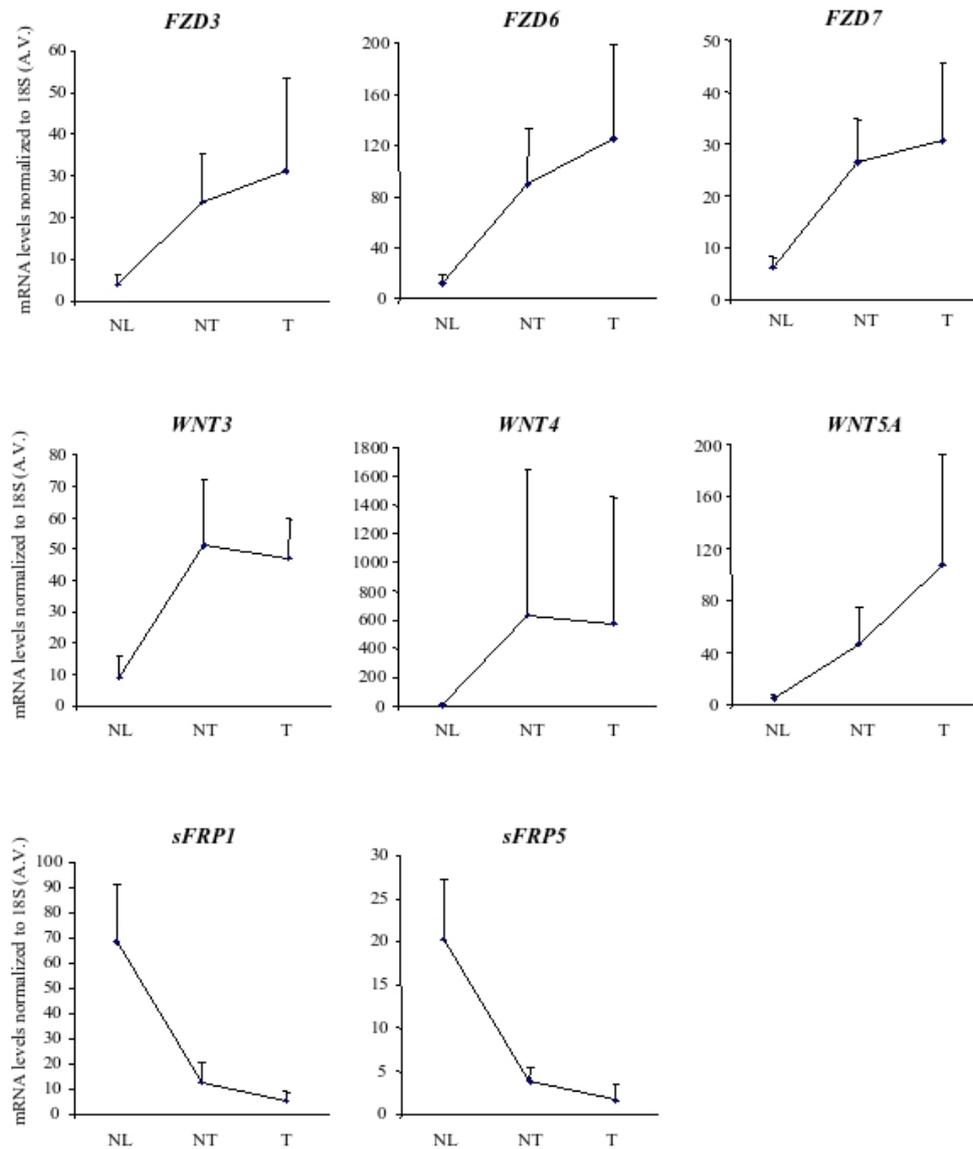


Figure 2. Profiles of mRNA steady state level variations between normal liver (NL) and HCC tumors (T) and their surrounding matched liver parenchyma (NT) for *FZD3/6/7*, *WNT3/4/5A* and *sFRP1/5* as assessed by semi-quantitative real-time RT-PCR following normalization to *18S rRNA* and expressed as arbitrary values (described in *Material and Methods*). For calculation of averages and standard deviations in T and NT, only values considered as either up-regulated for *FZD3/6/7* and *WNT3/4/5A* or down-regulated for *sFRP1/5* were taken into account.

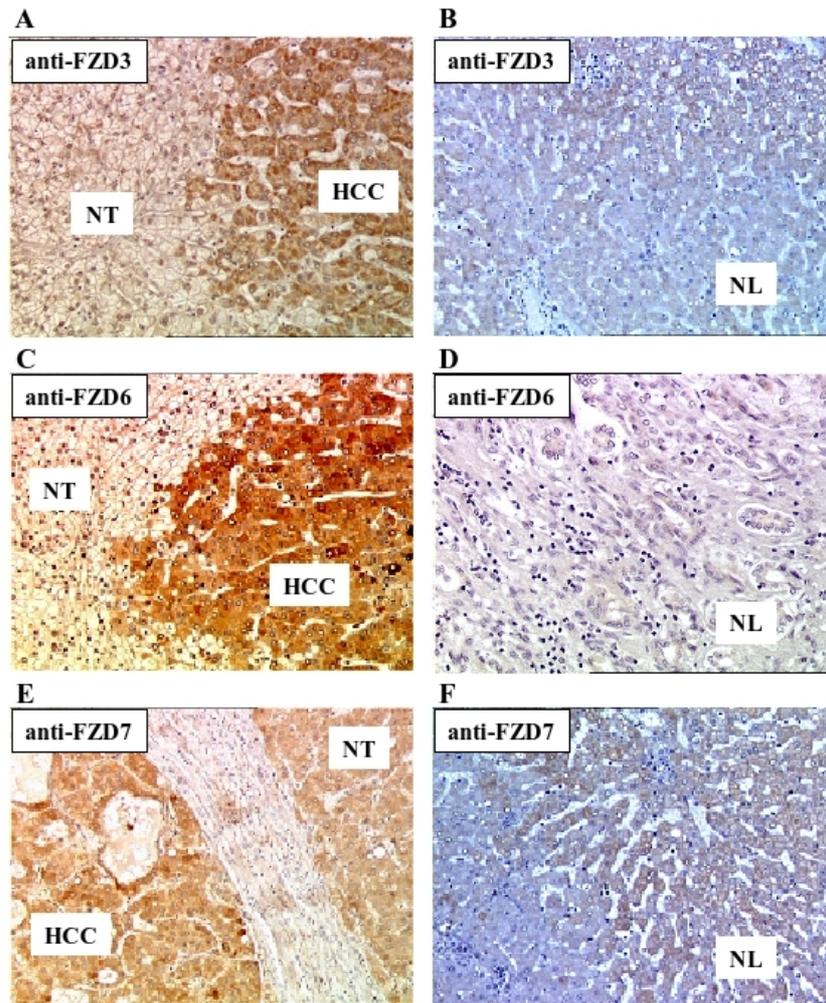


Figure 3. Representative examples of immunostaining for Frizzled receptors in liver sections involving both HCC (T) and the surrounding nontumorous liver parenchyma (NT) for FZD3 (A), FZD6 (C) and FZD7 (E). Staining of normal liver (NL) is presented for comparison for (B, D, and F). Frizzled-3 was detected in HCC as compared to adjacent nontumorous hepatocytes (A). In the normal liver, only a faint labeling was observed in the perivenous area of the lobule (B). Frizzled-6 was strongly expressed in HCC cells as compared to adjacent nontumorous hepatocytes (C). In the normal liver, no expression was detected either in hepatocytes or normal biliary epithelial cells (D). Frizzled-7 was highly expressed in a well differentiated HCC (E). In the normal liver faint labeling was observed in the perivenous region of the lobule (F).

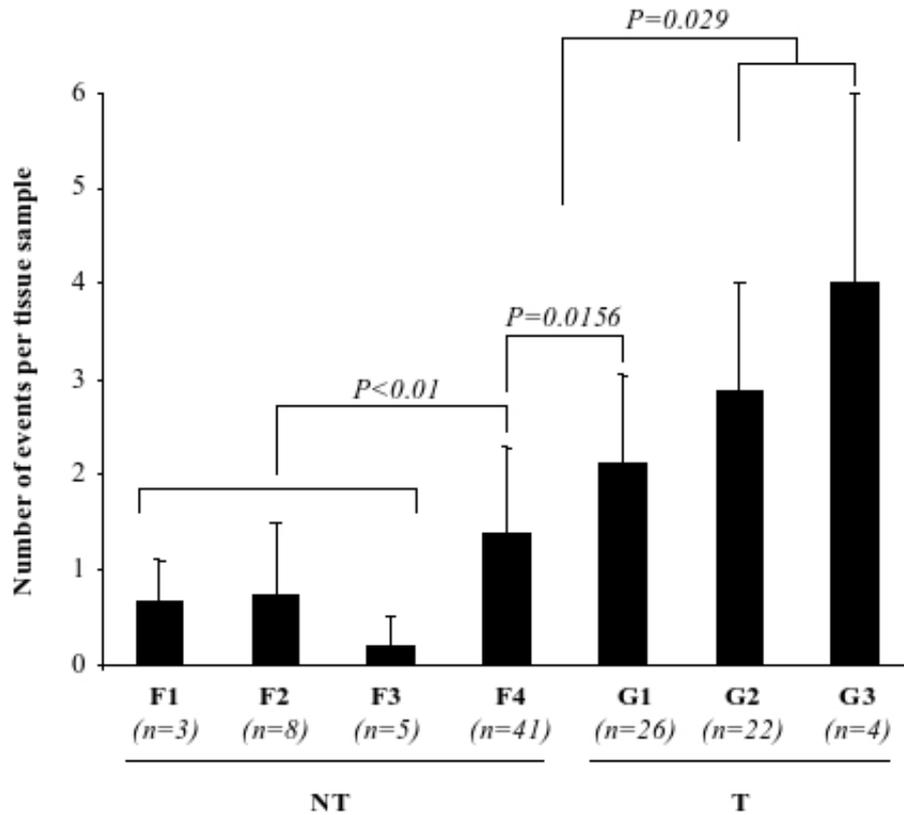


Figure 4. Average number of events – i.e. up-regulation of *FZD3*, *FZD6*, *FZD7*, *WNT3*, *WNT4*, *WNT5A* or down-regulation of *sFRP1*, *sFRP5* – per tissue sample. Comparisons were made between HCC tumors (T) of well (G1), moderately (G2) or poorly (G3) differentiation status and the surrounding noncancerous liver parenchyma at different stages of fibrosis (F1 to F4) using the following Metavir criteria; where F4 represents the cirrhotic stage and F1 to F3 are various stages of the noncirrhotic fibrotic process.

Discussion et perspectives

I. Les mutations des gènes *TP53* et *CTNNB1* sont-elles des biomarqueurs du CHC ?

A. Les mutations sont-elles associées aux étiologies ?

Deux grands mécanismes distincts d'hépatocarcinogénèse ont été décrits, l'un associé à une instabilité génomique, à la mutation du gène *TP53*, et à l'infection par le VHB; et l'autre associé à une stabilité génomique, à la mutation du gène *CTNNB1* et à une absence d'infection par le VHB (Laurent-Puig et Zucman-Rossi 2006). Bien que ces deux mécanismes ne soient pas présentés comme mutuellement exclusifs, cette distinction propose que la détection de mutations dans l'un de ces deux gènes dans une tumeur de CHC puisse servir de marqueur du mécanisme moléculaire impliqué.

Dans les études que nous avons menées, nous avons montré que les mutations du gène *TP53* sont plus fréquentes que dans le gène *CTNNB1* en Thaïlande et sont associées au VHB, facteur viral prédominant. En France, les mutations dans les deux gènes sont aussi fréquentes l'une que l'autre. Les mutations dans le gène *CTNNB1* sont plus fréquentes dans ces tumeurs, où le VHC est le facteur viral prédominant. Les types de mutation du gène *TP53* sont également concordants avec les données sur l'exposition à l'AFB1. En effet, dans les tumeurs de Thaïlande où l'exposition à l'AFB1 est présente, 7 des 9 mutations du gène *TP53* sont des mutations Ser249, alors qu'aucune des tumeurs de France où l'exposition à l'AFB1 est nulle ne contient cette mutation.

Cependant, nous avons montré que les mutations des gènes *TP53* et *CTNNB1* ne sont pas mutuellement exclusives, et que si les mutations sont associées à une étiologie, elles ne sont pas exclusives de cette étiologie et ne représentent donc pas des biomarqueurs spécifiques des mécanismes de la cancérogenèse hépatique. Par exemple, en Thaïlande, les mutations de *CTNNB1* ne sont pas associées à une étiologie particulière, et en France, nous avons trouvé des mutations de *TP53* et *CTNNB1* à la fois dans des CHC liés au VHB, au VHC ou à aucun de ces deux virus. Le modèle de deux mécanismes distincts d'hépatocarcinogénèse n'est donc pas satisfaisant.

B. Les mutations sont le résultat d'un mécanisme complexe d'hépatocarcinogénèse

Nous avons observé la présence simultanée de mutations dans les gènes *TP53* et *CTNNB1* dans les CHC de France et de Thaïlande. Ces résultats pourraient être dus au caractère polyclonal des CHC, chaque mutation pouvant être présente dans des populations cellulaires différentes de la tumeur. Dans nos échantillons, la surexpression des protéines p53 et β -caténine a été étudiée par des immunomarquages. Ceux-ci montrent des distributions homogènes dans les lésions, sans répartition différentielle des marquages de p53 ou de la β -caténine. Toutefois, cet aspect n'a pas été étudié au niveau cellulaire, où des double marquages auraient pu permettre de distinguer différentes zones avec des profils différents d'expression des deux protéines, ce qui nous aurait indiqué une possible origine polyclonale des CHC.

La présence de mutations des gènes *TP53* et *CTNNB1* dans un même échantillon peut également signifier que le modèle des deux mécanismes de l'hépatocarcinogénèse est trop catégorique, et que d'autres facteurs doivent être pris en compte pour décrire les voies par lesquelles les tumeurs se forment et progressent. Un facteur critique de ce point de vue est la temporalité de l'occurrence des mutations. En effet, les voies de la β -caténine et de p53 sont liées par plusieurs interconnexions moléculaires, et les deux protéines exercent des régulations l'une sur l'autre (cf. figure 56). La β -caténine peut activer c-myc qui active p14^{ARF}, qui inhibe à son tour le complexe MDM2/p53 (Brooks et Gu 2006). La protéine p53 est alors activée et s'accumule de façon transitoire, exerçant un effet suppresseur qui prévient la prolifération cellulaire intempestive en réponse à un stress oncogénique. En retour, la protéine p53 peut activer SIAH-1 qui inhibe la β -caténine en favorisant le complexe GSK3- β /Axin1/APC/ β -caténine, ciblant cette dernière vers sa dégradation (Iwai *et al.* 2004) (figure 56 A). Un tel mécanisme fait probablement partie des voies par lesquelles p53 peut contrôler la prolifération de cellules où la voie β -caténine joue un rôle central.

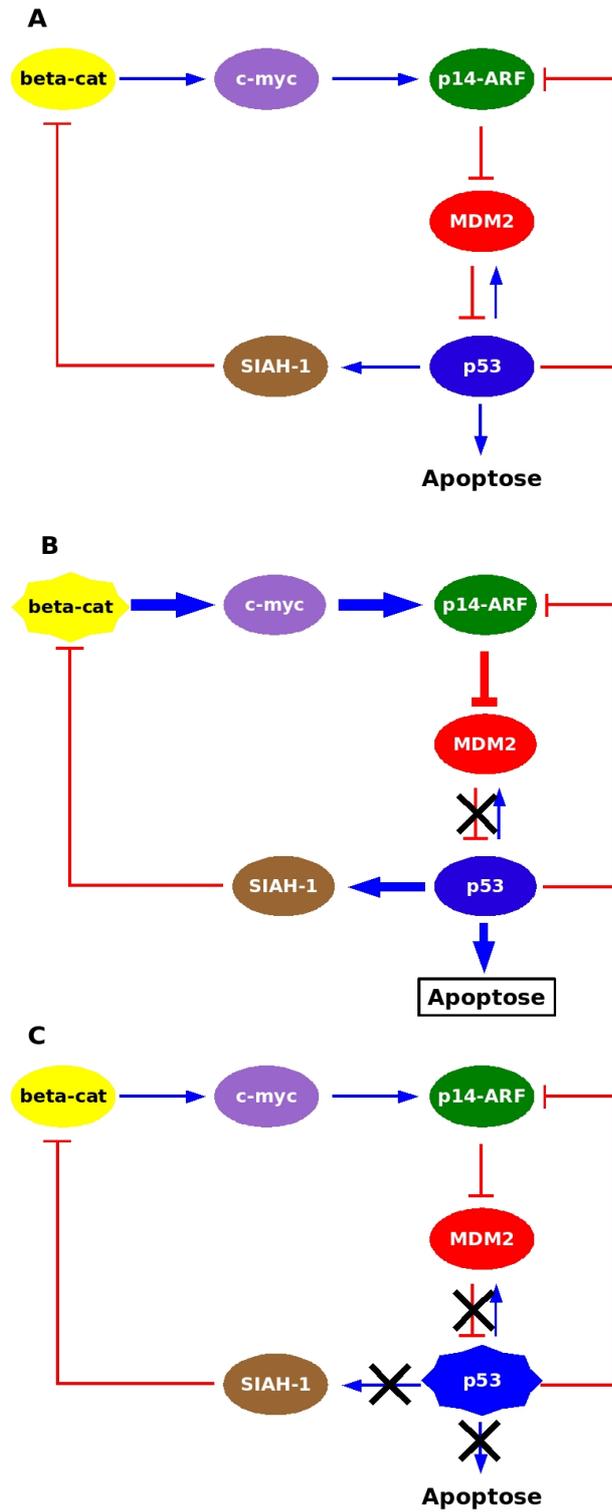


Figure 56 : En A : schéma de la régulation des protéines p53 et β -caténine exercée l'une sur l'autre. En B : situation lorsque que la β -caténine est mutée. En C : situation lorsque p53 est mutée.

Dans le cas où la mutation du gène *CTNNB1* au niveau d'un point chaud constitue un événement précoce dans la séquence temporelle de la cancérogenèse hépatique, la β -caténine n'est plus ciblée vers sa dégradation et peut s'accumuler, ce qui induit l'activation de p53 (figure 56 B). Cette dernière va induire l'inhibition de la β -caténine. Or, cette inhibition passe par le complexe GSK3- β /Axin1/APC/ β -caténine, qui ne remplit plus son rôle lorsque la β -caténine est mutée (Giles *et al.* 2003). La β -caténine continue donc à s'accumuler. Si la protéine p53 est fonctionnelle, elle va répondre à ce stress oncogénique par l'induction de l'apoptose. Il y a donc une forte pression de sélection en faveur de clones où la voie p53 est inactivée. Cette inactivation peut résulter de mutations du gène *TP53* ainsi que d'autres mécanismes, en particulier la perte ou l'inactivation de p14^{ARF}. Dans ce contexte, la mutation de *TP53* apparaît de manière secondaire à la mutation de *CTNNB1*. Elle ne constitue pas un passage obligé puisque le même effet fonctionnel peut être atteint par l'inactivation de p14^{ARF}, par exemple par hyperméthylation de son promoteur (Dominguez *et al.* 2003).

Dans le cas où la mutation de *TP53* constitue l'événement précoce dans la séquence temporelle de la cancérogenèse, la protéine p53 mutée ne peut plus ni induire l'apoptose, ni activer la β -caténine (figure 56 C). Dès lors, la cellule a acquis la capacité de survivre dans des conditions défavorables telles que l'exposition à des agents qui endommagent l'ADN ou des stimuli prolifératifs intempestifs. Cependant, la mutation de *TP53* n'est vraisemblablement pas, à elle seule, un événement suffisant pour initier le processus de transformation, comme le suggère le fait que de nombreuses copies d'ADN muté au codon 249 de *TP53* soient détectables dans le plasma d'individus sans lésions néoplasiques dans le foie. La transformation et la progression tumorale requièrent donc l'activation secondaire d'autres voies par l'intermédiaire de mutations ou d'autres altérations. Les mutations du gène *CTNNB1* peuvent intervenir dans ce contexte mais ne constituent pas un passage obligé.

Ce double modèle rend compte de l'existence possible de deux grands mécanismes différents pour l'hépatocarcinogénèse, caractérisés par l'ordre d'apparition des altérations de *TP53* et de *CTNNB1* dans la séquence temporelle des événements oncogéniques. Il explique aussi comment les deux types d'altérations peuvent co-exister dans la même tumeur. La mise en place de ces mécanismes dépend

de l'étiologie et donc de l'impact moléculaire des facteurs de risque viraux, génétiques et environnementaux. Par exemple, lorsque l'exposition à l'AFB1 est forte, le gène *TP53* est le premier muté au codon 249, ce qui explique le pourcentage faible de CHC contenant une mutation dans le gène *CTNNB1* dans ce contexte.

C. Activation de la voie Wnt et marqueur précoce d'hépatocarcinogénèse

L'activation de la voie Wnt par surexpression des récepteurs Frizzled, des co-récepteurs, des ligands activateurs, ou par répression des inhibiteurs, semble être un événement précoce dans le développement d'un CHC puisqu'on retrouve ces dérégulations à la fois dans le tissu cancéreux et dans le tissu adjacent. Cependant, l'origine de ces dérégulations est inconnue, et ne semble pas liée à la présence des mutations dans les gènes *TP53* et *CTNNB1*. Nous pouvons supposer que l'activation de la voie Wnt par ces dérégulations n'est pas suffisante pour acquérir le phénotype malin.

L'activation de la voie Wnt par sa dérégulation en amont pourrait mettre en place un contexte favorisant le développement d'un CHC, mais sans favoriser particulièrement l'apparition de mutations dans le gène *TP53* ou défavoriser l'apparition de mutations dans le gène *CTNNB1*. En effet, l'activation anormale et constitutive de la voie Wnt devrait activer p53 et donc exercer une pression de sélection favorisant l'inactivation de la voie p53, comme nous l'avons vu plus haut. De même, si la voie Wnt est constitutivement activée, les mutations de *CTNNB1* ne sont pas particulièrement sélectionnées. Nous nous attendrions donc à trouver plus de mutations dans le gène *TP53* et moins dans le gène *CTNNB1*. Nous pouvons donc supposer que l'activation de la voie Wnt en amont n'est pas suffisante ou pas assez efficace pour permettre une activation constitutive de la β -caténine mimant l'activation liée à la présence d'une mutation dans le gène *CTNNB1*. Cependant, la forte prévalence de l'activation de la voie Wnt en amont (95% des tissus tumoraux étudiés) montre qu'elle est associée au développement du CHC. Le mécanisme à l'origine de cette dérégulation et l'effet sur les hépatocytes reste à éclaircir.

Puisque l'activation en amont de la voie Wnt semble être précoce, sa détection pourrait servir de marqueur précoce du développement d'un CHC. Il suffirait d'analyser une biopsie chez les patients à risque. Cependant, il reste à vérifier que cette activation est bien spécifique du CHC, et ne se retrouve pas dans des foies de patients cirrhotiques ou atteints d'hépatite virale, mais n'ayant pas encore développé de CHC. La compréhension du mécanisme sous-jacent à l'activation de la voie Wnt serait d'autant plus intéressant qu'il pourrait alors permettre de proposer une thérapie préventive très précoce chez ces patients à risque et d'éliminer ce contexte favorisant le développement d'un CHC.

D. Mutation Ser249 et ADN circulant

D.1. Un marqueur d'exposition à l'AFB1 et au VHB

La prévalence de la mutation Ser249 dans les CHC a été établie dans plusieurs études effectuées dans des régions de forte, moyenne ou faible exposition à l'AFB1. Ces études ont montré une relation entre la prévalence de la mutation Ser249, l'exposition à l'AFB1, et l'incidence de CHC en particulier dans un contexte d'infection par le VHB (Montesano *et al.* 1997). Nos résultats sur les échantillons tumoraux de Thaïlande (27% des échantillons présentent la mutation Ser249) et de France (0% de mutation Ser249) sont conformes à ces données. De fait, les données d'exposition suggèrent que l'AFB1 reste un contaminant potentiel de l'alimentation traditionnelle en Thaïlande (Montesano *et al.* 1997, Hollstein *et al.* 1993). La présence de la mutation Ser249 dans les tumeurs peut donc être considérée comme un marqueur de l'étiologie du CHC associé à l'exposition à l'AFB1.

Chez les patients atteints d'un CHC présentant la mutation Ser249, la même mutation peut être détectée dans leur ADN circulant avec une très bonne concordance entre plasma et tumeur (Szymańska *et al.* 2004). L'ADN circulant est donc un bon matériel de remplacement pour étudier les altérations présentes dans une tumeur hépatique. Une étude longitudinale menée en République populaire de Chine a montré que la mutation pouvait être retrouvée dans l'ADN circulant de sujets non diagnostiqués pour un CHC, et ce, de un à 5 ans avant le diagnostic (Jackson *et al.*

2003). De plus, dans les études cas-contrôle menées en Gambie, la mutation Ser249 s'est avérée détectable dans l'ADN circulant d'une partie des patients atteints de cirrhose mais sans cancer (15%) ainsi que de sujets sans diagnostic clinique de lésion hépatique (3%) (Kirk *et al.* 2005a). La question est donc de déterminer si la présence de la mutation Ser249 dans l'ADN circulant de sujets sans lésion cancéreuse diagnostiquée constitue un marqueur de l'existence de lésions sub-cliniques (indétectables par les méthodes de diagnostic utilisées en Gambie), ou bien si elle témoigne simplement du fait que ces sujets sont exposés à l'AFB1, et donc susceptibles d'accumuler transitoirement de l'ADN muté suite à la formation de lésions promutagènes dans l'ADN des hépatocytes.

L'étude que nous avons menée sur la mutation Ser249 dans l'ADN circulant de porteurs chroniques asymptomatiques et de non porteurs chroniques du VHB, a montré que deux facteurs prédominants influencent la présence et la concentration de la mutation dans le sérum. Ces deux facteurs sont le portage chronique du VHB et le mois de prélèvement.

Chez les porteurs chroniques du VHB, la mutation est détectée chez un plus grand nombre d'individus, et en plus forte concentration (exprimée en copies de mutation Ser249 par μL de sérum) entre mars et juillet que pendant le reste de l'année. Chez les non-porteurs chroniques du VHB, la mutation est détectée chez un plus grand nombre d'individus entre mars et juillet que le reste de l'année, mais les concentrations en mutation dans le sérum restent globalement très faibles.

Cette variation temporelle répond aux variations connues de l'exposition à l'AFB1 tout au long de l'année. Nous avons déterminé que la période où nous trouvons le plus de mutation Ser249 dans l'ADN circulant suit de quelques semaines la période où les individus sont soumis à la plus forte exposition à l'AFB1. En effet, à la fin de la saison des pluies, les arachides sont récoltées (septembre/octobre), stockées dans des conditions humides et chaudes favorables au développement d'*A. flavus* qui produit de l'AFB1, qui s'accumule dans les aliments conservés (cf. figure 57). Le dosage d'adduits des métabolites de l'AFB1 sur l'albumine dans le sérum suggère que l'exposition à l'AFB1 augmente au fur et à mesure de la consommation de ce stock d'arachides pour atteindre son maximum durant l'hiver avant de diminuer au printemps en raison de l'épuisement des réserves et de la diversification des sources

d'alimentation disponibles à cette période (Turner *et al.* 2000). Après consommation des arachides contaminées, l'AFB1 pourrait s'accumuler dans les hépatocytes où elle est métabolisée, permettant la formation d'adduits sur l'ADN. Des mutations Ser249 peuvent donc se former et persister dans les hépatocytes jusqu'à ce qu'ils atteignent leur fin de vie et soient éliminés par un processus de nécrose ou d'apoptose entraînant la libération de fragments d'ADN dans le sang. Ce mécanisme explique les 2-3 mois de délai entre le pic d'exposition à l'AFB1 et le pic de détection de la mutation Ser249 dans l'ADN circulant. La saisonnalité des variations de la concentration en ADN Ser249 dans l'ADN circulant suggère donc que la mutation Ser249 est un marqueur de l'exposition à l'AFB1.

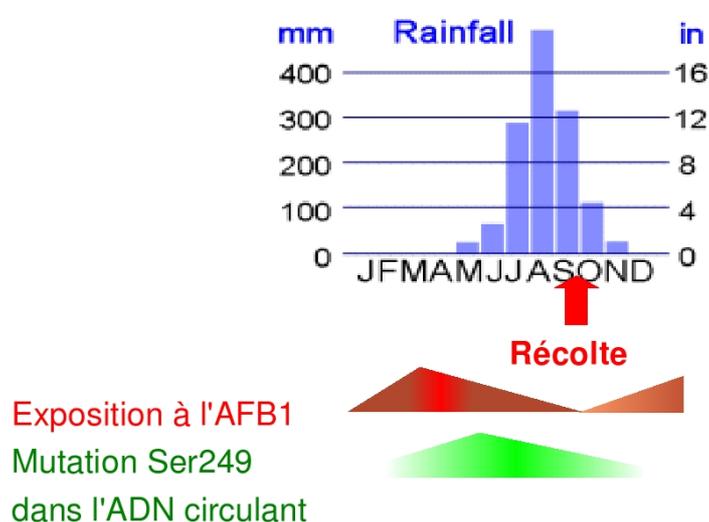


Figure 57 : Graphique représentant la pluviométrie en Gambie, et la relation avec l'exposition à l'AFB1, la récolte des arachides, la présence et la concentration de la mutation Ser249 dans l'ADN circulant.

D'une manière globale, les porteurs chroniques du VHB montrent des concentrations en mutation Ser249 dans le sérum plus élevées que les non-porteurs chroniques. Ceci suggère une interaction étroite entre le VHB chronique et l'AFB1 dès les premiers stades de l'exposition. En effet, la présence du VHB pourrait influencer la formation de lésions dans l'ADN par les métabolites de l'AFB1, leur réparation, ainsi que le temps de vie des cellules altérées et la libération de leur ADN dans la circulation sanguine. Or, les échantillons de sérum des porteurs chroniques sont significativement plus concentrés en ADN que les échantillons de sérum des non-porteurs chroniques, ce qui suggère un effet du virus sur le relargage de l'ADN, peut-

être à cause de l'existence d'un stress cellulaire chronique causé par le virus. Les hautes concentrations en ADN muté Ser249 chez les porteurs chroniques pourraient donc être liées à un renouvellement plus important des cellules hépatiques infectées. Cependant, il faut signaler que la concentration totale d'ADN circulant et muté Ser249 n'est pas significativement associée à la positivité pour l'antigène HBe, ce qui indique qu'elle n'est pas affectée par l'existence d'une réplication active du virus. Dans cette étude, nous n'avons pas pu disposer d'une batterie de tests de fonction et de toxicité hépatiques, qui auraient pu nous informer sur l'état global de "stress" hépatique et sur la possibilité que ce stress explique la libération plus importante d'ADN dans le sang.

L'hypothèse d'une interaction spécifique par laquelle le VHB chronique favoriserait la mutagenèse par l'AFB1 ne peut donc être écartée. Plusieurs mécanismes possibles ont été mis en évidence dans d'autres systèmes : la présence du virus pourrait, par exemple, augmenter le métabolisme de l'AFB1, la formation de lésions promutagènes, diminuer la réparation, ou favoriser une prolifération cellulaire compensatoire qui stabilise au moins de façon temporaire des clones ayant acquis une mutation.

Étant donné que les différents génotypes du VHB pourraient avoir un comportement et un effet différent sur le foie, nous avons cherché à savoir s'il existait des correspondances entre la présence de variants viraux particuliers et la présence de la mutation Ser249 dans l'ADN circulant. Nous avons observé une concordance entre la présence de certains variants et la concentration en mutation Ser249 détectée dans le sérum. La mise en évidence de différences dans les propriétés de ces variants pourrait permettre de comprendre les bases moléculaires de la synergie entre VHB et AFB1. D'autre part, il sera intéressant de déterminer si les variants qui favorisent la formation de mutations Ser249 dans l'ADN circulant sont préférentiellement présents chez les patients cancéreux.

Nous savons que des facteurs génétiques, notamment les polymorphismes des gènes codant des protéines intervenant dans la réparation de l'ADN et la métabolisation de l'AFB1, interviennent comme modulateurs dans l'acquisition de la mutation Ser249 (Kirk *et al.* 2005b). Or, il a été montré que le VHB pourrait agir sur

ces systèmes de réparation et de métabolisation. Les différences d'effet de nos variants pourraient donc s'expliquer par des différences dans leurs interactions avec les systèmes de réparation de l'ADN et de métabolisation de l'AFB1. À l'appui de cette hypothèse, une étude sur des souris transgéniques exprimant le VHB avec ou sans la protéine X a montré que l'expression de la protéine X favorisait la mutagenèse due à l'exposition à l'AFB1 (Madden *et al.* 2002). Il faudrait donc étudier la protéine X de nos variants afin de voir si les différences observées entre variants viennent des différences d'effet de leur protéine X sur la mutagenèse AFB1-dépendante.

Les données discutées ci-dessus montrent que la présence de la mutation Ser249 dans l'ADN circulant d'individus asymptomatiques pour des maladies du foie est non seulement un marqueur d'exposition à l'AFB1 mais aussi un marqueur d'exposition au VHB.

D.2. Un marqueur d'hépatocarcinogénèse ?

Une étude précédente, conduite sur le mode cas-contrôle, a montré que la concentration en mutation Ser249 dans le sérum est associée au statut hépatique, et notamment lorsque cette concentration est supérieure à 10 copies Ser249/ μ L de sérum (Leonart *et al.* 2005). Or, dans notre étude, nous avons détecté des concentrations au delà de ce seuil chez certains individus. Le dépassement de ce seuil est-il indicatif de lésions pré-cancéreuses ou cancéreuses ? Pour répondre à cette question il faudrait faire un bilan du statut hépatique de ces individus et vérifier sur le registre des cancers si ces individus n'ont pas été diagnostiqués pour un cancer du foie depuis le prélèvement. Cette vérification est actuellement en cours. Sur base des données d'incidence du CHC et des estimations du risque attribuable au VHB dans les régions rurales de Gambie (taux d'incidence standardisé sur l'âge de de 35,7/100 000 hommes et 11,2/100 000 femmes, dont 53% sont attribuables au VHB), on doit cependant s'attendre à ce que moins d'un individu par an développe un cancer dans notre cohorte de porteurs chroniques.

L'étude longitudinale sur des porteurs chroniques du VHB dans le cadre de l'évaluation de différents anti-viraux a montré qu'il existe des variations inter-

individuelles de la concentration en mutation Ser249 dans le sérum, ainsi que des variations temporelles en fonction de la date de prélèvement. Si nous considérons que la concentration en mutation dans le sérum peut non seulement être un marqueur d'exposition mais aussi un marqueur de cancérogenèse, nous pouvons émettre l'hypothèse que ce n'est pas la concentration en elle-même qui est informative, mais sa variation au cours du temps. En effet, si la présence d'ADN muté dans le plasma est due à la libération d'ADN muté par une lésion pré- ou sub-clinique, les niveaux d'ADN mutés dans le plasma devraient rester constants, ou même montrer une augmentation reflétant l'évolution de la lésion, indépendamment des variations temporelles de l'exposition à l'AFB1 (figure 58, courbe rouge).

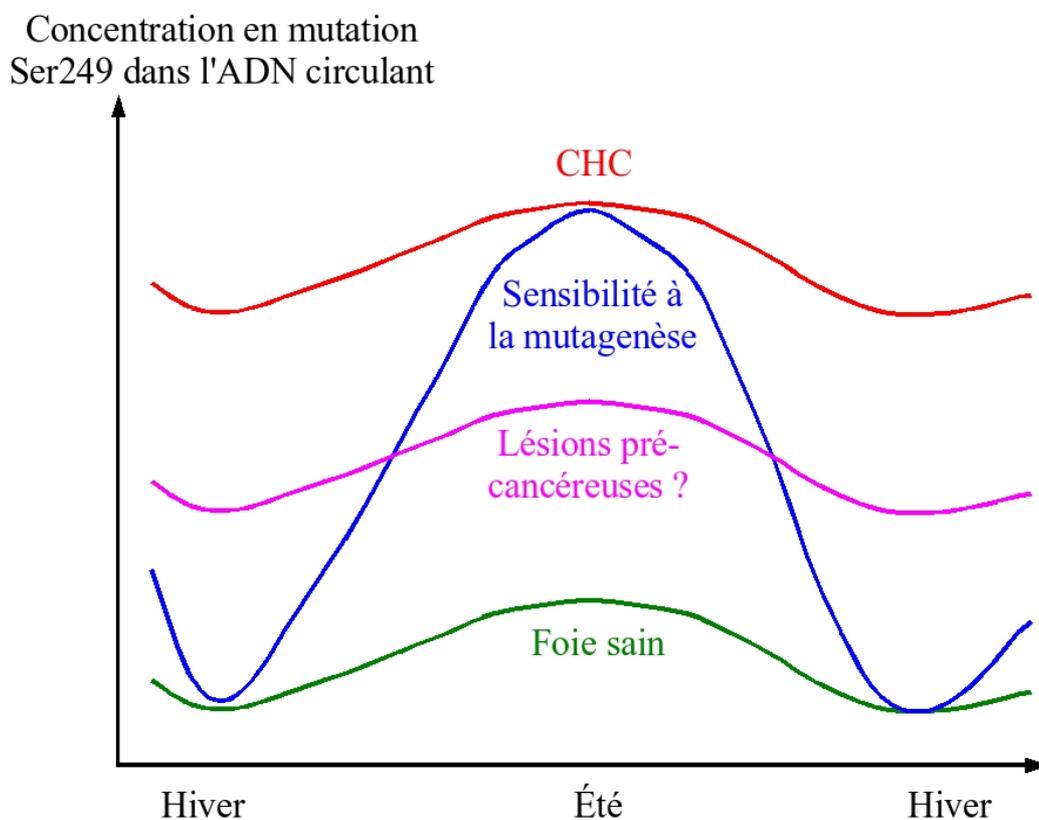


Figure 58 : Graphique représentant l'hypothèse sur la relation entre les variations de la concentration en mutation Ser249 dans le sérum et le statut hépatique.

Dans le cas d'un individu sain, la concentration seuil de la mutation Ser249 dans le sérum serait près de zéro et varierait plus ou moins selon la sensibilité de l'individu à l'exposition et la mutagenèse due à l'AFB1. Nous pouvons supposer que

chaque année, l'individu éliminerait au fur et mesure les cellules mutées et donc la concentration de la mutation dans le sérum redescendrait à un seuil très bas en période de faible exposition (figure 58, courbes verte et bleue). Un individu présentant un profil intermédiaire, avec un seuil de base intermédiaire de concentration en mutation Ser249 dans le sérum, pourrait être déterminé comme un individu n'éliminant pas tous ses hépatocytes mutés, et qui pourrait donc être en train de développer des lésions précancéreuses ou cancéreuses (figure 58, courbe rose).

Nos résultats montrent donc qu'une étude sur la mutation Ser249 dans l'ADN circulant doit prendre en compte la période de prélèvement. Dans les études publiées précédemment, la saison de prélèvement est rarement discutée. Nous pouvons supposer que la prise en compte de ces variations pourrait permettre d'affiner les analyses statistiques sur les corrélations entre mutation et pathologies hépatiques. En effet, la dispersion des prélèvements dans le temps ajoute un facteur de variation, qui peut jouer sur les résultats des tests statistiques.

Si notre hypothèse se vérifie, la détermination des caractéristiques des variations saisonnières de la concentration en mutation Ser249 dans le sérum pourrait servir à détecter les individus les plus sensibles à la mutagenèse hépatique due à l'AFB1 et au VHB, à détecter les individus les plus à risque de développer une maladie du foie, et à effectuer un diagnostic précoce du CHC. En première approche, la détection de hauts niveaux d'ADN muté dans le plasma pourrait constituer une indication pour la réalisation d'investigations cliniques plus poussées, notamment par échographie hépatique, afin de détecter des lésions indétectables à l'examen clinique. Ceci pourrait permettre d'identifier les patients de façon très précoce, et donc mettre en place des stratégies de prise en charge préventives, curatives ou palliatives, qui sont impossibles à réaliser actuellement à cause de la présentation tardive des patients.

D.3. Utilisation en tant que marqueur précoce

La détection précoce de la mutation Ser249 dans l'ADN plasmatique dans les pays de forte incidence du CHC a-t-elle sa place vis-à-vis des méthodes de prévention ?

La méthode que nous avons utilisée pour détecter de façon quantitative et sensible est peu importable dans des pays en voie de développement. En effet, la méthode est très coûteuse et nécessite l'acquisition d'un spectromètre de masse en tandem, d'une HPLC et de matériaux coûteux pour la préparation des échantillons, et l'utilisation du spectromètre de masse nécessite la présence d'un technicien spécialisé. De plus, la méthode SOMA n'est pas adaptée aux analyses à grande échelle. Il faudrait donc développer une technique de détection quantitative ou semi-quantitative de la mutation Ser249 dans le sang qui soit simple, peu coûteuse et utilisable à grande échelle.

Les méthodes actuelles disponibles ou du moins les plus simples à mettre en place pour prévenir le développement du CHC dans des pays en voie de développement sont : (1) la vaccination contre le VHB, (2) l'éducation des populations pour le stockage des cultures sensibles à *A. flavus*, (3) le changement de régime alimentaire en remplaçant les cultures sensibles par des cultures non sensibles à *A. flavus*.

(1) La vaccination contre le VHB a démontré son efficacité contre l'infection par le virus et le portage chronique, mais nous ne connaissons pas encore son efficacité à long terme contre le développement du CHC (Sun *et al.* 2002, Chang *et al.* 2000, Montesano 2002). La vaccination reste une méthode peu chère et aisée à mettre en place puisqu'il existe dans la plupart des pays un programme de vaccination des nouveaux-nés et des enfants, auquel il suffit de rajouter le vaccin contre le VHB.

(2) L'éducation des populations a montré son efficacité sur le court terme (Turner *et al.* 2005). Il existe des moyens simples et efficaces de diminuer la contamination des cultures par de l'AFB1. Cependant, il semble qu'une fois les intervenants partis, les populations tendent à revenir à leur méthodes de culture et de stockage traditionnelles.

(3) Le changement de régime alimentaire par du riz par exemple a montré son efficacité dans la diminution de l'exposition des populations à l'AFB1 (revue de Yu 1995). Cependant, l'introduction de rizières en Afrique semble compromise par les problèmes d'eau. Il faudrait trouver une alimentation adaptée au climat de chaque région et qui ne soit pas contaminée par de l'AFB1. Le deuxième problème se situe au niveau de l'économie. En effet, de nombreux pays africains notamment vivent de la culture d'arachide qui est ensuite transformée et exportée. Le changement

d'orientation de l'agriculture pourrait avoir un impact encore inconnu sur l'économie de nombreux pays.

Ces méthodes de prévention sont sûrement utiles à mettre en place, mais leur efficacité sur l'incidence du CHC ne pourra être évaluée qu'après 20 ou 30 ans. De plus, il n'a pas été démontré si l'exposition à l'AFB1 induit le CHC suite à une exposition régulière tout au long de la vie ou si l'exposition durant l'enfance est déterminante. Donc ces méthodes préventives ne bénéficieront pas aux personnes déjà exposées au VHB et/ou à l'AFB1. L'utilisation de la mutation Ser249 comme marqueur de l'hépatocarcinogénèse pourrait permettre de cibler parmi les populations exposées, les personnes les plus à risque de développer un CHC ou les personnes développant un CHC, et donc permettre la mise en place de traitements curatifs précoces ou de traitements ralentissant le développement du CHC, de façon ciblée et donc moins coûteuse.

II. Perspectives

A. Développement d'études prospectives

Nous avons émis l'hypothèse que le profil des variations de concentration de la mutation Ser249 dans le sérum pourrait être indicatif du statut hépatique chez des individus exposés à l'AFB1. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait réaliser une étude prospective par suivi d'une cohorte d'individus de porteurs chroniques du VHB et exposés à l'AFB1 dans le cadre de leur alimentation normale. Au recrutement, suite à leur consentement, les participants feront l'objet d'un examen de leur statut hépatique. Ils seront alors suivis tous les 6 mois, avec un prélèvement de sang en été et en hiver. Une fois par an, leur statut hépatique sera évalué par un examen clinique, biochimique et par ultrasonographie. Le recrutement d'une cohorte de 2 à 3 000 hommes et femmes entre 35 et 45 ans devrait permettre une puissance statistique suffisante pour étudier des variations d'ADN Ser249 dans le sérum comme prédictrices de l'évolution du statut hépatique.

À part la mutation Ser249, les mutations des gènes *TP53* et *CTNNB1* que nous avons observées dans les CHC ne sont pas spécifiques de ce type de cancer.

Cependant, chez un individu à risque de développer un CHC (porteur chronique du VHB et/ou du VHC, patient atteint d'une cirrhose...), l'apparition d'une quelconque mutation dans l'un de ces deux gènes pourrait indiquer le développement d'un CHC.

Actuellement, les patients cirrhotiques ou porteurs chroniques d'un virus hépatique dans les pays développés sont suivis de façon régulière. Or, comme pour le cas de la mutation Ser249, nous pouvons supposer possible que lors de l'apparition d'un clone muté dans le foie, la mutation correspondante puisse être détectée dans l'ADN circulant. Pour cela, il faudrait étudier des paires d'échantillons de CHC et de sérum (prélevé en même temps que la tumeur). Cette étude pourrait montrer s'il y a concordance entre la présence d'une mutation de *TP53* ou de *CTNNB1* dans un CHC et la présence de la mutation dans l'ADN circulant.

Si cette concordance est vérifiée, nous pouvons imaginer que le suivi des patients à risque puisse se faire par simple prise de sang et que l'apparition d'une mutation des gènes *TP53* et/ou *CTNNB1* dans l'ADN circulant signifie le développement de lésions cancéreuses ou pré-cancéreuses dans le foie. Pour cela, deux points sont à vérifier.

(1) Il faudrait mettre en place une étude sur des patients cirrhotiques et/ou porteurs asymptomatiques d'un virus hépatique. En plus du suivi clinique, ces patients donneraient un échantillon sanguin. Le suivi par imagerie ou biopsie permettrait de connaître l'évolution du statut hépatique. L'analyse de l'ADN circulant dans les échantillons sanguins prélevés aux mêmes moments permettrait de corréler ou non l'apparition d'une mutation dans l'ADN circulant avec le résultat des méthodes de diagnostic classiques.

(2) Dans nos études, nous avons trouvé des mutations dans les gènes *TP53* et *CTNNB1* dans près de la moitié des CHC. Nous pouvons en déduire que l'analyse de la présence de mutations dans ces gènes ne pourra pas servir de méthode de diagnostic pour tous les CHC. Soit cette analyse pourrait compléter les méthodes actuelles et permettre un diagnostic plus précoce et/ou une adaptation du traitement dès les premiers signes d'une lésion hépatique; soit il faudrait étudier d'autres altérations afin de couvrir l'ensemble des CHC. Dans ce contexte, l'apport des analyses du transcriptome pourrait être déterminant pour identifier de nouvelles cibles.

B. Développement d'un modèle d'étude mécanistique de l'interaction VHB/AFB1

Le mécanisme de l'interaction entre le VHB et l'AFB1 qui mène à la sélection de clones possédant la mutation Ser249 et au développement du CHC n'est pas connu. Or, il n'existe pas de modèle d'étude de cette interaction. En effet, les modèles animaux de l'infection par le virus de l'hépatite B ne sont pas représentatifs de l'infection de l'Homme par le VHB. Il existe des modèles de souris transgéniques exprimant le VHB humain. Cependant, si la réplication du génome viral est entretenu dans ce modèle, il ne mime pas l'infection virale en elle-même. De plus, le traitement de souris par de l'AFB1 ne conduit pas à la formation de la mutation Ser249 lorsque ces souris possèdent le gène *TP53* humain (Tong *et al.* 2006). Nous pouvons supposer que les systèmes de métabolisation de l'AFB1 et de la réparation de l'ADN ne sont pas identiques chez l'Homme et la Souris. Il existe d'autres modèles animaux, notamment le canard (infectable par le DHBV, Duck Hepatitis B Virus) et la marmotte (infectable par le WHBV, Woodchuck Hepatitis B Virus). Cependant, les maladies développées par ces animaux suite à une infection par le virus correspondant ne sont pas les mêmes que chez l'Homme. Le modèle animal d'infection le plus proche de l'Homme reste le Chimpanzé. Mais ce n'est pas un modèle facilement utilisable.

Les lignées cellulaires humaines utilisées pour étudier l'infection par le VHB sont soit des cellules transfectées avec un plasmide contenant la séquence du VHB, soit des lignées cellulaires possédant le génome du VHB intégré. Ces cellules entretiennent la réplication virale mais ne sont pas infectables par le VHB.

Une lignée dérivée d'un CHC humain a été isolée à l'INSERM U522, la lignée HepaRG (Gripon *et al.* 2002). Elle a la propriété d'être infectable par le VHB *in vitro*. Son utilisation pourrait permettre de déterminer les effets de l'AFB1 et du VHB sur les voies cellulaires et plus particulièrement sur les systèmes de réparation de l'ADN et de métabolisation de l'AFB1, ainsi que de déterminer les mécanismes conduisant à la formation de la mutation Ser249.

C. Développement d'études cliniques

Dans les régions de forte exposition à l'AFB1, la moitié des CHC contient la mutation Ser249. Nous avons vu que l'acquisition de cette mutation est un événement précoce, puisqu'elle peut être détectée chez des individus non-cancéreux. Même si le mécanisme conduisant à l'acquisition spécifique de cette mutation et si le rôle de cette mutation dans l'hépatocarcinogénèse ne sont pas connus, la protéine mutée correspondante (p53Ser249) pourrait être une cible thérapeutique de choix dans les pays en voie de développement.

Récemment, de petites molécules ont été identifiées comme réactivant spécifiquement les propriétés sauvages de certains mutants p53. L'une de ces molécules, PRIMA-1 (p53 Reactivation and Induction of Massive Apoptosis) (Bykov *et al.* 2002), a été testée sur des clones cellulaires exprimant la protéine p53Ser249 en culture ou injectés à des souris (Shi *et al.* en préparation). Les résultats montrent que le traitement par PRIMA-1 induit une cytotoxicité dans les cellules contenant la protéine mutée p53Ser249.

Ces résultats sont très prometteurs, et s'ils étaient confirmés, des études cliniques de traitements de patients ayant développé un CHC contenant la mutation Ser249 pourraient être mises en place. Nous pouvons également imaginer traiter à titre préventif des individus n'ayant pas été diagnostiqués pour un CHC mais chez lesquels nous détecterions des concentrations importantes de mutation Ser249 dans le sérum. Ce traitement pourrait éviter la survie de clones contenant la mutation Ser249 dans le foie, et donc le développement d'un CHC.

À terme, ce type d'approche est indispensable pour développer des suivis thérapeutiques efficaces, gérables, et appropriés au contexte très particulier que représentent les CHC dans des régions de haute incidence.

Bibliographie

- Adams J.M., Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. **281**, 1322-1326 (1998).
- Agarwal M.L., Agarwal A., Taylor W.R., Stark G.R. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 8493-8497 (1995).
- Albertson D.G., Collins C., McCormick F., Gray J.W. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat. Genet.* **34**, 369-376 (2003).
- Andressoo J-O., Hoeijmakers J.H.J., Mitchell J.R. Nucleotide excision repair disorders and the balance between cancer and aging. *Cell Cycle*. **5**, 2886-2888 (2006).
- Anker P., Stroun M. Circulating DNA in plasma or serum. *Medicina (B Aires)*. **60**, 699-702 (2000).
- Arauz-Ruiz P., Norder H., Robertson B.H., Magnus L.O. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J. Gen. Virol.* **83**, 2059-2073 (2002).
- Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. **281**, 1305-1308 (1998).
- Bachelder R.E., Ribick M.J., Marchetti A., Falcioni R., Soddu S., Davis K.R., Mercurio A.M. p53 inhibits $\alpha 6\beta 4$ integrin survival signaling by promoting the caspase 3-dependent cleavage of AKT/PKB. *J. Cell. Biol.* **147**, 1063-1072 (1999).
- Bah E., Parkin D.M., Hall A.J., Jack A.D., Whittle H. Cancer in The Gambia: 1988-97. *Br. J. Cancer*. **84**, 1207-1214 (2001).
- Bailey E.A., Iyer R.S., Stone M.P., Harris T.M., Essigmann J.M. Mutational properties of the primary aflatoxin B1-DNA adduct. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 1535-1539 (1996).
- Balint É., Vousden K.H. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br. J. Cancer*. **85**, 1813-1823 (2001).
- Benvenuti S., Arena S., Bardelli A. Identification of cancer genes by mutational profiling of tumor genomes. *FEBS Letters*. **579**, 1884-1890 (2005).
- Bertrand P., Saintigny Y., Lopez B.S. p53's double life: transactivation-independent repression of homologous recombination. *Trends Genet.* **20**, 235-243 (2004). Erratum in: *Trends Genet.* **21**, 36 (2004).
- Block T.M., Mehta A.S., Fimmel C.J., Jordan R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. **22**, 5093-5107 (2003).
- Blumberg B.S., Alter H.J., Visnich S. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA*. **191**, 541-546 (1965).

- Bode A.M., Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer.* **4**, 793-805 (2004).
- Bouchard M.J., Schneider R.J. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J. Virol.* **78**, 12725-12734 (2004).
- Bourdon J-C., Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A., Xirodimas D.P., Saville M.K., Lane D.P. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* **19**, 2122-2137 (2005).
- Breinholt V., Schimerlik M., Dashwood R., Bailey G. Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B1: complex formation with the carcinogen. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 506-514 (1995).
- Brooks C.L., Gu W. p53 ubiquitination: mdm2 and beyond. *Mol. Cell.* **21**, 307-315 (2006).
- Bruix J., Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* **42**, 1208-1236 (2005).
- Bruno R., Puoti M., Sacchi P., Filice C., Carosi G., Filice G. Management of hepatocellular carcinoma in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Hepatol.* **44**, S146-S150 (2006).
- Buckbinder L., Talbott R., Velasco-Miguel S., Takenaka I., Faha B., Seizinger B.R., Kley N. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature.* **377**, 646-649 (1995).
- Buckwold V.E., Xu Z., Chen M., Yen T.S.B., Ou J-H. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J. Virol.* **70**, 5845-5851 (1996).
- Bykov V.J.N., Issaeva N., Selivanova G., Wiman K. Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis.* **23**, 2011-2018 (2002).
- Cadigan K.M., Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* **11**, 3286-3305 (1997).
- Cagatay T., Ozturk M. p53 mutation as a source of aberrant β -catenin accumulation in cancer cells. *Oncogene.* **21**, 7971-7980 (2002).
- Cammà C., Di Bona D., Schepis F., Heathcote E.J., Zeuzem S., Pockros P.J., Marcellin P., Balart L., Alberti A., Craxi A. Effect of peginterferon alfa-2a on liver histology in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. *Hepatology.* **39**, 333-342 (2004).

Capurro M., Wanless I.R., Sherman M., Deboer G., Shi W., Miyoshi E., Filmus J. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. **125**, 89-97 (2003).

Carman W.F., Jacyna M.R., Hadziyannis S., Karayiannis P., McGarvey M.J., Makris A., Thomas H.C. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet*. **2**, 588-591 (1989).

Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manzillo G., Tanzi E., Zuckerman A.J., Thomas H.C. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet*. **336**, 325-329 (1990).

Carreño V. Occult hepatitis C virus infection: a new form of hepatitis C. *World J. Gastroenterol.* **12**, 6922-6925 (2006).

Chang H-W., Lee S.M., Goodman S.N., Singer G., Cho S.K.R., Sokoll L.J., Montz F.J., Roden R., Zhang Z., Chan D.W., Kurman R.J., Shih I-E. Assessment of plasma DNA levels, allelic imbalance, and CA 125 as diagnostic tests for cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 1697-1703 (2002).

Chang M-H., Chen C-J., Lai M-S., Hsu H-M., Wu T-C., Kong M-S., Liang D-C., Shau W-Y., Chen D-C. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1855-1859 (1997).

Chang M-H., Shau W-Y., Chen C-J., Wu T-C., Kong M-S., Liang D-C., Hsu H-M., Chen H-L., Hsu H-Y., Chen D-S. Hepatitis B vaccination and hepatocellular carcinoma rates in boys and girls. *JAMA*. **284**, 3040-3042 (2000).

Chao Y., Shih Y-L., Chiu J-H., Chau G-Y., Lui W-Y., Yang W-K., Lee S-D., Huang T-S. Overexpression of cyclin A but not Skp 2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **58**, 985-990 (1998).

Chemin I., Trépo C. Clinical impact of occult HBV infections. *J. Clin. Virol.* **34**, S15-S21 (2005).

Chen C-J., Yang H-I, Su J., Jen C-L., You S-L., Lu S-N., Huang G-T., Iloeje U.H. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*. **295**, 65-73 (2006).

Chi S-W., Lee S-H., Kim D-H., Ahn M-J., Kim J-S., Woo J-Y., Torizawa T., Kainosho M., Han K-H. Structural details on mdm2-p53 interaction. *J. Biol. Chem.* **280**, 38795-38802 (2005).

Chiaromonte M., Stroffolini T., Vian A., Stazi M.A., Floreani A., Lorenzoni U., Lobello S., Farinati F., Naccarato R. Rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with compensated viral cirrhosis. *Cancer*. **85**, 2132-2137 (1999).

Chiu C-M., Yeh S-H., Chen P-J., Kuo T-J., Chang C-J., Chen P-J., Yang W-J., Chen D-S. Hepatitis B virus X protein enhances androgen receptor-responsive gene

- expression depending on androgen level. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 2571-2578 (2007).
- Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. **244**, 359-362 (1989).
- Christofori G., Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 73-76 (1999).
- Courtois S., Verhaegh G., North S., Luciani M-G., Lassus P., Hibner U., Oren M., Hainaut P. Δ N-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene*. **21**, 6722-6728 (2002).
- Cowin P. Unraveling the cytoplasmic interactions of the cadherin superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 10759-10761 (1994).
- Crockett S.D., Keeffe E.B. Natural history and treatment of hepatitis B virus and hepatitis C virus coinfection. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **4**, 13 (2005).
- Cui R., He J., Zhang F., Wang B., Ding H., Shen H., Li Y., Chen X. Diagnostic value of protein induced by vitamin K absence (PIVKAII) and hepatoma-specific band of serum gamma-glutamyl transferase (GGTII) as hepatocellular carcinoma markers complementary to α -fetoprotein. *Br. J. Cancer*. **88**, 1878-1882 (2003).
- Dameron K.M., Volpert O.V., Tainsky M.A., Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*. **265**, 1582-1584 (1994).
- Daniele B., Bencivenga A., Megna A.S., Tinessa V. α -fetoprotein and ultrasonography screening for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. **127**, S108-S112 (2004).
- de Castro Junior G., Puglisi F., de Azambuja E., El Saghir N.S., Awada A. Angiogenesis and cancer: a cross-talk between basic science and clinical trial ("the do ut des" paradigm). *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **59**, 40-50 (2006).
- De Maria N., Manno M., Villa E. Sex hormones and liver cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **193**, 59-63 (2002).
- Denissenko M.F., Cahill J., Koudriakova T.B., Gerber N., Pfeifer G.P. Quantitation and mapping of aflatoxin B1-induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin B1-8,9-epoxide and microsomal activation systems. *Mut. Res.* **425**, 205-211 (1999).
- Devereux T.R., Stern M.C., Flake G.P., Yu M.C., Zhang Z-Q., London S.J., Taylor J.A. *CTNNB1* mutations and β -catenin protein accumulation in human hepatocellular carcinomas associated with high exposure to aflatoxin B1. *Mol. Carcinog.* **31**, 68-73 (2001).
- Dominguez G., Silva J., Garcia J.M., Silva J.M., Rodriguez R., Muñoz C., Chacón I., Sanchez R., Carballido J., Colás A., España P., Bonilla F. Prevalence of aberrant

methylation of *p14ARF* over *p16INK4a* in some human primary tumors. *Mutat. Res.* **530**, 9-17 (2003).

Donato F., Tagger A., Gelatti U., Parrinello G., Boffetta P., Albertini A., Decarli A., Trevisi P., Ribero M.L., Martelli C., Porru S., Nardi G., Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am. J. Epidemiol.* **155**, 323-331 (2002).

Dorner J.W., Cole R.J., Wicklow D.T. Aflatoxin reduction in corn through field application of competitive fungi. *J. Food Prot.* **62**, 650-656 (1999).

Edamoto Y., Akira H., Biernat W., Terracciano L., Cathomas G., Riehle H-M., Matsuda M., Fujii H., Scoazec J-Y., Ohgaki H. Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus, hepatitis B and alcohol liver cirrhosis. *Int. J. Cancer.* **106**, 334-342 (2003).

el-Deiry W.S., Kern S.E., Pietenpol J.A., Kinzler K.W., Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* **1**, 45-49 (1992).

El-Serag H.B., Davila J.A., Petersen N.J., McGlynn K.A. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. *Ann. Intern. Med.* **139**, 817-823 (2003).

El-Zayadi A-R. Heavy smoking and liver. *World J. Gastroenterol.* **12**, 6098-6101 (2006).

Evan G., Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science.* **281**, 1317-1322 (1998).

Falini B., Mason D.Y. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection immunocytochemistry. *Blood.* **99**, 409-426 (2002).

Fang J.W., Chow V., Lau J.Y. Virology of hepatitis C virus. *Clin. Liver Dis.* **1**, 493-514 (1997).

Farazi P.A., DePinho R.A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 674-687 (2006).

Fattovich G., Stroffolini T., Zagni I., Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology.* **127**, S35-S50 (2004).

Fodde R., Smits R., Clevers H., APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **1**, 55-67 (2001).

Furutani M., Arii S., Tanaka H., Mise M., Niwano M., Harada T., Higashitsuji H., Imamura M., Fujita J., Decreased expression and rare somatic mutation of the CIP/WAF1 gene in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **111**, 191-197 (1997).

- Futreal P.A., Coin L., Marshall M., Down T., Hubbard T., Wooster R., Rahman N., Stratton M.R. A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer*. **4**, 177-183 (2004).
- Gan L.S., Skipper P.L., Peng X.C., Groopman J.D., Chen J.S., Wogan G.N., Tannenbaum S.R. Serum albumin adducts in the molecular epidemiology of aflatoxin carcinogenesis: correlation with aflatoxin B1 intake and urinary excretion of aflatoxin M1. *Carcinogenesis*. **9**, 1323-1325 (1988).
- Ganem D., Prince A.M. Hepatitis B virus infection - Natural history and clinical consequences. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1118-1129 (2004).
- Giannini C., Bréchet C. Hepatitis C virus biology. *Cell Death Differ.* **10**, S27-S38 (2003).
- Giles R.H., van Es J.H., Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1653**, 1-24 (2003).
- Gollin S.M. Mechanisms leading to chromosomal instability. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 33-42 (2005).
- Gordon M.D., Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.* **281**, 22429-22433 (2006).
- Gormally E., Caboux E., Vineis P., Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat. Res.* (2007).
- Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*. **281**, 1309-1312 (1998).
- Grinberg A.V., Hu C.D., Kerppola T.K. Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells. *Mol Cell Biol.* **24**, 4294-4308 (2004).
- Gripon P., Rumin S., Urban S., Le Seyec J., Glaise D., Cannie I., Guyomard C., Lucas J., Trepo C., Guguen-Guillouzo C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 15655-15660 (2002).
- Groopman J.D., Wild C.P., Hasler J., Junshi C., Wogan G.N., Kensler T.W. Molecular epidemiology of aflatoxin exposures: validation of aflatoxin-N7-guanine levels in urine as a biomarker in experimental rat models and humans. *Environ. Health Perspect.* **99**, 107-113 (1993).
- Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*. **100**, 57-70 (2000).
- Harris L.C., Remack J.S., Houghton P.J., Brent T.P. Wild-type p53 suppresses transcription of the human O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase gene. *Cancer Res.* **56**, 2029-2032 (1996).
- Harris H. The analysis of malignancy by cell fusion: the position in 1988. *Cancer Res.* **48**, 3302-3306 (1988).

He T-C., Sparks A.B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L.T., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W. *Science*. **281**, 1509-1512 (1998).

Hollstein M.C., Wild C.P., Bleicher F., Chutimataewin S., Harris C.C., Srivatanakul P., Montesano R. p53 mutations and aflatoxin B1 exposure in hepatocellular carcinoma patients from Thailand. *Int. J. Cancer*. **53**, 51-55 (1993).

Hsieh T-H., Liu C-J., Chen D-S., Chen P-J. Natural course and treatment of hepatitis D virus infection. *J. Formos. Med. Assoc.* **105**, 869-881 (2006).

Hsu H-C., Jeng Y-M., Mao T-L., Chu J-S., Lai P-L., Peng S-Y. β -catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am. J. Pathol.* **157**, 763-770 (2000).

IARC. Alcohol drinking. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. **44** (1988).

IARC. Some naturally occurring substance: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. **56** (1993).

IARC. Hepatitis viruses. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. **59** (1994).

Ijichi M., Takayama T., Matsumura M., Shiratori Y., Omata M., Makuuchi M. α -fetoprotein mRNA in the circulation as a predictor of postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Hepatology*. **35**, 853-860 (2002).

Iloeje U.H., Yang H-I., Su J., Jen C-L., You S-L., Chen C-J. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology*. **130**, 678-686 (2006).

Ishizuka H., Nakayama T., Matsuoka S., Gotoh I., Ogawa M., Suzuki K., Tanaka N., Tsubaki K., Ohkubo H., Arakawa Y., Okano T. Prediction of the development of hepato-cellular-carcinoma in patients with liver cirrhosis by the serial determinations of serum alpha-L-fucosidase activity. *Intern. Med.* **38**, 927-931 (1999).

Ito Y., Takeda M, Tsujimoto M., Higashiyama S, Noda K., Miyoshi E., Monden M., Matsuura N. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer*. **84**, 1377-1383 (2001).

Iwai A., Marusawa H., Matsuzawa S-I., Fukushima T., Hijikata M., Reed J.C., Shimotohno K., Chiba T. Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates β -catenin activity in a p53-dependent manner. *Oncogene*. **23**, 7593-7600 (2004).

Jackson P.E., Kuang S-Y., Wang J-B., Strickland P.T., Muñoz A., Kensler T.W., Qian G-S., Groopman J.D. Prospective detection of codon 249 mutations in plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Carcinogenesis*. **24**, 1657-1663 (2003).

Jacob S., Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie*. **84**, 27-47 (2002).

Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.D., Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. **61**, 1659-1665 (2001).

Jeffrey P.D., Gorina S., Pavletich N.P. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*. **267**, 1498-1502 (1995).

Jin M., Piao Z., Kim N.G., Park C., Shin E.C., Park J.H., Jung H.J., Kim C.G., Kim H. p16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. **89**, 60-68 (2000).

Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., Volgestein B., Craig R.W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*. **51**, 6304-6311 (1991).

Keasler V.V., Hodgson A.J., Madden C.R., Slagle B.L. Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo. *J. Virol*. **81**, 2656-2662 (2007).

Kensler T.W., Egner P.A., Wang J-B., Zhu Y-R., Zhang B-C., Lu P-X., Chen J-G., Qian G-S., Kuang S-Y., Jackson P.E., Gange S.J., Jacobson L.P., Muñoz A., Groopman J.D. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in aflatoxin endemic areas. *Gastroenterology*. **127**, S310-S318 (2004).

Kew M.C., Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver Int*. **23**, 405-409 (2003).

Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y., Kidd A.H. Genetic variability in hepatitis B virus. *J. Gen. Virol*. **83**, 1267-1280 (2002).

Kim R., Emi M., Tanabe K., Arihiro K. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res*. **66**, 5527-5536 (2006).

Kim S.J., Choi I.K., Park K.H., Yoon S.Y., Oh S.C., Seo J.H., Choi C.W., Kim B.S., Shin S.W., Kim Y.H., Kim J.S. Serum vascular endothelial growth factor per platelet count in hepatocellular carcinoma: correlations with clinical parameters and survival. *Jpn. J. Clin. Oncol*. **34**, 184-190 (2004).

Kirk G.D., Lesi O.A., Mendy M., Akano A.O., Sam O., Goedert J.J., Hainaut P., Hall A.J., Whittle H., Montesano R. The Gambia Liver Cancer Study: infection with hepatitis B and C and the risk of hepatocellular carcinoma in West Africa. *Hepatology*. **39**, 211-219 (2004).

Kirk G.D., Lesi O.A., Mendy M., Szymańska K., Whittle H., Goedert J.J., Hainaut P., Montesano R. 249ser TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B viral infection, and risk of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. **24**, 5858-5867 (2005a).

Kirk G.D., Turner P.C., Gong Y., Lesi O.A., Mendy M., Goedert J.J., Hall A.J., Whittle H., Hainaut P., Montesano R., Wild C.P. Hepatocellular carcinoma and polymorphisms in carcinogen-metabolizing and DNA repair enzymes in a population with aflatoxin exposure and hepatitis B virus endemicity. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**, 373-379 (2005b).

Kowdley K.V. Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. **127**, S79-S86 (2004).

Kraus C., Liehr T., Hulsken J., Behrens J., Birchmeier W., Grzeschik K.H., Ballhausen W.G. Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics*. **23**, 272-274 (1994).

Krishnamurthy Y.L., Shashikala J. Inhibition of aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus*, isolated from soybean seeds by certain natural plant products. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**, 469-474 (2006).

Krugman S., Giles J.P., Hammond J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA*. **200**, 365-373 (1967).

Kunkel T.A. DNA replication fidelity. *J. Biol. Chem.* **279**, 16895-16898 (2004).

Lane D.P., Crawford L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. **278**, 261-263 (1979).

Laurent-Puig P., Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene*. **25**, 3778-3786 (2006).

Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral Hepat.* **11**, 97-107 (2004).

Le Roux E., Gormally E., Hainaut P. Somatic mutations in human cancer: applications in molecular epidemiology. *Rev. Epidemiol. Sante Publique*. **53**, 257-266 (2005).

Lee J.S., Thorgeirsson S.S. Comparative and integrative functional genomics of HCC. *Oncogene*. **25**, 3801-3809 (2006).

Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* **37**, 646-650 (1977).

Levin A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. **88**, 323-331 (1997).

Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene*. **25**, 3834-3847 (2006).

Linnet M.S., Gridley G., Nyrén O., Mellekjaer L., Olsen J.H., Keehn S., Adami H-O., Fraumeni Jr. J.F. Primary liver cancer, other malignancies, and mortality risks following porphyria: a cohort study in Denmark and Sweden. *Am. J. Epidemiol.* **149**, 1010-1015 (1999).

Liu C-J., Kao J-H., Chen D-S. Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes. *Liver Int.* **25**, 1097-1107 (2005).

Lleonart M.E., Kirk G.D., Villar S., Lesi O.A., Dasgupta A., Goedert J.J., Mendy M., Hollstein M.C., Montesano R., Groopman J.D., Hainaut P., Friesen M.D. Quantitative analysis of plasma TP53 249Ser-mutated DNA by electrospray ionization mass spectrometry. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**, 2956-2962 (2005).

Llovet J.M., Burroughs A., Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. **362**, 1907-1917 (2003).

Lo Y.M.D., Zhang J., Leung T.N., Lau T.K., Chang A.M.Z., Hjelm N.M. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 218-224 (1999).

Lok A.S.F., Akarca U., Greene S. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 4077-4081 (1994).

Long X.D., Ma Y., Wei Y.P., Deng Z.L. The polymorphisms of GSTM1, GSTT1, HYL1*2, and XRCC1, and aflatoxin B1-related hepatocellular carcinoma in Guangxi population, China. *Hepatol. Res.* **36**, 48-55 (2006).

Macé K., Aguilar F., Wang J-S., Vautravers P., Gómez-Lechón M., Gonzalez F.J., Groopman J., Harris C.C., Pfeifer A.M.A. Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis*. **18**, 1291-1297 (1997).

Majumder M., Steele R., Ghosh A.K., Zhou X.Y., Thornburg L., Ray R., Phillips N.J., Ray R.B. Expression of hepatitis C virus non-structural 5A protein in the liver of transgenic mice. *FEBS Lett.* **555**, 528-532 (2003).

Maltzman W., Czyzyk L. UV radiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1689-1694 (1984).

Marrero J.A., Su G.L., Wei W., Emick D., Conjeevaram H.S., Fontana R.J., Lok A.S. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology*. **37**, 1114-1121 (2003).

May P., May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. **18**, 7621-7636 (1999).

Mayans M.V., Hall A.J., Inskip H.M., Lindsay S.W., Chotard J., Mendy M., Whittle H.C. Do bedbugs transmit hepatitis B? *Lancet*. **343**, 761-763 (1994).

McBride O.W., Merry D., Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **8**, 130-134 (1986).

McCrea P.D., Gumbiner B.M. Purification of a 92-kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (Uvomorulin). *J. Biol. Chem.* **266**, 4514-4520 (1991).

McGlynn K.A., Rosvold E.A., Lustbader E.D., Hu Y., Clapper M.L., Zhou T., Wild C.P., Xia X-L., Baffoe-Bonnie A., Ofori-Adjei D., Chen G-C., London W.T., Shen F-M., Buetow K.H. Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 2384-2387 (1995).

McGlynn K.A., London W.T. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **19**, 2-23 (2005).

Mehlen P., Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 449-458 (2006).

Mills A.A. p53: link to the past, bridge to the future. *Genes Dev.* **19**, 2091-2099 (2005).

Mills K.D., Ferguson D.O., Alt F.W. The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunol. Rev.* **194**, 77-95 (2003).

Miura N., Maeda Y., Kanbe T., Yazama H., Takeda Y., Sato R., Tsukamoto T., Sato E., Marumoto A., Harada T., Sano A., Kishimoto Y., Hirooka Y., Murawaki Y., Hasegawa J., Shiota G. Serum human telomerase reverse transcriptase messenger RNA as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3205-3209 (2005).

Monazahian M., Böhme I., Bonk S., Koch A., Scholz C., Grethe S., Thomssen R. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* **57**, 223-229 (1999).

Montesano R., Hainaut P., Wild C.P. Hepatocellular carcinoma: from gene to public health. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1844-1851 (1997).

Montesano R. Hepatitis B immunization and hepatocellular carcinoma: The Gambia Hepatitis Intervention Study. *J. Med. Virol.* **67**, 444-446 (2002).

Morgan T.R., Mandayam S., Jamal M.M. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* **127**, S87-S96 (2004).

- Motola-Kuba D., Zamora-Valdés D., Uribe M., Méndez-Sánchez N. Hepatocellular carcinoma. An overview. *Ann. Hepatol.* **5**, 16-24 (2006).
- Murakami Y., Saigo K., Takashima H., Minami M., Okanoué T., Bréchet C., Paterlini-Bréchet P. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut.* **54**, 1162-1168 (2005).
- Neel B.G., Hayward W.S., Robinson H.L., Fang J., Astrin S.M. Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion. *Cell.* **23**, 323-334 (1981).
- Nollet F., Berx G., Molemans F., van Roy F. Genomic organization of the human β -catenin gene (CTNNB1). *Genomics.* **32**, 413-424 (1996).
- Norder H., Courouce A.M., Magnius L.O. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology.* **198**, 489-503 (1994).
- Norder H., Couroucé A-M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S-D., Mushahwar I.K., Robertson B.H., Locarnini S., Magnius L.O. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology.* **47**, 289-309 (2004).
- Oka Y., Waterland R.A., Killian J.K., Nolan C.M., Jang H-S., Tohara K., Sakaguchi S., Yao T., Iwashita A., Yata Y., Takahara T., Sato S-I., Suzuki K., Masuda T., Jirtle R.L. *M6P/IGF2R* tumor suppressor gene mutated in hepatocellular carcinomas in Japan. *Hepatology.* **35**, 1153-1163 (2002).
- Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H., Sastrosoewignjo R.I., Imai M., Miyakawa Y., Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.* **69**, 2575-2583 (1988).
- Okanoue T., Minami M. Update of research and management of hepatitis B. *J. Gastroenterol.* **41**, 107-118 (2006).
- Okuda H. Hepatocellular carcinoma development in cirrhosis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **21**, 161-173 (2007).
- Pang R., Tse E., Poon R.T.P. Molecular pathways in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **240**, 157-169 (2006).
- Parada L.F., Land H., Weinberg R.A., Wolf D., Rotter V. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature.* **312**, 649-651 (1984).
- Pardali K., Moustakas A. Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta.* **1775**, 21-62 (2006).
- Parkin M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* **55**, 74-108 (2005).

- Pitti R.M., Marsters S.A., Lawrence D.A., Roy M., Kischkel F.C., Dowd P., Huang A., Donahue C.J., Sherwood S.W., Baldwin D.T., Godowski P.J., Wood W.I., Gurney A.L., Hillan K.J., Cohen R.L., Goddard A.D., Botstein D., Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*. **396**, 699-703 (1998).
- Pluquet O., Hainaut P. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Lett.* **174**, 1-15 (2001).
- Pollack J.R., Ganem D. Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. *J. Virol.* **68**, 5579-5587 (1994).
- Poynard T., McHutchison J., Manns M., Trepo C., Lindsay K., Goodman Z., Ling M-H., Albrecht J. *Gastroenterology*. **122**, 1303-1313 (2002).
- Prince A.M., Fuji H., Gershon R.K. Immunohistochemical studies on the etiology of anicteric hepatitis in Korea. *Am. J. Hyg.* **79**, 365-381 (1964).
- Regimbeau J.M., Colombat M., Mognol P., Durand F., Abdalla E., Degott C., Degos F., Farges O., Belghiti J. Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* **10**, S69-S73 (2004).
- Reisman D., Loging W.T. Transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 317-324 (1998).
- Rous P. A transmissible avian neoplasm (Sarcoma of the common fowl). *J. Exp. Med.* **150**, 738-753 (1979).
- Rudnick D.A., Perlmutter D.H. Alpha-1-antitrypsin deficiency: a new paradigm for hepatocellular carcinoma in genetic liver disease. *Hepatology*. **42**, 514-521 (2005).
- Scott J.D., Gretch D.R. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection. *JAMA*. **297**, 724-732 (2007).
- Shapiro B., Chakrabarty M., Cohn E.M., Leon S.A. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer*. **51**, 2116-2120 (1983).
- Shaulian E., Zauberman A., Milner J., Davies E.A., Oren M. Tight DNA binding and oligomerization are dispensable for the ability of p53 to transactivate target genes and suppress transformation. *EMBO J.* **12**, 2789-2797 (1993).
- Shay J.W., Wright W.E. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*. **26**, 867-874 (2005).
- Sheen I.S., Jeng K.S., Tsai Y.C. Is the expression of γ -glutamyl transpeptidase messenger RNA an indicator of biological behavior in recurrent hepatocellular carcinoma? *World J. Gastroenterol.* **9**, 468-473 (2003).

- Shi H., Le Calvez F., Olivier M., Hainaut P. Patterns of TP53 mutations in human cancer: interplay between mutagenesis, DNA repair and selection. In: Hainaut P. and Wiman K.G. (Eds.) 25 years of p53 research. Springer. pp. 293-319 (2005).
- Shi H., Lambert J., Hautefeuille A., Bykov V., Wiman K., Hainaut P., Caron de Fromental C. Implication of mutant p53ser 249 in the cytotoxic effects of PRIMA-1 on hepatocellular carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*. (En préparation).
- Shih C., Shilo B.Z., Goldfarb M.P., Dannenberg A., Weinberg R.A. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 5714-5718 (1979).
- Shimajima M., Komine F., Hisatomi H., Shimizu T., Moriyama M., Arakawa Y. Detection of telomerase activity, telomerase RNA component, and telomerase reverse transcriptase in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res.* **29**, 31-38 (2004).
- Shtutman M., Zhurinsky J., Simcha I., Albanese C., D'Amico M., Pestell R., Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of β -catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 5522-5527 (1999).
- Silverman A.L., Qu L.H., Blow J., Zitron I.M., Gordon S.C., Walker E.D. Assessment of hepatitis B virus DNA and hepatitis C virus RNA in the common bedbug (*Cimex lectularius* L.) and kissing bug (*Rodnius prolixus*). *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 2194-2198 (2001).
- Smela M.E., Currier S.S., Bailey E.A., Essigmann J.M. The chemistry and biology of aflatoxin B1: from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis.* **22**, 535-545 (2001).
- Smela M.E., Hamm M.L., Henderson P.T., Harris C.M., Harris T.M., Essigmann J.M. The aflatoxin B1 formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 6655-6660 (2002).
- Smukler A.J., Ratner L. Hepatitis viruses and hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients. *Curr. Opin. Oncol.* **14**, 538-542 (2002).
- Soussi T., May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J. Mol. Biol.* **260**, 623-637 (1996).
- Sozzi G., Conte D., Mariani L., Lo Vullo S., Roz L., Lombardo C., Pierotti M.A., Tavecchio L. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res.* **61**, 4675-4678 (2001).
- Stewart B.W., Kleihues P. World cancer report. *IARC press*, Lyon, France (2003).
- Stickel F., Schuppan D., Hahn E.G., Seitz H.K. Cocarcinogenic effects of alcohol in hepatocarcinogenesis. *Gut.* **51**, 132-139 (2002).

Stommel J.M., Marchenko N.D., Jimenez G.S., Moll U.M., Hope T.J., Wahl G.M. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* **18**, 1660-1672 (1999).

Stribling R., Sussman N., Vierling J.M. Treatment of hepatitis C infection. *Gastroenterol. Clin. M. Am.* **35**, 463-486 (2006).

Stroun M., Anker P., Lyautey J., Lederrey C., Maurice P.A. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **23**, 707-712 (1987).

Stroun M., Anker P., Maurice P., Lyautey J., Lederrey C., Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology.* **46**, 318-322 (1989).

Stuyver L., De Gendt S., Van Geyt C., Zoulim F., Fried M., Schinazi R.F., Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Virol.* **81**, 67-74 (2000).

Summers J., Mason W.S. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell.* **29**, 403-415 (1982).

Sun Z., Ming L., Zhu X., Lu J. Prevention and control of hepatitis B in China. *J. Med. Virol.* **67**, 447-450 (2002).

Sylla A., Diallo M.S., Castegnaro J-J., Wild C.P. Interactions between hepatitis B virus infection and exposure to aflatoxins in the development of hepatocellular carcinoma: a molecular epidemiological approach. *Mutat. Res.* **428**, 187-196 (1999).

Szymańska K., Lesi O.A., Kirk G.D., Sam O., Taniere P., Scoazec J-Y., Mendy M., Friesen M.D., Whittle H., Montesano R., Hainaut P. Ser-249 *TP53* mutation in tumour and plasma DNA of hepatocellular carcinoma patients from a high incidence area in The Gambia, West Africa. *Int. J. Cancer.* **110**, 374-379 (2004).

Talwalkar J.A., Gores G.J. Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* **127**, S126-S132 (2004).

Taylor W.R., Stark G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene.* **20**, 1803-1815 (2001).

Tellinghuisen T.L., Rice C.M. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 419-427 (2002).

The Gambia Hepatitis Study Group. The Gambia Hepatitis Intervention Study. *Cancer Res.* **47**, 5782-5787 (1987).

Thorgeirsson S.S., Grisham J.W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* **31**, 339-346 (2002).

Thornberry N.A., Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. **281**, 1312-1316 (1998).

Tokino T., Tamura H., Hori N., Matsubara K. Chromosome deletions associated with hepatitis B virus integration. *Virology*. **185**, 879-882 (1991).

Tong W-M., Lee M-K., Galendo D., Wang Z-Q., Sabapathy K. Aflatoxin-B exposure does not lead to *p53* mutations but results in enhanced liver cancer in Hupki (human *p53* knock-in) mice. *Int. J. Cancer*. **119**, 745-749 (2006).

Truant R., Xia H., Ingles C.J., Greenblatt J. Direct interaction between the transcriptional activation domain of human *p53* and the TATA box-binding protein. *J. Biol. Chem*. **268**, 2284-2287 (1993).

Turner P.C., Mendy M., Whittle H., Fortuin M., Hall A.J., Wild C.P. Hepatitis B infection and aflatoxin biomarker levels in Gambian children. *Trop. Med. Int. Health*. **5**, 837-841 (2000).

Turner P.C., Sylla A., Gong Y.Y., Diallo M.S., Sutcliffe A.E., Hall A.J., Wild C.P. Reduction in exposure to carcinogenic aflatoxins by postharvest intervention measures in west africa: a community-based intervention study. *Lancet*. **365**, 1950-1956 (2005).

Tuttleman J.S., Pourcel C., Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*. **47**, 451-460 (1986).

Venot C., Maratrat M., Dureuil C., Conseiller E., Bracco L., Debussche L. The requirement for the *p53* proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific *PIG3* gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J*. **17**, 4668-4679 (1998).

Vousden K.H. *p53*: death star. *Cell*. **103**, 691-694 (2000).

Walshe J.M., Waldenström E., Sams V., Norlinder H., Westermark K. Abdominal malignancies in patients with Wilson's disease. *Q. J. Med*. **96**, 657-662 (2003).

Wang J-S., Groopman J.D. DNA damage by mycotoxins. *Mutat. Res*. **424**, 167-181 (1999).

Wang J-S., Shen X., He X., Zhu Y-R., Zhang B-C., Wang J-B., Qian G-S., Kuang S-Y., Zarba A., Egner P.A., Jacobson L.P., Muñoz A., Helzlsouer K.J., Groopman J.D., Kensler T.W. Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B1 by oltipraz in residents of Qidong, People's Republic of China. *J. Natl. Cancer Inst*. **91**, 347-354 (1999).

Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol*. **32**, 102-112 (2005).

Weigelt B., Peterse J.L., van't Veer L.J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer*. **5**, 591-602 (2005).

Weinberg R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. **81**, 323-330 (1995).

Wild C.P., Jiang Y.Z., Allen S.J., Jansen L.A., Hall A.J., Montesano R. Aflatoxin-albumin adducts in human sera from different regions of the world. *Carcinogenesis*. **11**, 2271-2274 (1990).

Wild C.P., Rasheed F.N., Jawla M.F., Hall A.J., Jansen L.A., Montesano R. In-utero exposure to aflatoxin in west Africa. *Lancet*. **337**, 1802 (1991).

Wild C.P., Hudson G.J., Sabbioni G., Chapot B., Hall A.J., Wogan G.N., Whittle H., Montesano R., Groopman J.D. Dietary intake of aflatoxins and the level of albumin-bound aflatoxin in peripheral blood in The Gambia, West Africa. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. **1**, 229-234 (1992).

Wild C.P., Hall A.J. Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. *Mutat. Res*. **462**, 381-393 (2000).

Wild C.P., Turner P.C. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*. **17**, 471-481 (2002).

Willert K., Nusse R. β -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev*. **8**, 95-102 (1998).

Wojnowski L., Turner P.C., Pedersen B., Hustert E., Brockmoller J., Mendy M., Whittle H.C., Kirk G., Wild C.P. Increased levels of aflatoxin-albumin adducts are associated with CYP3A5 polymorphisms in The Gambia, West Africa. *Pharmacogenetics*. **14**, 691-700 (2004).

Wong C.M., Fan S.T., Ng I.O. Beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer*. **92**, 136-145 (2001).

Xu Z., Yen T.S.B., Wu L., Madden C.R., Tan W., Slagle B.L., Ou J-H. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J. Virol*. **76**, 2579-2584 (2002).

Yakicier M.C., Irmak M.B., Romano A., Kew M., Ozturk M. Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. **18**, 4879-4883 (1999).

Yang H., Qi X., Sabogal A., Miller M., Xiong S., Delaney IV W.E. Cross-resistance testing of next-generation nucleoside and nucleotide analogues against lamivudine-resistant HBV. *Antivir. Ther*. **10**, 625-633 (2005).

Yeh S-H., Chang C-F., Shau W-Y., Chen Y-W., Hsu H-C., Lee P-H., Chen D-S., Chen P-J. Dominance of functional androgen receptor allele with longer CAG repeat in hepatitis B virus-related female hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*. **62**, 4346-4351 (2002).

Yoshikawa H., Matsubara K., Qian G-S., Jackson P., Groopman J.D., Manning J.E., Harris C.C., Herman J.G. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat. Genet.* **28**, 29-35 (2001).

Yu C-T.R., Hsu J.M., Lee Y-C.G., Tsou A-P., Chou C-K., Huang C-Y.F. Phosphorylation and stabilization of HURP by Aurora-A: Implication of HURP as a transforming target of Aurora-A. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5789-5800 (2005).

Yu J., Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 851-858 (2005).

Yu M.C., Yuan J-M. Environmental factors and risks for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* **127**, S72-S78 (2004).

Yu S.Z. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 674-682 (1995).

Zhang L., Yu D., Hu M., Xiong S., Lang A., Ellis L.M., Pollock R.E. Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* **60**, 3655-5661 (2000).

Zhang X., Xu H-J., Murakami Y., Sachse R., Yashima K., Hirobashi S., Hu S-X., Benedict W.F., Sekiya T. Deletions of chromosome 13q, mutations in *Retinoblastoma 1*, and Retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **54**, 4177-4182 (1994).

Zhang Y.J., Jiang W., Chen C.J., Lee C.S., Kahn S.M., Santella R.M., Weinstein I.B. Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 1010-1016 (1993).

Zhou L., Liu J., Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **12**, 1175-1181 (2006).

Annexes

Mise au point de RFLP pour détecter des mutations de certains points chauds de mutation de l'exon 3 du gène *CTNNB1*

Nous avons mis au point 5 RFLP afin de détecter les mutations sur 5 des 6 points chauds de mutation de l'exon 3 du gène *CTNNB1*, aux codons 33 et 34, et pour les deux premières bases des codons 32, 37 et 41.

L'exon 3 du gène *CTNNB1* est amplifié avec 3 couples d'amorces : BCAT-GF/BCAT-GR, BCAT-F34/BCAT-GR, et BCAT-GF/BCAT-R32 (cf. tableaux 1 et 2 ci-dessous). L'amorce BCAT-F34 insère un site de restriction reconnu par l'enzyme BstNI et élimine ce même site 6 bases en amont, et l'amorce BCAT-R32 élimine un site de restriction reconnu par l'enzyme HinfI. Après amplification par PCR, les fragments amplifiés sont digérés, déposés sur gel d'agarose, et les bandes correspondant à des fragments mutés sont découpées, réamplifiées et séquencées. Les différentes conditions de PCR, digestion et séquençage sont résumées dans les tableaux 2, 3 et 4).

Tableau 1 : Séquences et longueur des différents amorces utilisées.

Amorce	Séquence	Longueur (pb)
BCAT-GF	CCAATCTACTAATGCTAATACTG	23
BCAT-GR	CTGCATTCTGACTTTCAGTAAGG	23
BCAT-F34	GGCAGCAACAGTCTTACTTGGACCC	25
BCAT-R32	GTGGTAGTGGCACCAGAATGGATAC	25
BCAT-R33	CCTTTACCACTCAGAGAAGGAGC	23

Tableau 2 : Conditions et résultats des PCRs.

Enzyme	Amorces pour PCR	Concentration en MgCl ₂ (mM)	Longueur des produits PCR (pb)	Longueur des fragments sauvages (pb)	Longueur des fragments mutés (pb)
Hpy188III	BCAT-GF/GR	2	310	56, 60, 72 et 122	60, 72 et 178
XmnI	BCAT-GF-GR	2	310	129 et 181	310
BsaXI	BCAT-GF/GR	2	310	135, 145, 165 et 175	310
BstNI	BCAT-F34/GR	2	220	25 et 195	220
HinfI	BCAT-GF/R32	1.5	149	31 et 118	149

BCAT-GF

C CAATCTACTA ATGCTAATAC TGTTTTCGTAT TTATAGCTGA
TTTGATGGAG TTGGACATGG CCATGGAACC AGACAGAAA
GCGGCTGTTA GTCACTGGCA GCAACAGTCT TACCTGGACT
33 34 ▼ 37 41 45
CTG**GAA**TCCA **TTC**TGGTGCC ACTACCACAG CTCCTTCTCT
GAGTGGTAAA GGCAATCCTG AGGAAGAGGA TGTGGATACC
TCCCAAGTCC TGTATGAGTG GGAACAGGGA TTTTCTCAGT
CCTTCACTCA AGAACAAGTA GCTGGTAAGA GTATTATTTT
TCATTG**CCTT ACTGAAAGTC AGAATGCAG**

BCAT-GR

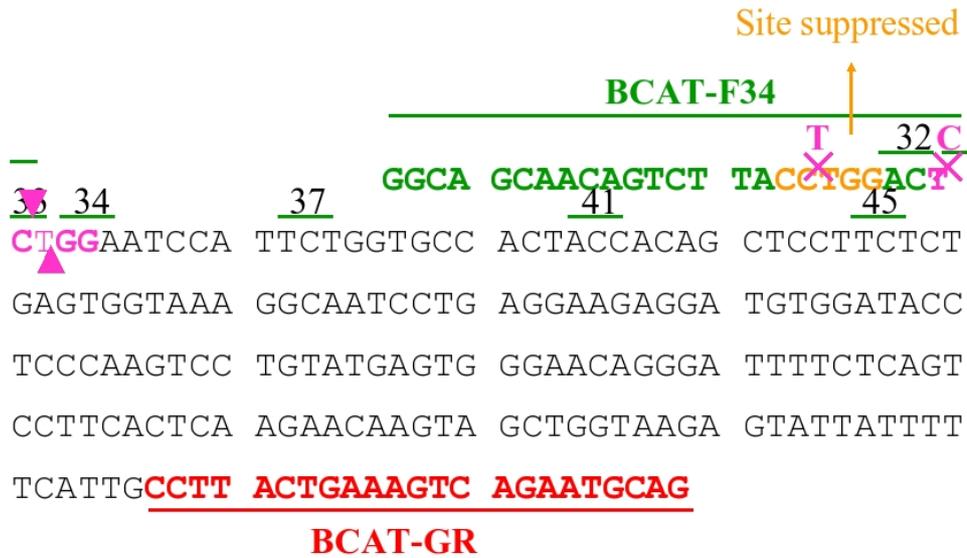
Principe de la RFLP par XmnI. Le site reconnu est indiqué en rose, et les flèches désignent les sites de coupure.

BCAT-GF

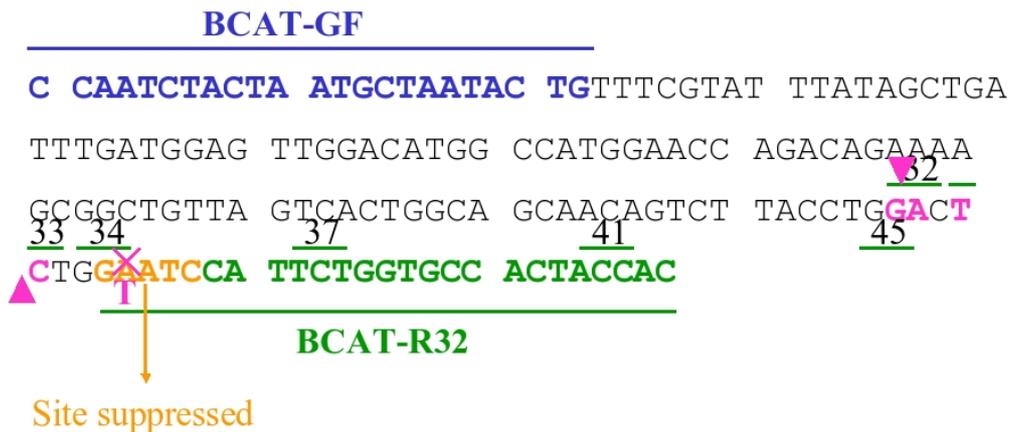
C CAATCTACTA ATGCTAATAC TGTTTTCGTAT TTATAGCTGA
TTTGATGGAG TTGGACATGG CCATGGAACC AGACAGAAA
GCGGCTGTTA GTCACTGGCA GCAACAGTCT TACCTGGACT
33 34 ▼ 37 ▼ 41 45
CTG**GAA**TCCA **TTC**TGGTGCC ACT**ACC**ACAG **CTCC**TTCTCT
GAGTGGTAAA GGCAATCCTG AGGAAGAGGA TGTGGATACC
TCCCAAGTCC TGTATGAGTG GGAACAGGGA TTTTCTCAGT
CCTTCACTCA AGAACAAGTA GCTGGTAAGA GTATTATTTT
TCATTG**CCTT ACTGAAAGTC AGAATGCAG**

BCAT-GR

Principe de la RFLP par BsaXI. Le site reconnu est indiqué en rose, et les flèches désignent les sites de coupure.



Principe de la RFLP par BstNI. Le site reconnu est indiqué en rose, et les flèches désignent les sites de coupure.



Principe de la RFLP par HinfI. Le site reconnu est indiqué en rose, et les flèches désignent les sites de coupure.

Autres articles publiés

- Gormally E., Vineis P., Matullo G., Veglia F., Caboux E., Le Roux E., *et al.* *TP53* and *KRAS2* mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence: a prospective study. *Cancer Res.* 2006 Jul 1; **66** (13): 6871-6.
- Le Roux E., Gormally E., Hainaut P. Somatic mutations in human cancer: applications in molecular epidemiology. *Rev Epidemiol Santé Publique.* 2005 Jun **53** (3): 257-66. Review.

TP53 and KRAS2 Mutations in Plasma DNA of Healthy Subjects and Subsequent Cancer Occurrence: A Prospective Study

Emmanuelle Gormally,^{1,2} Paolo Vineis,^{3,4} Giuseppe Matullo,^{4,5} Fabrizio Veglia,⁴ Elodie Caboux,¹ Emilie Le Roux,¹ Marco Peluso,⁶ Seymour Garte,⁸ Simonetta Guarrera,⁴ Armelle Munnia,⁶ Luisa Airoidi,⁹ Herman Autrup,¹¹ Christian Malaveille,¹ Alison Dunning,¹³ Kim Overvad,¹² Anne Tjønneland,¹⁵ Eiliv Lund,¹⁶ Françoise Clavel-Chapelon,¹⁷ Heiner Boeing,¹⁸ Antonia Trichopoulou,¹⁹ Domenico Palli,⁷ Vittorio Krogh,¹⁰ Rosario Tumino,²⁰ Salvatore Panico,²¹ H. Bas Bueno-de-Mesquita,²² Petra H. Peeters,²³ Guillem Pera,²⁴ Carmen Martinez,²⁵ Miren Dorronsoro,²⁶ Aurelio Barricarte,²⁷ Carmen Navarro,²⁸ José Ramón Quirós,²⁹ Göran Hallmans,³⁰ Nicholas E. Day,¹⁴ Timothy J. Key,³¹ Rodolfo Saracci,¹ Rudolf Kaaks,¹ Elio Riboli,¹ and Pierre Hainaut¹

¹IARC; ²Université Catholique de Lyon, Lyon, France; ³Imperial College London and University of Torino; ⁴ISI Foundation; ⁵University of Torino, Turin, Italy; ⁶Cancer Risk Factor Branch, Molecular Biology Laboratory, and ⁷Molecular and Nutritional Epidemiology Unit, CSPO-Scientific Institute of Tuscany, Firenze, Italy; ⁸Genetics Research Institute; ⁹Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri; ¹⁰Department of Epidemiology, National Cancer Institute, Milan, Italy; ¹¹Department of Occupational and Environmental Medicine; ¹²Department of Clinical Epidemiology, Åalborg Hospital and Åarhus University Hospital, and Department of Epidemiology and Social Medicine, University of Åarhus, Åarhus, Denmark; ¹³Department of Oncology, University of Cambridge; ¹⁴Medical Research Council Dunn Human Nutrition Unit, Cambridge, United Kingdom; ¹⁵Institute of Cancer Epidemiology, Danish Cancer Society, Copenhagen, Denmark; ¹⁶Institute of Community Medicine, University of Tromsø, Tromsø, Norway; ¹⁷Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U521, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ¹⁸German Institute of Human Nutrition, Potsdam-Rehbrücke, Germany; ¹⁹Department of Hygiene and Epidemiology, University of Athens Medical School, Athens, Greece; ²⁰Ragusa Cancer Registry, Azienda Ospedaliera Civile MP Arezzo, Ragusa, Italy; ²¹Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università Federico II, Naples, Italy; ²²Center for Nutrition and Health, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands; ²³Julius Center for Health Sciences and Primary Care, University Medical Center, Utrecht, the Netherlands; ²⁴Department of Epidemiology, Catalan Institute of Oncology, Barcelona, Spain; ²⁵Andalusian School of Public Health, Granada, Spain; ²⁶Department of Public Health of Guipuzkoa, San Sebastian, Spain; ²⁷Public Health Institute, Navarra, Spain; ²⁸Epidemiology Department, Murcia Health Council, Murcia, Spain; ²⁹Dirección General de Salud Pública, Consejería de Salud y Servicios Sanitarios Asturias, Oviedo, Spain; ³⁰Department of Public Health and Clinical Medicine, Umeå University, Umeå, Sweden; and ³¹Cancer Research UK Epidemiology Unit, University of Oxford, United Kingdom

Abstract

In cancer patients, plasma often contains mutant DNA released by cancer cells. We have assessed the significance of plasma DNA mutations for subsequent cancer development in healthy subjects in a large longitudinal prospective study. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study was analyzed with a nested case-control design. Cases were nonsmokers or ex-smokers for >10 years and newly diagnosed with lung, bladder, or upper aerodigestive tract cancers or leukemia accrued after a median follow-up of 6.3 years. Controls were matched 2:1 for follow-up, age, sex, area of recruitment, and smoking status. *KRAS2* mutations were detected by mutant-enriched PCR and sequencing ($n = 1,098$). *TP53* mutations were detected by denaturing high-performance liquid chromatography, temporal temperature gradient electrophoresis, and sequencing ($n = 550$). *KRAS2* or *TP53* mutations were detected in 13 of 1,098 (1.2%) and 20 of 550 (3.6%) subjects, respectively, 16 of whom developed cancer on average after 18.3 months of follow-up. Among 137 subjects who developed bladder cancer, 5 had *KRAS2* mutations [odds ratio (OR), 4.25; 95% confidence interval (95% CI), 1.27-14.15]

and 7 had *TP53* mutations (OR, 1.81; 95% CI, 0.66-4.97). There was a nonsignificant trend for association between *TP53* mutations and bulky adducts in lymphocyte DNA (OR, 2.78; 95% CI, 0.64-12.17). This is the first report of *TP53* or *KRAS2* mutations in the plasma of healthy subjects in a prospective study, suggesting that *KRAS2* mutation is detectable ahead of bladder cancer diagnosis. *TP53* mutation may be associated with environmental exposures. These observations have implications for monitoring early steps of carcinogenesis. (Cancer Res 2006; 66(13): 6871-6)

Introduction

Circulating free DNA (CFDNA) in the plasma has emerged as a source of genetic material of tumoral origin in a variety of cancers. Somatic DNA alterations in CFDNA include point mutations, hypermethylation, microsatellite instability, and loss of heterozygosity (LOH; reviewed in ref. 1). For example, a special mutation at codon 249 in the tumor suppressor gene *TP53* has been identified in 36% of African patients with hepatocellular carcinoma (2), with a concordance of 88% between plasma and tumor (3). This mutation is considered as the result of sequence-specific DNA damage by metabolites of aflatoxin, a well-known hepatocarcinogen that contaminates many components of traditional diet in sub-Saharan Africa. In the same population, *TP53* mutations were also detected in the plasma of some subjects with liver cirrhosis (15%) or no liver disease (3%; ref. 2). However, the clinical utility of CFDNA for mutation screening remains to be ascertained.

Several clinical studies have reported that mutations detected in tumor tissues may also be detectable in plasma DNA (1). However, thus far, only one population-based, prospective study on detection

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

Genetic Susceptibility to Air Pollution and Environmental Tobacco Smoking is a program of the European Community (QL4-1999-000927).

Requests for reprints: Pierre Hainaut, IARC, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France. Phone: 33-4-72-73-85-32; Fax: 33-4-72-73-83-22; E-mail: hainaut@iarc.fr.

©2006 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4556

of *TP53* mutations in plasma DNA has been reported (4). In that study, *TP53* mutations were detected 1 to 5 years before diagnosis in four of eight cases of hepatocellular carcinoma patients from Qidong (China), an area of high exposure to aflatoxin and high prevalence of hepatitis B virus chronic carriage (4). Mutations in *KRAS2* have also been detected ahead of clinical diagnosis in the plasma of subjects considered at high risk for colorectal cancer (subjects with genetic predisposition or with previous history of cancer) as well as in patients referred to a colonoscopy clinic for symptomatic evaluation (5). Similarly, Allan et al. reported the presence in CFDNA of LOH at up to four different loci in patients attending a bronchoscopy clinic and presenting a variety of symptoms suggestive of lung cancer (6).

In this study, we have analyzed *KRAS2* and *TP53* mutations in CFDNA in a longitudinal study, in relation with the occurrence of different types of cancers potentially caused by environmental exposures. The Genetic Susceptibility to Air Pollution and Environmental Tobacco Smoking (GENAIR) study focuses on cancers of the lung, bladder, and upper aerodigestive tract (UADT; including pharynx, larynx, and oral cavity) and leukemias in nonsmokers and ex-smokers who have quit for >10 years. GENAIR was conducted to elucidate the relationship among air pollution, environmental tobacco smoking, and genetic susceptibility (7, 8). It was designed as a case-control study nested into European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC), a multicenter European study of >520,000 healthy volunteers of both genders, ages 35 to 74 years, and recruited in 23 centers from 10 countries between 1993 and 1998 (9). A total of 550 subjects for *TP53* mutations and 1,098 for *KRAS2* mutations were analyzed.

Materials and Methods

Study design and subjects. EPIC is a multimember European study, coordinated by the IARC (Lyon, France), including >520,000 healthy volunteers recruited in 10 European countries (Denmark, France, Germany, Greece, Italy, the Netherlands, Norway, Spain, Sweden, and the United Kingdom) corresponding to 23 recruitment centers (10). The cohort includes subjects selected in the general population of a specific geographic area, town or province, of both genders and mostly in the age range 35 to 74 years at recruitment. Recruitment took place between 1993 and 1998. Detailed dietary and lifestyle histories collected mainly through self-administered questionnaires plus a 24-hour dietary recall through person-to-person interview (in a 10% sample), anthropometric measurements, and a 30- to 40-mL blood sample are available. Blood samples were stored for 2 to 5 hours at 5°C to 10°C until they were transferred and processed in local laboratories in each but one of the recruitment centers (where specimens were shipped for processing to another center in the same country). The

plasma, serum, RBC, and lymphocytes were stored at -196°C in 500 µL straws (7, 8, 10). All questionnaire information is available in a computerized format. Informed consent were obtained from all participants (11).

The follow-up was based on population cancer registries in seven of the participating countries: Denmark, Italy, the Netherlands, Norway, Spain, Sweden, and the United Kingdom. In France, Germany, and Greece, a combination of methods was used, including health insurance records, cancer and pathology registries, and active follow-up through study participants and their next-of-kin. Mortality data were also obtained from either the cancer registry or mortality registries at the regional or national level. Follow-up was virtually 100% complete. We used the *International Statistical Classification of Diseases, Injuries and Causes of Death, 10th Revision*.

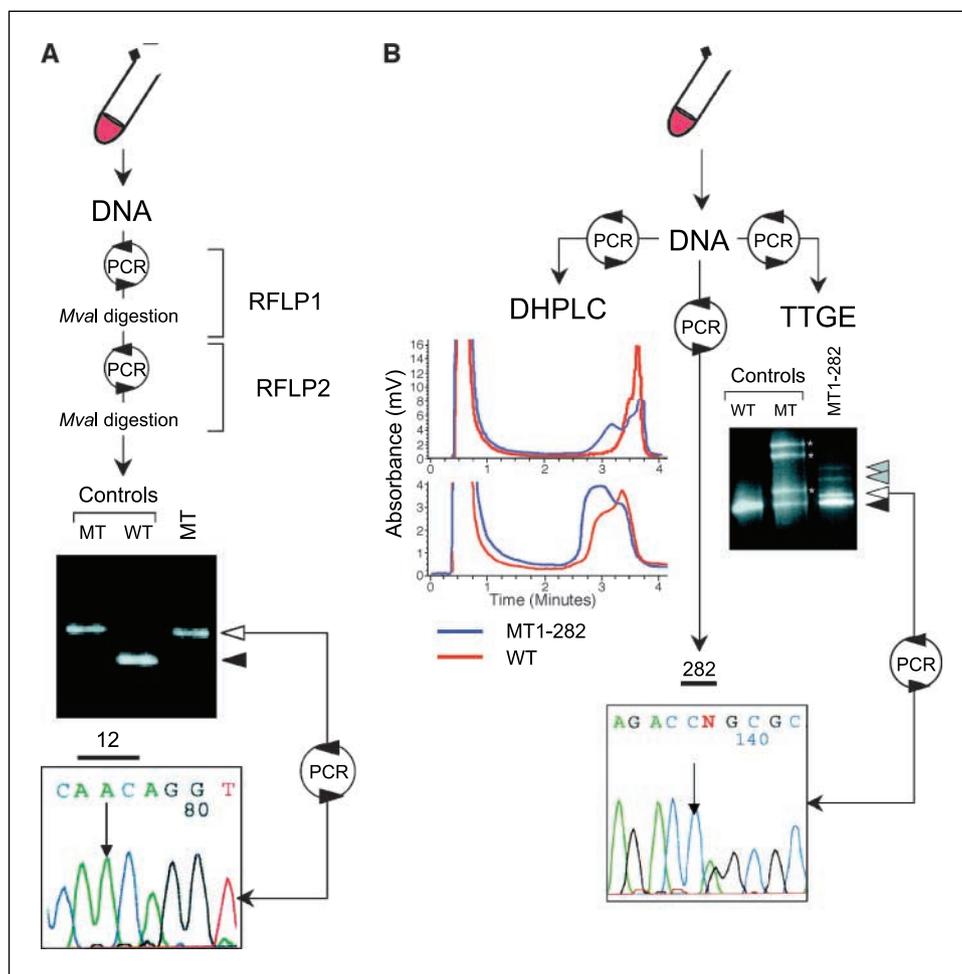
GENAIR is a case-control study nested within the EPIC cohort, aiming at studying the relationship between some types of cancers and air pollution or environmental tobacco smoke (12). Cases are subjects with bladder, lung, or UADT cancers or leukemia, all newly diagnosed after recruitment. Only nonsmokers or ex-smokers who had given up smoking at least 10 years before recruitment have been included in GENAIR. We have identified 1,074 cases who met the protocol criteria. The Malmo center decided not to allow the use of their blood samples but participated in the rest of the project. After exclusion of the 231 Malmo cases, 843 cases were available, including 487 with blood samples (for further details, see the Peluso et al. study). Preliminary analyses suggested an association with bladder cancer. Thus, we analyzed all bladder cancers ($n = 124$); in addition, we enriched the series by extending follow-up (13 cases were identified in addition to the 124 described by Peluso et al.). Of the remaining cases of lung and UADT cancers and leukemia, we only analyzed a random sample of 254 cases matched 1:2 with controls for *KRAS* mutations. Because of the more demanding technical requirements for mutation detection, *TP53* analysis was limited to a subset of 236 cases (including bladder cases) matched 1:1 with controls (Table 1). Matching criteria were gender, age (± 5 years), smoking status (never or former smoker), site of recruitment, and follow-up time. Mean follow-up was 89 months (minimum, 1.8; maximum, 123). GENAIR has been approved by the Ethical Committee of the IARC and by the local ethical committees of the 23 centers.

Mutation detection. CFDNA was extracted using affinity columns (Qiagen, Hilden, Germany) from 300 µL plasma and eluted in 200 µL buffer (7). Mutation analysis was done using 10 µL plasma DNA in a 25 µL PCR according to previously described techniques. For *TP53* mutation analysis, exons 5 to 9 were amplified by PCR in three segments and analyzed by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC; ref. 13; for primers and conditions, see Supplementary Table) followed by direct sequencing of regions generating abnormal chromatograms. We have shown that DHPLC could reliably detect amounts of mutant DNA representing between 3% and 12% of wild-type DNA depending on mutation type and sequence context (13). Temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE) was used as an additional strategy to enrich in mutant-specific sequences before sequencing (14). PCR products corresponding to DNA heteroduplexes were excised from the gel, reamplified with nested primers, and characterized by sequencing. Whenever possible, the presence of a mutation was confirmed by restriction digestion with enzymes cutting

Table 1. Distribution of cancers among subjects of the GENAIR study tested for *TP53* and/or *KRAS2* mutations

Pathology	Total samples	<i>TP53</i>			<i>KRAS2</i>		
		Total samples tested (%)	Mutants (% of total tested)	OR (95% CI)	Total samples tested (%)	Mutants (% of total tested)	OR (95% CI)
Bladder	137	126 (92)	7 (5.5)	1.81 (0.66-4.87)	131 (95.6)	5 (3.8)	4.25 (1.27-14.15)
Lung	115	36 (31)	2 (5.5)	1.83 (0.36-9.44)	77 (67)	0 (0)	—
UADT	82	30 (36.6)	0 (0)	—	57 (69.5)	1 (1.7)	2.07 (0.23-18.7)
Leukemia	166	44 (26.5)	1 (2.3)	0.70 (0.09-5.61)	120 (72.3)	0 (0)	—
None	1,086	314 (30)	10 (3.2)	1 (Reference)	713 (65.7)	7 (1)	1 (Reference)
Total	1,586	550 (34.7)	20 (3.6)		1,098 (69)	13 (1.2)	

Figure 1. *KRAS2* (A) and *TP53* (B) mutation detection in CFDNA. A, detection of mutations in codon 12 of *KRAS2* by ME-PCR (involving two consecutive RFLP analyses for enrichment of the mutant DNA). After *MvaI* digestion, the mutant PCR product (MT; white arrow) is excised, amplified, and sequenced. Black arrow, wild-type PCR product (WT). B, detection of *TP53* mutation at codon 282. Mutations in exons 5 to 9 were first analyzed in CFDNA by DHPLC. Samples with abnormal DHPLC chromatograms were sequenced from an independent PCR product. If the mutation could not be characterized by sequencing, a new PCR product was analyzed by TTGE. If homoduplex products were detected they were excised from the TTGE gel, reamplified, and sequenced. All procedures were repeated using independent PCR products to rule out PCR artifacts. Gray arrow, mutant-wild-type heteroduplexes; white arrow, mutant homoduplexes; black arrow, wild-type homoduplexes; white star, mutant control heteroduplexes (top two bands) and homoduplexes.



within the suspected mutation site, allowing the detection of 3% to 6% mutant allele in a background of wild-type material (data not shown).

KRAS2 mutations at codon 12 were analyzed by mutant-enriched PCR (ME-PCR), involving two successive RFLP leading to enrichment in mutant sequence, and characterized by sequencing (ref. 15; see Supplementary Material for primers and conditions). To avoid false-positive results generated during successive PCR rounds, all analyses were repeated at least once. We have found that *KRAS2* codon 12 ME-PCR could detect up to 0.1% of mutant DNA in wild-type DNA. All mutations were confirmed by at least one second analysis and sequencing of independent PCR products. Results were scored as “positive” or “negative” with respect to established cutoff sensitivity values described above. However, no systematic attempt was made to obtain a quantitative assessment of the amount of gene mutation present in each sample.

Statistical analyses. We have computed odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) in logistic regression models. It was not possible to use conditional regression analysis for matched pairs because there was no pair in which both the case and the control(s) showed mutations. In addition to matching variables, we also fitted models, including educational level as a further adjustment variable. *P*s < 0.05 were considered as statistically significant. All analyses were done using SAS Statistical Package version 8 (SAS Institute, Cary, NC).

Results

Table 1 shows the distribution of cancer types and mutations among the subjects whose plasma was analyzed. A total of 550 specimens were tested for *TP53* (236 cases and 314 controls),

whereas 1,098 specimens were tested for *KRAS2* (385 cases and 713 controls). The imperfect matching was due to the lack of biological samples for either member of the matched pairs.

The extraction and quantification of CFDNA has been reported elsewhere (7). The geometric mean of CFDNA concentrations was 28 ng/mL in controls and varied between 29 and 36 ng/mL in the various cancer groups, the difference being nonsignificant. Typical examples of *TP53* and *KRAS2* mutation detection are shown in Fig. 1. *KRAS2* mutations were tested in 1,098 subjects (Tables 1 and 2A and B). Six mutations were detected in cancer cases (median follow-up, 14.3 months; range, 2.6-24.9 months), five of which were bladder cancers (OR, 4.25; 95% CI, 1.27-14.15; Tables 1 and 2A). After adjustment for sex, age, area of recruitment, and education, an OR (95% CI) of 5.15 (1.34-19.72) for bladder cancer was found. Among subjects with mutations, there were six healthy controls (median follow-up, 85.5 months; range, 72.7-97.3 months) plus one control who developed skin cancer during follow-up (80.2 months). In the 550 subjects analyzed for *TP53* mutations (Table 1), 20 subjects had mutations at different codons, including 10 in cases, 7 of which were bladder cancers (Table 2A and B; OR, 1.81; 95% CI, 0.66-4.97). One bladder cancer case had two mutations at codons 207 and 216. With one exception (one subject with bladder cancer diagnosed 1.8 months after recruitment), mutations in CFDNA were detected at least 6 months ahead of diagnosis (median follow-up, 18.6 months; range, 1.8-44.8). For the 10 control subjects with *TP53* mutation, the median follow-up was 75.4 months (range,

Table 2.

Codon	Mutation classification*	Mutation	Amino acid change	Cancer site	Time to diagnosis (mo)
(A) Mutations detected in CFDNA of subjects who subsequently developed cancer					
<i>KRAS2</i>					
12		GGT>GTT	Gly>Val	Bladder	24.9
12		GGT>GTT	Gly>Val	Bladder	22.4
12		GGT>GTT	Gly>Val	Bladder	15.9
12		GGT>GTT	Gly>Val	Bladder	12.8
12		GGT>GAT	Gly>Asp	Bladder	2.6
12		GGT>GTT	Gly>Val	UADT	6.3
<i>TP53</i>					
175	MT1	CGC>TGC	Arg>Cys	Lung	19.1
179	MT2	CAT>CCT	His>Pro	Bladder	32.2
181	MT1	CGC>CAC	Arg>His	Lung	18.1
196	MT2	CGA>CAA	Arg>Gln	Leukemia	8.6
207 [†]	MT2	GAT>GGT	Asp>Gly	Bladder	44.8
216 [†]	MT3	GTG>GTA	Val>Val		
262	MT2	GGT>AGT	Gly>Ser	Bladder	18.1
271	MT2	GAG>GGG	Glu>Gly	Bladder	1.8
282	MT1	CGG>CAG	Arg>Glu	Bladder	15.8
324	MT2	GAT>GGT	Asp>Gly	Bladder	6.3
IN4 (13051)	MT3	G>C	None	Bladder	42.89
(B) Mutations detected in CFDNA of control subjects					
<i>KRAS2</i>					
12		GGT>GTT	Gly>Val		97.3
12		GGT>GTT	Gly>Val		85.5
12		GGT>GTT	Gly>Val		95.7
12		GGT>AGT	Gly>Ser		73
12		GGT>GTT	Gly>Val		80.2
12		GGT>GTT	Gly>Val		72.7
12		GGT>GTT	Gly>Val		89.4
<i>TP53</i>					
144	MT2	CAG>CGG	Glu>Arg		80.8
157	MT1	GTC>TTC	Val>Phe		64.3
163	MT1	TAC>TGC	Tyr>Cys		75.4
207	MT2	GAT>GGT	Asp>Gly		72.0
266	MT3	GGA>GGT	Gly>Gly		61.4
283	MT1	CGC>TGC	Arg>Cys		100.8
298	MT2	GAG>GGG	Glu>Gly		78
313	MT2	AGC>AAC	Ser>Asn		90.9
IN4 (13028)	MT3	T>C	None		82.6
IN6 (13436)	MT3	T>G	None		62.7

Abbreviation: UADT, Upper Aero-Digestive Tract.

*MT1, missense mutations frequent in IARC *TP53* mutation database; MT2, missense mutations infrequent in IARC database; MT3, mutations with no known effect on p53 protein (for details, see text).

[†]Mutations at codons 207 and 216 were found in the same plasma DNA sample.

61.4-100.8 months), and one of them developed pancreatic cancer after 82.6 months (mutation in intron 4, bp 13028). *TP53* mutations were classified in three groups. MT1 included missense mutations frequently reported in the IARC *TP53* database (ref. 16; at least 18 independent reports; <http://www-p53.iarc.fr>, version R10). MT2 included rare missense mutations. MT3 included mutations with no known effect on protein structure, such as mutations in introns (not at splice junctions) and silent mutations, none of which were registered as polymorphisms in the IARC *TP53* database. Taking into account only MT1 and MT2 groups, an OR (95% CI) for bladder cancer of 2.00 (0.66-6.06) was found, which was not significantly different than for any *TP53* mutation.

Recent publications have reported associations with biomarkers of environmental exposures in the GENAIR cohorts, including bulky DNA adducts in WBC (12), and biomarkers of genetic susceptibility, such as polymorphisms in genes involved in carcinogen metabolism, detoxification, and DNA repair (17).³² Here, we have reanalyzed these previously reported data with respect to the presence of mutations in plasma DNA (Table 3). We found that *TP53* mutations, but not *KRAS2* mutations, were more

³² H. Autrup et al. in preparation.

frequent among subjects with bulky adducts in WBC, although this association was not statistically significant (OR, 2.78; 95% CI, 0.64-12.17; Table 3). A tendency for association was found between the codon 399 *Gln* allele of *XRCC1* and *TP53* (A/A genotype; OR, 2.97; 95% CI, 0.96-9.14) but not *KRAS2* mutations. Mutations of *TP53* or *KRAS2* in CFDNA also showed a nonsignificant tendency for association with mutant alleles of *N-acetyltransferase 2* (*NAT2*) defining the "slow acetylator" phenotype [*NAT2**5 and *NAT2**6; OR (95% CI), 1.68 (0.63-4.49) for *TP53* and 2.66 (0.73-9.74) for *KRAS2*].

Discussion

Our results from a large prospective study, GENAIR, show that mutations in *TP53* or *KRAS2* could be detected in CFDNA of healthy subjects on average 20.8 months (range, 1.8-44.8) and 14.3 months (range, 2.6-24.9) before cancer diagnosis, respectively. The presence of a mutation was not dependent on the total amount and concentration of DNA extracted from plasma (geometric mean in samples with a *TP53* or *KRAS2* mutation, 28 ng/mL). The GENAIR study includes specimens collected in 10 different countries; in a previous study, we reported a variation in the amount of plasma DNA between participating centers. However, the distribution of mutations is too sparse to allow a comparison by center. The fact that each mutation in *TP53* or in *KRAS2* was confirmed by at least two analyses of independent PCR products ruled out that their detection was a polymerase fidelity artifact (18). We found that mutation in CFDNA had a tendency to predict bladder cancer but not other cancers (OR, 2.08; 95% CI, 0.90-4.76). However, the association with bladder cancer was significant only for mutations at codon 12 in *KRAS2* (adjusted OR, 5.15; 95% CI, 1.34-19.72) and not for *TP53* (OR, 1.81; 95% CI, 0.66-4.97), even

when only mutations leading to amino acid substitutions were taken into account (OR, 2.00; 95% CI, 0.66-6.06). Furthermore, when comparing subjects with and without mutations, the follow-up times were significantly shorter for those subjects with mutation in *KRAS2* ($P = 0.006$) but not in *TP53* ($P = 0.35$; data given in Supplementary Material). This observation supports an association between plasma *KRAS2* mutation and the occurrence of bladder cancer.

In bladder cancer tissues, *TP53* mutations are rather rare in early lesions but are common in advanced, metastatic cancers, with a prevalence of 50% in progressive, muscle-invasive disease (19). Mutations at codon 12 of *KRAS2* are infrequent in bladder cancer (20, 21). In a recent study, Jebar et al. have found *KRAS2* mutations in 3 of 98 bladder cancer patients. However, these mutations were early events, mutually exclusive to *FGFR3* mutations, suggesting their association with a subgroup of bladder cancers (22). Interestingly, experimental studies in transgenic mice have shown that tissue-specific expression of a *RAS* transgene in the urothelium led to urothelial hyperplasia and superficial papillary tumors (23). These observations suggest that activation of *RAS* may contribute to early steps of carcinogenesis in the bladder. Thus, the temporal sequence of occurrence of *KRAS2* (early event) and *TP53* (late event) during bladder tumorigenesis may explain our observation that *KRAS2* mutation in CFDNA is a better predictor of bladder cancer than *TP53* mutation. However, as tumor tissues were not available in the present study, we cannot ascertain whether the tumors also contained the same mutations as those identified in the plasma and whether these mutations occurred as early or late events.

TP53 and *KRAS2* mutations were detected in 3% and 1%, respectively, of subjects who did not develop cancer during follow-up (10 *TP53* mutations and 7 *KRAS2* mutations). The proportion of mutations in controls remains low compared with subjects who developed bladder cancer (5.5% for *TP53* and 3.8% for *KRAS2*). It should be kept in mind that controls were matched with cases for the duration of follow-up. Thus, it is possible that control subjects with mutations in CFDNA will ultimately develop a cancer disease after the period of matched follow-up. Of 65 controls subjects who developed cancer after follow-up, 2 had a *TP53* or a *KRAS2* mutation and were diagnosed with pancreas and skin cancer, respectively. These numbers are too small to be informative on the risk of cancer in positive, control subjects.

Another important information of the present study is that no predictive value of CFDNA mutations were found for several cancers other than bladder, including lung, UADT, and leukemia. This observation is in line with many studies showing considerable variations in the concordance between mutations detected in CFDNA and in tumors in cancer patients (1). Although some of these variations can be explained by technical considerations (e.g., the need for high sensitivity methods to detect mutations in CFDNA), they are most likely to reflect intrinsic differences among tissues in the way mutations occur, persist, expand clonally, and are released in CFDNA. In a recent study, we found an overall concordance of 88% between *TP53* mutations in CFDNA and in matched primary liver cancer in a series of patients from western Africa (3). In contrast, in lung cancers, recent studies have reported an overall poor concordance between mutations in CFDNA and tumor (24). Thus, the occurrence of mutations in CFDNA may have organ- and tissue-specific patterns that reflect the architecture of the organ (e.g., the proportion of released DNA that ends up in the bloodstream), the type and level of exposure to mutagens, and the

Table 3. Association between mutations in CFDNA and DNA adducts or polymorphisms in susceptibility genes

	Mutant	Total	OR (95% CI)*
<i>TP53</i> and DNA adducts			
Detectable	16	409	2.78 (0.64-12.17)
Nondetectable	2	122	1 (Reference)
<i>KRAS2</i> and DNA adducts			
Detectable	0	779	0.49 (0.15-1.61)
Nondetectable	4	170	1 (Reference)
<i>TP53</i> and <i>XRCC1</i>			
AA	4	69	2.97 (0.96-9.14)
AG	7	233	1.07 (0.37-3.13)
GG	7	234	1 (Reference)
<i>KRAS2</i> and <i>XRCC1</i>			
AA	2	116	0.7 (0.12-4.07)
AG	5	419	0.82 (0.21-3.17)
GG	5	424	1 (Reference)
<i>TP53</i> and <i>NAT2</i>			
Slow acetylator	12	525	1.68 (0.63-4.49)
Fast acetylator	5	410	1 (Reference)
<i>KRAS2</i> and <i>NAT2</i>			
Slow acetylator	9	534	2.66 (0.73-9.74)
Fast acetylator	3	413	1 (Reference)

*Adjusted for age, sex, time and site of recruitment, and smoking history.

temporal sequence of occurrence of mutations in the target tissue. Thus, in bladder cancer, molecular alterations, such as mutations in *FGFR3* and microsatellite instabilities, which occur in bladder transitional cell carcinoma at higher frequencies than either *TP53* or *KRAS2* mutations (30–40% and up to 70% alterations respectively; refs. 25–27), may provide additional, sensitive markers for CFDNA screening.

In the GENAIR study, several genetic polymorphisms have been assessed in relation to cancer risk. The rationale for analyzing these polymorphisms as candidates is explained by Matullo et al. (17). Our results suggest a tendency for plasma DNA mutation to correlate with exposure and/or susceptibility to environmental mutagens. Two polymorphisms showed a suggestive tendency for association with CFDNA mutations. The codon 399 *Gln* allele (A/A genotype) of *XRCC1* is a potential biomarker of susceptibility to chemically induced genetic damage (28). The “slow acetylator” phenotype of NAT2, a carcinogen-metabolizing enzyme involved in the inactivation of arylamines, is suspected to determine an increasing risk for bladder cancer (29). Thus, mutations in the CFDNA of healthy subjects may reflect the effect of ongoing exposures to environmental carcinogens, particularly in subjects who have genetic polymorphisms that predispose to higher levels of mutagenic damage by such carcinogens. This interpretation is consistent with the results of studies on *TP53* mutations at codon 249 in the plasma DNA of healthy subjects from regions of high incidence of hepatocellular carcinoma in The Gambia, West Africa (3) and in Qidong, China (4). This mutation is considered as a “fingerprint” of mutagenesis by aflatoxins, and its presence in the plasma of subjects without cancer may reflect ongoing, dietary

exposure to this carcinogen. In the present study, the potential exposures are more diverse and less characterized and pervasive as aflatoxin in The Gambia and in Qidong. Overall, these observations have implication for the use of CFDNA mutations as indicators of disease in prospective studies. The rarity of mutations in both cases and controls is a limitation for their use in clinical cancer detection. Further investigations are needed to determine whether it is possible to discriminate disease-associated from exposure-associated CFDNA mutations based on mutation patterns and quantitative accrual over time of mutant DNA in the plasma.

Acknowledgments

Received 12/22/2005; revised 4/13/2006; accepted 4/28/2006.

Grant support: Compagnia di San Paolo (Torino) and Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori (P. Vineis). Support for the EPIC study: “Europe Against Cancer” Programme of the European Commission; Ligue contre le Cancer (France); Société 3M (France); Mutuelle Générale de l’Education Nationale; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; German Cancer Aid; German Cancer Research Center; German Federal Ministry of Education and Research; Danish Cancer Society; Health Research Fund of the Spanish Ministry of Health; the participating regional governments and institutions of Spain; Cancer Research UK; Medical Research Council (United Kingdom); Stroke Association (United Kingdom); British Heart Foundation; Department of Health (United Kingdom); Food Standards Agency (United Kingdom); Wellcome Trust (United Kingdom); Greek Ministry of Health; Greek Ministry of Education; Italian Association for Research on Cancer; Italian National Research Council; Dutch Ministry of Public Health, Welfare and Sports; Dutch Ministry of Health; Dutch Prevention Funds; LK Research Funds; Dutch Zorg Onderzoek Nederland; World Cancer Research Fund; Swedish Cancer Society; Swedish Scientific Council; and Regional Government of Skane, Sweden.

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

We thank G. Tchoua, G. Martel-Planche, D. Dulac, and M. Dupasquier for technical assistance.

References

- Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stabel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev* 2002;28:255–71.
- Kirk GD, Lesi OA, Mendy M, et al. 249(Ser) TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B viral infection, and risk of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2005;24:5858–67.
- Szymanska K, Lesi OA, Kirk GD, et al. Ser-249TP53 mutation in tumour and plasma DNA of hepatocellular carcinoma patients from a high incidence area in The Gambia, West Africa. *Int J Cancer* 2004;110:374–9.
- Jackson PE, Kuang SY, Wang JB, et al. Prospective detection of codon 249 mutations in plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Carcinogenesis* 2003;24:1657–63.
- Kopreski MS, Benko FA, Borys DJ, et al. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:918–23.
- Allan JM, Hardie LJ, Briggs JA, et al. Genetic alterations in bronchial mucosa and plasma DNA from individuals at high risk of lung cancer. *Int J Cancer* 2001;91:359–65.
- Gormally E, Hainaut P, Caboux E, et al. Amount of DNA in plasma and cancer risk: a prospective study. *Int J Cancer* 2004;111:746–9.
- Peluso M, Hainaut P, Airoldi L, et al. Methodology of laboratory measurements in prospective studies on gene-environment interactions: the experience of Gen-Air. *Mutat Res* 2005;574:92–104.
- Bingham S, Riboli E. Diet and cancer—the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Nat Rev Cancer* 2004;4:206–15.
- Kaaks R, Berrino F, Key T, et al. Serum sex steroids in premenopausal women and breast cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst* 2005;97:755–65.
- Riboli E, Hunt KJ, Slimani N, et al. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Health Nutr* 2002;5:1113–24.
- Peluso M, Munnia A, Hoek G, et al. DNA adducts and lung cancer risk: a prospective study. *Cancer Res* 2005;65:8042–8.
- le Calvez F, Ahman A, Tonisson N, et al. Arrayed primer extension resequencing of mutations in the TP53 tumor suppressor gene: comparison with denaturing HPLC and direct sequencing. *Clin Chem* 2005;51:1284–7.
- Taniere P, Martel-Planche G, Puttawibul P, et al. TP53 mutations and MDM2 gene amplification in squamous-cell carcinomas of the esophagus in south Thailand. *Int J Cancer* 2000;88:223–7.
- Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, et al. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998;4:271–5.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, et al. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002;19:607–14.
- Matullo G, Dunning AM, Guarrera S, et al. DNA repair polymorphisms and cancer risk in non-smokers in a cohort study. *Carcinogenesis* 2006. Epub.
- Jacobs G, Tscholl E, Sek A, et al. Enrichment polymerase chain reaction for the detection of Ki-ras mutations: relevance of Taq polymerase error rate, initial DNA copy number, and reaction conditions on the emergence of false-positive mutant bands. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:395–401.
- Al Sukhun S, Hussain M. Current understanding of the biology of advanced bladder cancer. *Cancer* 2003;97:2064–75.
- Olderoy G, Daehlin L, Ogreid D. Low-frequency mutation of Ha-ras and Ki-ras oncogenes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Anticancer Res* 1998;18:2675–8.
- Uchida T, Wada C, Ishida H, et al. Infrequent involvement of mutations on neurofibromatosis type 1, H-ras, K-ras and N-ras in urothelial tumors. *Urol Int* 1995;55:63–7.
- Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, et al. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24:5218–25.
- Zhang ZT, Pak J, Huang HY, et al. Role of Ha-ras activation in superficial papillary pathway of urothelial tumor formation. *Oncogene* 2001;20:1973–80.
- Trombino S, Neri M, Puntoni R, et al. Mutations in K-ras codon 12 detected in plasma DNA are not an indicator of disease in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Chem* 2005;51:1313–4.
- Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, et al. FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 2003;63:8108–12.
- Hoque MO, Lee CC, Cairns P, Schoenberg M, Sidransky D. Genome-wide genetic characterization of bladder cancer: a comparison of high-density single-nucleotide polymorphism arrays and PCR-based microsatellite analysis. *Cancer Res* 2003;63:2216–22.
- van Rhijn BW, Lurkin I, Radvanyi F, et al. The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate 8. *Cancer Res* 2001;61:1265–8.
- Wang Y, Spitz MR, Zhu Y, et al. From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair (Amst)* 2003;2:901–8.
- Green J, Banks E, Berrington A, et al. N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: an overview and consideration of the evidence for gene-environment interaction. *Br J Cancer* 2000;83:412–7.

Cancer

Somatic mutations in human cancer: applications in molecular epidemiology

Mutations somatiques dans le cancer humain : applications en épidémiologie moléculaire

E. LE ROUX, E. GORMALLY, P. HAINAUT

Molecular Carcinogenesis Group, International Agency for Research on Cancer, 150, cours Albert-Thomas, 69372 Lyon Cedex 08. Email : hainaut@iarc.fr (*Tirés à part* : P. Hainaut).

La protéine suppresseur de tumeur p53, une fois activée par différentes formes possibles de stress, induit l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose. Quand elle est activée, cette protéine « maître » module sa réponse selon la nature et l'intensité du stress. Le gène TP53 est le gène le plus muté dans les cancers, avec près de 20 000 mutations décrites. La plupart des mutations sont des mutations faux-sens et affectent essentiellement 200 codons dans la région centrale du gène. Dans différents cancers, les distributions des types de mutation et des sites d'occurrence suivent un profil reflétant les effets de mutagènes environnementaux. La mutation au codon 249 du gène TP53 dans les carcinomes hépatocellulaires des régions du globe caractérisées par de hauts niveaux en aflatoxine B1, un mutagène, et une infection endémique du virus HB, est un exemple d'une telle empreinte moléculaire. Récemment, des mutations de TP53 ont été détectées dans du matériel génétique de substitution comme l'ADN circulant isolé à partir du plasma. Les mutations plasmatiques de TP53 peuvent être détectées dans le sang de patients pré-cancéreux ou cancéreux, avec comme application potentielle la détection précoce du cancer. Ainsi, les mutations de TP53 ont des applications multiples comme marqueurs d'exposition à des mutagènes, ou comme marqueurs intermédiaires dans l'évaluation de l'occurrence ou de la progression du cancer.

p53. Empreinte moléculaire. Pronostic. Détection précoce.

The tumour suppressor protein p53 mediates cell-cycle arrest, DNA repair and apoptosis after activation by multiple forms of cellular stresses. When activated, this "master protein" modulates its response depending on the type and intensity of the stress. The TP53 gene with its nearly 20,000 described mutations is the most mutated gene in cancer. Most mutations are missense and occur at over 200 codons within the central portion of the gene. In several cancers, the distribution of mutation types and sites follow a specific pattern reflecting the effects of environmental mutagens. An example for such a "mutagen fingerprint" is TP53 mutation at codon 249 in hepatocellular carcinoma in regions of the world characterised by high levels of the mutagen aflatoxin B1 and endemic HBV infection. Recently, TP53 mutations have been detected in surrogate sources of genetic material such as free circulating DNA isolated from plasma. Plasma TP53 mutations can be detected in the blood of pre-cancer and cancer patients, with potential application for early cancer detection. Thus, TP53 mutations have multiple applications as markers of mutagenic exposures, or as intermediate end-points in assessment of cancer occurrence and progression.

p53. Fingerprints. Prognosis. Early detection.

INTRODUCTION

Somatic mutations are the cornerstone of cancer [1]. The development of cancer involves the contributions of many heritable genetic events as well as of a large number of epigenetic changes, but what makes the turning point between untransformed and transformed cell irreversible is the acquisition of targeted, somatic mutations, conferring to cells a selective advantage for clonal proliferation. These mutations can occur in many different genes, but only a handful of them are frequently mutated in a wide variety of human cancers. They include genes of the *RAS* family (mainly *KRAS*), *BRAF1*, *APC*, β *Catenin*, *p16/INK4a*, *PTEN* and *TP53*. After over 20 years of research on mutation detection in cancers, *TP53* remains the world champion of somatic mutations, with over 70% of all the mutations described so far in human cancers [2]. The database of *TP53* mutations maintained at IARC (<http://www.iarc.fr/p53>) contains close to 20,000 mutations identified in primary human cancers, cell lines and pre-cancerous lesions [3]. The overall spectrum of these mutations has several unique features. As for many tumour suppressor genes, mutations are scattered along large parts of the coding sequence, and also occur at splice junctions, in agreement with the notion that their primary consequence is to disrupt p53 protein function. In contrast to most other suppressors, however, the vast majority of *TP53* mutations are missense rather than nonsense or frameshift mutations. Thus, the spectrum of *TP53* mutations is extremely diverse and shows quite remarkable variations from one cancer type to the other. These variations are informative in two respects. First, the occurrence of particular mutations may be the consequence of exposure to mutagens involved in cancer causation; second, depending upon where the mutations fall in the protein, they may have different functional consequences and may therefore predict cancer development, response to therapy and outcome. In this review, we will briefly present the evidence behind these two concepts and discuss their application in the context of molecular epidemiological studies.

BIOLOGICAL FUNCTIONS OF *TP53*

GENE CHARACTERISTICS

TP53 (OMIM:191170, synonymous: P53) is located on chromosome 17p13.1 and encodes an

ubiquitous phosphoprotein of molecular mass 51-53000 daltons. The gene spans 20 kb, with a non-coding exon 1 and a very long first intron of 10 kb. The coding sequence contains five regions showing a high degree of conservation in vertebrates, predominantly in exons 2, 5, 6, 7 and 8, but the sequences found in invertebrates show only distant resemblance with mammalian *TP53* [4]. Over 15 polymorphisms are identified in the human population, with allele frequencies that vary with ethnic origin (see list at <http://www.iarc.fr/p53>). One of them affects the coding sequence at codon 72, specifying either an arginine or a proline. The Arg allele is the most common in the western population (allele frequencies ranging from 0.6 to 0.8) but the prevalence of the Pro allele seems to increase according to a North-South gradient, so that the Pro allele is the most frequent one near the equator and in indigenous populations of the Southern hemisphere [5]. There is growing evidence that this polymorphism may have a functional impact on cancer susceptibility and response to therapy [6].

p53 PROTEIN STRUCTURE

The p53 protein contains 393 residues and is structured as a hydrophobic, central core (residues 110-296, encoded by exons 5 to 8), flanked by an acidic N-terminus and a basic C-terminus. The N-terminus contains two complementary transcriptional activation domains, with a major one at residues 1-42 and a minor one at residues 55-75, specifically involved in the regulation of several pro-apoptotic genes [7]. The central core is made of a scaffold of two beta-sheets supporting a set of flexible loops and helices stabilized by the binding of an atom of zinc. These loops and helices make direct contact with DNA sequences containing inverted repeats of the motif RRRC(A/T) [8]. The C-terminus contains main nuclear localisation signals and oligomerisation domains (residues 325-366). The active form of the protein is a tetramer (a pair of dimers) [9]. The extreme C-terminus has multiple regulatory functions and exerts a negative control on sequence-specific DNA binding activities. Both N- and C-terminal regions contain multiple phosphorylation sites, while none has been identified so far in the central core.

REGULATION

The p53 protein is constitutively expressed in most cells and tissues as a latent factor. Due to its rapid turnover (5-20 minutes) the protein does not accumulate unless it is stabilized in response to a variety of intracellular and extracellular stimuli. Signals that activate p53 include diverse types of DNA damage (strand breaks, bulky adducts, oxidation of bases), blockade of RNA elongation, hypoxia, depletion of microtubules, ribonucleotides or growth factors, modulation of cell adhesion and alteration of polyamine metabolism (*fig. 1*) [10]. Most of the current knowledge on p53 protein activation is derived from studies using DNA strand breaks as inducing signals.

The main regulator of p53 protein activity is Mdm-2, a protein that binds to p53 in the N-terminus (residues 17-29), conceals its transcription activation domain, redirects p53 from nucleus to the cytoplasm and acts as an ubiquitin-ligase to target p53 for degradation by the proteasome. The MDM2 gene is a transcriptional

target of p53, thus defining a feedback loop in which p53 controls its own stability [11]. The p53/Mdm-2 complex is regulated by p14^{arf} (Alternative Reading Frame), a 14 kDa protein encoded by an alternative reading frame of CDKN2A, the gene that encodes the tumour suppressor p16 [12]. The kinetics, extent and consequences of p53 activation vary according to the nature and intensity of the inducing signals. In response to ionizing radiation, activation of p53 proceeds through phosphorylation of p53 in the N-terminus by kinases involved in DNA-damage sensing such as Atm (the product of the ataxia-telangiectasia mutated gene) and Chk2 (a cell-cycle regulatory kinase) [13]. Phosphorylation induces the dissociation of the p53/Mdm-2 complex, leading to p53 stabilization and allowing the binding of transcriptional co-activators such as p300/CBP and pCAF, that acetylate p53 in the C-terminus. This process, as well as others, coordinated post-translational modifications of the C-terminus, induces conformational changes that turn the protein into an active form with high affinity for specific DNA response elements. The

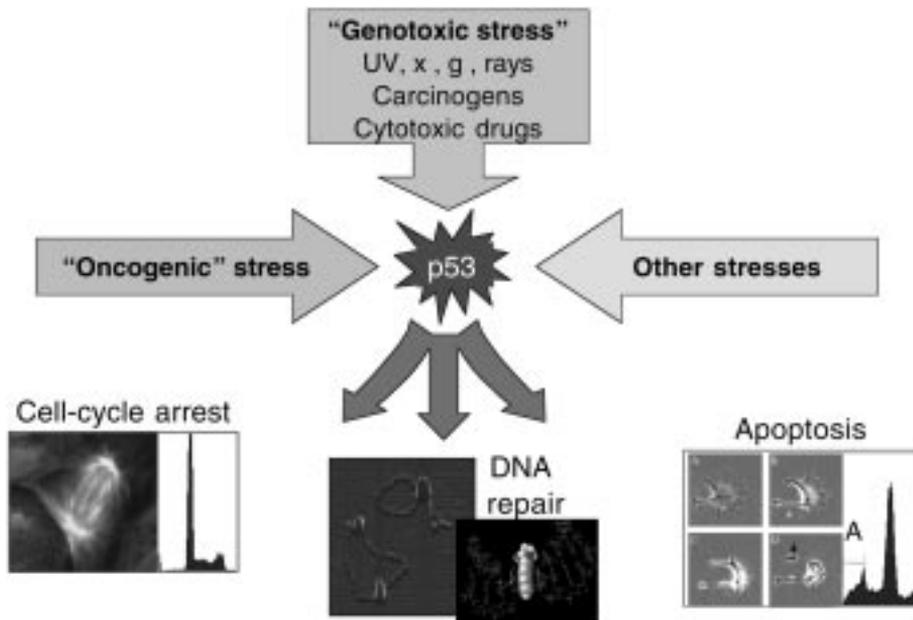


Fig. 1. — P53 pathway. p53 is a sensor of multiple forms of stress. It is activated in response to a variety of intracellular and extracellular stimuli. Once activated, p53 induces cell-cycle arrest, DNA repair or apoptosis, via diverse downstream effectors. The response depends upon the nature and amplitude of the stress, the cell type and differentiation status.

pathways of response to non-DNA damaging signals are less well understood and may involve different sets of phosphorylation events [10].

FUNCTIONS

Once activated, p53 exerts its effects through two major mechanisms: transcriptional control (activation or repression of specific genes) and interference with the function of other proteins through complex formation. Over 4,800 genes have been identified as containing a p53-response element in regulatory regions [14]. Downstream effectors include regulators of cell-cycle checkpoints (in G1/S, G2 and during mitosis), factors involved in the signalling of several routes of apoptosis (receptor- and/or mitochondria-dependent), genes mediating important aspects of DNA repair, and components of the transcription, replication and repair machineries (fig. 1). At the cellular level, activation of p53 generally induces either cell-cycle arrest (mostly in G1 and/or G2/M) or apoptosis. However, it must be realized that apoptosis is the preferred response in primary cells and that when cell-cycle arrest is induced, it is generally a permanent one, followed by cell senescence [15]. In other words, activation of p53 in a normal cell generally results in its permanent deletion from the pool of cells with proliferative capacity, providing a radical way for suppressing any cell that carries a risk of oncogenic transformation. How a cell “selects” between alternative responses (e.g. cell-cycle arrest or apoptosis) depends upon many factors, such as the nature and amplitude of the stress, as well as the cell type and differentiation status. In UV-irradiated skin, as well as in β -ray irradiated intestine, the level and consequences of p53 activation are dependent upon cell differentiation status [16, 17]. Together, these responses allow to neutralize cells that carry the highest risk of propagating DNA-damage, while keeping alive other cells that are important to maintain the integrity of the tissue. Thus, p53 can act as a mediator of not only genetic, but also tissular stability, in response to genotoxic stress.

MECHANISM OF MUTAGEN FINGERPRINTS

The formation of a mutation pattern in cancer can be seen as the result of a complex process of elimination of candidate lesions through a succession of filters. The first filter is determined by carcinogen metabolism and by the chemistry of

DNA damage. Mutagens can damage DNA in a specific way, generating promutagenic lesions that, to some extent, reflect the chemistry of DNA damage [18]. Moreover, base position, accessibility and sequence context are the main factors that influence the type and form of DNA damage, forming a second filter [19]. The third filter consists into DNA repair, a complex set of processes that removes the large majority of lesions, but does so in a selective manner so that all types of lesions are not eliminated with the same efficiency [20]. In particular, transcription-coupled excision repair preferentially eliminates polymerase-blocking lesions occurring on the transcribed DNA strand and is responsible for DNA strand bias in mutation distribution [21]. A fourth filter is represented by DNA replication. Although a very accurate system, DNA replication is also error-prone and critically dependent on polymerase fidelity [22]. Finally, once DNA alterations have been selected through these various filters, they become targets for biological selection through the so-called “protein filter” that confines the detectable mutations to genetic alterations that produce a functionally altered gene product [23, 24]. However, detection of a mutation in a clone of cancer cells does not necessarily imply that mutation is causal for cancer growth. In many cases, mutations can arise as by-products of the transformation process or may occur before the initiation of clonal expansion. Thus, a number of mutations may be hitchhikers, rather than drivers, in the process of clonal expansion. This is particularly true for the mutations that occur at rare codon positions (“cold-spots”) in the IARC *TP53* mutation database.

INTERPRETING MUTAGEN FINGERPRINTS: THE EXAMPLE OF AFLATOXINS AND LIVER CANCER

There are several, well-defined examples of cancers in which *TP53* mutation patterns can be read as “carcinogen fingerprints”. The best-documented ones are found in lung cancers of smokers (fingerprints of mutagenesis by PAH), in non-melanoma skin cancers (fingerprints of mutagenesis by UV light) and in liver cancers (hepatocellular carcinomas, HCC) occurring in tropical regions. In the latter case, the main mutagen appears to be aflatoxin B1 (AFB1), a mycotoxin that frequently contaminates traditional food in these regions.

The incidence rates of hepatocellular carcinoma (HCC) show large geographic variations, globally reflecting the prevalence of two main aetiologic factors, hepatitis B (HBV) and/or C (HCV) virus infection and exposure to high levels of aflatoxin in the diet [25]. The highest incidence rates are observed in regions where most of the population is exposed to both factors, such as in parts of eastern Asia and in sub-Saharan Africa [26]. These high incidences are consistent with the fact that HBV chronicity and exposure to aflatoxin have a multiplicative effect of risk for HCC (*fig. 2*) [27]. The contributions of viral factors to the pathogenesis of HCC are multi-factorial and depend on virus genotype, on the presence of viral variants with enhanced tumourigenic properties, and on co-infections by different viruses [28].

EPIDEMIOLOGICAL EVIDENCE

Depending on aetiology and geographic area, mutations in *TP53* in HCC show striking differences

in prevalence and pattern. In Europe and the US, where alcohol is a major risk factor in addition to viral infections, mutations occur in about 25% of HCC and show as much diversity in their type and codon position as in most other epithelial cancers. However, in high incidence areas such as Mozambique, Senegal, The Gambia (Africa) and Qidong county (China), *TP53* is mutated in over 50% of the cases and the vast majority of these mutations are a single missense, hotspot mutation at codon 249, AGG to AGT, resulting in the substitution of arginine into serine (249^{ser}). This mutation is uncommon in regions where aflatoxin is not present at significant levels in the diet. In areas of intermediate exposure to aflatoxin, as for example in Thailand, the prevalence of the 249^{ser} mutation is intermediate between high- and low-incidence areas. Thus, there is a dose-dependent relationship between exposure to aflatoxin, incidence of HCC and prevalence of the 249^{ser} mutation [29]. Mutations at codon 249 are detectable at a low prevalence in a number of other cancers, including lung cancers.

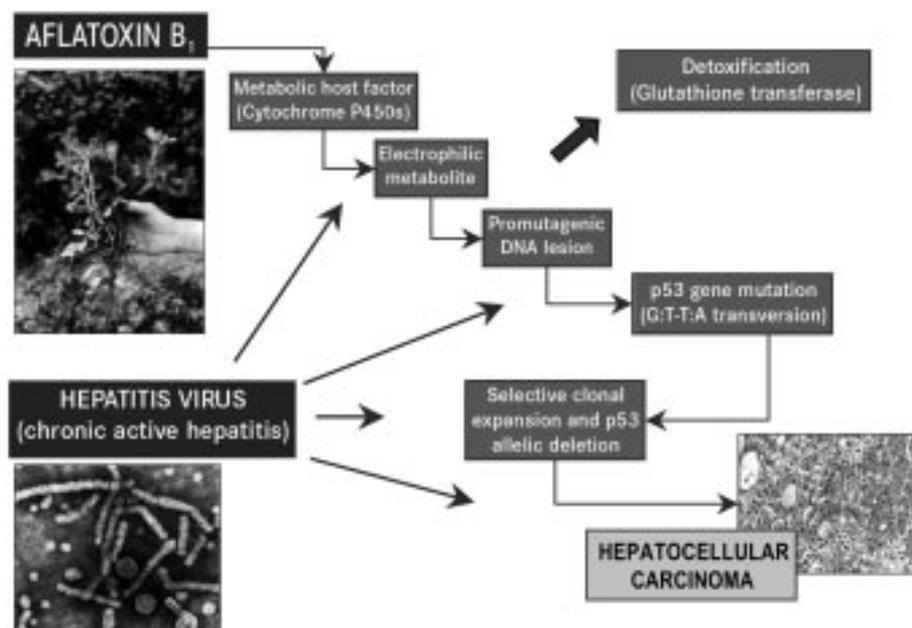


Fig. 2. — Interplay between HBV and AFB1 in liver carcinogenesis. Aflatoxin B1 (AFB1) is a mycotoxin metabolised by cytochrome P450 in an electrophilic metabolite forming promutagenic lesion if not detoxified. DNA lesions can be converted into mutations (G to T transversions) which can lead to selective clonal expansion and HCC development. HBV can promote HCC development by itself, but also supports formation of lesions and mutations by AFB1, and provides a selective environment for mutated cells.

However, in most cases, the mutation is a transversion affecting the second base of the codon, AGG to ATG, generating the substitution of the arginine into methionine [3].

EXPERIMENTAL EVIDENCE

There is strong experimental evidence that aflatoxins are potent DNA damaging agents. The most significant carcinogenic aflatoxin is B1 (AFB1), which is the most abundant in the diet. AFB1 is metabolized in the liver by several CYP450 enzymes (mainly 1A2 and 3A4) to a reactive AFB1-8,9-*exo*-epoxide [30]. This metabolite generates a primary DNA adduct (8-9, dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxyaflatoxin; AFB1-N7-Gua), naturally converted to two secondary lesions, an apurinic (AP) site and a stable, AFB1-formamidopyrimidine (AFB1-FAPY) adduct [31]. The latter is considered as the most mutagenic lesion [32]. Adducts do not form equally at all guanines in *TP53* and, experimentally, promutagenic lesions have been demonstrated at several positions throughout the coding sequence of the DNA-binding domain [33]. The sequence context of codon 249 (AGGCC) represents a site of intermediate affinity for the formation of AFB1-induced lesions. Other codons in *TP53*, including some codons that are "hotspots" in many cancers (codon 245, 248 and 273), have a similar or even greater affinity for AFB1 than codon 249 [34]. Thus, the selectivity for 249^{ser} in HCC cannot be solely explained by the preferential formation of adducts at this position and other factors must play a role to select this particular mutation as the major carcinogenic one in liver cells exposed to aflatoxins.

There is evidence that imperfect DNA repair may increase the risk of mutagenesis and carcinogenesis induced by AFB1. Higher levels of AFB1-DNA adducts have been detected in the placenta of healthy women from Taiwan carrying the Gln399 allele of *XRCC1*, an enzyme involved in base excision repair, causing slower repair and persistence of DNA adducts [35]. Slow excision repair due to the interference of the HBx antigen of HBV with the host's repair system has been proposed as a critical factor [36]. However, a faster adduct removal rate by the DNA-repair system was observed at codon 249 than at other codons [34]. Together, these results suggest that

deficient DNA repair does not explain the high prevalence of 249^{ser} in HCC, and that biological selection may play a role to facilitate the clonal expansion of cells carrying 249^{ser} during the development of HCC (*table 1*).

TP53 MUTATIONS, CANCER PROGNOSIS AND OUTCOME

Experimental studies have shown that not all mutations have equivalent effects on p53 protein functions. Some mutant p53 proteins may retain a low level of wild-type activity. Moreover, other mutants have not only lost wild-type, suppressor functions but have acquired dominant, pro-oncogenic effects. Thus, it is widely expected that the impact of p53 mutation on cancer development and outcome may differ according to the type, position, and functional consequence of the mutation. Although more than 500 studies have investigated the value of *TP53* status as a prognostic and/or predictive marker in various types of cancer, results have often been contradictory. Several reasons can explain this apparent confusion, from differences in study design, heterogeneity in the cohorts to methodology used to assess *TP53* status. However, the main reason certainly resides in the fact that the majority of studies (about 400/500) have used immuno-histochemistry (IHC) to assess *TP53* status. Earlier observations have shown that the majority of *TP53* mutations are missense mutations that accumulate in cancer cells and thus can be detected by IHC. However, it is now admitted that IHC is not suitable as a screening method for mutations since not all types of mutations are detected. Sequencing of the complete coding sequence of *TP53* shows that 10 to 25% of the mutations are truncating mutations (nonsense, frameshift or splice site mutations) that are not detected by IHC since they do not lead to a stable protein. Moreover, some cases of IHC positive cells do not carry a mutation but may result from the accumulation of the wild-type protein in response to cellular stress signals. Finally, IHC studies have used different antibodies, different labelling procedures and different cut-off value for positive cases. Hence, the use of IHC leads to an unacceptable number of misclassified cases and to a greater inter-study variability.

TABLE I. — A succession of filters shape *TP53* specific mutations at codon 249 in liver cancer in areas of high exposure to Aflatoxin B1 and Hepatitis B Virus.

Filter		Example	Type of lesion
Filter 1	Chemistry of DNA damage	AFB1 is metabolized by CYP450 (mainly 1A2 and 3A4) to generate AFB1-8,9-epoxide that binds on N7 position of guanine	8-9,dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxyaflatoxin adduct=AFB1-N7-Gua adduct which is converted into two types of lesions: apurinic (AP) site and stable AFB1-formamidopyrimidine (AFB1-FAPY) adduct
Filter 2	Detoxification	Glutathione transferase binds epoxide to the glutathione	Decreased number of lesions, excretion of the epoxide
Filter 3	Sequence context	Adducts preferentially form at G adjacent to another G	Major adducts: 245, 248, 273. Codon 249 has an intermediate affinity for the adduct
Filter 4	HBV and DNA repair	XRCC1 Gln399 polymorphism implies slower base excision repair. Interference of the HBx antigen of HBV with the host's repair system could also slow down excision repair?	Adducts less removed?
Filter 5	DNA replication	Lesion bypass of an adducted template by pol eta misincorporates A instead of C; replication results in substitution of G to T opposite to misincorporated A	Formation of G to T transversions
Filter 6	Biological selection?	The mutant Ser249 P53 protein could facilitates clonal expansion?	Excess of G to T transversions at codon 249 of <i>TP53</i> specific of HCC induced by AFB1 exposure

MUTATIONS AND PROGNOSIS

When only studies that have used gene sequencing to assess *TP53* mutation status are taken into account, *TP53* appears to be of prognostic value in a variety of cancers. A comprehensive list of such studies is provided on the IARC *TP53* database web site (<http://www.iarc.fr/p53>). Association with poor prognosis has repeatedly been reported for breast, bladder, head and neck and hematological cancers. Results for colorectal, lung and oesophageal cancers are more heterogeneous, but a majority of studies found an association with poor prognosis. For ovarian cancer, results remain contradictory. In brain tumours, the majority of studies show a lack of association with prognosis and two studies report an association with good prognosis. Overall, 65/93 studies found that *TP53* is a statistically significant factor of poor prognosis in various cancers. It should be noted that the majority of studies (20/27) reporting no association between *TP53* status and survival have been done on cohorts of less than

100 patients, which give insufficient statistical power to detect moderate differences in survival.

MUTATIONS AND RESPONSE TO THERAPY

Response to adjuvant chemotherapy or radiotherapy is a major determinant of patient outcome. Among 19 studies that have specifically investigated the association between tumour response to treatment and *TP53* mutation status, 14 have found that the presence of a mutation was associated with a poor response to various chemotherapy or radiotherapy regimens in breast, head and neck, hematological, colorectal, ovarian, oesophageal cancers and soft tissue sarcomas (see *TP53* Function Database, <http://www.iarc.fr/p53>). These observations are in agreement with experimental data showing a key role for *TP53* in the anti-proliferative response induced by various chemotherapeutic agents. Interestingly, one study on ovarian cancer patients showed that *TP53* status was predictive of response to treatment in patients treated with cyclophosphamide and cisplatin but not in

patients treated with a paclitaxel/cisplatin regimen [37]. In a study on 63 advanced breast cancer patients treated with doxorubicin in a neo-adjuvant setting, a strong correlation between lack of response and presence of *TP53* mutation was observed. The same was seen for 35 breast cancer patients treated with FUMI (5 fluorouracil and Mitomycin C) in a neo-adjuvant setting [38]. These observations are in agreement with the fact that DNA-damaging agents have been shown to induce p53-dependent apoptosis whereas paclitaxel (a microtubule stabilizing agent) effects are expected to be independent of p53 function. In 2000, Berns *et al.* reported that patients with *TP53* mutation showed the lowest response to tamoxifen in a series of 243 breast cancer patients. This effect was observed in oestrogen receptor (ER) positive patients only, suggesting that ER-dependent response to anti-hormone therapy may also depend on an intact *TP53* pathway [39].

It is not clear from the available studies whether the prognostic value of *TP53* for the overall survival of a patient depends on the administration of adjuvant treatment, or if it also has a value for patients receiving only surgery. In one study of colorectal tumours where patients treated with surgery alone were included, the presence of mutations in specific regions was correlated with a shorter survival [40]. In another study on colorectal cancer, the survival of patients treated with surgery only was compared with patients receiving adjuvant chemotherapy in addition to surgery. It showed that survival was strongly correlated with the presence of *TP53* mutations in the entire cohort. However, when only patients undergoing a radical resection were considered, *TP53* mutation status was no longer of prognostic significance [41]. In oesophageal cancer, *TP53* alterations (*TP53* mutation plus positive immunostaining) but not *TP53* mutation alone, was found to be significantly associated with shorter overall and disease-free survival in 91 patients treated by surgery only [42]. Although these results remain to be confirmed and extended, they suggest that *TP53* mutation has a weak prognostic value, if any, in patients treated with surgery only. The capacity of *TP53* to mediate tumour response to chemotherapeutic drugs may thus be the main mechanism explaining its prognostic value.

PERSPECTIVES: APPLICATION OF *TP53* MUTATION STUDIES IN MOLECULAR EPIDEMIOLOGY

The results discussed above clearly identify *TP53* mutation patterns as a significant source of information on exposure to carcinogens or mutagenesis. Moreover, presence of a *TP53* mutation may represent an intermediate end-point as marker of tumourigenesis. However, so far most studies have focused on mutation detection in malignant or premalignant cancer lesions. Thanks to recent technical developments, it is now possible to detect low-levels of *TP53* mutant DNA in non-cancer material. These developments open new perspectives to fully exploit the potential of *TP53* mutation studies in molecular epidemiology.

One of the most interesting sources of biological material in this context is free circulating DNA isolated from the plasma. The presence of extracellular nucleic acid in the human bloodstream was first described in 1948 by Mandel and Metais [43]. For almost 30 years, it has been demonstrated that serum or plasma from cancer patients contains a higher mean concentration of DNA (on average, 13 ng/mL in healthy patient *versus* 180 ng/mL in cancer patients) [44]. The exact mechanism of free cell DNA release is not yet elucidated, but, in cancer patients, evidence of its tumoural origin have been provided since the eighties [45]. Indeed, a part of plasma DNA presents the same alterations as in tumoural DNA such as decreased DNA stability, mutations, microsatellite alterations or hypermethylations.

In 2000, we have used plasma DNA as a surrogate source of genetic material to investigate the association between the 249^{ser} mutation, HBV and/or HCV infection, and liver cancer in a population of individuals exposed to dietary aflatoxins in The Gambia, West Africa. Using a case-control study design, we found that 249^{ser} was detectable in 40% of HCC cases, 3.5% of controls and 15% of patients with liver cirrhosis. The relative risk (RR) for cancer reaches 20.25 (95% CI: 8.19-50.03) in subjects positive for 249^{ser} in plasma DNA, and 398.55 (95% CI: 48.55-3271.97) in subjects positive for both 249^{ser} and HB surface antigen (HBsAg) (Kirk *et al.*, submitted). There was a 88% concordance between 249^{ser} status in plasma DNA and in tumour biopsies [46].

The significance of 249^{ser} as a marker of liver tumorigenesis was further investigated by Jackson *et al.* who used a sensitive, mass-spectrometry methodology to perform a retrospective study on the plasma DNA of 8 Chinese patients having a 249^{ser} mutation in their tumours: they detected in 4 of them the presence of the mutation in plasma specimens collected 1 to 5 years before diagnosis [47]. Thus, study of plasma DNA could be used as a non-invasive method for diagnosis, prognosis, follow-up or early detection of cancer. The main challenge in further studies will be to determine whether 249^{ser} represents a strict marker of tumorigenesis, or can also occur in healthy subjects as a marker of mutagenesis from exposure to dietary aflatoxins. Overall, the paradigm emerging from studies on liver cancer in Africa and in China may set a model for studies on other cancers in which *TP53* mutations occur frequently, such as cancers of the upper-aero-digestive tract.

REFERENCES

- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 2000; 77: 82-137.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002; 19: 607-14.
- May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999; 18: 7621-36.
- Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, *et al.* Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 1994; 44: 266-70.
- Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiante G, *et al.* p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 2003; 3: 387-402.
- Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J* 1998; 17: 4668-79.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; 265: 346-55.
- McLure KG, Lee PW. How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J* 1998; 17: 3342-50.
- Pluquet O, Hainaut P. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Lett* 2001; 174: 1-15.
- Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 1001-8.
- Moore L, Venkatachalam S, Vogel H, Watt JC, Wu CL, Steinman H, *et al.* Cooperativity of p19ARF, Mdm2, and p53 in murine tumorigenesis. *Oncogene* 2003; 22: 7831-7.
- Kastan MB, Lim DS, Kim ST, Yang D. ATM: a key determinant of multiple cellular responses to irradiation. *Acta Oncol* 2001; 40: 686-8.
- Wang L, Wu Q, Qiu P, Mirza A, McGuirk M, Kirschmeier P, *et al.* Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches. *J Biol Chem* 2001; 276: 43604-10.
- Linke SP, Clarkin KC, Wahl GM. p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation. *Cancer Res* 1997; 57: 1171-9.
- Chaturvedi V, Qin JZ, Stennett L, Choubey D, Nickoloff BJ. Resistance to UV-induced apoptosis in human keratinocytes during accelerated senescence is associated with functional inactivation of p53. *J Cell Physiol* 2004; 198: 100-9.
- Wilson JW, Pritchard DM, Hickman JA, Potten CS. Radiation-induced p53 and p21WAF-1/CIP1 expression in the murine intestinal epithelium: apoptosis and cell cycle arrest. *Am J Pathol* 1998; 153: 899-909.
- Essigmann JM, Wood ML. The relationship between the chemical structures and mutagenic specificities of the DNA lesions formed by chemical and physical mutagens. *Toxicol Lett* 1993; 67: 29-39.
- Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN. The nature and mechanisms of human gene mutations. *In: Vogelstein B, Kinzler W, eds. The genetic basis of human cancer.* 2nd ed. New York: Mc Graw-Hill, 2002: 7-41.
- Hanawalt PC, Ford JM, Lloyd DR. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. *Mutat Res* 2003; 544: 107-14.
- Vrieling H, Van Zeeland AA, Mullenders LH. Transcription coupled repair and its impact on mutagenesis. *Mutat Res* 1998; 400: 135-42.
- Kunkel TA. DNA replication fidelity. *J Biol Chem* 2004; 279: 16895-8.
- Dogliotti E, Hainaut P, Hernandez T, D'Errico M, DeMarini DM. Mutation spectra resulting from carcinogenic exposure: from model systems to cancer-related genes. *Recent Results Cancer Res* 1998; 154: 97-124.

24. Hollstein M, Hergenhahn M, Yang Q, Bartsch H, Wang ZQ, Hainaut P. New approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra. *Mutat Res* 1999; 431: 199-209.
25. Chen CJ, Yu MW, Liaw YF. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: S294-308.
26. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94: 153-6.
27. Ross RK, Yuan JM, Yu MC, Wogan GN, Qian GS, Tu JT, *et al.* Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1992; 339: 943-6.
28. Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 395-403.
29. Montesano R, Hainaut P, Hall J. The use of biomarkers to study pathogenesis and mechanisms of cancer: oesophagus and skin cancer as models. *IARC Sci Publ* 1997; 291-301.
30. Mace K, Aguilar F, Wang JS, Vautravers P, Gomez-Lechon M, Gonzalez FJ, *et al.* Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1291-7.
31. Smela ME, Currier SS, Bailey EA, Essigmann JM. The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2001; 22: 535-45.
32. Smela ME, Hamm ML, Henderson PT, Harris CM, Harris TM, Essigmann JM. The aflatoxin B(1) formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6655-60.
33. Puisieux A, Lim S, Groopman J, Ozturk M. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Res* 1991; 51: 6185-9.
34. Denissenko MF, Koudriakova TB, Smith L, O'Connor TR, Riggs AD, Pfeifer GP. The p53 codon 249 mutational hotspot in hepatocellular carcinoma is not related to selective formation or persistence of aflatoxin B1 adducts. *Oncogene* 1998; 17: 3007-14.
35. Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Thompson CL, Bell DA. XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res* 1999; 59: 2557-61.
36. Jia L, Wang XW, Harris CC. Hepatitis B virus X protein inhibits nucleotide excision repair. *Int J Cancer* 1999; 80: 875-9.
37. Smith-Sorensen B, Kaern J, Holm R, Dorum A, Trope C, Borresen-Dale AL. Therapy effect of either paclitaxel or cyclophosphamide combination treatment in patients with epithelial ovarian cancer and relation to TP53 gene status. *Br J Cancer* 1998; 78:375-81.
38. Geisler S, Borresen-Dale AL, Johnsen H, Aas T, Geisler J, Akslen LA, *et al.* TP53 gene mutations predict the response to neoadjuvant treatment with 5-fluorouracil and mitomycin in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5582-8.
39. Berns EM, Foekens JA, Vossen R, Look MP, Devilee P, Henzen-Logmans SC, *et al.* Complete sequencing of TP53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 2155-62.
40. Borresen-Dale AL, Lothe RA, Meling GI, Hainaut P, Rognum TO, Skovlund E. TP53 and long-term prognosis in colorectal cancer: mutations in the L3 zinc-binding domain predict poor survival. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 203-10.
41. Tortola S, Marcuello E, Gonzalez I, Reyes G, Arribas R, Aiza G, *et al.* p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1375-81.
42. Casson AG, Evans SC, Gillis A, Porter GA, Veuglers P, Darnton SJ, *et al.* Clinical implications of p53 tumor suppressor gene mutation and protein expression in esophageal adenocarcinomas: results of a ten-year prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 1121-31.
43. Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *CR Acad Sci Paris* 1948; 142: 241-3.
44. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18: 65-73.
45. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; 46: 318-22.
46. Szymanska K, Lesi OA, Kirk GD, Sam O, Taniere P, Scoazec JY, *et al.* Ser-249TP53 mutation in tumour and plasma DNA of hepatocellular carcinoma patients from a high incidence area in the Gambia, West Africa. *Int J Cancer* 2004; 110: 374-9.
47. Jackson PE, Kuang SY, Wang JB, Strickland PT, Munoz A, Kensler TW, *et al.* Prospective detection of codon 249 mutations in plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1657-63.