



HAL
open science

Caractérisation moléculaire des carcinomes hépatocellulaires liés au virus de l'hépatite B

Qian Cao

► **To cite this version:**

Qian Cao. Caractérisation moléculaire des carcinomes hépatocellulaires liés au virus de l'hépatite B. Hématologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05S010 . tel-01126915

HAL Id: tel-01126915

<https://theses.hal.science/tel-01126915>

Submitted on 6 Mar 2015

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-DESCARTES (Paris 5)

École doctorale : Biologie et Biotechnologie

Institut Universitaire d'Hématologie

THÈSE

pour obtenir le diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Spécialité : Hématologie et Oncologie

présentée par

Qian CAO

**CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES CARCINOMES
HÉPATOCELLULAIRES LIÉS AU VIRUS DE L'HÉPATITE B**

Thèse dirigée par le Pr. Jessica ZUCMAN-ROSSI

Soutenue le 2 octobre 2014

JURY

Pr. Pierre LAURENT-PUIG	Président
Pr. Gilbert FAURE	Rapporteur
Pr. Jean-Claude TRINCHET	Rapporteur
Dr. Pierre NAHON	Examineur
Pr. Jessica ZUCMAN-ROSSI	Directrice de thèse

à ma famille

et mes amis

qui sont toujours à mes côtés

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements au Professeur Pierre Laurent-Puig qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse, et aux Professeur Jean-Claude Trinchet et Professeur Gilbert Faure pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de le rapporter. J'adresse également mes très vifs remerciements au Docteur Pierre Nahon pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Jessica pour avoir dirigé cette thèse, et m'avoir permis de la réaliser dans un des meilleurs laboratoires qui soit. C'est elle qui m'a fait apprendre à réfléchir, à persévérer, à progresser scientifiquement et aussi à me remettre en question. Étudier dans son laboratoire a été une grande expérience pour moi, et j'espère avoir été digne de la confiance qu'elle m'a accordée. Je suis aussi très honorée de l'avoir eu comme directrice de ma thèse. J'exprime également toute ma reconnaissance à Michel, pour ses merveilleux conseils et ses encouragements.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma chère collègue, Giuliana Amaddeo. Elle a été une grande source d'inspiration et un vrai modèle pour moi. Tout au long des années de mes études doctorales, nous avons travaillé côte à côte, et elle m'a pris comment mettre en place, examiner et présenter un projet de recherche.

Je souhaite aussi faire part de ma profonde gratitude aux Professeur Yunfeng Zhou, directeur général de l'hôpital Zhongnan de Wuhan ; Professeur Yan Zhao et Professeur Ziqiang Li, vice-directeurs de l'hôpital Zhongnan de Wuhan ; Professeur Jean-françois Stoltz et Professeur Jacques Hubert de l'Université Henri-Poincaré Nancy 1. Grâce à eux, j'ai eu de la chance d'apprendre le français et faire des études en France. J'ai beaucoup apprécié le charme des différentes cultures, qui jouera un véritable rôle dans ma carrière.

Je tiens à remercier tous les membres de mon laboratoire, en particulier, Sandra Rebouissou, Gabrielle Couchy, Clément Meiller, Jean-Charles Nault, Sandrine Imbeaud, Abdelhadi Tout, Laura Pelletier, Yannick Ladeiro et les collègues à l'hôpital Jean Verdier, Erwan Guyot et Angela Sutton, pour m'avoir donné leurs précieux commentaires et des véritables aides, à Karine Poussin, qui a très gentiment lu et corrigé mon manuscrit avec attention, à Julien Calderaro, Emilie Gelabale, Marie-Claude Jaurand, Didier Jean, Annie Renier, Anais Boulai, Andrea Franconi, Kornelius Schulze, Shalini Datta, Johnny Jean-Baptiste, Frederic Soysouvanh, et Camilla Pilati pour leur soutien et encouragement, et à Many, la plus belle maman du monde, pour sa patience concernant les documents administratifs et les commandes de dernière minute !

Je tiens aussi à remercier tous mes amis de près ou de loin. En particulier Yingying Wang et Hongwei Lu, mes meilleures et formidables copines, en effet : je n'aurais jamais pu mener ma thèse jusqu'à la fin sans leurs soutiens. A ma chère mamie Janine Champale, mes petites copines Morgane et Olivia, leur maman Corinne Tomic, et aussi Lorraine Letranchant, Marie Lecompte, Ségolène Schaff et leurs familles, Hongru Xing, Liwei Wu, la famille Morawski, et aussi la petite Eva et sa famille qui m'a accueilli chez eux avec plein de gentillesse et de générosités !

Ma famille est une partie intégrante de cette thèse. Surtout, je voudrais remercier mes parents Yaozu et Shefeng, ma sœur Qiao et mon beaux-frère Zhengshuang pour leur amour et leur soutien éternel, et aussi mon petit neveu Yixing : ils m'ont apporté des merveilleuses joies et plein de bonheur dans ma vie. Je dédie cette thèse à toute ma famille, qui m'a constamment inspiré et soutenu pour poursuivre ma carrière universitaire.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
ABREVIATIONS.....	6
INDEX DE TABLEAUS ET DE FIGURES	8
INTRODUCTION	10
I. LE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE	11
1. Epidémiologie et facteurs étiologiques	11
2. Caractéristiques anatomo-pathologiques.....	13
2.1 Physio-pathologie	14
2.2 Pathologie tumorale	14
2.3 Classifications anatomo-pathologiques des CHC	15
3. Mécanisme moléculaire de l'hépatocarcinogénèse.....	16
3.1 Mutations d'oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur dans les CHC	17
3.2 Altérations chromosomiques	21
3.3 Modifications épigénétiques.....	22
4. Classification transcriptomique des CHC	23
5. Diagnostic et évolution.....	26
II. LE VIRUS DE L'HEPATITE B.....	33
1. Epidémiologie.....	33
2. Données virologiques	34
2.1 La structure virale	34
2.2 Les génotypes du VHB	36
2.3 Le cycle de réplication du VHB.....	38
3. Histoire naturelle de l'infection par le VHB	39
4. Mécanismes moléculaires de l'hépatocarcinogénèse induite par le VHB.....	40
4.1 Mécanismes indirects.....	41
4.2 Mécanismes directs.....	42
III. POLYMORPHISMES NUCLEOTIDIQUES ET CHC.....	45
1. SNPs, Projets Internationaux HapMap et 1000 Génomes.....	45
2. Etude gènes candidats et CHC	48
3. Etude d'association pangénomique et CHC	49
3.1 Les SNPs associés pour les CHC liés au VHB.....	50
3.2 Les SNPs associés pour les CHC liés au VHC	52
CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE ET OBJECTIFS	55

RESULTATS	56
I. Caractérisation moléculaire des CHC liés au VHB, par rapport au CHC non lié au VHB	57
Article 1	58
<u>Integration of tumor and viral genomic characterizations in HBV related hepatocellular carcinomas.</u>	58
II. Etude par génotypage de 3 cohortes de patients Européens selon deux approches, longitudinales et cas-témoins	59
Article 2	61
<u>Analysis of 4 candidate SNPs and the risk of hepatocellular carcinoma in two French prospective cohorts of 513 cirrhotic patients and 700 resected HCC.</u>	61
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	81
I. LE LIEN ENTRE VHB ET LA TUMORIGENESE HEPATIQUE	82
1. La diversité génotypique de VHB et le CHC.....	82
2. Le spectre des mutations du VHB et le CHC	83
2.1 Les substitutions dans les gènes <i>HBs</i> et <i>HBx</i>	83
2.2 Les mutations inactivatrices d' <i>HBx</i>	84
3. Inactivation de la voie p53 et mauvais pronostic.....	86
4. Expression prédominante et anormale des gènes onco-fœtaux/progéniteurs	87
5. Classification transcriptomique des CHC liés au VHB.....	88
II. LES SNPS ASSOCIES AU RISQUE DE SURVENUE DU CHC DANS LES COHORTES EUROPEENNES	90
1. KIF1B-rs17401966	90
2. STAT4-rs7574865	92
3. MICA-rs2596542.....	93
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	99

ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNccc : covalently closed circular DNA
AFB1 : Aflatoxine B1
AFP : Alpha-Foetoprotéine
AHC : Adénome Hépatocellulaire
AKT : V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog
ALT : Alanine Aminotransférase
ARID1A : AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ARID2 : AT-rich interactive domain-containing protein 2
ARN : Acide Ribonucléique
ARNpg : ARN pré-génomique
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
AURKA : Aurora Kinase A
AXIN 1 : Axis Inhibition Protein 1
BCLC : Barcelona Clinic Liver Cancer
BIRC5 : Baculoviral IAP Repeat Containing 5
CCNB1 : G1/S-specific cyclin-E1
CDKN2A : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A/p16
CGH : Comparative Genomic Hybridation
CHC : Carcinome Hépatocellulaire
CNV : Copy Number Variant
CSC : Cancer Stem Cell
CTL : Cytotoxic T lymphocytes
CTNNB1 : Catenin (Cadherin-Associated Protein) beta 1
CUL 3 : Cullin 3
CYP : Cytochrome P450
DEPDC5: DEP Domain Containing 5
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EglN3: Egl-9 Family Hypoxia-Inducible Factor 3
EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule
FAR 2 : Fatty Acyl CoA Reductase 2
GLUL : Glutamate-Ammonia Ligase
GWAS : Genome-Wide Association Studies
HAL : Histidine Ammonia Lyase
HES : Coloration d'Hématoxyline-Eosine-Safran
HFE : Hereditary Hemochromatosis Protein
HLA : Human Leukocyte Antigen
HN 1 : Hematological And Neurological Expressed 1
HNF1a/HNF1A : Hepatocyte Nuclear factor 1 Alpha
HPC : Hepatic Progenitor Cells
IGF2 : Insulin-like Growth Factor 2
IGF2BP3 : Insulin-Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 3
IL6ST : Interleukine 6 Signal Transducer
IFN : Interferon
IP3R1 : Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor, Type 1
IRAK2 : Interleukin-1 Receptor Associated Kinase-2
IRF2 : Interferon Regulatory Factor 2
JAK : Janus Kinase
KEAP 1 : Kelch-Like ECH-Associated Protein 1

KIF1B: Kinesin Family Member 1B
KRAS : Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
KRT19 : Keratin 19
LOH : Loss Of Heterozygosity
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
MDM2 : Murine Double Minute-2
MICA: MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A
MLL : Myeloid/Lymphoid ou Mixed-Lineage Leukemia
MMP : Métalloprotéases Matricielles
mTOR : Mammalian Target of Rapamicyn
MYC : Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
NASH : Non Alcoholic Steato-Hepatitis
NEU1 : Sialidase 1
NFE2L2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NF-Kbeta : Nuclear Factor-Kappa B
NK : Natural Killer Cells
NKG2D/CD314 : Natural killer group 2, member D
NRCAM : Neuronal Cell Adhesion Molecule
ORF : Open Reading Frame
PCRq : quantitative Polymerase Chain Reaction
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PI3K : Phosphoinositide-3-Kinase
PIK3CA : Phosphoinositide-3-Kinase Catalytic Alpha
PNPLA3 : Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3
PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog
RAN : Member RAS Oncogene Family
RAS : Rat Sarcoma
RAMP 3 : Receptor (G Protein-Coupled) Activity Modifying Protein 3
RB1 : Retinoblastoma 1
RE : Réticulum Endoplasmique
RHBG : Rh family, B glycoprotein
ROS : Reactive Oxygen Species
RPS6KA3 : Ribosomal Protein S6 Kinase, 90kDa, Polypeptide 3
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SPP1 : Osteopontin
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
TAF 9 : RNA Polymerase II TBP-Associated Factor
TBX3 : T-box transcription factor 3
TERT : Telomerase Reverse Transcriptase
TGFb : Transforming Growth Factor beta
TNFa : Facteur De Nécrose Tumorale Alfa
TP53 : Tumor Protein p53
UGT2B7: UDP Glucuronosyltransferase 2 Family, Polypeptide B7
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
WES : Whole Exome Sequencing
WGS : Whole Genome Sequencing
UGT : UDP-Glucuronyltransferase
VHB : Virus de l'Hépatite B
VHC : Virus de l'Hépatite C
VHD : Virus de l'Hépatite Delta
WNT : Wingless-type MMTV Integration site family

INDEX DE TABLEAUX ET DE FIGURES

Tableaux

Tableau 1. Classifications histologiques des CHC

Tableau 2. Résumé des études de séquençage à haut débit de cancer du foie

Tableau 3. Principaux facteurs de risque du CHC et des événements épigénétiques associés

Tableau 4. Description des 5 gènes inclus dans le score pronostique

Tableau 5. Essais cliniques randomisés de phase III complétés dans le CHC avec les médicaments de première et deuxième ligne (2007-2013).

Tableau 6. Les groupes de la population participant au projet HapMap

Tableau 7. Les groupes de la population participant aux différentes phases du projet 1000 génomes

Tableau 8. Les polymorphismes impliqués dans le CHC selon différentes études publiées

Tableau 9. Les polymorphismes impliqués dans les CHC identifiés par les études GWAS

Tableau 10. Les résultats de l'association pour rs17401966 dans cinq populations cas-témoins et 159 trios familiaux

Tableau 11. Les résultats de l'association pour rs 7574865 et rs 9275319 dans sept populations chinoises

Tableau 12. Les résultats d'association du rs2596542 dans le stade GWAS, le stade de réplication et de l'analyse combinée

Tableau 13. Le risque allèle T du rs 2596542 est impliqué dans le processus de transformation maligne de patients ayant une hépatite C chronique par rapport aux patients japonais ayant un CHC

Tableau 14. Les résultats d'association du rs 1012068 dans le stade GWAS, le stade de réplication et de l'analyse combinée

Tableau 15. Les 4 SNPs impliqués dans les CHC identifiés par les études GWAS

Tableau 16. Méta-analyse de l'allèle G du SNP rs17401966-*KIF1B* ('Events') et susceptibilité au CHC dans les 13 cohortes publiées

Tableau 17. Association de rs7574865 du *STAT4* avec la progression de l'infection par le VHB

Tableau 18. Association entre rs2596542 et CHC

Figures

Figure 1. Les mortalités régionales des CHC (ajusté selon l'âge).

Figure 2. (a). Carcinome hépatocellulaire bien différencié. (b). Cirrhose post hépatite chronique

Figure 3. Hépatocarcinogenèse : un processus multi-étapes

Figure 4. Les voies de signalisation altérées dans l'hépatocarcinogénèse

Figure 5. Voies principales de l'hépatocarcinogénèse définies par des altérations génétiques et des paramètres cliniques

Figure 6. Classification transcriptomique des CHC proposée par l'équipe de Zucman-Rossi

Figure 7. Classification transcriptomique des CHC proposée par l'équipe d'Hoshida

Figure 8. L'algorithme des procédures diagnostiques des CHC

Figure 9. La classification BCLC

Figure 10. Score pronostique composite

Figure 11. Les courbes de survie des patients randomisés au sorafénib ou un placebo (Essai SHARP)

Figure 12. Prévalence de l'infection par le VHB dans le monde, sur la base du taux de prévalence estimée de l'antigène de surface du VHB

Figure 13. Le virus de l'hépatite B

Figure 14. Le génome du VHB et les quatre gènes codants

Figure 15. Répartition géographique des génotypes du VHB

Figure 16. Le cycle de la réplication du VHB

Figure 17. L'évolution clinique et sérologique de l'infection chronique par le VHB

Figure 18. L'hépatocarcinogénèse induite par le VHB

Figure 19. Mécanismes de clairance virale induite par les CTL.

Figure 20. La fréquence des sites d'intégration de différents loci du génome VHB

Figure 21. Courbe de Kaplan-Meier chez les patients ayant un CHC lié au VHB

Figure 22. L'hypothèse d'expression de MICA chez les personnes ayant un CHC induite par le VHC

Figure 23. L'hypothèse d'expression de MICA chez les personnes ayant un CHC induite par le VHB

INTRODUCTION

I. LE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

Le cancer est en passe de devenir une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les décennies à venir dans toutes les régions du monde. Le cancer du foie représente le cinquième cancer et deuxième cause de mortalité liée au cancer d'après GLOBOCAN 2012 (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).

1. Epidémiologie et facteurs étiologiques

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente entre 85% et 90% des cancers primitifs du foie. Il présente plusieurs caractéristiques épidémiologiques intéressantes : des différences de distribution ont été remarquées entre les régions géographiques, les groupes ethniques, mais aussi en fonction du sexe et de la présence de plusieurs facteurs de risque liés à l'environnement (El-Serag *et al.*, 2007).

1.1 La distribution

Le carcinome hépatocellulaire n'est pas uniformément réparti dans le monde entier. La plupart des CHC (>80%) surviennent en Afrique sous-saharienne ou en Asie de l'Est (incidence supérieure à 20 cas pour 100 000 habitants par an). La Chine représente à elle seule plus de 50% des cas dans le monde (taux d'incidence normalisé selon l'âge: les hommes, 35.2/100 000; femmes, 13.3/100 000). Les régions à risque intermédiaire sont l'Italie, l'Espagne, la Grèce (incidence de 10 à 20 cas pour 100 000 habitants par an) et les régions à faible risque sont l'Europe du Nord, l'Amérique du Nord, l'Amérique du sud et l'Océanie (une incidence inférieure à 5 cas pour 100 000 habitants par an) (figure 1).

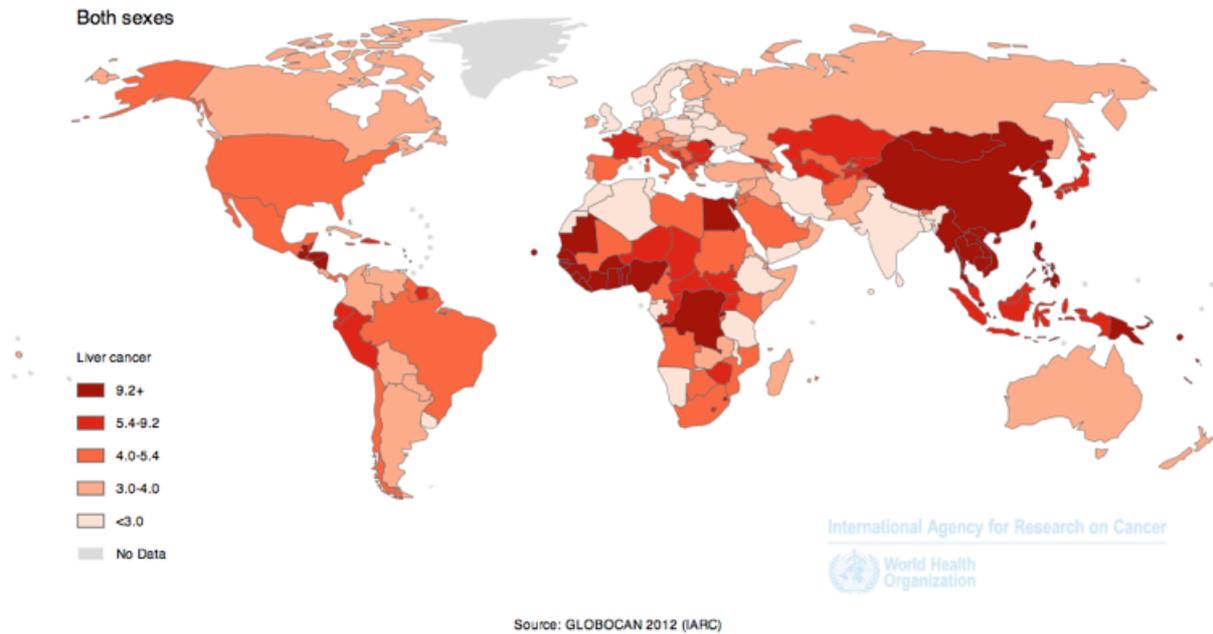


Figure 1. Les mortalités régionales des CHC (ajusté selon l'âge). Les fréquences sont indiquées pour 100 000 personnes. (GLOBOCAN 2012).

1.2 Race/ Ethnicité

L'incidence des CHC varie aussi considérablement entre les différentes populations vivant dans la même région. Par exemple, en Asie, les taux d'incidence de CHC peuvent aller de 7.8/100 000 chez les hommes Indiens et 21.2/100 000 chez les hommes chinois (1993-1997). Et aussi pour les femmes : 5.1/100 000 chez les Chinoises et 1.8/100 000 chez les Indiennes (El-Serag *et al.*, 2007). Un autre exemple, aux États-Unis, les taux d'incidence de CHC sont deux fois plus élevés chez les Asiatiques (sauf les Japonais) par rapport aux Africo-Américains, en sachant que ces derniers ont déjà un taux d'incidence des CHC plus élevés par rapport aux Européen-Américains (Bosch *et al.*, 2004). Mais il faut remarquer que ces variations ethniques peuvent aussi être causées par les différents facteurs de risque dans les différentes populations.

1.3. Le sexe

Le cancer du foie est le cinquième cancer le plus fréquent chez les hommes (554 000 cas, 7.5% du total) et le neuvième chez les femmes (228 000 cas, 3.4% du total) (GLOBOCAN 2012), avec des ratios hommes: femmes entre 2 :1 et 4 :1. Les raisons de taux plus élevés de cancer du foie chez les hommes peuvent s'expliquer par des différences d'exposition aux facteurs de risque selon le sexe. Mais des facteurs endogènes pourraient

aussi contribuer à cette disparité tels que les facteurs hormonaux (androgènes et œstrogènes). Ces résultats proviennent des études épidémiologiques qui suggèrent qu'à long terme l'utilisation de contraceptifs oraux et de stéroïdes anabolisants androgènes peuvent induire des tumeurs hépatocellulaires bénignes et malignes (De Maria *et al.*, 2002). L'expression de récepteurs d'hormones sexuelles, y compris des récepteurs d'œstrogène, peuvent être détectés dans des proportions variables (entre 14% et 52%) dans les CHC (Ohnishi *et al.*, 1986). Malgré tout, jusqu'à maintenant, aucun des essais cliniques réalisés à grande échelle ne montre un avantage de survie chez les patients par l'administration du tamoxifène, un agent anti-œstrogène (Nowak *et al.*, 2005), ou par une thérapie anti-androgène (Grimaldi *et al.*, 1998). En conclusion, jusqu'à présent, il n'existe pas de preuves solides pour envisager le CHC comme une tumeur hormono-sensible (Di Maio *et al.*, 2008).

1.4 Les facteurs de risque

Les causes de carcinome hépatocellulaire comprennent l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) en particulier en Asie du sud et en Afrique (Chen *et al.*, 2011); une exposition à l'aflatoxine B1 dans certaines régions subtropical ; le virus de l'hépatite C (VHC) en Asie de l'est ; l'hépatopathie alcoolique en France, et la stéato-hépatite non alcoolique (NASH) (Borie *et al.*, 2009). Les causes moins communes sont l'hémochromatose héréditaire, le déficit en alpha1-antitrypsine, l'hépatite auto-immune, la cirrhose biliaire primitive, et la maladie de Wilson (El-Serag H. B., 2011).

2. Caractéristiques anatomo-pathologiques

Les aspects macroscopiques des CHC sont extrêmement variables avec notamment une taille pouvant aller de quelques millimètres à plus de 20 cm de diamètre. C'est une tumeur épithéliale maligne hépatocytaire (Roncalli, 2004).

2.1 Physio-pathologie

Chez un patient atteint d'une maladie chronique du foie, un tissu cicatriciel remplace les cellules hépatiques endommagées : la fibrose hépatique. En cas de cirrhose, le tissu cicatriciel entoure des amas de cellules hépatiques qui régénèrent; ces amas constituent des nodules de régénération. Selon l'ampleur des dommages subis par le foie, la fibrose peut-être plus ou moins importante, et l'on distingue plusieurs stades, de la fibrose focale jusqu'à la cirrhose (Fattovich *et al.*, 2004). La cirrhose est présente chez 80 à 90% des patients avec un carcinome hépatocellulaire, et elle est considérée comme un état précancéreux (figure 2b). La cirrhose est définie par une fibrose mutilante, diffuse avec destruction de l'architecture du foie et formation de nodules parenchymateux (nodules de régénération) (Schuppan *et al.*, 2008).

2.2 Pathologie tumorale

Les cellules tumorales sont plus ou moins atypiques. Elles peuvent contenir des corps de Mallory, des globules hyalins, du glycogène, des graisses (cellules tumorales avec stéatose). Elles peuvent également produire de la bile. L'architecture de la prolifération tumorale, dans les tumeurs bien différenciées, reproduit plus ou moins celle du parenchyme hépatique avec des cellules organisées en travées par des sinusoides. Les travées de cellules tumorales sont plus épaisses que dans du foie normal (> ou = à 3 cellules) et il existe une diminution du réseau réticulinique, mis en évidence par la coloration de Gordon Sweet ou de rouge Sirius (figure 2a) (Trinchet *et al.*, 2012). L'architecture peut également être pseudoglandulaire (formation d'acini par dilatation du canalicule biliaire) ou compacte avec des massifs de cellules tumorales sans travée, ni sinusoides. On peut également observer des remaniements à type de péliose (dilatation des sinusoides), d'hémorragie ou de nécrose.

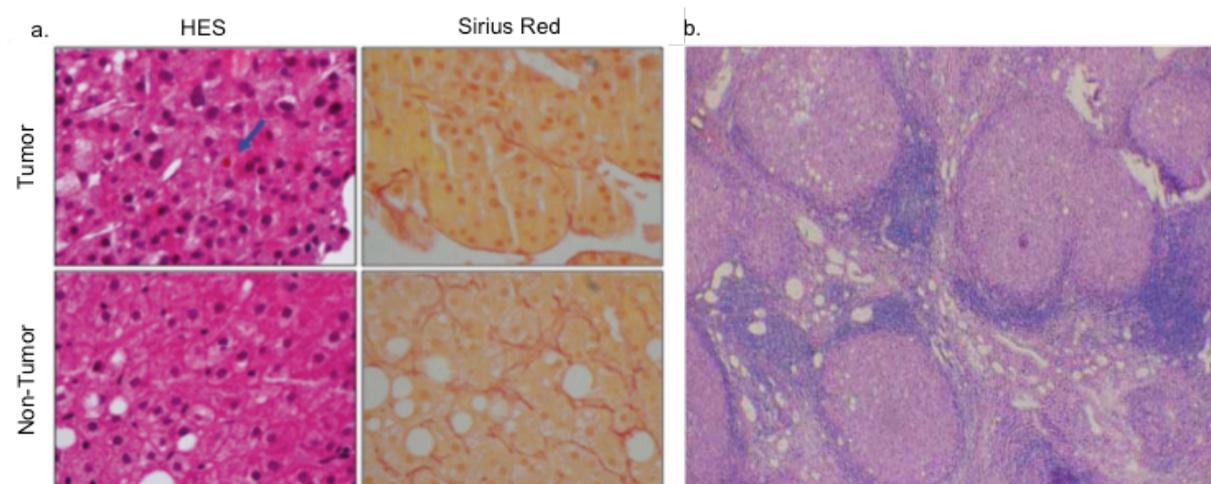


Figure 2. (a). Carcinome hépatocellulaire bien différencié. Le diagnostic repose sur des critères morphologiques, architecturaux et cytologiques. Par rapport aux hépatocytes non tumoraux (en bas), les rapports nucléocytoplasmiques sont augmentés et la densité cellulaire est élevée. À droite, sur la coloration par le rouge Sirius, le réseau sinusoïdal est nettement diminué (en haut) par rapport à celui du foie non tumoral (en bas). La flèche indique la production de bile par les cellules tumorales. (HES : coloration hématoxyline/éosine/safran). (b). Cirrhose post hépatite chronique. (Trinchet *et al.*, 2012).

2.3 Classifications anatomo-pathologiques des CHC

Plus le CHC ressemble à du foie normal, plus il est considéré comme bien différencié. Plusieurs systèmes de classification anatomopathologique ont été proposés. Actuellement, l'Organisation Mondiale de la Santé propose de classer les CHC en tumeurs bien, moyennement et peu différenciées. Le grade d'Edmondson-Steiner évalue également le degré de différenciation des tumeurs : Le grade I correspond à un carcinome très bien différencié, difficile à distinguer du tissu non tumoral, et le grade IV correspond à un carcinome peu différencié. L'intérêt de cette classification est discuté car dans une même tumeur, l'aspect et le grade peuvent être différents d'une zone à l'autre (tableau 1) (Edmondson *et al.*, 1954).

Auteurs	Principales catégories	Caractéristiques
World Health Organization 2000	<i>Bien différencié</i>	Architecture trabéculaire ou pseudo-acineuse, atypies cytonucléaires modérées
	<i>Moyennement différencié</i>	Architecture trabéculaire, atypies cytonucléaires marquées
	<i>Peu différencié</i>	Architecture compacte, atypies cytonucléaires plus marquées
Edmonson et Steiner, 1954	<i>Grade I</i>	Hépatocytes très bien différenciés semblables à des cellules normales
	<i>Grade II</i>	Hépatocytes bien différenciés possédant des changements faibles mais bien définis
	<i>Grade III</i>	Hépatocytes pléiomorphes à noyaux proéminents, quelques cellules géantes plurinucléés
	<i>Grade IV</i>	Hépatocytes anaplasiques, cytoplasme réduit et noyaux proéminents

Tableau 1. Classifications histologiques des CHC.

3. Mécanisme moléculaire de l'hépatocarcinogénèse

L'atteinte la plus caractéristique dans l'hépatocarcinogénèse est une lésion hépatique chronique sous-jacente, ce qui conduit à des cycles répétés de mort des hépatocytes, inflammation et prolifération cellulaire compensatrice (la régénération des hépatocytes), qui fournit un environnement mutagène conduisant au développement du CHC (Nakagawa *et al.*, 2012). La carcinogénèse hépatique est un processus multi-étapes, les hépatites chroniques et la cirrhose étant les étapes prénéoplasiques (Sakamoto *et al.*, 1991). En effet, dans la plupart des cas, durant surtout la phase de développement de la cirrhose, des phénomènes d'inflammation et de sénescence répliquative vont entraîner une accumulation d'altérations génétiques qui vont favoriser la sélection d'hépatocytes transformés (figure 3). Ces altérations génétiques peuvent être divisées en deux groupes (Laurent-Puig *et al.*, 2006). Le premier groupe comprend l'ensemble des modifications génétiques spécifiques liées aux différents facteurs de risque de la tumeur hépatocellulaire ; le deuxième groupe est constitué de l'ensemble des altérations génétiques non spécifiquement liées aux étiologies, y compris les gains et les pertes récurrentes de chromosomes, les modifications épigénétiques, les mutations d'oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur dans les CHC.

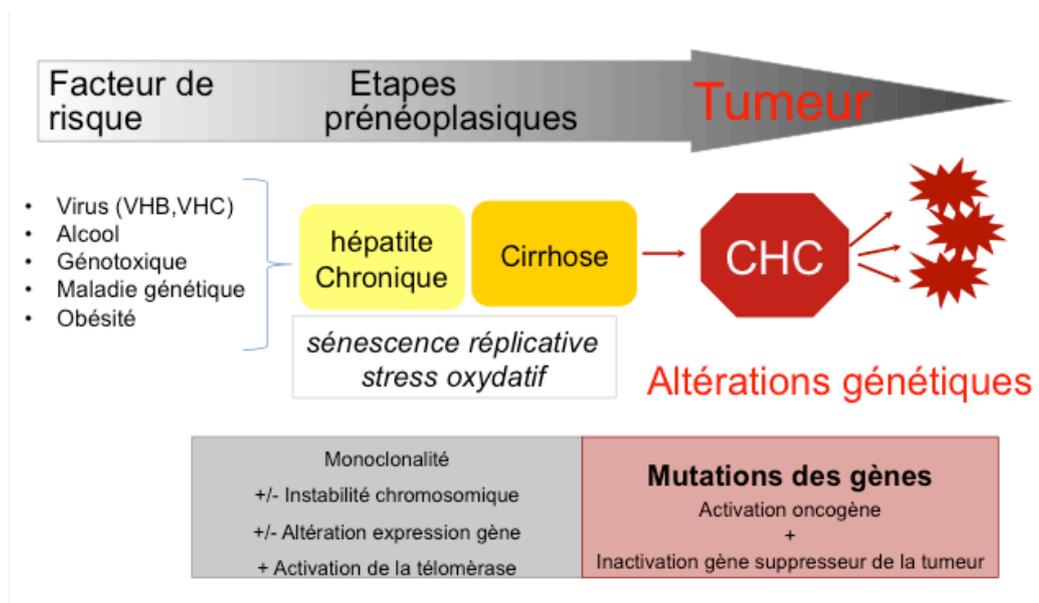


Figure 3. Hépatocarcinogénèse : un processus multi-étapes.

3.1 Mutations d'oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur dans les CHC

Pendant ces 20 dernières années, différentes stratégies ont été utilisées pour identifier des mutations géniques somatiques dans les CHC, mais la plus fréquente était le séquençage de gènes candidats sur de larges séries de tumeurs.

Récemment, le développement des technologies innovantes dans le domaine du séquençage de nouvelle génération (NGS), a permis le séquençage de l'ensemble des exons ou du génome entiers. Cette approche permet d'identifier rapidement et de manière exhaustive les événements génétiques clés, y compris des cibles thérapeutiques moléculaires potentiellement impliqués dans le CHC (figure 4) (Nault *et al.*, 2014). Plusieurs analyses de NGS sont résumées dans le tableau 2.

Plate-forme d'analyse	No. échantillons	Etiologie	Attention particulière	Ref.
Exome (~18,000 genes)	10	HBV + HCV+NBNC		Li et al.
WGS + Exome	1	HCV		Totoki et al.
WGS	1	HBV	Metastase multiples	Tao et al.
WGS + RNA-Seq	4	HBV	Integration HBV	Jiang et al.
Exome + SNP array	24	Alcool		Guichard et al.
WGS	27	HBV + HCV + NBNC	Tumeurs multicentriques	Fujimoto et al.
WGS	88	HBV	Integration HBV	Sung et al.
Exome	10	HBV	Thrombose de la veine porte	Huang et al.
WGS	88	HBV+HCV		Kan et al.
Exome	87	HBV+HCV+Alcool		Cleary et al.

Tableau 2. Résumé des études de séquençage à haut débit de cancer du foie. (Li S. *et al.*, 2013).

a). la voie de la maintenance de télomère

Nous avons décrit récemment des mutations somatiques dans le promoteur de *TERT* (telomerase reverse transcriptase gène) (Nault, Mallet, *et al.*, 2013). Toutefois, ces mutations représentent l'altération génétique la plus fréquente dans le CHC (59%) et la première altération génétique récurrente dans les lésions cirrhotiques prénéoplasiques (25%). Une forte association a été retrouvée entre les mutations du promoteur de *TERT* et les mutations activatrices de *CTNNB1*, ce qui suggère que les mutations du promoteur de *TERT* et l'activation de la voie Wnt/ β -caténine pourraient coopérer pour promouvoir la transformation maligne.

b). la voie WNT/ β -caténine

Toutes ces études NGS ont confirmé que l'activation de la voie WNT/ β -caténine était la principale voie oncogénique impliquée dans l'hépatocarcinogénèse. Elle joue un rôle clef dans la physiologie hépatique, en termes de différenciation, de renouvellement des cellules souches, de transition épithélio-mésenchymateuse, de zonation, de prolifération, d'adhésion cellulaire et de régénération du foie (Pez *et al.*, 2013). Des mutations somatiques activatrices du gène *CTNNB1* codant la β -caténine ont été identifiées dans 10 à 32% des CHC, selon les étiologies (de La Coste *et al.*, 1998; Laurent-Puig *et al.*, 2006). Ces mutations induisent l'accumulation de la β -caténine dans le noyau des hépatocytes. Les mutations somatiques classiques se trouvent dans l'exon 3 du gène *CTNNB1* (Li *et al.*, 2011). Les mutations dans les exons 7 et 8 du gène *CTNNB1* ont été décrites récemment dans les CHC et les adénomes hépatocellulaires (Pilati *et al.*, 2014). Les mutations inactivatrices de l'*AXIN1* présentes dans 8-15% des CHC, peuvent aussi activer la voie WNT/ β -caténine, et sont mutuellement exclusives des mutations activatrices de *CTNNB1* (Imbeaud *et al.*, 2010; Laurent-Puig *et al.*, 2001; Nault *et al.*, 2011).

c). la voie de régulateurs du cycle cellulaire/p53

Les gènes régulateurs du cycle cellulaire sont fréquemment altérés. Outre les altérations bien connues de *TP53* et *CDKN2A* (codant deux suppresseurs de tumeur p14/ARF et p16/INK4a) (Nault *et al.*, 2011), les études de NGS ont identifié de nouvelles mutations récurrentes telles que les inactivations de *IRF2* (5%) (Guichard *et al.*, 2012), et de *ATM* (5%) (Fujimoto *et al.*, 2012). *IRF2* est un partenaire d'interaction de MDM2 (inhibiteur de p53), muté de manière exclusive à la mutation de *TP53*, et ses mutations conduisent à une inactivation fonctionnelle de *TP53*. *ATM* est une protéine impliquée dans la régulation du

cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN endommagé. Une fois activé, il entraîne un arrêt du cycle cellulaire et conduit soit à la réparation de l'ADN, soit à l'apoptose cellulaire.

d). la voie du remodelage chromatine

De plus, des analyses de séquençage ont révélé des modifications fréquentes dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. En particulier, les mutations inactivations somatiques récurrente d'*ARID1A* et d'*ARID2* ont été identifiées dans environ 10% des CHC (Fujimoto *et al.*, 2012; Guichard *et al.*, 2012). Les mutations récurrentes dans les gènes *MLL* (Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia, 2%), *MLL2* (4,5%), *MLL3* (1%) et *MLL4* (7%) ont également été identifiés (Cleary, Jeck, Zhao, Chen, *et al.*, 2013). Ces gènes appartient dans la famille « histone methylation writers » et codent la méthyltransférase H3K4 (histone H3 lysine 4) qui est impliquée dans la méthylation, l'acétylation et le remodelage des nucléosomes (figure 4). De manière intéressante, des mutations d'insertion de séquence virale d'hépatite B dans les gènes *MLL2* (Brechot *et al.*, 2010) et *MLL4* ont été décrit (Sung *et al.*, 2012). Avec les mutations *ARID1A* et *ARID2*, ces données renforcent le lien entre les défauts du génome tumoral et les modifications épigénétiques dans la tumorigenèse hépatique.

e). la voie PI3K/Akt/mTOR et Ras/Raf/MAP kinase

Des mutations activatrices de *PIK3CA*, *FGF19* et des mutations inactivatrices de *RPS6KA3* sont également des altérations génétiques récurrentes dans le CHC, conduisant à une activation constitutive de la voie PI3K/Akt/mTOR et Ras/Raf/MAP kinase (Fujimoto *et al.*, 2012; Guichard *et al.*, 2012).

f). la voie du stress oxydatif

Une autre voie de signalisation identifiée par NGS était l'activation de la voie NRF2/KEAP1 qui intervient sous le stress oxydatifs (Guichard *et al.*, 2012). NRF2 (codée par *NFE2L2*) est un facteur de transcription qui est dégradé par le protéasome dans un complexe avec *KEAP1* et *CUL3*. Lorsqu'il est activé, NRF2 se dissocie de KEAP1, migre vers le noyau et active la transcription de gènes antioxydants (figure 4) ; ces derniers donnent une survie avantageuse aux cellules tumorales.

g). la voie JAK-STAT

Enfin, l'activation de la voie JAK-STAT avec les mutations activatrices de *JAK1* (9,1%), ont également été décrites dans une série de CHC lié au VHB (Kan *et al.*, 2013) mais ces résultats ne sont pas retrouvés dans des tumeurs occidentales. Enfin, *IL6ST* est rarement muté dans les CHC en France (2%) (Guichard *et al.*, 2012), il est possible

d'envisager un traitement de ces tumeurs présentant une activation de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib.

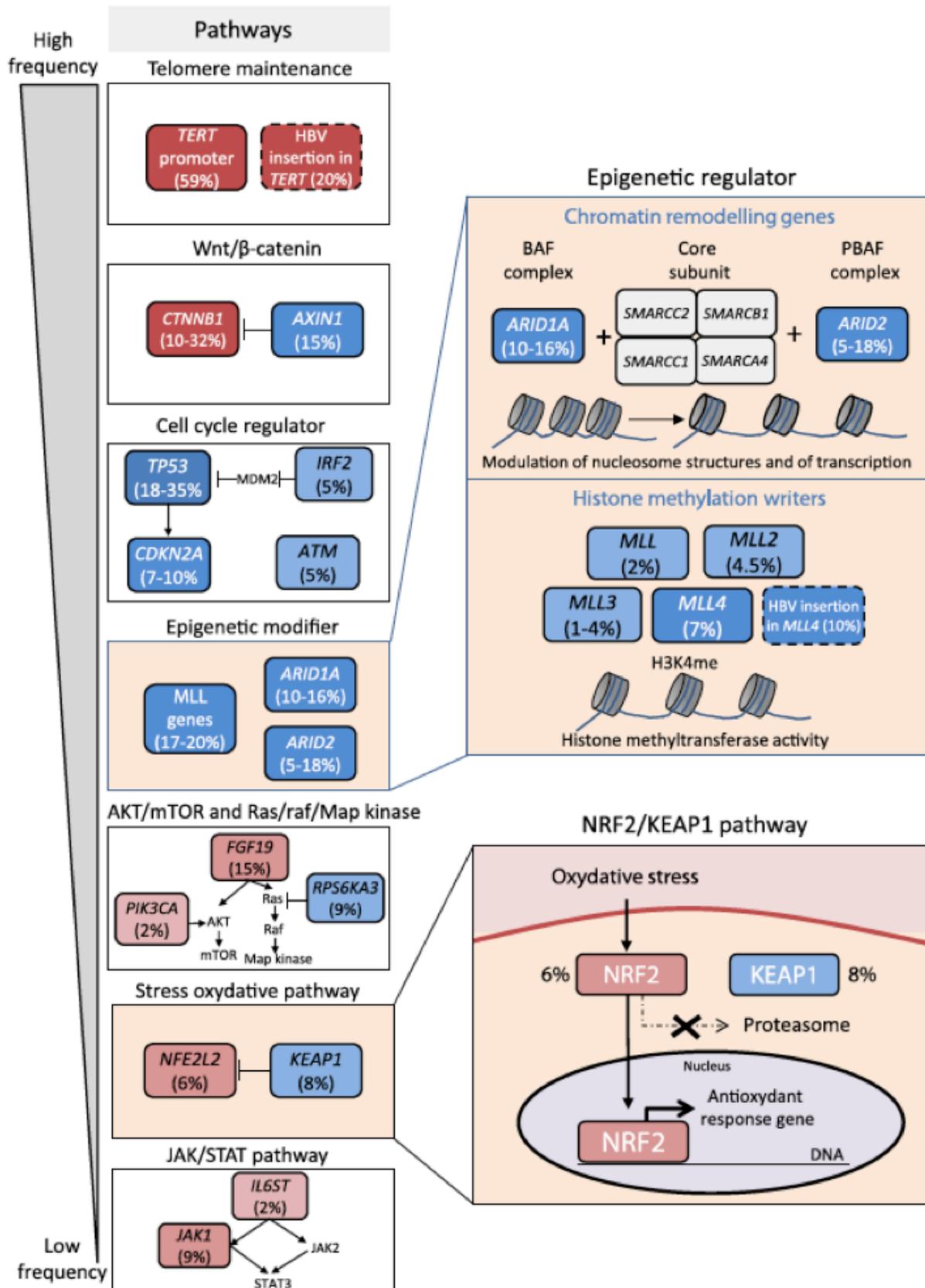


Figure 4. Les voies de signalisation altérées dans l'hépatocarcinogénèse. Les voies mutées récurrentes dans le CHC sont présentées dans le panneau à droite. Les oncogènes sont indiqués en rouge et les gènes suppresseurs de tumeur sont en bleu, avec les pourcentages des mutations. (Nault *et al.*, 2014).

3.2 Altérations chromosomiques

Dans les CHC, les hépatocytes tumoraux accumulent un grand nombre de réarrangements chromosomiques conduisant à la formation de caryotypes très complexes. L'ADN hyperploïde a été mis en évidence par la cytométrie en flux dans des cellules tumorales, ce qui suggère un gain global de matériel génétique dans la moitié des cas de CHC (Chiu *et al.*, 1992). L'hyperploïdie est également retrouvée dans 43% des lésions dysplasiques observées dans les maladies cirrhotiques (Thomas *et al.*, 1992). Ces fréquences importantes suggèrent que les pertes de chromosomes suivies par l'endomitose sont des étapes précoces dans l'hépatocarcinogénèse pour le sous-groupe de tumeurs présentant une instabilité chromosomique (Laurent-Puig *et al.*, 2006).

Au cours des 20 dernières années, de nombreux allélotypes centrés sur certains bras chromosomiques (Nagai *et al.*, 1997) ou analysant l'ensemble du génome à l'aide de marqueurs microsatellites ont été publiés (Boige *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 1997; Sheu *et al.*, 1999). Un consensus clair se dégage pour identifier les bras chromosomiques les plus fréquemment perdus, il s'agit, des chromosomes 17p, 8p, 16q, 16p, 4q, 9p, 13q, 1p, et 6q. Ces résultats sont en accord avec des expériences de CGH qui confirment la perte fréquente de ces segments de chromosomes et ont identifié des gains fréquents des chromosomes 1q, 7q, 8q et 17q (Balsara *et al.*, 2001; Guan *et al.*, 2000; Marchio *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2000). La mise en évidence de pertes alléliques récurrentes suggère l'existence de gènes suppresseurs de tumeurs localisés sur ces bras chromosomiques. En effet, la perte de l'une des deux copies de ces gènes constitue l'un des deux événements génétiques impliqués dans leur inactivation. L'identification des plus petites régions communes de délétion constitue un premier pas essentiel vers l'identification des gènes suppresseurs de tumeur. Jusqu'en 2012, les gènes suppresseurs de tumeur n'avaient pas encore été identifiés sur les chromosomes 1p, 4q, 8p et 16q. A l'opposé, pour les régions chromosomiques 6q, 9p, 13q, 16p et 17p, l'inactivation des gènes *IGF2R*, *P16*, *RB1*, *AXIN1* et *TP53* a été proposée comme cible des pertes chromosomiques (Bressac *et al.*, 1990; De Souza *et al.*, 1995; Hui *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1991; Satoh *et al.*, 2000).

En général, les CHC peuvent être divisés en deux groupes en fonction de l'état de la stabilité chromosomique. Dans le premier groupe qui a une stabilité chromosomique, la

mutation β -caténine avec une perte du chromosome 8p est souvent la seule altération génétique, qui est associée avec une tumeur de grande taille et un statut VHB négatif. Dans le second groupe, l'instabilité chromosomique est souvent associée avec des mutations dans les gènes *TP53* et *AXIN1*. Toutes ces modifications dans le second groupe, à l'exception des pertes sur 6q et 9p, sont associées avec l'infection par le VHB et avec une mauvaise différenciation des tumeurs. De plus, les pertes des chromosomes 9p et 6q sont retrouvées dans des tumeurs de mauvais pronostic (Laurent-Puig *et al.*, 2001) (figure 5).

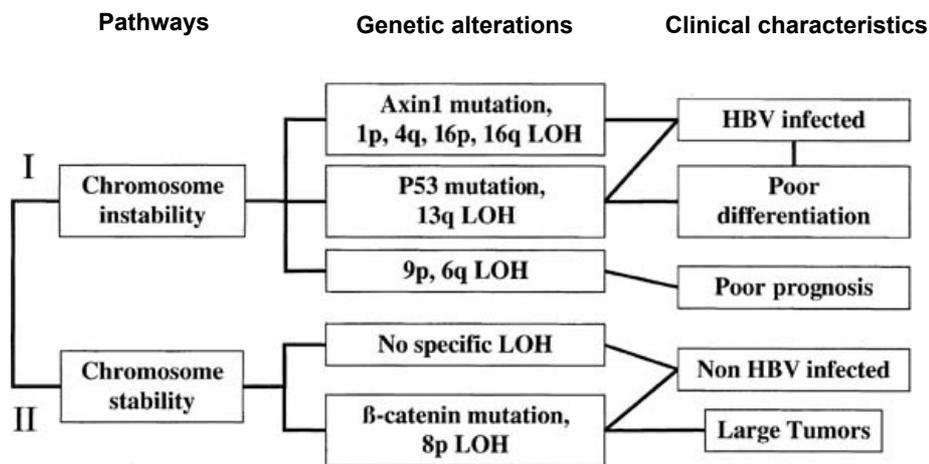


Figure 5. Voies principales de l'hépatocarcinogénèse définies par des altérations génétiques et des paramètres cliniques. Les traits entre les carrés indiquent une corrélation significative. (Laurent-Puig *et al.*, 2001).

3.3 Modifications épigénétiques

La chromatine est la forme sous laquelle l'information génétique de l'ADN est organisée dans une cellule. Cette organisation du génome influe considérablement les capacités d'activer ou d'éteindre des gènes. L'épigénétique, par définition, représente tous les changements héréditaires entre cellules influençant l'expression des gènes indépendamment des changements dans la séquence d'ADN elle-même. Ces mécanismes comprennent la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, le positionnement nucléosomique et les ARN non-codants, surtout l'expression des microARNs, essentiels pour le maintien d'expression des gènes, le développement normal et la survenue d'états pathologiques comme le cancer chez les mammifères (Sharma *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2006). De nombreuses études récentes ont exploré le rôle des événements épigénétiques induits par des facteurs environnementaux dans le CHC et la cirrhose. Ces études ont

permis d'identifier un grand nombre de gènes et de voies ciblées par la dérégulation épigénétique au cours du développement et de la progression du CHC. Les résultats sont conformes à l'idée que la dérégulation épigénétique associées à des facteurs de risque spécifiques dans les lésions précancéreuses précède et favorise le développement du CHC (tableau 3) (Herceg *et al.*, 2011).

HCC risk factor	Reported epigenetic event	Contribution in HCC development
HBV infection	DNA methylation	Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways due to silencing of important tumor suppressor genes (p16, p21, E-cadherin and GSTP1)
	Histone modifications	Altered expression of critical cellular genes (hTERT, IGFBP-3 interleukin-4 receptor and metallothionein-1F and CDH6)
	RNA interference	miR-152, miR-602 and miR-143 MIR regulate important cellular genes including DNMT1, RASSF1A and FNDC3B affecting pathways related to cell death, DNA damage, recombination, and signal transduction.
HCV infection	DNA methylation	Hypermethylation of Gadd45beta expression (aberrant cell cycle arrest and diminished DNA excision repair). Hypomethylation of STAT1 (interfering with interferon-alpha signaling).
	Histone modifications	Increased histone deacetylation activity regulates iron metabolism through affecting hepcidin expression. Overexpression of Protein Phosphatase 2A (PP2Ac), affecting the H4 acetylation and methylation and histone H2AX phosphorylation.
	RNA interference	miR-122 regulates HCV replication. miR-196 regulates HMOX1/Bach1 and HCV expression.
Alcoholism	DNA methylation	Hypermethylation of MGMT affects the DNA repair efficiency.
	Histone modifications	CYP2E1 down regulation results in decreased mitochondrial oxidative stress and apoptotic potential. Adh, GST-yc2 are upregulated, while Lsdh, cytP4502c11 are downregulated
Aflatoxin exposure	DNA methylation	p16 silencing and hypomethylation mediated overexpression of SNGC
	RNA interference	miR-122s expression and function is affected (skewed IGF-1R regulatory circuitry)

Tableau 3. Principaux facteurs de risque du CHC et des événements épigénétiques associés. (Herceg *et al.*, 2011).

4. Classification transcriptomique des CHC

Les individus présentant un CHC ont une évolution clinique et un pronostic très variable. Ces variabilités individuelles reflètent une hétérogénéité moléculaire, et soutiennent l'idée que le CHC se compose de plusieurs sous-groupes biologiquement distincts. Les technologies récentes utilisant des outils génomiques ont mis en évidence la diversité moléculaire dans les CHC. En conséquence, plusieurs classifications moléculaires ont été décrites en utilisant des analyses transcriptomiques (Boyault *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2008; Hoshida *et al.*, 2009; Lee J. S. *et al.*, 2006).

Au sein de notre laboratoire, nous avons proposé une classification transcriptomique de CHC en 6 sous-groupes (G1 à G6) fortement associés à des caractéristiques cliniques et génétiques (figure 6) (Boyault *et al.*, 2007). Les groupes G1 à G3 présentent une instabilité chromosomique importante avec des pertes d'hétérozygoties. Les groupes G1 et G2 sont associés aux mutations *AXIN1* et les groupes G2 et G3 aux mutations *TP53*. Les groupes G1 et G2 sont essentiellement enrichis en CHC liés à une infection VHB : G1 est caractérisé par un faible nombre de copies du VHB et au contraire G2 est associé à un fort nombre de copies de VHB. De plus, les CHC classés dans le groupe G1 sont plutôt associés à des patients de sexe féminin, d'origine africaine, jeunes et présentant un taux d'alphafoetoprotéine (AFP) sérique plus élevé. Le groupe G3 est lié à la surexpression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et associé à un mauvais pronostic. Le groupe G4 est un sous-groupe hétérogène de CHC, y compris ceux qui sont mutés pour *HNF1A* (*TCF1*), alors que dans les groupes G5 et G6, on retrouve les tumeurs mutées pour le gène *CTNNB1*, caractérisées par une stabilité chromosomique et une histologie bien différenciée. En particulier le groupe G6 est composé des CHC avec la présence des nodules satellites et l'E-cadherine sous exprimée.

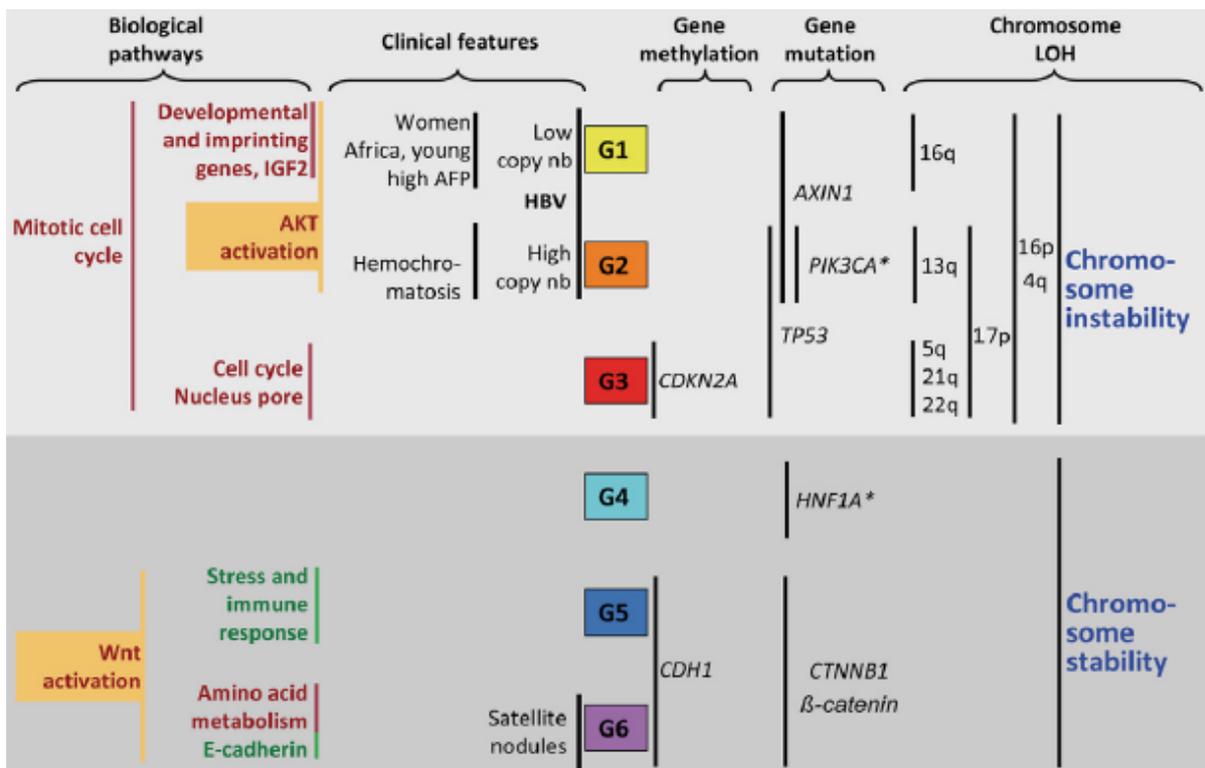


Figure 6. Classification transcriptomique des CHC proposée par l'équipe de Zucman-Rossi. (Boyault *et al.*, 2007).

Un peu plus tard, Hoshida et collaborateurs ont réalisé une méta-analyse de huit études transcriptomiques publiés avec des données indépendantes des patients (comprenant notre classification G1-G6), en vue d'établir un véritable système de classification universelle. Ils ont appliqué ces résultats de méta-analyse à une cohorte de 118 patients supplémentaires. Un total de 603 patients a été analysé, représentant les étiologies principales de CHC (VHB et VHC) collectées auprès des pays occidentaux et orientaux. Trois classes de CHC (appelées S1, S2, et S3) ont été observés, chacune en corrélation avec les paramètres cliniques et moléculaires. Le groupe S1 est caractérisé par une activation aberrante de la voie de signalisation Wnt et TGF- β , le groupe S2 est caractérisé par une importante prolifération cellulaire avec une surexpression d'*EpCAM* et par l'activation de gènes *MYC* et *AKT*. Les groupes S1-S2 ont en général un profil prolifératif associés souvent avec les mutations inactivatrices de *TP53*, et avec une tumeur de plus grand diamètre, moins différenciée, un taux d'alpha-foetoprotéine sérique plus élevé et un mauvais pronostic clinique. Des études fonctionnelles ont indiqué que l'activation de la voie Wnt dans le groupe S1 n'était pas le résultat d'une mutation activatrice de la β -caténine mais était le résultat de l'activation du TGF- β (transforming growth factor β), ce qui pourrait représenter un nouveau mécanisme d'activation de la voie WNT dans le CHC. Enfin, le groupe S3 a été associé à une bonne différenciation des hépatocytes et à une meilleure survie des patients. (figure 7) (Hoshida *et al.*, 2009).

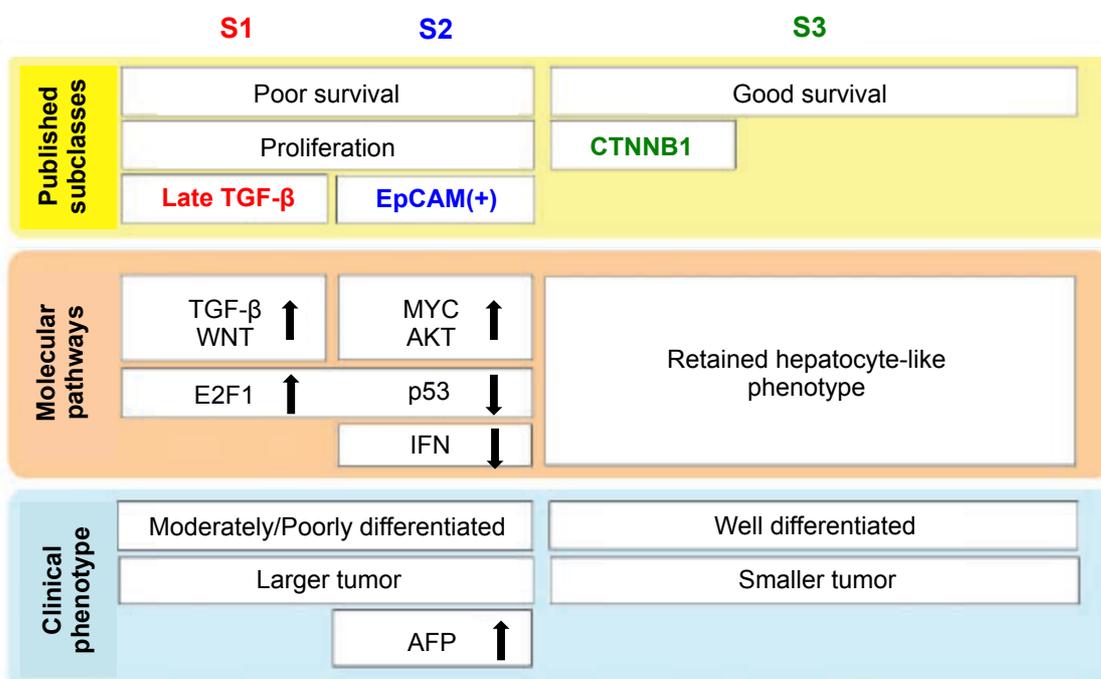


Figure 7. Classification transcriptomique des CHC proposée par l'équipe d'Hoshida. (Hoshida *et al.*, 2009).

Cette méta-analyse constitue un premier pas important afin de mettre en place un consensus international permettant de définir des bases communes pour une classification moléculaire de CHC. Cette classification a montré une bonne homogénéité pour expliquer les différents caractères cliniques et moléculaires des CHC dans différentes populations. Par exemple, les groupes S1-S2 correspondent aux groupes « prolifération » de Chiang *et al.* et aux groupes G1-G2-G3 de notre classification. Et le groupe S3 correspond au groupe « CTNNB1 » de Chiang *et al.* et aux groupes G5-G6 de notre classification. Néanmoins, des études multicentriques élargies sont nécessaires pour valider cette classification. En plus, avec les progrès génomiques dans le CHC, de nouveaux gènes drivers et des voies de signalisation peuvent être intégrés dans cette classification pour mieux définir les CHC de différentes étiologies en détail. En conclusion, on espère que l'apparition d'une classification moléculaire du CHC internationale permettra au minimum d'améliorer l'application des modalités de traitement actuel et qui offrira des nouvelles stratégies du traitement.

5. Diagnostic et évolution

Aujourd'hui, le diagnostic précoce du CHC est possible dans 30-60 % des cas dans les pays développés, ce qui permet un traitement curatif, c'est-à-dire la résection, la transplantation et l'ablation percutanée (la radiofréquence et l'injection d'éthanol percutanée). En effet, alors que les tumeurs de moins de 2 cm de diamètre représentaient moins de 5% des cas au début des années quatre-vingts dix en Europe, actuellement, elles représentent jusqu'à 30% des cas au Japon. Cette tendance devrait se confirmer de façon croissante dans les pays développés en parallèle à la mise en œuvre des mesures de surveillance plus performantes. Cependant, la détection de ces nodules de moins de 2 cm de diamètre pose un problème diagnostique car ils sont difficiles à caractériser par les examens radiologiques, et à distinguer en particulier avec les nodules dysplasiques. Toutes les lésions dysplasiques doivent être suivies régulièrement par des méthodes d'imagerie, puisque au moins un tiers de ces nodules vont se transformer en un phénotype malin (European Association for the Study of the Liver, 2012).

5.1 Le diagnostic du CHC

Les groupes de patients chez lesquels la surveillance est recommandée ont été récemment déterminés par l'Association américaine pour l'étude des maladies du foie (AASLD) en incluant les patients cirrhotiques et les patients présentant une infection chronique par le VHB sans cirrhose (figure 8). Le test recommandé pour la surveillance est l'échographie qui présente une sensibilité de 65-80% et une spécificité supérieure à 90% (Lencioni, 2010). L'intervalle de surveillance entre les échographies est controversé. Un intervalle de 6 mois est recommandé et la plupart des études suggèrent que cet intervalle est suffisant pour la détection des tumeurs à un stade précoce (Bolondi *et al.*, 2001; Sangiovanni *et al.*, 2004). Un essai récent comparant un intervalle de surveillance de 3 mois et de 6 mois a montré qu'il n'y avait pas de bénéfice à effectuer des examens plus fréquents (Trinchet J. C. *et al.*, 2011). Malheureusement, à l'heure actuelle, de nombreux patients ne suivent pas de programme de surveillance (mauvaise compliance, méconnaissance de l'hépatopathie) et uniquement environ 20% des CHC sont détectés lors d'une échographie de contrôle.

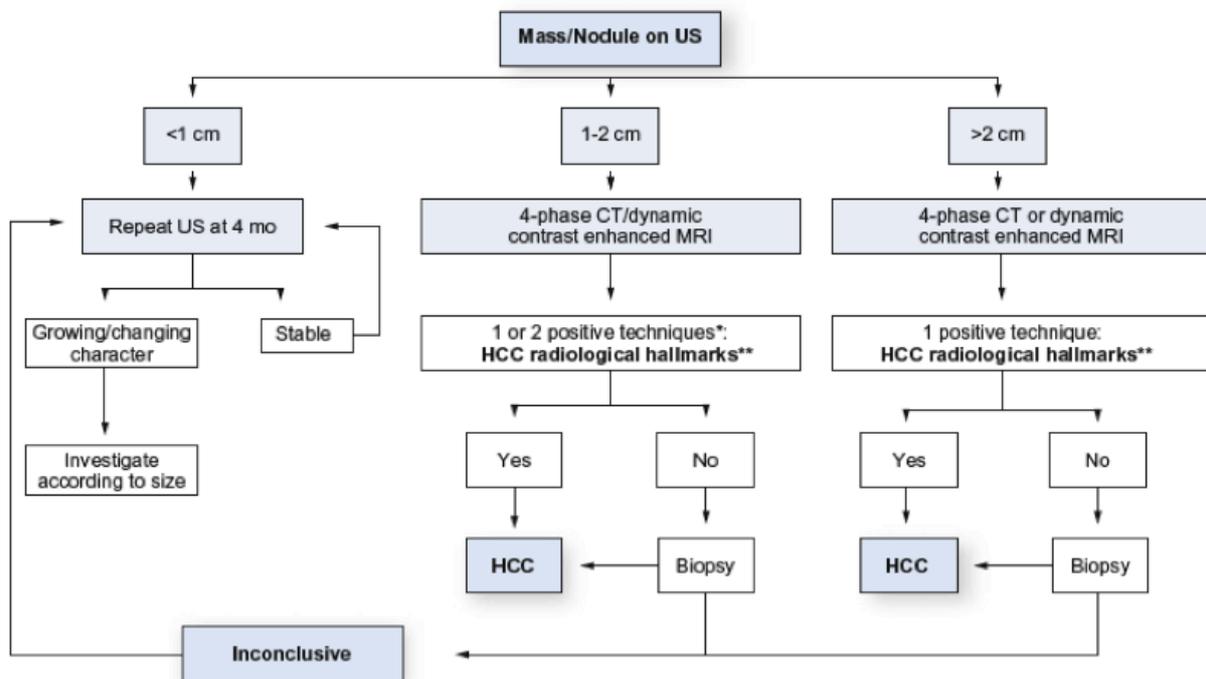


Figure 8. L'algorithme des procédures diagnostiques des CHC. *Un résultat d'imagerie positif est recommandé uniquement dans les centres avec des équipements radiologiques de haute gamme. ** Hyper vascularisation artérielle avec la phase 'wash-out'. (European Association for the Study of the Liver, 2012).

5.2 Classification clinique et pronostique

Une fois le diagnostic de CHC posé, la classification BCLC (Barcelona-Clinic Liver Cancer) divise les patients en 5 groupes (0, A, B, C et D) selon les paramètres préétablis, donne des informations sur la prédiction pronostique et permet l'application de thérapies adaptées selon le classement des patients (figure 9) (European Association for the Study of the Liver, 2012). Selon ce système, les patients atteints d'un CHC sont répartis en 4 groupes : BCLC 0/A ; BCLC B ; BCLC C ; BCLC D (Forner *et al.*, 2012). Les patients classés BCLC 0/A présentent de 1 à 3 nodules de moins de 3 centimètres, ont une fonction hépatique préservée et ne présentant pas de symptôme associé au cancer. Ce sont les seuls patients pour lesquels un traitement curatif peut être envisagé. Les patients classés BCLC B ont une fonction hépatique préservée mais un CHC de plus grande taille et/ou multifocal. Le traitement recommandé est palliatif (chimio-embolisation transartérielle). Les patients présentant une invasion portale néoplasique sont classés BCLC C. Un traitement palliatif est recommandé avec une administration de Sorafénib (cf. après). Les patients de niveau BCLC D présentent une fonction hépatique et un état général fortement altéré, des soins palliatifs sont recommandés.

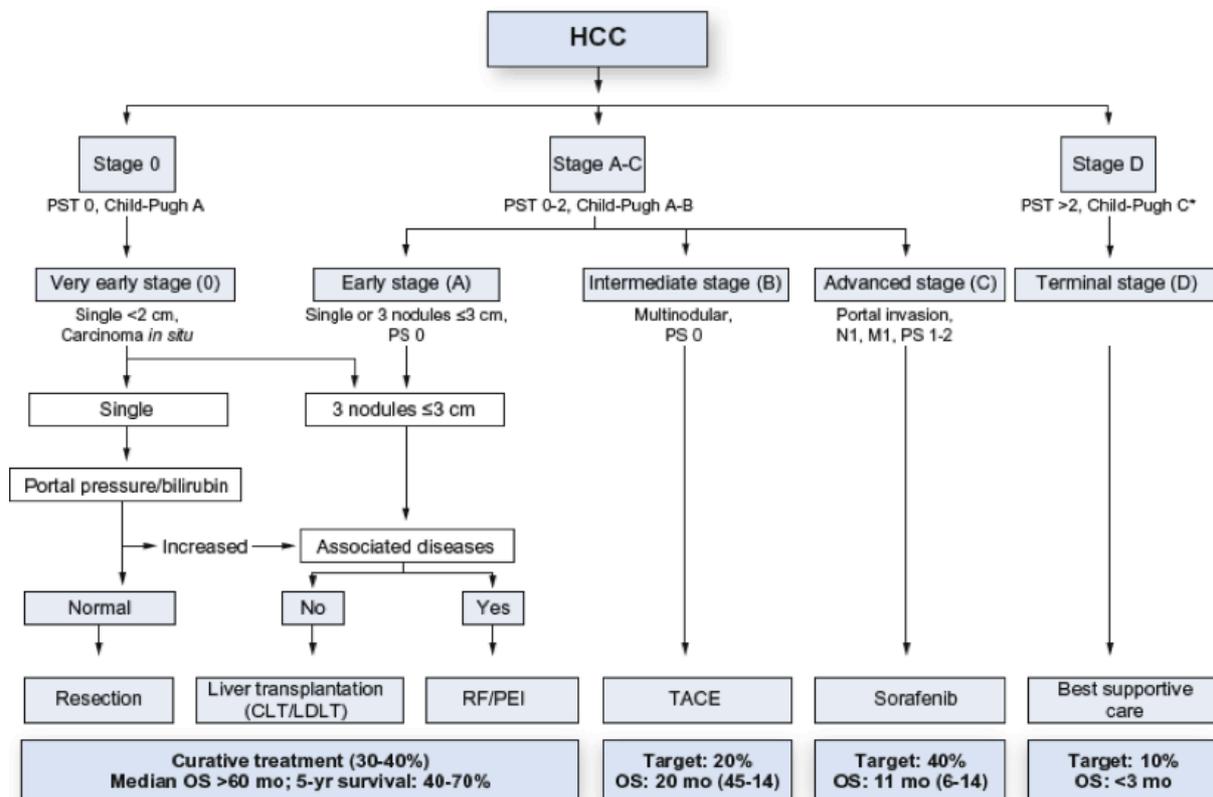


Figure 9. La classification BCLC. (European Association for the Study of the Liver, 2012).

Le pronostic des patients classique est défini par des paramètres tumoraux (la taille et le nombre des tumeurs, l'invasion vasculaire, N1, M1), la fonction hépatique (la classification Child-Pugh) et l'état de santé (ECOG score). Concernant la complexité du CHC (qui est survenu souvent sur une maladie chronique du foie ou un fond cirrhotique), les critères cliniques ne sont pas toujours fiables. Avec les avancées dans le domaine moléculaire, une signature moléculaire robuste est dans certains cas nécessaire pour prédire avec précision le pronostic des patients. Récemment au sein du laboratoire, un panel de 5 gènes (*TAF9*, *RAMP3*, *HN1*, *KRT19*, et *RAN*) (tableau 4) ont été analysés dans 3 cohortes indépendantes avec un total de 748 patients. Nous avons pu montrer une valeur pronostique plus pertinente, en particulier, beaucoup plus précise avec ce panel pour prédire le pronostic des patients par rapport à des signatures génétiques connues (Nault, De Reynies, *et al.*, 2013).

	HUGO Gene name	Chromosome location	Biological functions
HN1	Hematological and neurological expressed 1	17q25.1	Regulation of androgen receptor
KRT19	Keratin 19	17q21-q23	Structural integrity of epithelial cells, liver stem cell marker
RAMP3	Receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 3	7p13-p12	Adrenomedullin receptor, vasodilatation, angiogenesis
RAN	RAN, member RAS oncogene family	12q24.3	Ras/raf pathway, control of DNA synthesis, cell cycle progression
TAF9	TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 32kDa	5q11.2-q13.1	transcriptional activation, gene regulation associated with apoptosis

Tableau 4. Description des 5 gènes inclus dans le score pronostique. (Nault, De Reynies, *et al.*, 2013).

En plus, nous avons développé un score pronostique composite, en intégrant à la fois la classification BCLC, l'invasion microvasculaire, et le score à 5 gènes, qui permet de classer les patients dans des groupes avec un bon, intermédiaire et mauvais pronostic en utilisant un score de 200 points (figure 10). Dans l'avenir, l'application de notre score à 5 gènes doit être testé dans les décisions d'orientation clinique. (Nault, De Reynies, *et al.*, 2013).

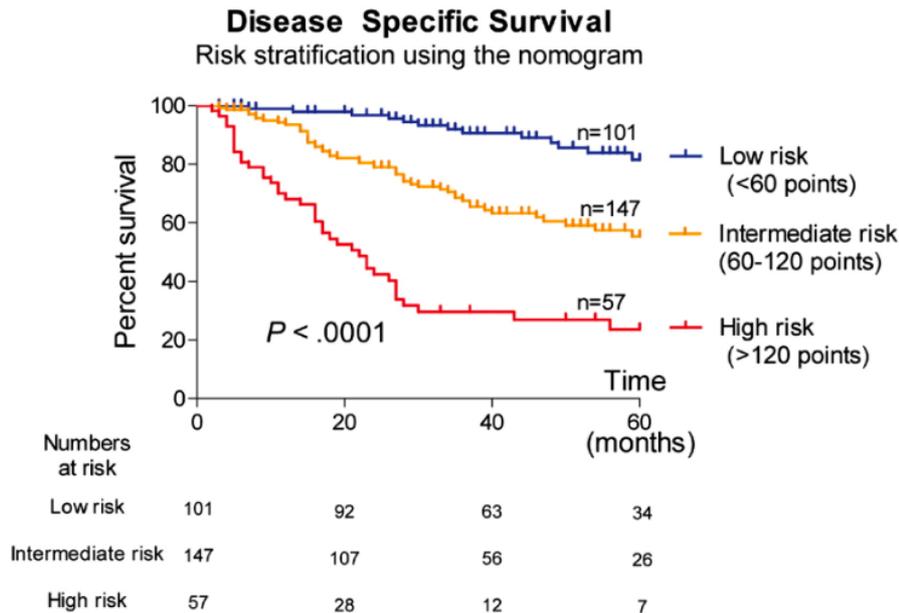


Figure 10. L'ensemble de la population a été divisée en trois sous-groupes en fonction des points total calculés: le groupe des patients à faible risque (<60 points), à risque intermédiaire (60-120 points), et à haut risque (>120 points). (Nault, De Reynies, *et al.*, 2013).

5.3 Le chimiothérapie du CHC

Les thérapies moléculaires ciblées ont considérablement changé le traitement du cancer. Environ 20 thérapies moléculaires ciblées ont été approuvées dans différents types de cancer au cours des dernières années (Llovet & Bruix, 2008). Récemment, un inhibiteur multi-kinase, le sorafénib, qui inhibe la kinases sérine/thréonine BRAf et CRAF, les VEGFR (vascular endothelial growth factors receptors)-1/2/3 et les PDGFR (platelet-derived growth factor receptors)- α/β , ont montré un avantage de trois mois de survie globale des patients avec un CHC avancé (Essai SHARP) (figure 11) (Llovet, Ricci, *et al.*, 2008). Ceci représente un progrès capital dans le traitement de cette maladie, et prouve que les thérapies moléculaires peuvent être efficaces pour ce type de cancer. Une meilleure compréhension de l'hépatocarcinogénèse moléculaire reste essentielle pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

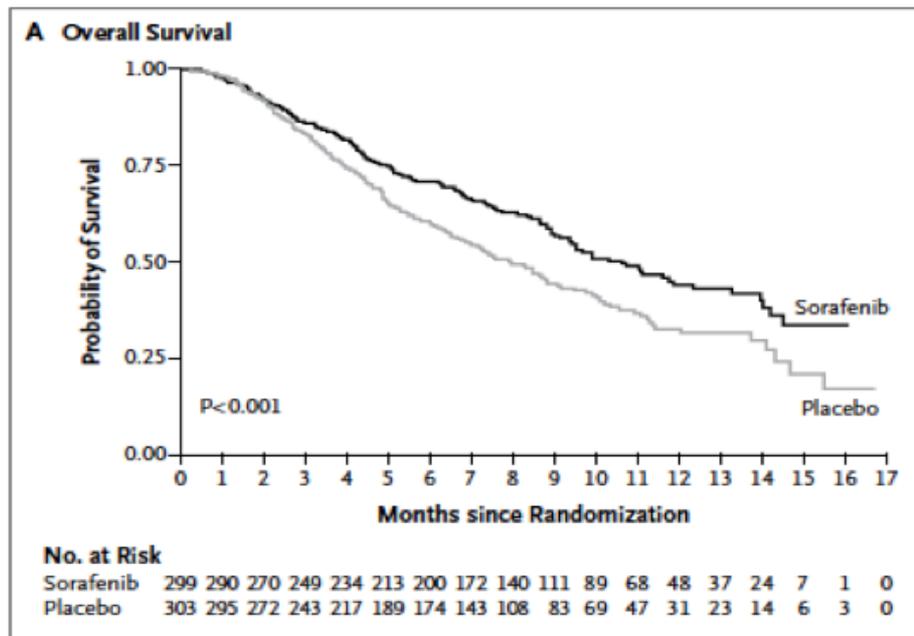


Figure 11. Les courbes de survie des patients randomisés au sorafénib ou un placebo (Essai SHARP). La médiane de survie globale de patients randomisés traités au sorafénib (299 patients) était de 10,7 mois par rapport à 7,9 mois pour le placebo (303 patients). (Hazard ratio de la mortalité=0,69, IC 95%=0,55-0,87). (Llovet, Ricci, *et al.*, 2008).

Cependant, cet avantage de survie des patients dans l'essai SHARP est lié presque entièrement à une stabilisation de la tumeur. Les patients dans le groupe sorafénib ont une réponse au traitement (objective response rate, ORR) de 2% seulement, par rapport à 1% dans le groupe placebo ($p=0,05$). Cette différence entre la survie et la réponse a souligné les limites de l'application des critères d'évaluation de la réponse au traitement dans les tumeurs solides (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST). Ces critères regroupent un ensemble de règles pour évaluer une amélioration, une stabilisation, ou une aggravation de la maladie au cours des traitements, en particulier dans le CHC, où la cirrhose limite les effets du traitement (Patel *et al.*, 2014).

Contrastant avec l'optimisme initial, des études faites avec d'autres molécules ont été incapables de reproduire le succès du sorafénib. Les inhibiteurs multiples des kinases antiangiogéniques (tyrosine-kinase inhibitors, TKIs) testés en essai de phase III comme le brivanib, sunitinib, linifanib ont toutes échouées à montrer une amélioration de la survie des patients malgré les données encourageantes des études de phase II (tableau 5) (Llovet *et al.*, 2014). D'autres molécules ciblant différentes voies de signalisation sont en cours de développement clinique dans le CHC.

First-line advanced HCC			
Comparison	Design	OS ^a	TTP
Sorfenib vs. placebo (SHARP trial)	Superiority	10.7 mo vs. 7.9 mo; HR = 0.69 (95% CI, 0.55–0.87); <i>P</i> = 0.00058	5.5 mo vs. 2.8 mo; HR = 0.58 (95% CI, 0.45–0.74); <i>P</i> < 0.001
Sorfenib vs. placebo (Asia Pacific Trial)	Superiority	6.5 mo vs. 4.2 mo; HR = 0.68 (95% CI, 0.50–0.93); <i>P</i> = 0.014	2.8 mo vs. 1.4 mo; HR = 0.57 (95% CI, 0.42–0.79); <i>P</i> = 0.0005
Sunitinib vs. sorafenib (SUN trial)	Superiority	7.2 mo vs. 10.2 mo; HR = 1.30 (95% CI, 1.13–1.5); <i>P</i> = 0.001	3.8 mo vs. 4.1 mo; HR = 1.13 (95% CI, 0.98–1.31); <i>P</i> = 0.16
Brivanib vs. sorafenib (BRISK-FL trial)	Noninferiority	9.5 mo vs. 9.9 mo; HR = 1.05 (95% CI, 0.94–1.23); <i>P</i> = 0.31	4.1 mo vs. 4.2 mo; HR = 1.01 (95% CI, 0.88–1.16); <i>P</i> = 0.8
Linifanib vs. sorafenib (LIGHT Trial)	Noninferiority	9.1 mo vs. 9.8 mo; HR = 1.04 (95% CI, 0.89–1.22); <i>P</i> = ns	5.4 mo vs. 4 mo; HR = 0.76 (95% CI, 0.64–0.89); <i>P</i> < 0.001
Sorafenib ± everolimus vs. sorafenib (SEARCH trial)	Superiority	9.5 mo vs. 8.5 mo; HR = 0.92 (95% CI, 0.78–1.1); <i>P</i> = 0.2	3.2 mo vs. 4.0 mo; HR = 0.1.13 (95% CI, 0.94–1.36); <i>P</i> = 0.91
Second-line advanced HCC ^b			
Brivanib vs. placebo (BRISK-PS Trial)	Superiority	9.4 mo vs. 8.2 mo; HR = 0.89 (95% CI, 0.69–1.15); <i>P</i> = 0.33	4.2 mo vs. 2.7 mo; HR = 0.56 (95% CI, 0.42–0.78); <i>P</i> = 0.001

Abbreviation: TTP, time to progression.

^aOverall survival (OS) is the primary endpoint in all studies.

^bResults for everolimus vs. placebo have been reported as negative in a recent press release.

Tableau 5. Essais cliniques randomisés de phase III complétés dans le CHC avec les médicaments de première et deuxième ligne (2007-2013) (Llovet *et al.*, 2014).

En conclusion, le CHC est une maladie caractérisée par son hétérogénéité. Les différents facteurs étiologiques conduisent à la transformation maligne par des processus moléculaires distincts. Cette situation s'explique par l'accumulation de mutations au cours d'une maladie hépatique chronique progressant jusqu'à la cirrhose. Des efforts continus sont nécessaires pour identifier les différentes voies de signalisation impliquées dans l'hépatocarcinogénèse. Bien qu'actuellement, aucun biomarqueur ni prédicteur de réponse n'aient été identifiés dans le CHC, plusieurs classifications basées sur les profils moléculaires ont été proposées. Toutefois, celles-ci restent à être évaluées dans la pratique clinique de routine. De même, l'identification de variations génétiques entre les différentes populations est nécessaire, en particulier dans l'évaluation du pronostic et de la réponse au traitement. Ceci permettra d'orienter la recherche vers l'adaptation des schémas thérapeutiques ciblés pour des populations spécifiques.

II. LE VIRUS DE L'HEPATITE B

Le virus de l'hépatite B (VHB) est un virus ubiquitaire avec une distribution mondiale. L'hépatite B est l'une des maladies infectieuses les plus courantes et les plus graves du monde. On estime que plus d'un tiers de la population mondiale a été infectée par le virus de l'hépatite B. Environ 5% de la population sont porteurs chroniques du VHB, et près de 25% de tous les porteurs développent des maladies graves du foie telles que l'hépatite chronique, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. L'infection par le VHB provoque plus d'un million de décès chaque année (<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis>).

1. Epidémiologie

Le taux de portage de l'antigène HBs varie entre 0,1 à 20% selon les populations à travers le monde (figure 12). L'incidence du portage de l'antigène HBs dans les populations est liée surtout à l'âge de la primo-infection. Dans les zones endémiques d'Afrique et d'Asie, les modèles épidémiologiques diffèrent de ceux observés en Amérique du Nord et en Europe occidentale. Dans ces régions, la plupart des infections se produisent chez les nourrissons et chez les enfants en raison de la transmission materno-néonatale mais aussi du contact étroit lors de la petite enfance, bien que la contamination percutanée avec des aiguilles contaminées ou des injections à risque sont toujours une possibilité dans ces pays. Néanmoins, la disponibilité d'un vaccin efficace, la sélection optimisée des donneurs du sang, et les meilleures procédures de stérilisation pour les instruments dérivés sanguins ont réduit considérablement le risque d'infection dans les zones de forte d'endémie comme l'Alaska, le Taiwan, l'Indonésie, la Polynésie et la Gambie. (Chang *et al.*, 1997; El-Serag *et al.*, 2007).

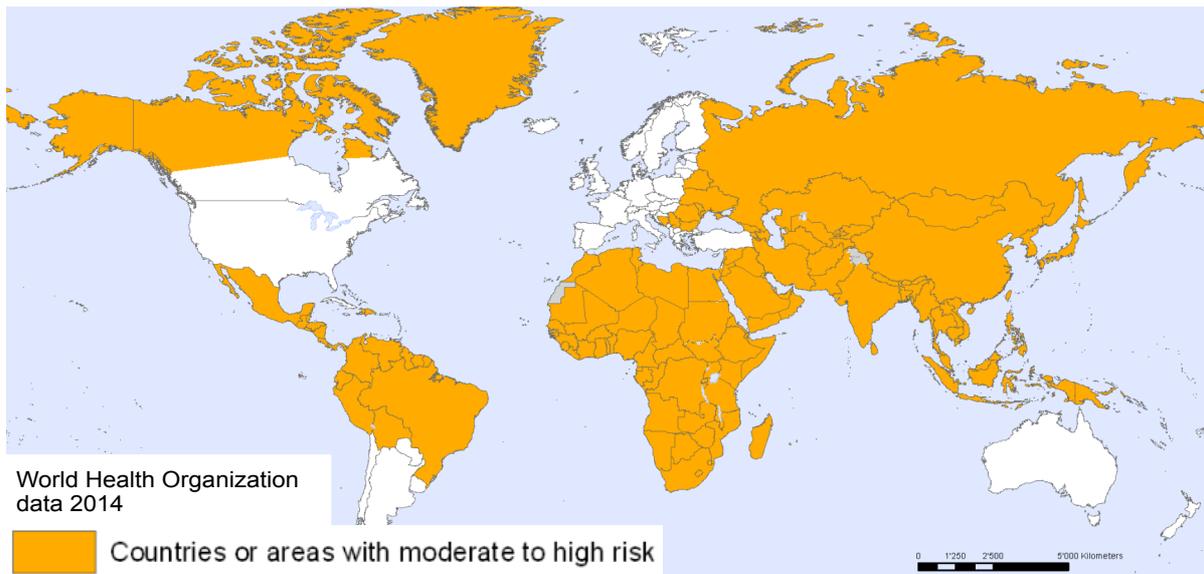


Figure 12. Prévalence de l'infection par le VHB dans le monde, sur la base du taux de prévalence estimée de l'antigène de surface du VHB (AgHBs, risque modéré : 2-8% ; risque élevé : >8% des populations infectées). (WHO, 2014).

2. Données virologiques

2.1 La structure virale

Le virus de l'hépatite B appartenant à la famille d'hépadnaviridae, est un virus d'ADN partiellement double brin de 42 nm, composée d'un noyau nucléocapside (AgHBc) de 27 nm, entouré par une enveloppe lipoprotéique externe contenant l'antigène de surface (AgHBs) (figure 13) (Yokosuka *et al.*, 2006).

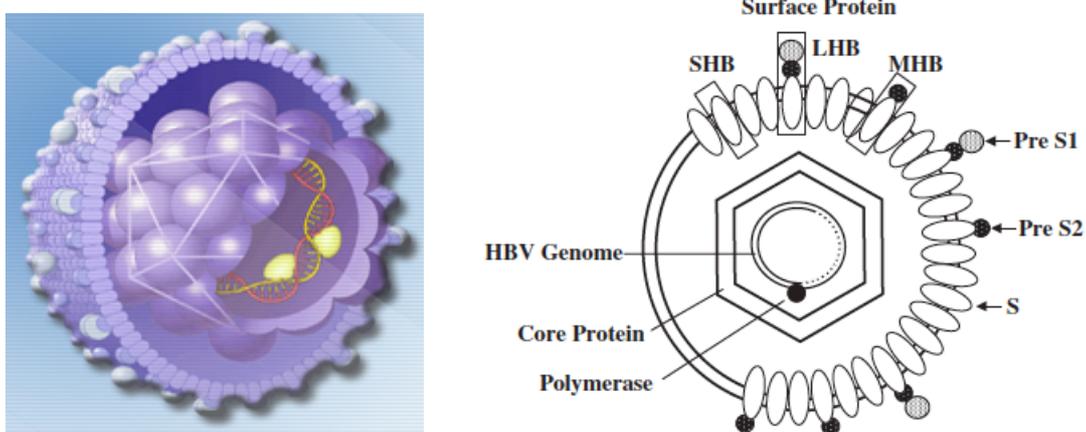


Figure 13. Le virus de l'hépatite B (particule de « Dane »). (Yokosuka *et al.*, 2006)

L'ADN du VHB est partiellement double brin, composé de 3020 à 3320 nucléotides (pour le brin négatif) et de 1700 à 2800 nucléotides (pour le brin positif). La séquence nucléotidique du génome du VHB comprend quatre cadres de lecture ouverts (open reading frame, ORFs) situés sur le brin (-) et codant pour les différentes protéines virales (figure 14) (Arzumanyan *et al.*, 2013):

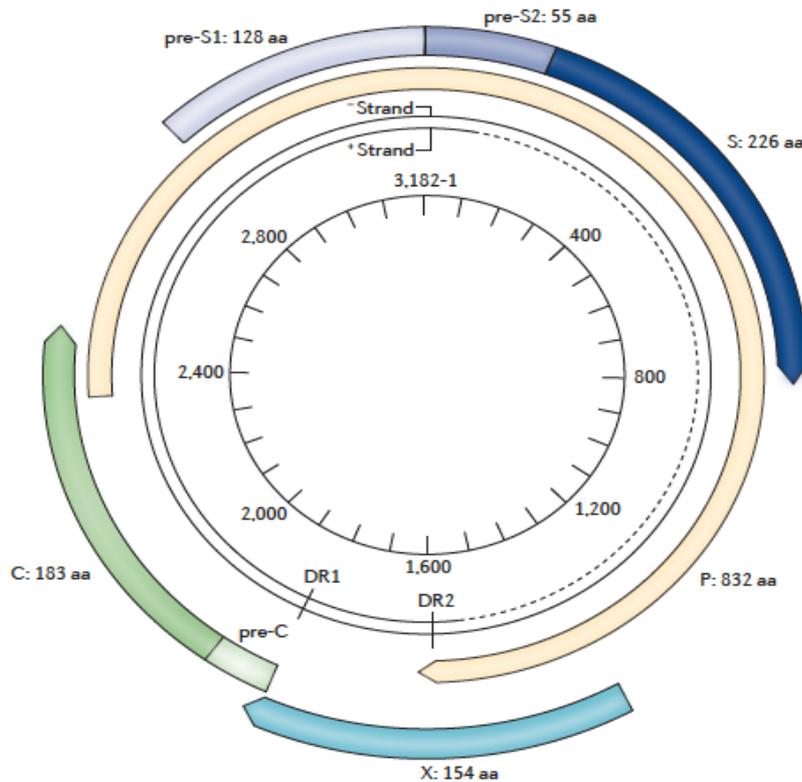


Figure 14. Le génome du VHB et les quatre gènes codants (S,C,X et P). aa: acides aminés. (Arzumanyan *et al.*, 2013)

a). La région S

Elle code pour les trois protéines de surface: (1) le gène S, pour la plus petite protéine (SHBs, 226aa) ; (2) le gène PréS2/S, pour la protéine moyenne (MHBs, 281aa) ; (3) le gène PréS1/PréS2/S, pour la protéine la plus grande (LHBs, 455aa), jouant un rôle dans l'infectiosité du VHB par sa présence sur les particules de « Dane » (reconnaissance du récepteur hépatocytaire).

b). La région Core

Elle code pour la protéine de la nucléocapside. La région PréC/C présente une séquence supplémentaire en 5' du gène C codant pour un peptide-signal adressant le

précurseur PréC/C vers le réticulum endoplasmique (RE) où il subit une maturation par clivage (protéolyse N- et C-terminale), lui permettant d'être sécrété sous forme d'une protéine de 16 kDa qui est l'antigène HBe. Cette protéine n'est pas nécessaire à la réplication virale, mais a probablement un rôle immunomodulateur (Alexopoulou *et al.*, 2014).

c). La région P

Elle code pour une protéine de 92 kDa: la polymérase virale. Ce gène présente 4 domaines de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale: (1) le domaine protéique N-terminal ayant un rôle dans l'initiation de la synthèse du long brin d'ADN et dans l'encapsidation; (2) le domaine non fonctionnel; (3) le domaine transcriptase inverse/ADN polymérase présentant des homologies avec la transcriptase inverse rétrovirale et (4) le domaine RNase H.

d). La région X

Elle code pour une protéine virale de 17 kDa, de localisation cytoplasmique, qui semble jouer un rôle important dans la réplication du VHB, notamment, le domaine composé par les 50 premiers acides aminés d'*HBx* qui est un régulateur négatif permettant à la protéine virale de réguler sa transactivation. Elle a été longtemps être soupçonnée d'être impliquée dans l'hépatocarcinogenèse, bien que son rôle oncogène reste controversé.

2.2 Les génotypes du VHB

Dans le cas du VHB, la définition consensuelle du génotype est fondée sur la disparité de séquences nucléotidiques supérieure à 7,5%. Huit génotypes différents, marqués par les lettres alphabétiques de A à H, ont été décrits. Les génotypes pourraient également être associés à des distributions géographiques spécifiques (figure 15).

2.3 Le cycle de réplication du VHB

Le cycle de réplication du VHB commence une fois que les virions s'accrochent aux récepteurs situés sur la membrane de la cellule hôte. (figure 16) (Rehermann *et al.*, 2005).

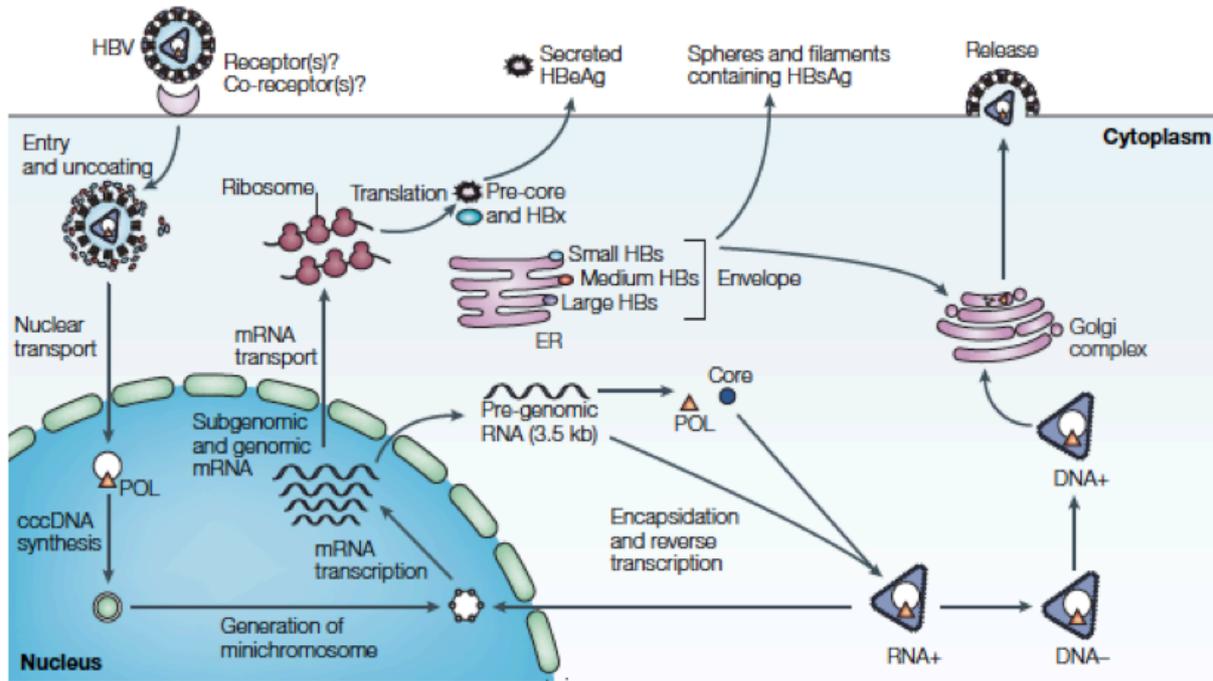


Figure 16. Le cycle de la réplication du VHB. (Rehermann *et al.*, 2005).

Après la fusion de l'enveloppe à la membrane, la particule Core pénètre dans la cellule et est transportée vers le noyau. L'ADN partiellement double brin du VHB est ensuite libéré et transformé en un ADN circulaire entièrement double brin appelé « covalently closed circular DNA » (ADNccc) qui va servir de matrice pour l'ARN polymérase II de l'hépatocyte hôte. Celle-ci va générer une série de transcrits subgénomiques codant pour les protéines virales ainsi qu'une version entière du génome viral sous forme d'ARN, appelée ARN pré-génomique (ARNpg). Les ARN viraux vont être transportés vers le cytoplasme et traduits en protéines virales. La capsid virale composée de protéines core (HBc) s'assemble ensuite dans le cytosol, encapsidant une molécule de ARNpg et une polymérase. Une fois que l'ARNpg est encapsidé, sa rétro-transcription commence avec la synthèse séquentielle de l'ADN partiellement double brin du VHB. Tout d'abord, la polymérase synthétise un brin d'ADN à partir de l'ARNpg, puis dégrade la molécule d'ARN pour synthétiser le second brin d'ADN à partir du premier. Ensuite, une partie des virions va retourner au noyau pour repartir dans le cycle et ainsi créer un pool de ADNccc dans le noyau de l'hépatocyte infecté. L'autre

partie va aller vers le réticulum endoplasmique afin d'y recevoir l'enveloppe virale de lipoprotéines codées par HBs (L, M et S) et, enfin, être sécrétée à l'extérieur de la cellule par transport vésiculaire (Raimondo *et al.*, 2007).

3. Histoire naturelle de l'infection par le VHB

L'infection par le virus de l'hépatite B peut être extrêmement variable, en fonction de l'âge de la primo-infection et l'état immunitaire du patient, mais aussi du stade auquel la maladie est reconnue. La plupart des patients adultes se rétablissent complètement, environ 5 à 10% de patients qui ne peuvent pas éliminer le virus et deviennent des porteurs chronique asymptomatiques ou développent une hépatite chronique pouvant entraîner une cirrhose et/ou un cancer du foie (Arzumanyan *et al.*, 2013).

L'histoire naturelle de l'infection chronique par le VHB est composé de 4 phases (figure 17) (Rehermann *et al.*, 2005) et la réponse immunitaire de l'hôte joue un rôle essentiel (Yim *et al.*, 2006) :

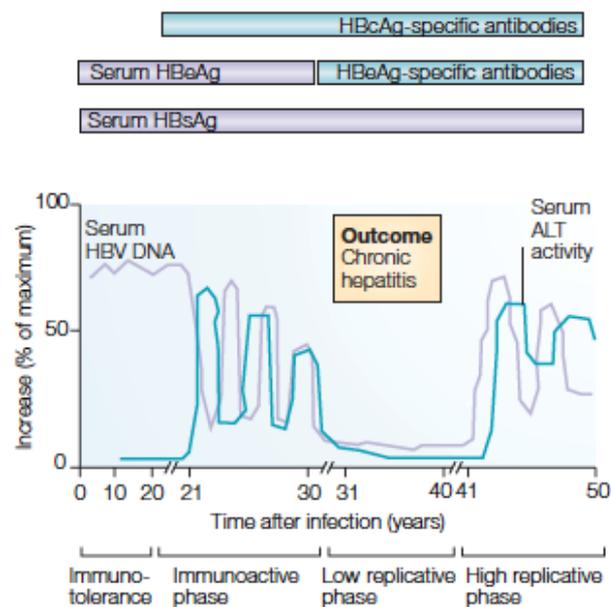


Figure 17. L'évolution clinique et sérologique de l'infection chronique par le VHB. A remarquer que tous les patients ne passent pas par toutes les étapes. (ALT: l'alanine aminotransférase.) (Rehermann *et al.*, 2005).

3.1 La phase de la tolérance immunitaire

Les patients sont souvent positifs pour l'AgHBe, présentent de forts taux d'ADN viral sérique avec une activité d'ALT sérique normal. Cette phase peut durer plusieurs années lors d'une infection périnatale, par contre pour un adulte, elle sera de courte durée et le taux d'ALT va augmenter rapidement.

3.2 La phase de la clairance immunitaire

C'est la phase au cours de laquelle le système immunitaire de l'hôte est activé. Elle se caractérise par la persistance d'un AgHBe positif, avec de faibles taux d'ADN viral sérique, un niveau d'ALT sérique fluctuant et une inflammation du foie.

3.3 La phase du porteur inactif de VHB

Elle se caractérise par une perte de l'AgHBe, une séro-conversion au profit de l'anticorps Anti-HBe, une baisse de l'ADN viral circulant à des niveaux quasi indétectables, un niveau d'ALT normal et une diminution de l'inflammation.

3.4 La phase de la réactivation

Elle correspond à une phase d'infection chronique caractérisée par la présence d'anticorps Anti-HBe, une élévation de l'ALT sérique, une charge virale fluctuante et des mutations fréquentes dans le domaine précore ou BCP (basal core promoter). Cet état est associé à une maladie du foie active pouvant mener à la cirrhose et au CHC à long terme.

4. Mécanismes moléculaires de l'hépatocarcinogénèse induite par le VHB

L'infection chronique par le VHB peut jouer un rôle dans la carcinogénèse hépatique de plusieurs façons. Bien que la majorité des cancers du foie se développe sur cirrhose, une fraction significative de CHC liés au VHB se produit dans un contexte d'hépatite chronique en l'absence de cirrhose (Brechot, 2004). Le pourcentage plus bas de CHC sur cirrhose par rapport aux autres étiologies suggère un rôle plus direct du VHB dans le processus hépatocarcinogénèse (Honda M. *et al.*, 2006). L'intégration de l'ADN du VHB dans le

génomique de l'hôte et l'expression persistante de protéines virales peut activer des oncogènes, induire un stress oxydatif et une instabilité génomique, offrant un terrain favorable à l'émergence d'altérations génétiques et épigénétiques conduisant à la transformation maligne des hépatocytes (figure 18) (Neuveut *et al.*, 2010).

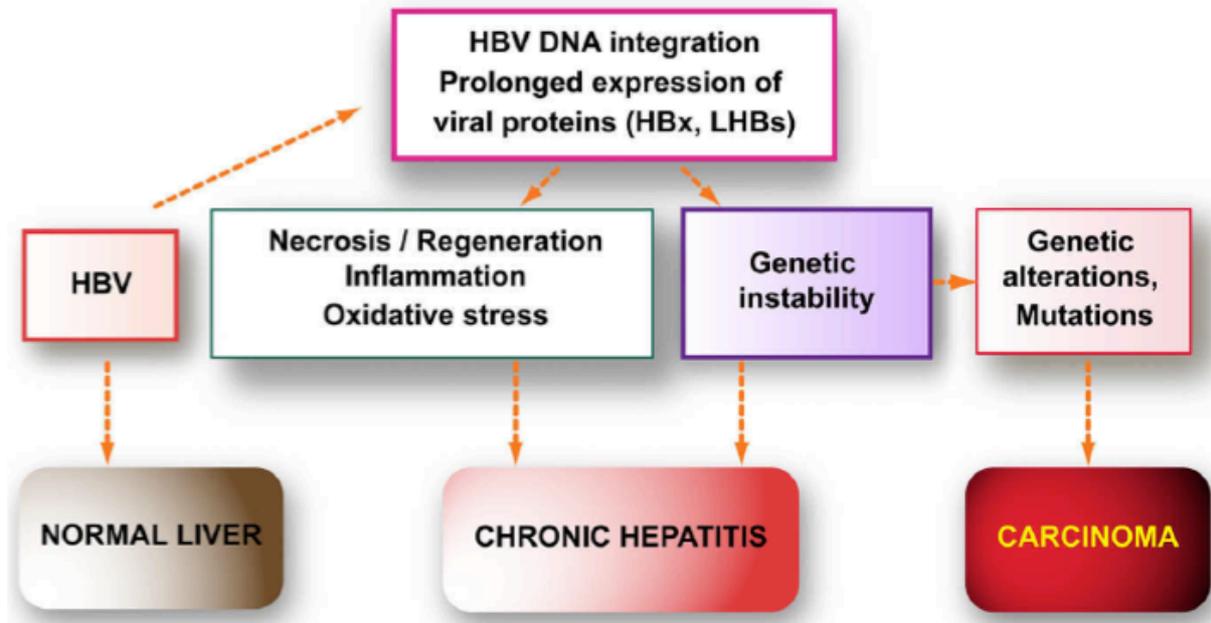


Figure 18. L'hépatocarcinogénèse induite par le VHB. (Neuveut *et al.*, 2010).

4.1 Mécanismes indirects

En général, le VHB n'a pas d'effet cytopathologique direct sur l'hépatocyte infecté (Guidotti *et al.*, 2006). La transformation maligne se produit après une longue période de maladie chronique du foie, souvent associée à une cirrhose, ce qui suggère un mécanisme non spécifique provoqué par la réponse immunitaire de l'hôte (Cougot *et al.*, 2005). A la suite de la réponse immunitaire innée, une inflammation chronique est induite par le virus de l'hépatite B et ses protéines, provoquant un stress du réticulum endoplasmique (RE) ou induire l'accumulation de lipides, qui à son tour conduit à un stress oxydatif avec la production de ROS (reactive oxygen species) et des lésions oxydatives de l'ADN. Alors que le rôle du système immunitaire adaptatif vis à vis de l'infection du VHB est principalement médié par la réponse cellulaire aux protéines du VHB présentes à la surface des hépatocytes, surtout celles des lymphocytes T-cytotoxique (CTL/CD8+) et des lymphocytes T-helper (Th/CD4+) (Dandri *et al.*, 2012; Lupberger *et al.*, 2007). Les cytokines et chimiokines induites par les lymphocytes T participent également à l'élaboration de la

réponse immunitaire et contribuent à la clairance virale principalement en bloquant l'entrée du virus dans les hépatocytes et en éliminant des virions infectieux de la circulation (figure 19) (Guidotti *et al.*, 2006; Higgs *et al.*, 2014; Rehermann, 2013).

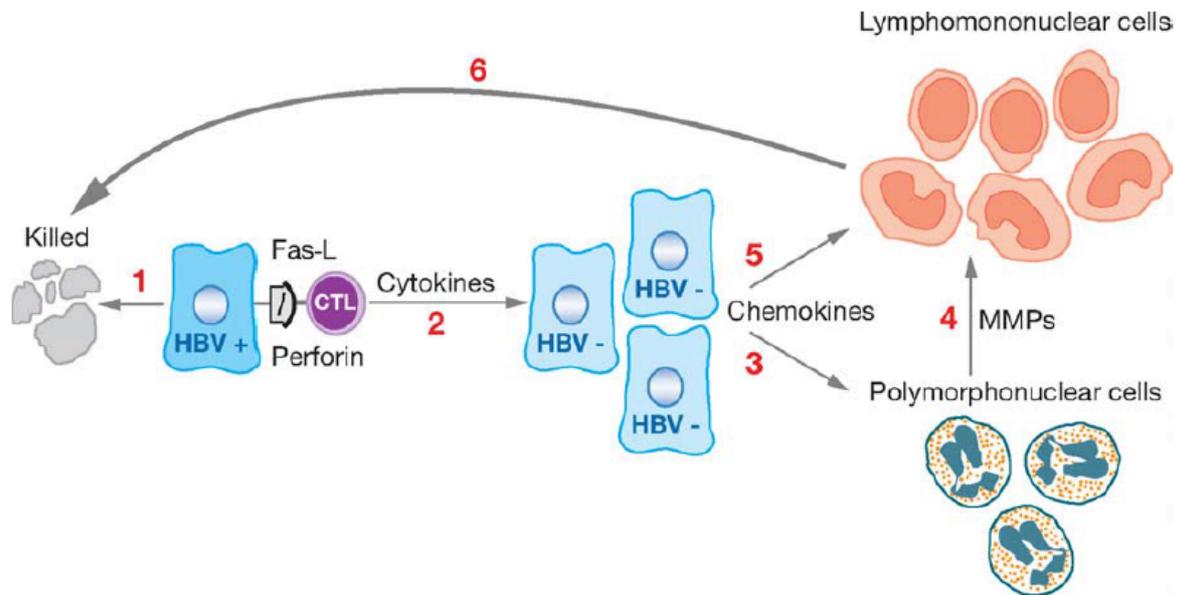


Figure 19. Mécanismes de clairance virale induite par les CTL : 1) un petit nombre d'hépatocytes sont tués par l'intermédiaire de Fas-L et par la voie Perforin, et produisent des cytokines antivirales 2) qui inhibent la réplication VHB d'une manière non cytopathologique dans un plus grand nombre de cellules. Ces cytokines peuvent activer la production des chimiokines par les cellules parenchymateuses et non parenchymateuses hépatiques 3) qui peuvent contribuer à recruter des cellules polynucléaires non spécifiques (e.g. des neutrophiles) infiltrés dans le foie. La production des métalloprotéases matricielles (MMPs) par ces cellules 4) en plus de chimiokines 5) peuvent contribuer à la migration des cellules lymphomononucléaire non spécifiques (par exemple, des cellules 'natural killer' et les macrophages) dans le foie et amplifier la maladie du foie initiée par les CTL. (Higgs *et al.*, 2014)

4.2 Mécanismes directs

Le génome d'ADN viral a la capacité de s'intégrer au génome des cellules hôtes infectées, et cette insertion peut se produire dès les stades précoces de l'infection virale (Lugassy *et al.*, 1987) ou durant la phase d'hépatite chronique (Boender *et al.*, 1985; Tanaka *et al.*, 1988). Dans les CHC associés à l'infection par le VHB, des séquences intégrées du génome viral sont présentes dans 80% des échantillons (Brechot *et al.*, 1980). L'intégration de l'ADN viral pourrait conférer un avantage sélectif de croissance aux cellules ciblées, ce qui conduirait à l'apparition de nodules préneoplasiques. Le premier site d'intégration du génome du VHB signalé a été identifié au niveau du gène *TERT*, dans deux cas (Gozaucik *et al.*, 2001; Paterlini-Brechot *et al.*, 2003). Par la suite, cinq intégrations impliquant les

gènes *FAR2*, *IP3R1*, *IRAK2*, *MAPK1*, *MLL2* et *MLL4* ont été identifiées (Gozuacik *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2005; Paterlini-Brechot *et al.*, 2003; Saigo *et al.*, 2008). Néanmoins, ces études se sont limitées à un faible nombre d'échantillons sans annotation clinique. Cependant, cette situation a été récemment remise en cause par des analyses à grande échelle de sites d'insertion virales (Ding *et al.*, 2012; Murakami *et al.*, 2005; Toh *et al.*, 2013). Il a été démontré que le site d'insertion du VHB cible souvent des gènes impliqués dans les différentes étapes de la signalisation cellulaire ou de la régulation de la croissance cellulaire. (Brechot *et al.*, 2010; Sung *et al.*, 2012). L'intégration d'ADN VHB peut également altérer la stabilité chromosomique via des délétions, des duplications et des translocations (Tokino *et al.*, 1987; Tsuei *et al.*, 2002). Bien que l'intégration d'ADN VHB se fasse de manière aléatoire, le gène *HBx* est la partie d'ADN VHB le plus souvent impliqué dans les phénomènes d'intégration dans le génome humain (Sung *et al.*, 2012) (figure 20).

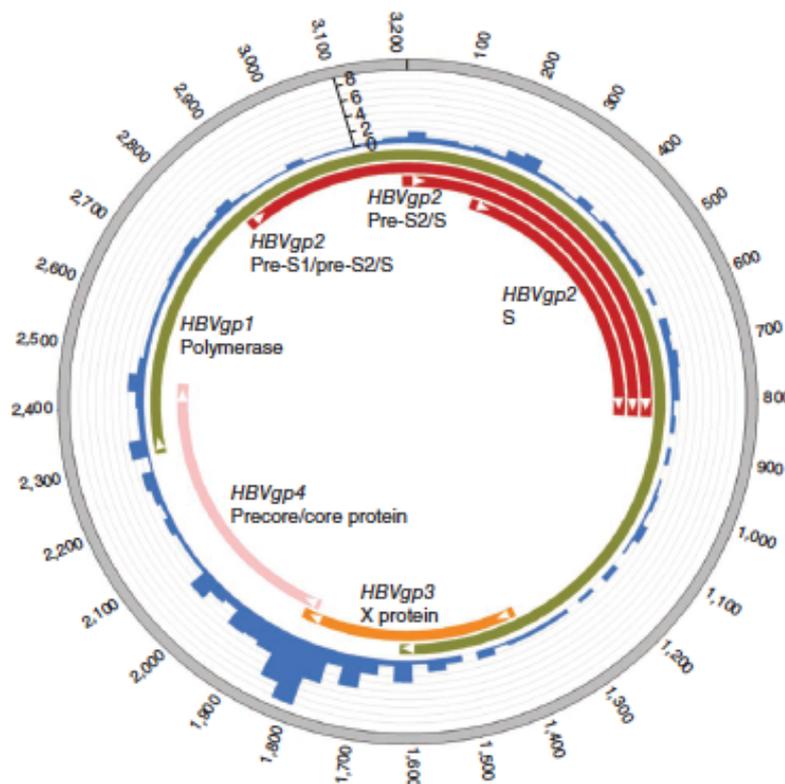


Figure 20. La fréquence des sites d'intégration de différents loci du génome VHB est présentée sous forme d'un histogramme bleu. (Sung *et al.*, 2012).

En conclusion, plus de 2 000 millions individus de la population mondiale ont été infectés par le VHB, et parmi celles-ci, environ 350 millions restent infectés chroniquement et

deviennent les porteurs chroniques du virus. Le VHB est parmi les facteurs étiologiques le plus important du CHC. Néanmoins, les mécanismes d'hépatocarcinogenèse induite par le VHB ne sont pas encore bien éclaircis, en grande partie à cause des limitations des systèmes permettant d'étudier ce virus. Mais avec les progrès dans la génomique fonctionnelle, de nouvelles voies de signalisation et de nouveaux gènes impliqués dans la carcinogenèse ont été mis en évidence. A l'aide des nouvelles technologies, il sera important de distinguer les mutations « passager » et des mutations « driver ». D'autre part, des progrès dans les modèles animaux pour étudier l'infection par le VHB, par exemple, les souris xénogreffées produisant l'inflammation et la fibrose, pourraient contribuer à une meilleure connaissance de la pathogenèse du CHC.

III. POLYMORPHISMES NUCLEOTIDIQUES ET CHC

L'hépatocarcinogénèse est un processus complexe et multifactoriel qui fait intervenir à la fois des facteurs génétiques et environnementaux jusqu'à la transformation maligne. Le risque de CHC n'est cependant pas identique d'un patient à un autre. L'identification des facteurs génétiques de l'hôte joue également un rôle important dans le développement du CHC. Cette connaissance peut ainsi aider à mieux sélectionner des patients qui pourraient bénéficier de mesures de prévention spécifiques ou avoir des protocoles de dépistage adaptés. Les polymorphismes nucléotidiques simples (SNPs) sont la forme la plus commune de variation génomique, qui concerne le changement d'un seul nucléotide dans la séquence d'ADN. La contribution des SNPs dans l'hépatocarcinogénèse a été étudiée de manière intensive par différentes méthodes pendant ces dernières années (McCarthy *et al.*, 2008; Miki *et al.*, 2012).

1. SNPs, Projets Internationaux HapMap et 1000 Génomes

Il est bien reconnu que environ 99,5% de séquence d'ADN génomique est identique parmi les humains. Seulement 0,5% de la séquence (environ 15 millions paires de bases) représente les différences individuelles, y compris la susceptibilité pour une maladie et la réponse individuelle aux médicaments. Cette différence dans la séquence d'ADN génomique est constituée soit de « di », « tri », et « tétra » répétitions de nucléotides (séquences satellite); soit de grands variants >1kb à cause des délétions, insertions ou duplications (copy number variants, CNV); ou encore de substitutions de nucléotides, dont le type le plus commun est le polymorphisme pour un nucléotide (SNP). Les SNPs sont stables, très abondants et distribués uniformément dans tout le génome. Certaines associations de SNP sont caractéristiques pour certaines populations (Roberts *et al.*, 2010).

Selon la position du SNP, il peut y avoir des conséquences phénotypiques différentes. Certains SNPs dans les régions codantes du gène altérant la fonction ou la

structure des protéines codées sont nécessaire et suffisante pour causer les maladies héréditaires monogéniques récessives ou dominantes. Ces maladies sont toutefois rares et surviennent dans moins de 0,1% de la population. Contrairement aux maladies monogéniques, les maladies multigéniques, responsables de la plupart des décès dans le monde sont dûes aux variants génétiques qui se produisent beaucoup plus souvent, et dans ce cas là, la prédisposition génétique est dûe à des gènes multiples plutôt qu'un seul gène. Ainsi, aucun gène n'est nécessaire ou suffisant pour induire le phénotype (Wang D. G., 1998).

Les connaissances actuelles suggèrent que la plupart des prédispositions génétiques pour les maladies courantes sont dûes aux SNPs. Ces SNPs, par définition, doivent se produire dans au moins 1% de la population, selon l'hypothèse de «maladie commune-variant commun» (common disease-common variant) (Manolio, 2010; Syvänen, 2001). En général, lorsqu'un SNP se produit dans au moins une proportion relativement importante de la population (typiquement de l'ordre de 1 à 10%), il est considéré comme un SNP commun. A ce jour, des millions de SNP communs ont été identifiés et sont accessibles dans les bases de données publiques, comme dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) ou Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

1.1 Projet International HapMap

Le projet HapMap est un projet international dont le but est de développer une carte d'haplotypes qui décrira les patrons communs de variation génétique du génome humain. Il a débuté officiellement en octobre 2002 et devait durer trois ans. Les échantillons d'ADN à l'étude dans le cadre du projet HapMap ont été recueillis auprès de 270 personnes. Les Yoruba d'Ibadan (Nigéria) ont fourni 30 ensembles d'échantillons de deux parents et d'un enfant d'âge adulte (chaque ensemble étant dénommé trio). Au Japon, 45 individus sans lien de parenté de la région de Tokyo ont été échantillonnés. En Chine, 45 individus sans lien de parenté de la région de Beijing ont été échantillonnés. Aux États-Unis, 30 trios ont fourni des échantillons, recueillis en 1980 auprès de résidents des États-Unis originaires de l'Europe du Nord et de l'Ouest par le Centre d'Étude du Polymorphisme Humain (CEPH) (Tableau 6) (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). Le projet comprend deux phases : lors de la phase I, pour chaque fenêtre de 5000 paires de bases, au moins un SNP ayant une fréquence de 5% ou plus a été génotypé pour chacune des populations. Au total plus d'un million de SNPs ont été génotypés ; pour la phase II, grâce aux développements de technologies à plus haut débit, plus de 4.6 millions de SNPs additionnels ont été rajoutés (Altshuler *et al.*, 2010; Frazer *et al.*, 2007).

Populations	Samples
Nigeria (Yoruba; Ibadan)	30 trios à 90 individuals
US (CEPH)	30 trios à 90 individuals
China (Han)	45 unrelateds
Japan (Tokyo)	45 unrelateds
Total	270 individuals

Tableau 6. Les groupes de la population participant au projet HapMap.

1.2 Projet International 1000 Génomes

Le projet 1000 génomes a été lancé en 2008, l'objectif est de découvrir des informations précises sur tous les polymorphismes de l'ADN humain dans plusieurs populations. Plus précisément, le but est de caractériser plus de 95% des variants qui sont dans des régions génomiques accessibles aux technologies actuelles de séquençage à haut débit et qui ont une fréquence d'allèle de 1% ou plus dans chacun des cinq principaux groupes de la population (tableau 7). (<http://www.1000genomes.org>). Parce que les variants fonctionnels sont souvent trouvés dans les régions codantes et ont une fréquence réduite, donc, les allèles de fréquences inférieures à 1% (vers 0,1%) seront également catalogués dans cette étude.

Population	Pilot Samples	Phase 1 Samples	Final Phase Samples	Total
Esat Asian (ASN)	185	286	515	523
South Asian (SAN)	0	0	494	494
African (AFR)	208	246	669	691
European (EUR)	160	379	505	514
Americas (AMR)	0	181	352	355
Total	553	1092	2535	2577

Tableau 7. Les groupes de la population participant aux différentes phases du projet 1000 génomes.

Depuis 2008, les résultats se sont améliorés avec une plus grande profondeur de lecture et une plus grande visibilité de la variation génétique chez l'humain. Les variants détectés par le projet ne sont pas répartis uniformément sur le génome: certaines régions, tel l'antigène de leucocyte humain (human leukocyte antigen, HLA) et les régions subtélomériques, ont des taux élevés de variants, tandis que d'autres régions hautement conservées autour du chromosome 3p21, ont de très faibles niveaux de variants (Abecasis *et al.*, 2010).

2. Etude gènes candidats et CHC

De nombreuses études ont été entreprises en utilisant des gènes candidats présélectionnés avec des fonctions connues et liées au risque de la maladie. Etant donné que le foie est le plus grand organe métabolique du corps humain, les SNPs candidats principalement étudient ceux qui sont liés aux gènes codant pour des enzymes de métabolisation, tels que ceux de la famille des cytochromes P450 (CYP), des UDP-glucuronosyltransférases (UGT), et de l'hémochromatose (HFE); les gènes de l'inflammation, tels que l'interleukine (ILs), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α); et aussi les oncogènes (e.g. MDM2) (tableau 8) (Jin *et al.*, 2011).

Gene	Country (regions)	Sample size (cases/ controls)	Cases main background	Population-based controls background	Hospital-based controls background	Polymorphisms
HFE	Morocco	96/222	HCV	Healthy	No	rs1800562
	France	103/198	Alcoholic, HCV	No	LC	rs1800562
	Spain	196/181	Alcoholic, HCV	Healthy	No	rs1800562
	France	133/100	Alcoholic, HCV	No	LC	rs1800562
	Spain	77/359	Alcoholic, HCV, HBV	Healthy	LC	rs1800562
	Sweden	54/294	Not reported	Healthy	No	rs1800562
	UK	144/1508	Not reported	Healthy	No	rs1800562
	Germany	137/233	Alcoholic, HCV	Healthy	Alcoholic, HCV	rs1800562
	Austria	162/671	Alcoholic, HCV	Healthy and HCV	HCV	rs1800562
	UGT1A7	Korea	244/537	HBV, male	Healthy and HBV carriers, male	No
France		164/264	Alcoholic, virus	Healthy	LC (alcoholic or virus)	rs17868323,rs1692021
France		56/166	HCV, alcoholic, HBV	NR	Liver-transplanted patients	rs17868323,rs1692021
Taiwan		217/291	HBV, HCV	Healthy	No	rs17868323,rs1692021
Japan		122/218	HCV	Healthy	HCV carriers	rs17868323,rs1692021
Germany		59/70	HBV, HCV, alcoholic	No	LC (HBV or HCV or alcoholic)	rs17868323,rs1692021
MDM2		Morocco	96/222	HCV, HBV	Healthy	HCV
	Taiwan	58/138	HBV, HCV	Healthy	No	rs2279744
	Korea	287/296	HBV	No	HBV	rs2279744
	Japan	187/296	HCV	Healthy	HCV	rs2279744
	Turkey	110/110	HBV, HCV	Healthy	No	rs2279744
	IL-1B	Japan	209/656	HCV	No	HCV
Japan		49/251	HBV	Healthy	HBV	rs1143627
Taiwan		573/383	HBV	No	HBV	rs1143627
Japan		122/158	HCV	No	HCV	rs1143627
Japan		86/80	HCV	No	HCV	rs1143627
MnSOD	Morocco	96/222	HCV	Healthy	HCV	rs4880
	France	74/257	HCV (LC)	Healthy	HCV (LC)	rs4880
	France	69/195	Alcoholic	Healthy	Alcoholic	rs4880

Tableau 8. Les polymorphismes impliqués dans le CHC selon différentes études publiées.(Jin *et al.*, 2011).

Malgré cet effort, la plupart des études ont une taille d'échantillons insuffisante, et les résultats sont non reproductibles (Nahon *et al.*, 2007). Récemment, avec l'émergence des études d'association pangénomique (GWAS), la recherche des SNPs associées aux maladies ou à des réponses aux médicaments ont changé les perspectives de façon spectaculaire.

3. Etude d'association pangénomique et CHC

Les études GWAS cherchent à identifier les locus qui abritent les variants génétiques prédisposants à une maladie, en comparant la fréquence des allèles entre les cas et les témoins. Contrairement aux méthodes qui testent spécifiquement une ou plusieurs régions génétiques, les études GWAS s'intéressent à l'ensemble du génome. L'approche est donc dite « non-candidat présélectionné », contrairement aux études « gène candidat spécifique ». Les études GWAS peuvent identifier les SNPs et d'autres variants de l'ADN qui sont associés à une maladie, mais ne peuvent pas identifier les gènes de causalité.

Jusqu'à maintenant, de nombreux SNPs ont été rapportés comme étant associés au risque de CHC par les études GWAS, principalement dans des populations asiatiques sur des CHC liés au VHB et VHC (Chan *et al.*, 2011; Clifford *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2011; Li S. *et al.*, 2012; Miki *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010) (tableau 9).

Chr. (locus)	SNP	Ethnicity	Aetiology	Sample size		RAF		p- Combined	Odds ratio (OR)
				Case	Control	Case	Control		
6p21.33 (MICA)	rs2596542	Japanese	HCV	1394	5486	0.413	0.331	4.21E-13	1.39
22q12.3 (DEPDC5)	rs1012068	Japanese	HCV	922	2390	0.182	0.121	1.27E-13	1.75
8p12 (DLC1)	rs2275959	Chinese	HBV	500	728	0.47	0.41	5.19E-4	1.31
1p36.22 (KIF1B)	rs17401966	Chinese	HBV	1962	1430	0.807	0.723	1.7E-18	0.61
2q32.2 (STAT4)	rs7574865	Chinese	HBV	4319	4966	0.71	0.67	2.48E-10	1.21
6p21.3 (HLA-DQ)	rs9275319	Chinese	HBV	4319	4966	0.93	0.90	2.72E-17	1.49
21q21.3 (GRIK1)	rs455804	Chinese	HBV	5969	6190	0.30	0.34	5.24E-10	0.84
6p21.32 (HLA-D)	rs9272105	Chinese	HBV	5969	6190	0.51	0.45	5.24E-22	1.28
2q14.1 (DDX18)	rs2551677	Korean	HBV/HCV	206	336	0.311	0.118	1.41E-10	3.38

Tableau 9. Les polymorphismes impliquées dans les CHC identifiés par les études GWAS.

3.1 Les SNPs associés pour les CHC liés au VHB

a). *KIF1B*- rs17401966

La première étude GWAS concernant les CHC a été réalisée par Zhang et collaborateurs. Elle porte sur 440 794 SNP dans un groupe de population homogène de patients chinois infecté par le VHB, la moitié d'entre eux ont un cancer du foie (Zhang *et al.*, 2010). Suite à ce premier processus de sélection, les SNPs les plus associés au CHC ont ensuite été évalués dans cinq cohortes indépendantes supplémentaires, de 1 962 patients ayant un CHC, de 1 430 patients ayant une hépatite chronique B, et de 159 familles trios. Un SNP intronique (rs17401966, G>A) dans le gène *KIF1B* sur le chromosome 1p36.22 a été montré fortement associé au CHC liée au VHB (A= allèle à risque ; tableau 10). La région 1p36 est une région qui est souvent impliquée dans des pertes ou des gains chromosomiques dans de nombreux cancers, y compris le CHC, surtout dans le CHC lié au VHB (Bagchi *et al.*, 2008; Li S. P. *et al.*, 2001; Midorikawa *et al.*, 2009).

Case-controls	Cases (sample size) ^a	Controls (sample size) ^a	OR (95% CI)	P value
GWAS	8/100/240 (348)	26/141/192 (359)	0.53 (0.41–0.70)	5.8 × 10 ⁻⁶
Replication 1	5/86/185 (276)	24/109/133 (266)	0.49 (0.37–0.67)	3.5 × 10 ⁻⁶
Replication 2	26/181/300 (507)	21/101/93 (215)	0.58 (0.45–0.75)	3.9 × 10 ⁻⁵
Replication 3a	26/228/497 (751)	35/195/279 (509)	0.65 (0.54–0.79)	1.4 × 10 ⁻⁵
Replication 3b	12/141/275 (428)	32/169/239 (440)	0.66 (0.52–0.83)	4.4 × 10 ⁻⁴
Total	77/736/1497 (2310)	138/715/936 (1789)	0.62 (0.56–0.69)	3.4 × 10 ⁻¹⁹
Family trios ^b	T/U	χ ²		
Replication 4	49/74	5.08	0.66 (0.46–0.95)	0.024
Overall ^c			0.61 (0.55–0.67)	1.7 × 10 ⁻¹⁸

T/U : number of transmissions/nontransmissions of the rs17401966 (G) allele. ^a : Counts of GG/AG/AA genotypes in cases and controls, respectively. ^b : Number of family trios is 159. ^c : Combined total of case-controls with the family trios samples.

Tableau 10. Les résultats de l'association pour rs17401966 dans cinq populations cas-témoins et 159 trios familiaux. (Zhang *et al.*, 2010).

L'expression de protéine et l'ARNm du gène *KIF1B* ont été évalués par Zhang et collaborateurs dans les tissus tumoraux et non tumoraux. Une surexpression de la protéine *KIF1B* a été démontrée chez les patients qui ont des allèles GG par rapport aux patients avec des allèles AA dans les tissus non tumoraux. Une augmentation de la transcription du gène *KIF1B* a également été observée chez les patients porteurs d'allèle G. Ces résultats suggèrent que le SNP rs17401966 du gène *KIF1B* influence probablement l'hépatocarcinogénèse en agissant comme un suppresseur de tumeur.

b). STAT4- rs7574865

Un autre groupe de la recherche chinois a identifié deux locus de susceptibilité génétique pour le CHC lié au VHB dans des cohortes chinoises provenant de régions différentes (Jiang *et al.*, 2013). 2 514 porteurs chroniques du VHB (1 161 CHC et 1 353 contrôles) ont été initialement génotypés au cours de stade GWAS, suivie par une validation en 2 étapes entre 6 populations indépendantes de porteurs chroniques du VHB (4 319 cas et 4 966 contrôles en total). Les analyses combinées ont montré que le risque CHC était significativement associé à deux locis indépendants: rs7574865 (T/G) dans le 3^{ème} intron du gène *STAT4*, p-Meta = $2,48 \times 10^{-10}$, OR=1,21(1.14-1.28); et rs9275319 (G/A) à *HLA-DQ*, p-Meta= $2,72 \times 10^{-17}$, OR=1,49 (1.36-1.63) (tableau 11).

SNP	Allele ^a	Study	Population ^b	RAF			P_{all}^d	OR _{add} (95% CI) ^{e,f}	P_{add}^e	P_{het}^f
				Cases	Controls	OR _{all} (95% CI) ^{c,d}				
rs7574865	T/G	GWAS	Qidong	0.72	0.67	1.25 (1.11–1.41)	3.21×10^{-4}	1.27 (1.12–1.44)	1.53×10^{-4}	0.74
		Replication 1	Suzhou	0.71	0.67	1.19 (1.00–1.42)	4.69×10^{-2}	1.19 (1.00–1.42)	5.19×10^{-2}	
		Replication 2a	Shanghai	0.72	0.68	1.23 (1.07–1.41)	3.93×10^{-3}	1.21 (1.04–1.39)	1.06×10^{-2}	
		Replication 2b	Nanjing	0.71	0.68	1.17 (1.02–1.34)	2.45×10^{-2}	1.18 (1.03–1.35)	1.96×10^{-2}	
		Replication 2c	Beijing	0.71	0.68	1.14 (0.97–1.34)	1.23×10^{-1}	1.14 (0.95–1.37)	1.50×10^{-1}	
		Replication 2d	Henan	0.72	0.67	1.23 (1.03–1.46)	2.07×10^{-2}	1.12 (0.92–1.36)	2.74×10^{-1}	
		Replication 2e	Guangxi	0.74	0.68	1.33 (1.11–1.60)	1.88×10^{-3}	1.36 (1.12–1.64)	1.64×10^{-3}	
		Meta-analysis ^g					1.22 (1.15–1.29)	1.66×10^{-11}	1.21 (1.14–1.28)	
rs9275319	G/A	GWAS	Qidong	0.92	0.88	1.58 (1.31–1.92)	2.27×10^{-6}	1.60 (1.32–1.93)	1.11×10^{-6}	0.12
		Replication 1	Suzhou	0.92	0.89	1.53 (1.16–2.03)	2.84×10^{-3}	1.49 (1.13–1.96)	4.73×10^{-3}	
		Replication 2a	Shanghai	0.92	0.88	1.45 (1.17–1.80)	6.89×10^{-4}	1.41 (1.13–1.75)	2.05×10^{-3}	
		Replication 2b	Nanjing	0.93	0.87	1.84 (1.49–2.28)	1.61×10^{-8}	1.85 (1.49–2.30)	2.42×10^{-8}	
		Replication 2c	Beijing	0.93	0.90	1.49 (1.14–1.95)	3.32×10^{-3}	1.42 (1.08–1.88)	1.35×10^{-2}	
		Replication 2d	Henan	0.91	0.89	1.33 (1.01–1.73)	4.28×10^{-2}	1.28 (0.95–1.73)	1.06×10^{-1}	
		Replication 2e	Guangxi	0.94	0.93	1.10 (0.79–1.53)	5.74×10^{-1}	1.07 (0.78–1.48)	6.59×10^{-1}	
		Meta-analysis ^g					1.51 (1.38–1.66)	8.65×10^{-19}	1.49 (1.36–1.63)	

RAF : risk allele frequency (G allele for rs7574865 ; A allele for rs9275319).

Tableau 11. Les résultats de l'association pour rs 7574865 et rs 9275319 dans sept populations chinoises. (Jiang *et al.*, 2013).

Jiang et collaborateurs ont également constaté que l'allèle à risque G du rs7574865 était significativement associé à une baisse des taux d'ARNm de *STAT4* dans les tissus tumoraux et non tumoraux de 155 individus ayant un CHC lié au VHB (p=0,000 8 et 0,000 2, respectivement). Ils ont aussi démontré une expression de l'ARNm plus faible de *STAT4* dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus non tumoraux appariés (p= $2,33 \times 10^{-14}$). Cependant l'influence du rs9275319 sur l'expression de gène *HLA-DQ* n'a pas été démontrée.

En résumé, ces deux études GWAS chinoises sont bien désignées, avec un grand nombre de patients homogènes. Les polymorphismes révélés par ces études sont très intéressants, et les validations ultérieures dans des cohortes prospectives et des essais fonctionnels sont nécessaires.

3.2 Les SNPs associés pour les CHC liés au VHC

a). *MICA*-rs 2596542

Plus récemment, deux GWAS ont été réalisées sur les CHC liés au VHC chez des patients japonais. Dans la première étude (Kumar *et al.*, 2011), huit loci de susceptibilité ont été sélectionnés parmi 432 703 SNPs en comparant 721 patients ayant un CHC à 2 890 personnes saines de la population générale japonaise. Ensuite, ces résultats ont été validés dans une cohorte cas-témoins indépendante, qui est similaire à la série initiale, mais seulement un de ces huit loci (rs 2596542, T/C) dans la région 6p21.33 du gène *MICA* a été analysé. Le risque allèle T du rs 2596542 est plus fréquent chez les patients CHC et associé à un taux sérique inférieur de *MICA*, une protéine impliquée dans l'activation des cellules NK (nature killer cells) et les cellules T (CD8+) en réponse aux cellules infectées par des virus (Bauer *et al.*, 1999; Kohga *et al.*, 2008) (tableau 12).

SNP	Chr. (locus)	Stage	Case RAF	Control RAF	P	OR (95% CI)
rs2596542 (T/C)	6 (<i>MICA</i>)	GWAS ^a	0.388	0.331	4.50 × 10 ⁻⁶	1.34 (1.16–1.53)
		Replication ^a	0.413	0.331	8.62 × 10 ⁻⁹	1.44 (1.27–1.63)
		Combined ^a	0.400	0.331	4.21 × 10 ⁻¹³	1.39 (1.27–1.52)
		MH test			7.76 × 10 ⁻¹²	1.35 (1.24–1.47)

We analyzed 1,394 cases with HCC (721 in the GWAS and 673 in the replication) and 5,486 controls (2,890 in GWAS and 2,596 in replication). Chr., chromosome; RAF, risk allele frequency (allele T); OR, odds ratio for the minor allele calculated by considering the major allele as a reference; MH, Mantel-Haenszel.

^aP values and ORs are adjusted for age and gender by logistic regression analysis under an additive model.

Tableau 12. Les résultats d'association du rs2596542 dans le stade GWAS, le stade de réplication et de l'analyse combinée.(Kumar *et al.*, 2011).

Etant donné que les témoins de cette étude ne sont pas infectés par le VHC, les auteurs ont génotypé une série supplémentaire de 1 730 patients chroniques infectés par le VHC. La distribution des allèles est identique dans ce groupe d'hépatite chronique par rapport au groupe population saine. Par contre, il existe une différence significative entre le groupe hépatite chronique et le groupe des patients CHC. Par conséquent, le risque allèle T

du rs 2596542 n'est pas associé à la susceptibilité d'hépatite C chronique, mais plutôt impliqué dans le processus de transformation maligne (tableau 13).

Subjects	RAF	(Comparison) P^a	OR ^a	95% CI
Healthy	0.331			
CHC	0.333	(Healthy vs. CHC) 0.61	1.02	0.94–1.10
HCC	0.398	(CHC vs. HCC) 3.13×10^{-8}	1.36	1.22–1.51

CHC : Chronic hepatitis C ; HCC : Hepatocellular Carcinoma.

Tableau 13. Le risque allèle T du rs 2596542 est impliqué dans le processus de transformation maligne de patients ayant une hépatite C chronique par rapport aux patients japonais ayant un CHC.(Kumar *et al.*, 2011)

b). *DEPDC5*- rs1012068

La deuxième étude GWAS (Miki *et al.*, 2011) concernant le CHC lié au VHC a également été réalisée au Japon en utilisant la même procédure que la première étude. Les auteurs ont identifié un loci de susceptibilité au CHC (rs1012068, T/G) dans la région 22q12 du gène *DEPDC5*, dans une cohorte de patients infectés par le VHC (stade de GWAS: 212 cas et 765 contrôles; stade de validation: 710 cas et 1 625 contrôles) (tableau 14).

SNP	Study	Allele (1/2)	Case			Control			MAF		OR	95% CI ^a	P^b
			11	12	22	11	12	22	Case	Control			
rs1012068	GWAS	T/G	138	68	6	624	136	5	0.189	0.095	2.20	1.64–2.97	8.05×10^{-8}
	Replication		470	221	19	1262	334	29	0.182	0.121	1.63	1.37–1.93	2.41×10^{-8}
	Combined studies ^d										1.75	1.51–2.03	1.27×10^{-13}

Tableau 14. Les résultats d'association du rs 1012068 dans le stade GWAS, le stade de réplication et de l'analyse combinée.(Miki *et al.*, 2011).

La délétion de la région 22q12 a été rapportée dans les tumeurs malignes de glioblastome cérébrale. Cependant, la fonction du *DEPDC5* est inconnue (Seng *et al.*, 2005). Bien que Miki et collaborateurs ont révélé une surexpression d'ARNm de *DEPDC5* dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus non tumoraux, aucune corrélation génotypique n'a été observée.

En résumé, grâce à des analyses complètes et précises du génome humain, de nouvelles mutations et des altérations de la voie de signalisation impliquées dans le développement du CHC sont en cours d'être analysées. Cette information est essentielle pour l'établissement de nouveaux biomarqueurs et aussi le développement de la thérapie moléculaire ciblée pour le traitement du CHC. Aussi, les études GWAS seront très importantes pour identifier les polymorphismes spécifiquement liés à certains groupes de population qui ont un risque élevé pour développer un CHC.

CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE ET OBJECTIFS

Mon projet de recherche s'est inscrit dans la continuité des résultats précédemment obtenus au sein du laboratoire sur la classification transcriptomique du CHC, surtout nous avons remarqué un enrichissement des CHC liés à l'infection VHB dans le groupe transcriptomique G1-G2.

J'ai d'abord étudié, dans une série plus élargie de CHC liés au VHB, par rapport aux CHC non liés au VHB, les interactions entre les altérations génomiques virales et hépatocytes et leurs relations avec les caractéristiques cliniques, pour mieux comprendre le rôle du VHB dans l'hépatocarcinogénèse.

Ensuite, j'ai évalué des influences de 4 SNPs, qui ont été rapportés comme étant associés au risque de CHC, principalement dans des populations asiatiques par les études GWAS, dans 3 cohortes distinctes des patients Européens selon deux approches, longitudinales et cas-témoins.

RESULTATS

I. Caractérisation moléculaire des CHC liés au VHB, par rapport au CHC non lié au VHB

En analysant les CHC réséqués en France, nous avons identifié les caractéristiques moléculaires spécifiques liées à l'infection du VHB, par rapport aux CHC liés aux autres étiologies: (1). les mutations inactivatrices d'*HBx* sont sélectionnées dans les tissus tumoraux de CHC liés au VHB, suggérant qu'il existe une pression de sélection spécifique au cours de l'hépatocarcinogénèse. (2). chez les patients ayant un faible nombre de copies d'ADN VHB par cellule dans le foie non-tumoral, nous avons identifié une corrélation avec les facteurs de risque supplémentaires (e.g. l'infection par le virus de l'hépatite C, la consommation excessive d'alcool ou la stéato-hépatite non alcoolique), suggérant un effet coopératif avec le VHB pour la carcinogénèse hépatique dans ces cas là. (3). les mutations *TP53* associées avec des conséquences différentes pour le pronostic des patients selon leur statut viral (VHB ou non-VHB). La relation avec un mauvais pronostic a été strictement liée aux patients réséqués avec une infection par le VHB. (4). les CHC liés au VHB montrent plus fréquemment de phénotypes progéniteurs par rapport aux CHC non liés au VHB, avec une surexpression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et codant pour les protéines onco-fœtales/ progénitrices.

En conclusion, nos résultats ont montré que les CHC liés ou non au VHB ont des caractéristiques moléculaires différentes à la suite d'une sélection différente des altérations génomiques et transcriptomiques. Par conséquent, une classification moléculaire du CHC est nécessaire pour aboutir à la prise en charge personnalisée des patients en tenant compte de la diversité moléculaire des tumeurs. L'identification de marqueurs pronostiques et des cibles thérapeutiques dans le CHC doit être validée dans des cohortes de patients avec un statut viral différent.

Article 1

Integration of tumor and viral genomic characterizations in HBV related hepatocellular carcinomas.

Giuliana Amaddeo*, Qian Cao*, Yannick Ladeiro, Sandrine Imbeaud, Jean-Charles Nault, Daphne Jaoui, Yann Gaston Mathe, Christophe Laurent, Alexis Laurent, Paulette Bioulac-Sage, Julien Calderaro, Jessica Zucman-Rossi.

GUT, May 2014, doi:10.1136/gutjnl-2013-306228.

* co-first authors

II. Etude par génotypage de 3 cohortes de patients Européens selon deux approches, longitudinales et cas-témoins

Dans la littérature, la première étude GWAS qui étudiait directement le risque de développement du CHC a été réalisée dans une population chinoise infectée par le VHB. Un SNP intronique (rs17401966, G/A) dans le gène *KIF1B* a été montré fortement associé au CHC liée au VHB. Après, un autre groupe a identifié rs7574865 (G/T) du gène *STAT4* comme locus de susceptibilité génétique pour le CHC lié au VHB dans des cohortes chinoises provenant de régions différentes. Presque en même temps, deux études GWAS ont été réalisées sur les CHC liés au VHC chez des patients japonais. La première étude a identifié un SNP rs 2596542 (C/T) dans le gène *MICA* et la deuxième a identifié un loci de susceptibilité au CHC (rs1012068, T/G) dans le gène *DEPDC5*. Ces différentes études GWAS asiatiques sont bien désignées, avec un grand nombre de patients homogènes (tableau 15).

Chr. (locus)	SNP	Ethnicity	Aetiology	Risk Allele	Sample size		RAF		Combined p-value	Odds ratio (OR)	Authors
					Case	Control	Case	Control			
1p36.22 (KIF1B)	rs17401966	Chinese	HBV	A	1962	1430	0.807	0.723	1.7E-18	0.61	Zhang et al, Nat Genet, 2010
2q32.2 (STAT4)	rs7574865	Chinese	HBV	G	4319	4966	0.71	0.67	2.48E-10	1.21	Jiang et al, Nat Genet, 2013
6p21.33 (MICA)	rs2596542	Japanese	HCV	T	1394	5486	0.413	0.331	4.21E-13	1.39	Kumar et al, Nat Genet, 2011
22q12.3 (DEPDC5)	rs1012068	Japanese	HCV	G	922	2390	0.182	0.121	1.27E-13	1.75	Miki et al, Nat Genet, 2011

Tableau 15. Les 4 SNPs impliquées dans les CHC identifiés par les études GWAS.

L'objectif de notre étude est de tester l'influence de ces 4 SNPs sur le risque de développement du CHC, dans 3 cohortes distinctes de patients européens selon deux approches : une approche cas-témoins (700 CHC réséqués versus une population générale) et longitudinale (deux cohortes prospectives).

Les résultats apparaissent plus compliqués que prévus. Dans notre série de cas-témoins, trois SNPs parmi les 4 testés (*STAT4*-rs7574865, *KIF1B*-rs17401966, *MICA*-rs2596542) ont montré des associations alléliques chez les patients présentant un CHC liés à la même étiologie que celle décrite dans la littérature. En revanche, dans nos deux cohortes prospectives françaises avec des patients cirrhotique d'étiologies VHC ou alcoolique, nous avons remarqué pour deux SNPs parmi les 4 testés (*STAT4*-rs7574865 et *MICA*-rs2596542), des corrélations inverses des associations alléliques avec le risque de développement d'un CHC, par rapport à celles qui ont été trouvées dans la littérature.

En conclusion, les distributions alléliques semblent varier selon l'étiologie de la pathologie hépatique. Ces résultats soulignent la complexité des études de prédisposition génétique au CHC. Elles doivent prendre en considération l'origine géographique des patients ainsi que les facteurs de risque associés.

Article 2

Analysis of 4 candidate SNPs and the risk of hepatocellular carcinoma in two French prospective cohorts of 513 cirrhotic patients and 700 resected HCC.

En préparation

Analysis of 4 candidate SNPs and the risk of hepatocellular carcinoma in two French prospective cohorts of 513 cirrhotic patients and 700 resected HCC.

Abstract

Background and aim. Recently, Genome Wide Association Studies (GWAS) have reported the associations between genetic variants and the risk of hepatocellular carcinoma (HCC). The aim of the study was to evaluate the influence of four polymorphisms on the risk of HCC occurrence in two European cohorts of patients with cirrhosis, and in one independent series of patients with resected HCC.

Methods. Four SNPs were selected: rs7574865 in the STAT4 gene and rs17401966 in KIF1B gene previously reported as associated with HCC in Chinese patients infected by hepatitis B virus (HBV). rs2596542 in MICA gene and rs1012068 in DEPDC5 gene were found associated with HCC in HCV infected Japanese patients. Allelic distributions of the 4 SNPs were analyzed in a series of 700 resected HCC samples (cases) with various aetiologies and compared to 580 European individuals from the international projects of HapMap and 1000 genomes. To evaluate the occurrence of HCC, we genotyped two cohorts of cirrhotic patients related to HCV infection (HCV cohort=267 patients) and high alcohol consumption (alcoholic cohort=246 patients).

Results. By comparing the 700 resected HCC patients to the general European population, we confirmed the higher prevalence of the G-allele of STAT4-rs7574865 specifically in the HBV infected patients (87% vs. 77%, $p=0,001$) and of the A-allele of KIF1B-rs17401966 (85% vs. 68%, $p<0,0001$). These enrichments were not found in HCCs related to other aetiologies and strikingly, the opposite T-allele of STAT4-rs7574865 was associated with the occurrence of HCC in our HCV cohort (OR=1,69 [1,09-2,59], $p=0.02$). We also confirmed the enrichment of T-allele of MICA-rs2596542 in HCC patients infected by HCV compared to the European population (46% vs. 36%, $p=0,003$), but not in HCC patients with other aetiologies. No significant association with HCC occurrence was identified in the HCV cohort whereas the opposite C-allele of MICA-rs2596542 was associated with the occurrence of HCC in the alcoholic cohort (OR=1.68[0.96-2.91], $p=0.03$). Finally, allelic distributions of DEPDC5-rs1012068 was not different between the resected HCV HCC patients compared to the general European population, whereas the G-allele was enriched in resected HBV HCC patients and the opposite T-allele was enriched in resected alcoholic HCC patients; but no significant associations were identified in neither of the two prospective cohorts.

Conclusion. Influence of the polymorphism in the risk of HCC development varies according to the aetiology of the liver disease. Ours findings underscore the complexity of the genetic

predisposition in hepatocarcinogenesis. Further studies have to be carried out in larger prospective cohorts considering both the geographical origin of the patients and the associated risk factors.

Introduction

Liver cancer is the fifth most frequently diagnosed cancer worldwide and the second most frequent cause of cancer death (<http://globocan.iarc.fr>). Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for between 85% and 90% of primary liver cancers. A variety of risk factors for HCC have been reported, including hepatitis B (HBV) and C viruses (HCV), aflatoxin B1, alcohol consumption, non-alcoholic fatty liver disease, and hemochromatosis (El-Serag H.B., 2011). Incidence of HCC varies around the world, largely reflecting the distribution of HBV and HCV infection. As HBV infection is highly prevalent in many Asian (particularly in China) and Africa countries, it is the most common aetiology of HCC in these regions; whereas in many developed countries, including Japan, HCV infection is the most common risk factor for HCC (Chen *et al.*, 2011; Higuchi *et al.*, 2002). Furthermore, increasing evidences in molecular genetics indicate that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in immune response and tumorigenesis related genes are associated with susceptibility to HCC (Jin *et al.*, 2011). In contrast to the older candidate gene approach, the Genome-Wide Association Studies (GWAS) not only investigates the region around candidate genes with a known or predicted role in disease, but also investigates across the entire genome using an SNP array, which simultaneously genotypes hundreds of thousands to millions of marker SNPs unbiasedly (Manolio, 2010).

Recently, several GWAS studies from Asia have identified new loci associated with the risk of HCC. The first Chinese study (Zhang *et al.* 2010) found one susceptibility locus (rs17401966) in *KIF1B* gene at chromosome 1p36.22, and the second Chinese study (Jiang *et al.* 2013) identified rs7574865 in the *STAT4* gene at chromosome 2q32.2–2q32.3, as associated with the risk of HCC development in HBV patients. The Japanese GWAS conducted by Kumar *et al.* identified a SNP rs2596542 associated with HCV-related HCC, which is located 4.7 kb upstream of *MICA* gene on chromosome 6p21.33. Moreover, the second GWAS performed by Miki *et al.* identified a susceptibility locus rs1012068 closed to *DEPDC5* gene, as associated with HCC risk in HCV-infected patients in Japan.

The aim of this study is to evaluate the effect of the 4 SNPs from the GWAS studies in a series of patients with resected HCC, and in two distinct longitudinal cohorts of followed-up patients with cirrhosis, that were regularly screened for liver cancer, on the risk of HCC occurrence in European population.

Materials and methods

Subjects

The two cirrhosis cohorts

The subjects in these settings included all the patients who were consecutively referred to the liver unit of Jean Verdier Hospital for diagnosis and management of cirrhosis between January 1999 and December 2007, who fulfilled the following inclusion criteria: (1) histologically proven cirrhosis, whatever the time of biopsy; (2) no infection from the human immunodeficiency virus or hepatitis B virus; (3) no evidence of HCC at the time of inclusion as judged by negative ultrasonographic findings, and a serum α -fetoprotein (AFP) <50 ng/ml; (4) residence in France; (5) acceptance of a regular follow-up and periodical HCC screening; (6) Caucasian origin; and (7) written informed consent for the use of frozen DNA.

The patients were considered as two distinct cohorts according to the aetiologies of their liver disease. The first cohort comprised patients with HCV-related cirrhosis who were defined as (1) absence of past or present daily alcohol intake; (2) chronic infection by HCV defined by positive serum HCV RNA; and (3) absence of other causes of liver disease. A total of 267 patients were included in this cohort and at the censored time, 87 patients among them developed HCC. The second cohort included patients with alcoholic cirrhosis, who were defined by several parameters such as (1) daily excessive alcohol consumption (>80g per day in males and >60 g per day in females for at least 10 years); (2) no HCV infection, as defined by negative serum HCV antibodies; and (3) absence of other causes of liver disease. A total of 246 patients were included in this cohort and at the censored time, 53 patients among them developed the HCC. The clinical data of patients was blindly extracted and is summarized in Table 1.

Clinical outcome	HCV cohort	Alcoholic cohort	p-value
Cirrhosis cohorts n=513	n=267(%)	n=246(%)	
Age(yr)	56.6±1.0	57.6±1.0	
Male gender	148(55)	196(80)	<0.0001*
BMI(kg/m ²)	27.6±0.5	27.7±0.6	
Diabetes	73(27)	75(30)	
Child-Pugh score	5.3±0.1	7.9±0.3	<0.0001**
Platelets(10 ³ /mm ³)	139.9±5.6	139.2±5.6	
HCC during follow-up	87(33)	52(21)	0.004*
Death	80(30)	96(39)	0.03*
HCC-related	51(19)	39(16)	
Liver-related	22(8)	53(22)	
Extra liver-related	7(3)	4(2)	

Shown are p values obtained from Chi-Square (*) and Mann-Whitney (**) tests (just the significant p values have been noted in the table). BMI:Body Mass Index.

Table 1. Clinical outcome of the patients in cirrhosis cohorts.

The resected HCC cohort

This population consisted of 700 HCC cases of different aetiologies. Tissue samples were obtained after surgical resection from two French medical care centers in Bordeaux and Creteil. All samples were immediately cryopreserved at -80 °C after surgical treatment. Demographic features and clinical-pathological records of these patients were prospectively collected in dedicated databases. This set of data was blindly extracted and is summarized in Table 2. All patients had given their informed consent according to French law and the Saint Louis Hospital's ethic committee.

Clinical data	HCV	HBV	OH	NV/VA	p-value
Resected HCC n=700(%)	n=160(23)	n=117(17)	n=208(29)	n=215(31)	
Age(yr)	59.4±11.0	53.6±13.4	64.8±9.2	62.8±12.8	< 0,0001*
Male gender	120(75)	97(83)	195(94)	169(79)	< 0,0001**
Metavir classification					
Non-cirrhosis (F0-F3)	47(29)	51(44)	94(45)	166(77)	< 0,0001**
Cirrhosis (F4)	113(71)	66(56)	114(55)	49(23)	

OH:alcoholic; NV/NA: non-viral/ non-alcoholic aetiologies. Shown are p values obtained from Kruskal-wallis (*) and Chi-Square (**) tests.

Table 2. Clinical data of the patients in resected HCC cohorts.

SNP Selection and Genotyping

DNA samples of the two cirrhosis cohorts were prepared from frozen blood samples stored in the Jean Verdier Hospital biobank. High molecular weight genomic DNA was isolated using a QIAGEN Blood DNA Kit anion-exchange resin (Qiagen, Courtaboeuf, France). DNA samples of the resected HCC cohort was extracted from frozen tissue, in accordance with standard procedures (Boyault *et al.*, 2007).

Four SNPs were selected according to the previously published GWAS studies: rs7574865 in *STAT4* gene, rs17401966 in *KIF1B* gene, rs2596542 in *MICA* gene, and rs1012068 in *DEPDC5* gene. Genotyping was performed by allelic discrimination using TaqMan probes assay (life technologies assay ID: 29882391; 1892822; 27301153 and 27100398) following the standard protocol. All the samples were successfully genotyped (about 3% samples have been genotyped a second time in order to get the genotypes).

Statistical Analysis

Qualitative variables were compared using Fisher's exact test, Chi-squared test, while quantitative variables were compared using the non-parametric Kruskal–Wallis test. The Kaplan–Meier method was used to estimate the occurrence of HCC for each parameter observed at enrolment; death was considered as an outcome in the experiment. The distributions of death and HCC were compared with the log-rank test. Statistical analyses were performed using the SAS System Package version 8.02 (SAS Institute, Cary, NC). All reported p values are two-tailed. Associations were considered statistically significant at a two-tailed α of 0.05.

Results

Allele frequency of the rs7574865, rs17401966, rs2596542 and rs1012068 in patients with resected HCC compared to European individuals

The demographic details of the resected HCC patients enrolled in the study are shown in Table 2. The risk factors of HCC were mainly HBV infection (17%), HCV infection (23%) and alcohol intake (29%), with 31% patients of non-viral/ non-alcoholic aetiologies. The average age for the HBV associated HCC patients were much more younger than alcoholic HCC patients (53 vs. 65). Male patients were particularly predominant (94%) in the group of alcoholic HCC patients compared to patients of others aetiologies. Most HCV related HCC patients have developed HCC in a cirrhosis liver (71%) and 77% patients of non-viral/non-alcoholic aetiologies developed HCC in a non-cirrhosis liver. The controls subjects were composed by 580 European individuals analyzed in the international HapMap project (113 CEU+ 88 TSI corresponding to the combined panel of Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection and Tuscans in Italy) and 1000 genomes project phase I (379 European).

The genotype distributions and allelic frequencies of the 4 SNPs were represented in Table 3. As described in the original GWAS, when compared with the general European population, STAT4-rs7574865 G allele was significantly enriched in the HBV related HCC, but not with the HCC of others etiologies. Indeed the frequency of the G allele was 87% in HBV-related HCC patients vs. 77% in general European population ($p=0.001$, OR=1.97, 95% CI=1.32-2.93). Similarly, the frequencies of the KIF1B-rs17401966 A allele was also enriched in the HBV related HCC with a frequency at 85% in HBV related HCC patients vs. 68% in controls ($p<0.0001$, OR=2.54, 95% CI=1.74-3.69). This enrichment was not found in HCC related to other etiologies. The T allele of MICA-rs2596542 was 46% in the HCV related HCC compared with 36% in the control group with a significant p value ($p=0.003$, OR=1.47, 95% CI=1.14-1.89). For DEPDC5-rs1012068, the results were different from what was expected: we did not found an enrichment of G allele in the HCV related HCC, whereas it was enriched in HBV related HCC (41%) compared to the control group (27%) ($p<0.0001$, OR=1.93, 95% CI=1.45-2.59); more surprisingly, it was decreased in the alcoholic HCC patients (18%) ($p=0.0003$, OR=0.59, 95% CI=0.44-0.78). Altogether these results showed allelic enrichment for polymorphism in STAT4, KIF1B and MICA in the HCC patients presenting the same risk factor than into the initial study.

STAT4-rs7574865	G**/T	Number	GG	GT	TT	G(%)	T(%)	p Value*	OR(95%CI)	
HapMap+1000Genomes	Total	578	346	197	35	889(77)	267(23)			
	HCV	160	106	45	9	257(81)	63(19)	0.22	1.25(0.92-1.71)	
	OH	208	130	71	7	331(79)	85(21)	0.37	1.14(0.86-1.50)	
	700 resected HCC	HBV	117	89	25	3	203(87)	31(13)	0.001	1.97(1.32-2.93)
	NV/NA	215	123	76	16	322(75)	108(25)	0.44	0.90(0.69-1.16)	
Total	700	448	217	35	1113(80)	287(21)	0.12	1.16(0.96-1.40)		
KIF1B-rs17401966	A**/G	Number	AA	AG	GG	A(%)	G(%)	p Value*	OR(95%CI)	
HapMap+1000Genomes	Total	580	280	234	66	794(68)	366(32)			
	HCV	160	86	58	16	230(72)	90(28)	0.27	1.18(0.90-1.55)	
	OH	208	97	92	19	286(69)	130(31)	0.92	1.01(0.80-1.29)	
	700 resected HCC	HBV	117	88	22	7	198(85)	36(15)	<0.0001	2.54(1.74-3.69)
	NV/NA	215	99	99	17	297(69)	133(31)	0.86	1.02(0.81-1.31)	
Total	700	370	271	59	1011(72)	389(28)	0.04	1.20(1.01-1.42)		
MICA-rs2596542	C/T**	Number	CC	CT	TT	C(%)	T(%)	p Value*	OR(95%CI)	
HapMap+1000Genomes	Total	580	226	287	67	739(64)	421(36)			
	HCV	160	51	72	37	174(54)	146(46)	0.003	1.47(1.14-1.89)	
	OH	208	79	101	28	259(62)	157(38)	0.63	1.06(0.84-1.34)	
	700 resected HCC	HBV	117	50	38	29	138(59)	96(41)	0.19	1.22(0.91-1.63)
	NV/NA	215	86	104	25	276(64)	154(36)	0.92	0.98(0.77-1.23)	
Total	700	266	315	119	847(61)	553(40)	0.24	1.10(0.94-1.30)		
DEPDC5-rs1012068	T/G**	Number	TT	TG	GG	T(%)	G(%)	p Value*	OR(95%CI)	
HapMap+1000Genomes	Total	580	305	239	36	849(73)	311(27)			
	HCV	160	82	61	17	225(70)	95(30)	0.34	1.15(0.88-1.51)	
	OH	208	141	60	7	342(82)	74(18)	0.0003	0.59(0.44-0.78)	
	700 resected HCC	HBV	117	45	47	25	137(59)	97(41)	<0.0001	1.93(1.45-2.59)
	NV/NA	215	112	88	15	312(73)	118(27)	0.84	1.03(0.81-1.32)	
Total	700	380	256	64	1016(73)	384(27)	0.76	1.03(0.86-1.23)		

OH:alcoholic; NV/NA: non-viral/ non-alcoholic aetiologies. * The p value is calculated by Chi-Square test in comparing the allelic distributions between the resected HCC and the data from HapMap and 1000 genomes. **Risk allele in the initial GWAS study. OR value in red color: the same risk allele compared to the initial GWAS study; OR value in green color: risk allele is the opposite one compared to the initial GWAS study.

Table 3. Associations between the allele frequency of GWAS-identified SNPs and the risk of different aetiologies related HCC compared with the general European population.

Genotyping results of the 4 SNPs in the prospective cohorts of cirrhotic patients

A total of 513 patients were enrolled in the two prospective cohorts of cirrhotic patients (Table 1): 267 had HCV-related cirrhosis and 246 had alcoholic cirrhosis. Alcoholic cirrhosis patients were more frequently male (80% vs. 55%, $p < 0.0001$) with a more severe liver disease at inclusion time compared to HCV-infected patients (mean Child–Pugh score: 7.9 ± 0.3 vs. 5.3 ± 0.1 , $p < 0.0001$). The patients with alcoholic cirrhosis also have an increased death ratio compared to HCV-infected patients (39% vs. 30%, $p = 0.03$) during follow-up, and an apparent relatively lower occurrence of HCC as compared to HCV-infected patients (21% vs. 33%, $p = 0.004$).

The genotype distributions and allelic frequencies of the 4 SNPs were first analyzed in the total cohort of 513 patients and were represented in Table 4. None of the four SNPs was

significant between the cirrhotic patients and the patients who have developed an HCC during the follow-up times.

STAT4-rs7574865	G**/T	Number	GG	GT	TT	G(%)	T(%)	p Value*
Cirrhotic patients	HCV+OH	374	247	117	10	611(82)	137(18)	0.48
HCC patients	HCV+OH	139	88	45	6	221(79)	57(21)	
KIF1B-rs17401966	A**/G	Number	AA	AG	GG	A(%)	G(%)	p Value*
Cirrhotic patients	HCV+OH	374	198	145	31	541(72)	207(28)	0.28
HCC patients	HCV+OH	139	77	57	5	211(76)	67(24)	
MICA-rs2596542	C/T**	Number	CC	CT	TT	C(%)	T(%)	p Value*
Cirrhotic patients	HCV+OH	374	123	193	58	439(59)	309(41)	1.09
HCC patients	HCV+OH	139	53	63	23	169(61)	109(39)	
DEPDC5-rs1012068	T/G**	Number	TT	TG	GG	T(%)	G(%)	p Value*
Cirrhotic patients	HCV+OH	374	188	144	42	520(70)	228(30)	0.65
HCC patients	HCV+OH	139	70	58	11	198(72)	80(28)	

* The p value is calculated by Chi-Square test. OH:alcoholic. ** Risk allele in the initial GWAS study.

Table 4. Associations between the allele frequency of GWAS-identified SNPs and HCV/OH related HCC and cirrhosis in an European population.

Secondly, we have analyzed the rate of HCC occurrence using the Kaplan–Meier method in the total cohort of 513 patients. But none of the four SNPs significantly influence the risk of HCC occurrence in cirrhosis patients with mixed etiologies (HCV+OH) (Supplementary Figure 1).

Risk assessment of HCC in the prospective HCV cohort of cirrhotic patients related to the 4 SNPs

In the HCV cohort of patients, genotype distributions and allelic frequencies of the 4 SNPs were analyzed and represented in Table 5. In contrast to the GWAS study, the Kaplan–Meier analysis (Figure 1) showed that during follow-up times, patients bearing at least one copy of the T-allele variant had a higher rate of HCC occurrence when compared to patients with 2 G-allele ($p=0.02$) of STAT4-rs7574865. Strikingly, it is the opposite allele that was identified associated with the risk of HBV related HCC (Jiang *et al.*, 2013). The remaining 3 SNPs loci, rs17401966, rs2596542 and rs1012068, did not significantly influence the risk of HCC occurrence in HCV-related cirrhosis patients (Supplementary Figure 2).

STAT4-rs7574865	G**/T	Number	GG	GT	TT	G(%)	T(%)	p Value*
Cirrhotic patients	HCV	180	126	49	5	301(84)	59(16)	0.09
HCC patients	HCV	87	50	35	2	135(78)	39(22)	
KIF1B-rs17401966	A**/G	Number	AA	AG	GG	A(%)	G(%)	p Value*
Cirrhotic patients	HCV	180	106	65	9	277(77)	83(23)	1.00
HCC patients	HCV	87	51	32	4	134(77)	40(23)	
MICA-rs2596542	C/T**	Number	CC	CT	TT	C(%)	T(%)	p Value*
Cirrhotic patients	HCV	180	57	95	28	209(58)	151(42)	0.86
HCC patients	HCV	87	28	43	16	99(57)	75(43)	
DEPDC5-rs1012068	T/G**	Number	TT	TG	GG	T(%)	G(%)	p Value*
Cirrhotic patients	HCV	180	89	75	16	253(70)	107(30)	1.00
HCC patients	HCV	87	41	40	6	122(70)	52(30)	

* The p value is calculated by Chi-Square test. ** Risk allele in the initial GWAS study.

Table 5. Associations between the allele frequency of GWAS-identified SNPs and HCV-related HCC and cirrhosis in an European population.

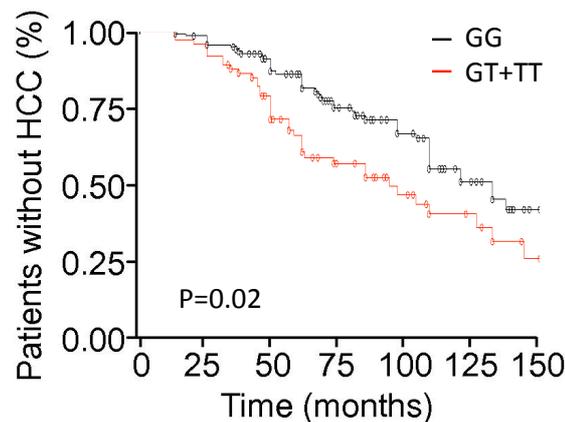


Figure 1. Influence of STAT4 rs7574865 genotypes (represented by different colors) on the risk of HCC occurrence (T=risk allele) in the cohort of HCV related cirrhotic patients (according to the Kaplan–Meier method). STAT4 rs7574865 genotypes influence the risk of HCC occurrence when divided into two groups (GG vs. GT+TT): OR = 1.69 [1.09–2.59], first quartile time to HCC occurrence: 96 vs. 55 months for rs7574865 (GG) and (GT+TT) genotypes, respectively; log-rank=0.02.

Risk assessment of HCC in the prospective alcoholic cohort of cirrhotic patients related to the 4 SNPs

In the alcoholic cohort of patients, genotype distributions and allelic frequencies of the 4 SNPs were analyzed and represented in Table 6. In contrast to the GWAS study, the Kaplan–Meier analysis (Figure 2) showed that during follow-up times, patients bearing at

least one copy of the “at risk” MICA-rs2596542 T-allele variant (Kumar *et al.*, 2011) had a lower rate of HCC occurrence when compared to patients with homozygous C-allele in our study ($p=0.03$). The remaining 3 SNP loci, rs17401966, rs7574865 and rs1012068, did not significantly influence the risk of HCC occurrence in alcoholic cirrhosis patients (Supplementary Figure 3).

STAT4-rs7574865	G**/T	Number	GG	GT	TT	G(%)	T(%)	p Value*
Cirrhosis patients	OH	194	121	68	5	310(80)	78(20)	0.61
HCC patients	OH	52	38	10	4	86(83)	18(17)	
KIF1B-rs17401966	A**/G	Number	AA	AG	GG	A(%)	G(%)	p Value*
Cirrhosis patients	OH	194	92	80	22	264(68)	124(32)	0.29
HCC patients	OH	52	26	25	1	77(74)	27(26)	
MICA-rs2596542	C/T**	Number	CC	CT	TT	C(%)	T(%)	p Value*
Cirrhosis patients	OH	194	66	98	30	230(59)	158(41)	0.17
HCC patients	OH	52	25	20	7	70(67)	34(33)	
DEPDC5-rs1012068	T/G**	Number	TT	TG	GG	T(%)	G(%)	p Value*
Cirrhosis patients	OH	194	99	69	26	267(69)	121(31)	0.47
HCC patients	OH	52	29	18	5	76(73)	28(27)	

* The p value is calculated by Chi-Square test. OH:alcoholic. ** Risk allele in the initial GWAS study.

Table 6. Associations between the allele frequency of GWAS-identified SNPs and alcoholic HCC and cirrhosis in an European population.

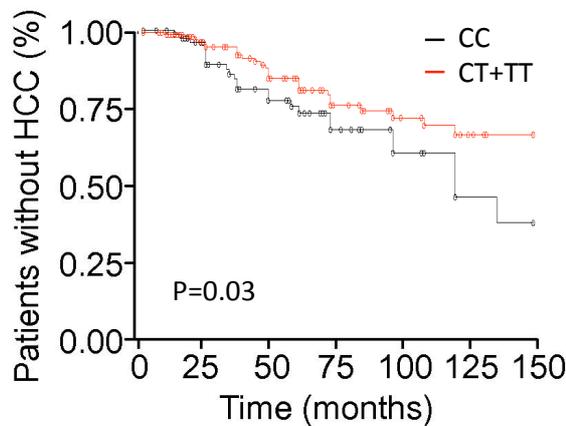


Figure 2. Influence of MICA rs2596542 genotypes (represented by different colors) on the risk of HCC occurrence (C=risk allele) in the cohort of alcoholic cirrhosis patients (according to the Kaplan–Meier method). MICA rs2596542 genotypes influence the risk of HCC occurrence when divided into two groups (CC vs. CT+TT); OR=1.68[0.96–2.91]; first quartile time to HCC occurrence: 60 vs. 84 months for rs7574865 (CC) and (CT+TT) genotypes, respectively; log-rank=0.03.

Discussion

In this study, we attempted to replicate, in an European population, the associations between 4 SNPs loci that were previously identified in several GWAS studies, with the risk of HCC occurrence and our results are contrasting.

Indeed, the previously published study have identified STAT4 as the genetic susceptibility loci for HBV-induced HCC in a Chinese cohort, based on a three-stage GWAS study utilizing seven case-control populations, in which the risk G-allele was increased in the HCC compared to the chronic hepatitis B controls (71% vs. 67%, p -combined=2.48X10⁻¹⁰). In accordance with this study, our results confirmed that the STAT4-rs7574865 is associated with the HBV induced HCC in our series of 700 resected HCC compared to the general European population (Table 3). As we have no available HBV related prospective cohort, we tried to test this SNP in our HCV related cirrhosis cohort. Surprisingly, we noticed a protective role for the 2 G-allele homozygotes in the occurrence of HCC, which is in contrast with the result of the Chinese GWAS study (Figure 1). Additionally, in this Chinese study, Jiang and collaborators have shown that the SNP rs7574865 influence the expression of STAT4 and this expression were significantly lower in tumor tissues compared to non-tumor tissues. The SNP rs7574865 has been reported as a genetic factor for the susceptibility to various autoimmune diseases including primary biliary cirrhosis (Hirschfield *et al.*, 2009; Remmers *et al.*, 2007). The minor allele T of rs7574865 has been demonstrated to be more sensitive to the IFN- α signaling through down regulating the serum IFN- α activity and up regulating the expression of IFN- α induced gene in systemic lupus erythematosus patients (Kariuki *et al.*, 2009). Furthermore, several genes in the STAT4 mediated pathway such as IL12A and IL12RB2 are related to susceptibility to primary biliary cirrhosis (Hirschfield *et al.*, 2009; Mells *et al.*, 2011). STAT4 is a member of the STAT protein family, which performs the function of transducing signals from cytokine-receptor complexes and regulating transcription of specific genes. STAT4 acts in response mainly to IL-12, IL-23 and interferon type I, and regulates the transcription and expression of a variety of genes via the JAK/STAT pathway, including IFN- γ (O'Shea *et al.*, 2013), which is a crucial cytokine for hepatocyte apoptosis, liver regeneration, viral infection and tumor suppression (Horras *et al.*, 2011). Further study on the direct interaction between viral factors and STAT4 expression as well as the contribution of STAT4 variants on inflammatory response are required to investigate the possible mechanism of HBV and HCV mediated progression towards HCC by STAT4.

Another GWAS study aimed to identify the SNPs associated with HBV related HCC progression, has been performed by Zhang and collaborators in a large number of Chinese populations. One SNP (rs17401966, G>A) located in the intron 24 of KIF1B at the

chromosome 1p36.22 has been identified as associated with the risk of HCC in HBV chronic infected patients (A= risk allele). KIF1B (kinesin-like factor 1 B) is a kinesin superfamily member, who is responsible for the transport of organelles, vesicles, protein complexes and RNA to specific destinations (Hirokawa *et al.*, 2009). KIF1B encodes two alternatively spliced isoforms, KIF1B α and KIF1B β . Both isoforms form homodimers and transport mitochondria and synaptic vesicle precursors, respectively (MacAskill *et al.*, 2010). It has been postulated that by regulating mitochondria transportation, KIF1B α might prevent energy expenditure cancer cells and suppress cancer growth. Likewise, KIF1B β can induce apoptosis by acting downstream of EglN3 prolyl hydroxylase, which may lead to inhibition of malignant transformation and progression (Lee S. *et al.*, 2005). In the study of Zhang *et al.*, the transcription of KIF1B β was markedly elevated in G allele carriers. As such, these results are consistent with the idea that KIF1B β can act as a tumor suppressor. Consistent with this study, our results confirmed that the KIF1B-rs17401966 A-allele is also associated with the HBV induced HCC in European population with an odd ratio as high as 2.54 (Table 3), inferring that the effect of this SNP on the clinical outcomes might be important.

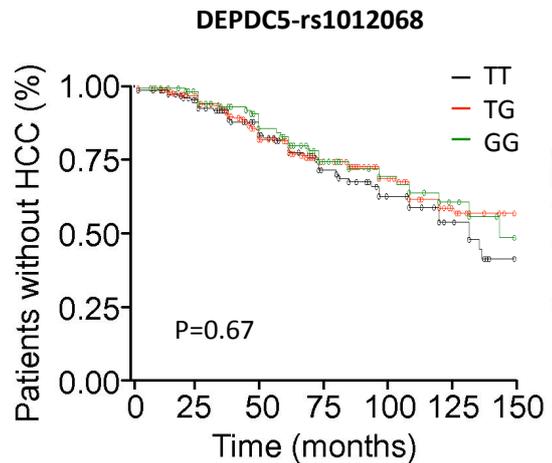
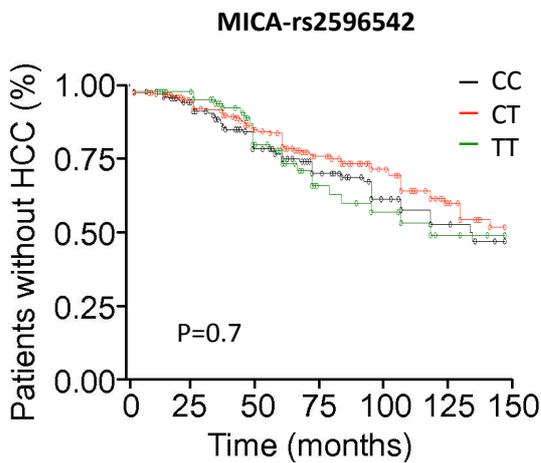
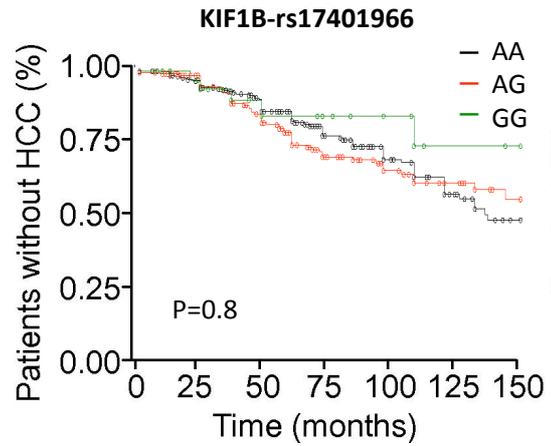
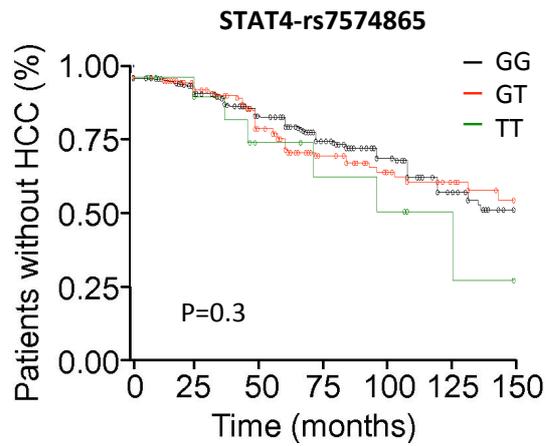
Additionally, two others GWAS studies have focused on HCV related HCC in Japanese patients. The first study performed by Kumar and collaborators has identified a SNP rs2596542 in the MICA region (6p21.33). The T allele of the SNP was more prevalent in HCC patients and was associated with lower MICA serum levels, a protein think to be implicated in the activation of natural-killer cells and in CD8+ T cells against virus-infected cells (Bauer *et al.*, 1999). Because initial “controls” were not HCV infected, the authors genotyped an additional cohort of 1730 HCV-infected patients. While no difference was observed in allele frequency distributions between this subgroup and non-HCV-infected individuals; the variations in genotype distributions were significant when compared to HCC patients. Of note, rs2596542 remained independently associated with HCC when several environmental factors, such as age, alcohol consumption or prior interferon-based therapy, were taken into account, but the severity of the underlying liver disease, namely the presence of cirrhosis or not, was not precise by the authors in the different subgroups. In accordance with the Japanese result, in our 700 resected HCC series, the distribution of T allele of MICA-rs2596542 was higher in the HCV related HCC (46%) compared to the control group (36%) ($p=0.003$). Unfortunately, it is not significant in our HCV related cirrhotic prospective cohort (Supplementary Figure 2). This result seemed to be ambiguous, but the following point should be noted: our HCV cohort composed by the cirrhotic patients, and any positive association should be considered to influence the hepatocarcinogenesis from precancerous cirrhotic status to the HCC. However, as we have mentioned above, in the Japanese study, the status of histology record for the HCV-infected patients were not clear.

So, further study is needed to discriminate this interference. Interestingly, in our alcoholic cohort, the minor allele T appeared to have a protective impact on HCC development, which represented an inverse association as compared to the result in Japanese population (Figure 2). This result needs to be confirmed by others studies and the mechanism of action needs to be explored.

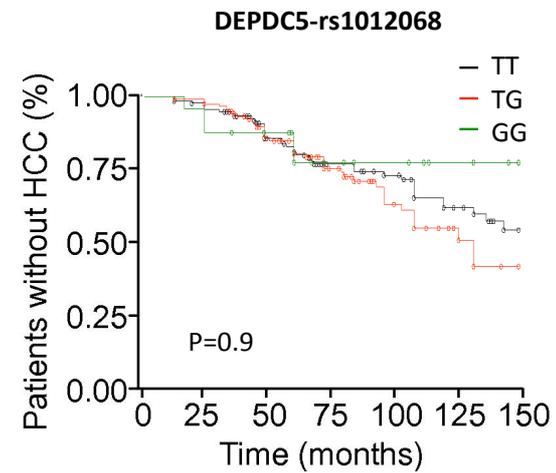
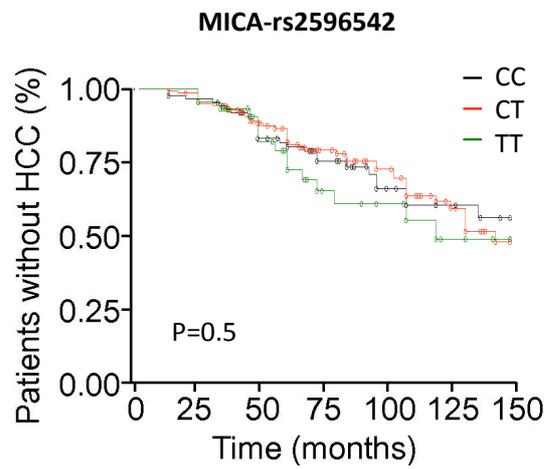
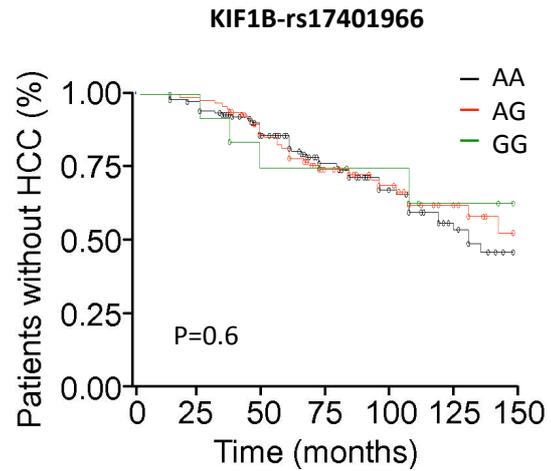
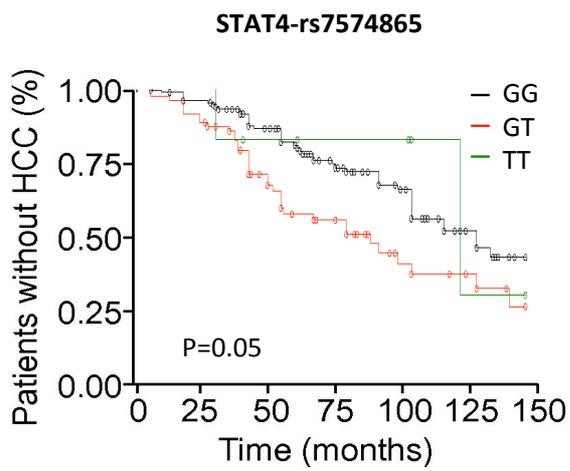
The second GWAS performed in Japan used the same stepwise procedure. The authors have identified a susceptibility locus near DEPDC5 (rs1012068), whose G-allele was associated with HCC in HCV-infected Japanese patients. Although the function of this gene product is unknown, deletion of the DEPDC5 region has been reported in malignant brain glioblastomas (Seng *et al.*, 2005). Interestingly, the results for this SNP were a little different in our cohorts: the allelic distributions are not significant in neither the HCV related subgroup of the 700 resected HCC series (Table 3), nor in the HCV related cirrhotic cohort (Supplementary Figure 2). But the G allele was enriched in the HBV related subgroup of the 700 resected HCC series (41%) compared to the control group (27%) ($p < 0.0001$), whereas it was decreased in the alcoholic subgroup of the 700 resected HCC series (18%) ($p = 0.0003$) (Table 3). These results highlight the complexity of the liver diseases and its tight relationship with the aetiology factors. Again, it needs to be further studied.

Of course, there are some limitations in our present study, which should be underlined. First, the sample size of our three cohorts was relatively small. Second, we have no available HBV related prospective cohort, neither the chronic hepatitis patients of different aetiologies as the controls.

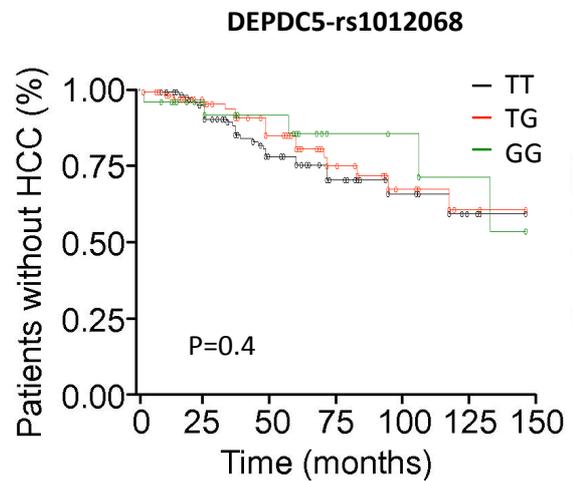
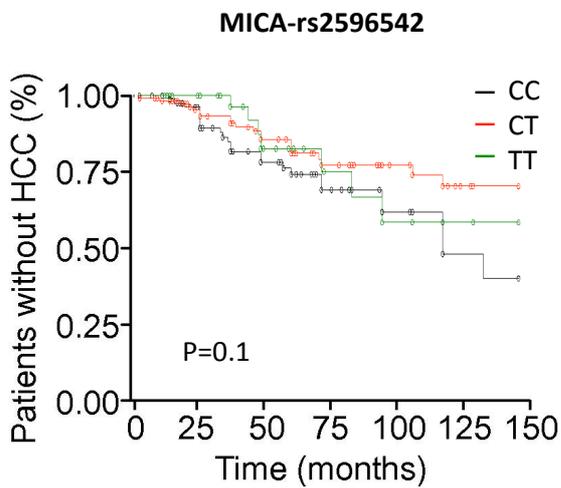
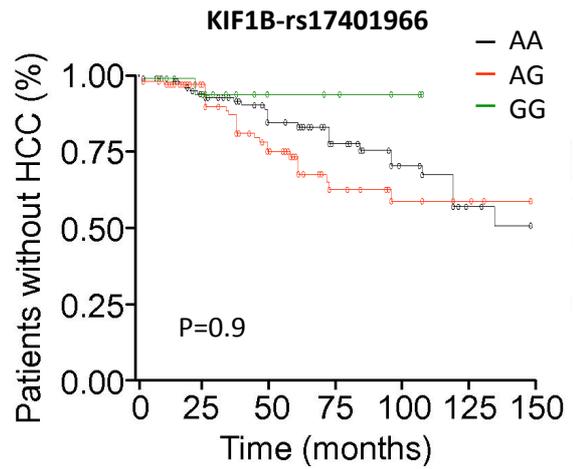
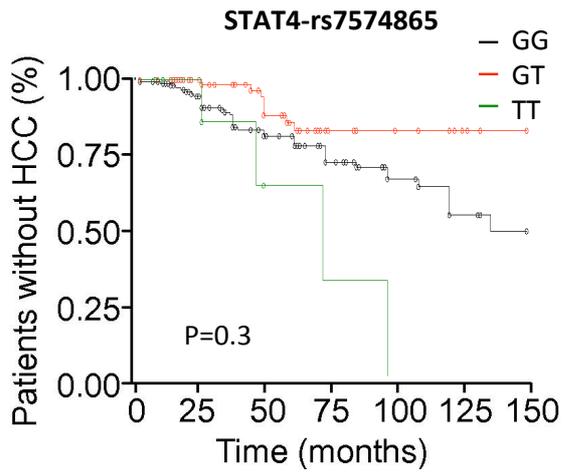
In conclusion, our study partially validated some results of the published GWAS studies, like the G-allele of STAT4-rs7574865 is not only associated with HBV related HCC in Asian population but also in the European population, as well as the A-allele of KIF1B-rs17401966 in HBV related European population, and the T-allele of MICA-rs2596542 in HCV related European population. However, looking at our results together, we recognized that the influence of polymorphism was much more complicated in the multi-stepped hepatocarcinogenesis procedures. Several interfering factors should be taken into account before making analysis, especially the different aetiologies and the subjacent liver disease. Therefore, in future it is worth performing similar study in larger prospective cohorts considering the geographical origin of patients and the associated risk factors.



Supplementary Figure 1. Influence of the 4 SNPs genotypes (represented by different colors) on the risk of HCC occurrence in the total cohort of 513 cirrhosis patients (according to the Kaplan–Meier method).



Supplementary Figure 2. Influence of the 4 SNPs genotypes (represented by different colors) on the risk of HCC occurrence in the cohort of HCV related cirrhosis patients (according to the Kaplan–Meier method).



Supplementary Figure 3. Influence of the 4 SNPs genotypes (represented by different colors) on the risk of HCC occurrence in the cohort of alcoholic cirrhosis patients (according to the Kaplan–Meier method).

References

- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., *et al.* (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285(5428), 727-729.
- Boyault, S., Rickman, D. S., de Reynies, A., Balabaud, C., Rebouissou, S., Jeannot, E., *et al.* (2007). Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*, 45(1), 42-52.
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., & Forman, D. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol*, 13(8), 790-801.
- Chen, J. G., & Zhang, S. W. (2011). Liver cancer epidemic in China: past, present and future. *Semin Cancer Biol*, 21(1), 59-69.
- El-Serag, H. B. (2011). Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*, 365, 1118-1127.
- El-Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557-2576.
- Higuchi, M., Tanaka, E., & Kiyosawa, K. (2002). Epidemiology and clinical aspects on hepatitis C. *Jpn J Infect Dis*, 55, 69-77.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., & Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(10), 682-696.
- Hirschfield, G. M., Liu, X., Xu, C., Lu, Y., Xie, G., Lu, Y., *et al.* (2009). Primary biliary cirrhosis associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 variants. *N Engl J Med*, 360(24), 2544-2555.
- Horras, C. J., Lamb, C. L., & Mitchell, K. A. (2011). Regulation of hepatocyte fate by interferon-gamma. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22(1), 35-43.
- Jiang, D. K., Sun, J., Cao, G., Liu, Y., Lin, D., Gao, Y. Z., *et al.* (2013). Genetic variants in STAT4 and HLA-DQ genes confer risk of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 45(1), 72-75.
- Jin, F., Xiong, W. J., Jing, J. C., Feng, Z., Qu, L. S., & Shen, X. Z. (2011). Evaluation of the association studies of single nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a systematic review. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137(7), 1095-1104.
- Kariuki, S. N., Kirou, K. A., MacDermott, E. J., Barillas-Arias, L., Crow, M. K., & Niewold, T. B. (2009). Cutting edge: autoimmune disease risk variant of STAT4 confers increased sensitivity to IFN-alpha in lupus patients in vivo. *J Immunol*, 182(1), 34-38.
- Kumar, V., Kato, N., Urabe, Y., Takahashi, A., Muroyama, R., Hosono, N., *et al.* (2011). Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 43(5), 455-458.
- Lee, S., Nakamura, E., Yang, H., Wei, W., Linggi, M. S., Sajan, M. P., *et al.* (2005). Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer. *Cancer Cell*, 8(2), 155-167.
- MacAskill, A. F., & Kittler, J. T. (2010). Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends Cell Biol*, 20(2), 102-112.
- Manolio, T. A. (2010). Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *N Engl J Med*, 363, 166-176.
- Mells, G. F., Floyd, J. A., Morley, K. I., Cordell, H. J., Franklin, C. S., Shin, S. Y., *et al.* (2011). Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat Genet*, 43(4), 329-332.
- Miki, D., Ochi, H., Hayes, C. N., Abe, H., Yoshima, T., Aikata, H., *et al.* (2011). Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. *Nat Genet*, 43(8), 797-800.
- O'Shea, J. J., Holland, S. M., & Staudt, L. M. (2013). JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med*, 368(2), 161-170.

- Remmers, E. F., Plenge, R. M., Lee, A. T., Graham, R. R., Hom, G., Behrens, T. W., *et al.* (2007). STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 357(10), 977-986.
- Seng, T. J., Ichimura, K., Liu, L., Tingby, O., Pearson, D. M., & Collins, V. P. (2005). Complex chromosome 22 rearrangements in astrocytic tumors identified using microsatellite and chromosome 22 tile path array analysis. *Genes Chromosomes Cancer*, 43(2), 181-193.
- Zhang, H., Zhai, Y., Hu, Z., Wu, C., Qian, J., Jia, W., *et al.* (2010). Genome-wide association study identifies 1p36.22 as a new susceptibility locus for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *Nat Genet*, 42(9), 755-758.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. LE LIEN ENTRE VHB ET LA TUMORIGENESE HEPATIQUE

Le CHC est un processus complexe qui comporte plusieurs étapes et un temps de latence important entre l'infection primaire et l'apparition de la tumeur (20 à 50 ans). Le CHC survient généralement (mais pas toujours) sur une cirrhose préexistante, complication évolutive de l'hépatite chronique active. L'infection virale chronique pourrait jouer un rôle indirect en induisant une réponse immunitaire et une maladie nécro-inflammatoire, favorisant la libération de radicaux oxygénés, de cytokines et de facteurs de croissance. Dans ce contexte, la régénération hépatique serait accompagnée d'un risque accru de lésions de l'ADN et d'altérations génétiques. La survenue d'un certain nombre de CHC sur un foie non pathologique est un argument fort pour affirmer un rôle direct du VHB dans le processus tumoral. Cependant, le ou les mécanisme(s) exact(s) de survenue de cette carcinogenèse liée au VHB reste à déterminer.

1. La diversité génotypique de VHB et le CHC

La population du VHB humaine est classée en 8 génotypes principaux (A-H), qui montrent une distribution spécifique à la différente zone mondiale (figure 15). La présence de plusieurs génotypes dans une population s'explique par l'immigration. En effet, la plupart des villes comportant plusieurs génotypes sont des villes cosmopolites. Dans notre série de 86 CHC liés au VHB, nous avons détecté 5 différents génotypes (A-E) (Article 1 ; Supplementary Figure 1), et la distribution des génotypes est bien cohérente avec les origines du patient : les génotypes A et E sont plus fréquemment retrouvés chez les immigrants africains, les génotypes B et C sont le plus souvent retrouvés chez les immigrants asiatiques, et les génotypes A et D sont le plus souvent chez les européens (Article 1 ; Supplementary Table 4). D'une manière intéressante, nous avons identifié dans 13 cas (15%) parmi nos échantillons (tissus tumoraux et non-tumoraux) une coexistence de deux génotypes différents (9 uniquement dans les CHC, 3 uniquement dans les tissus non-tumoraux et 1 à la fois dans le CHC et sa partie non-tumorale adjacente).

Récemment, les génotypes du VHB ont attiré de plus en plus l'attention car ils peuvent influencer sur la progression ainsi que la réponse aux traitements antiviraux (Liu *et al.*, 2006). En même temps, beaucoup d'intergénotypes recombinants du VHB ont été révélés,

surtout en cas de co-infection par différents génotypes (Bollyky *et al.*, 1996; Yang J. *et al.*, 2006). Dans une étude réalisée par Toan *et al.*, la prévalence des infections par les génotypes mixtes du VHB étaient de 16% dans une population de 375 Vietnamiens, par rapport à 13% (5/38) européennes et 30% (14/47) Africains (Toan *et al.*, 2006). Dans une autre étude européenne, dans laquelle tous les patients ont été traités par interféron (IFN) pour l'hépatite B chronique (étude Interpred, 1987-1990), une co-infection génotypique a été détectées chez 67% (20/30) de patients. Dans la plupart des cas, les changements génotypiques ont été détectés après une réduction de la quantité d'ADN VHB de 2 log. Mais la présence de multi-génotypes n'a pas influencé de manière significative la réponse à l'IFN dans cette étude (Hannoun *et al.*, 2002). Ce phénomène peut s'expliquer par une co-infection de différents génotypes initiale, et puis la souche mineure devient plus importante et augmente en proportion quand la virémie est réduite. Ceci est cohérent avec nos observations, car parmi les 13 cas qui ont eu une coexistence de deux génotypes dans notre série, 11 cas ont un très faible nombre de copie d'HBs/cellule.

Il est clair que les génotypes du VHB jouent un rôle important pendant l'infection ; ainsi la coexistence de différents génotypes complique la situation. Une meilleure compréhension du rôle des génotypes du VHB pourrait conduire à une intervention antivirale plus précoce, chez ceux qui ont été définis comme ayant un risque plus élevé de développer une cirrhose hépatique avancée ou un CHC.

2. Le spectre des mutations du VHB et le CHC

2.1 Les substitutions dans les gènes HBs et HBx

Différents mutations substitutions ont été fréquemment observées dans les 4 gènes codés par le VHB. Les substitutions du gène préC/C sont associées avec les hépatites sans AgHBe (e.g. G1896A) à cause de la survenue d'un codon « stop » précoce (Brunetto *et al.*, 1993); les substitutions du gène P sont associées à la résistance au traitement par Lamivudine (e.g. la modification du motif YMDD en YVDD ou YIDD) (Thibault *et al.*, 1999); les substitutions dans le gène S entraînent souvent un échappement à la vaccination, puisqu'il porte un épitope majeur qui s'appelle déterminant « a » (acide aminé 124-147), qui est essentiel pour la protection par le vaccin contre l'infection du VHB (e.g. G145R) (Fujii *et al.*, 1992); et les mutations du gène X sont souvent considérées comme associées avec le

carcinome hépatocellulaire, car elles sont le plus souvent observées chez des patients ayant un CHC par rapport aux patients atteints d'une hépatite chronique (Venard *et al.*, 2000).

Dans notre série de CHC liés au VHB, nous avons séquencé les gènes S et X du VHB dans les tissus tumoraux et aussi leurs contreparties non-tumorales. Nous avons remarqué qu'une proportion plutôt identique de substitutions entre les tissus tumoraux par rapport aux tissus non-tumoraux dans le gène S; et aussi une proportion identique de substitutions du gène S par rapport au gène X dans les tissus non-tumoraux (Article 1 ; Figure 1A). Ces mutations sont réparties uniformément dans ces deux gènes. Pour le gène S, nous avons constaté la mutation G145R chez 2 patients (2.3%, 2/86): une patiente à 61 ans, d'origine asiatique, l'autre est un homme Africain âge de 30 ans. Ces deux cas ont bien démontré que dans les zones de haute endémie, une infection par les souches mutantes est fréquente. Concernant les substitutions du gène X, trois « hotspot » : I127N/T/L, K130M/K/Q, et V131I/L/T, préalablement rapportées (Pollicino *et al.*, 2007), ont été fréquemment détectés dans notre série à la fois dans les tissus tumoraux (8/11/9 échantillons mutés pour les bases 127/130/131) et non tumoraux (17/23/20 échantillons mutés pour les bases 127/130/131). Mais cette différence n'a pas de significativité statistique, car ce biais est dû à la prédominance des délétions du gène X dans les tissus tumoraux.

Comme pour le VIH (le virus de l'immunodéficience humaine) ou le VHC (le virus de l'hépatite C), au cours de l'histoire naturelle de l'infection par le VHB, il existe un mélange de souches mutées et sauvages, définissant une distribution en « quasi-espèces » (Halfon *et al.*, 2002). La distribution en quasi-espèces du VHB lui confère un avantage considérable en terme de survie, car la présence simultanée chez un même individu de multiples séquences virales et la rapidité de génération de nouveaux variants permettent la sélection rapide des mutants les mieux adaptés aux conditions environnementales dans lesquelles le virus évolue.

2.2 Les mutations inactivatrices d'HBx

Dans notre étude, les mutations inactivatrices d'HBx, définies comme les changements de nucléotide conduisant à la survenue d'un codon « stop » précoce ou d'un « frameshift » qui transforme la séquence du gène. On compte aussi dans ce groupe de mutations, les séquences tronquées et des délétions importantes conduisant à une inactivation complète du gène X. Nous avons pu identifier dans notre série de 86 CHC liés au VHB des mutations inactivatrices d'HBx dans 71% des échantillons tumoraux et dans 33% des échantillons non tumoraux appariés ; contrairement au gène HBs, inactivé dans seulement 31% des échantillons tumoraux et dans 25% des échantillons non tumoraux

appariés (Article 1 ; Figure 1A et 1B). Ces spectres de délétion d'*HBx* sont similaires à ceux décrits par Iavarone et collaborateurs (Iavarone *et al.*, 2003). Dans leur première analyse de 6 patients pour les séquences d'*HBx*, les délétions de la séquence X ont été retrouvées chez 5/6 patients étudiés, et les fréquences des délétions étaient plus fréquentes dans les séquences de tumeurs (6/18) que dans les séquences dérivées non tumorales (1/20). Ce qui suggère que des mutations inactivatrices d'*HBx* ont été sélectionnées dans les tumeurs par rapport aux tissus non-tumoraux. Par conséquent, nous pouvons proposer ici le fait que le gène *HBx* soit délété dans la tumeur pourrait être important pour la carcinogenèse hépatique. D'un point de vue génétique, ce spectre d'*HBx* ressemble beaucoup à un gène suppresseur de tumeur classique.

Les fonctions de la protéine HBx ne sont pas entièrement éclaircies, bien qu'elle soit connue pour jouer un rôle régulateur dans la réplication du VHB et nécessaire pour l'établissement de l'infection virale (Lucifora *et al.*, 2011). Le rôle d'*HBx* dans la tumorigenèse hépatique a été étudié directement via la culture cellulaire et les modèles animaux, mais les résultats restent controversés. En fait, l'un des mécanismes bien documentés par lequel la protéine HBx contribue au développement du CHC est son effet sur l'apoptose, ayant à la fois des effets anti-apoptotiques, en association avec le gène *TP53*, et des effets pro-apoptotiques (Ng *et al.*, 2011). Il a été montré qu'*HBx* est capable de transformer plusieurs lignées cellulaires telle que la lignée NIH3T3 (fibroblaste embryonnaire) (Gottlob *et al.*, 1998), et pourrait contribuer à la transformation néoplasique des cellules, en collaboration avec d'autres oncogènes, tels que *H-ras*, pour surmonter l'effet d'apoptose induite par *HBx* (Kim Y. C. *et al.*, 2001). En revanche, d'autres laboratoires ont rapporté que l'*HBx* peut supprimer la transformation des cellules NIH3T3 induite par différents oncogènes due à son effet pro-apoptotique (Schuster *et al.*, 2000). Une explication possible est que des niveaux élevés de protéine HBx permettent l'apoptose, alors qu'un niveau faible l'inhibent (Ye *et al.*, 2008). Une autre explication, mais moins évidente est que les effets anti-apoptotiques survenant tôt dans la tumorigenèse permettent le développement et la persistance des hépatocytes initiés, tandis que dans un processus plus tardif, des effets pro-apoptotiques permettent l'accumulation de mutations et permettent la progression de la transformation maligne (Kew M. C., 2011).

Le potentiel rôle oncogénique d'*HBx* a également été évalué dans des modèles de souris transgéniques, donnant encore lieu à des résultats divergents. En effet, toutes les études qui ont montré un rôle oncogénique d'*HBx*, ont été réalisées chez des souris surexprimant HBx générées à partir de fonds génétiques différents (Kim C. M. *et al.*, 1991; Koike, 2002). Par contre, dans d'autres lignées de souris transgéniques, l'expression d'*HBx* ne conduit pas au développement du CHC (Perfumo *et al.*, 1992). Il semble que le gène X

utilisé pour générer les souris transgéniques ainsi que l'expression permanente d'HBx pourrait favoriser le développement du CHC. Cependant, le rôle d'HBx dans la transformation cellulaire reste incertain, et bien son rôle exact dans l'hépatocarcinogénèse a besoin encore d'être étudié ultérieurement.

3. Inactivation de la voie p53 et mauvais pronostic

La voie de signalisation du cycle cellulaire/p53 est la voie la plus fréquemment altérée dans notre série de CHC liés au VHB. Le spectre de mutations de *TP53* est différent de ceux des autres étiologies, avec environ 39% de mutation R249S (Article 1 ; Figure 2), qui est classiquement liée à l'exposition à l'aflatoxine B1 (AFB1). Les aflatoxines, métabolites secondaires des *aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*, sont des contaminants communs de divers aliments dont la base est le maïs et l'arachide dans les pays subtropicaux. Une grande partie de la contamination par les aflatoxines se produit pendant le stockage dans des conditions qui favorisent la croissance fongique et la production de toxines. L'IARC (International Agency for Research on Cancer) a classé les aflatoxines comme des cancérogènes pour l'homme. L'aflatoxine B1 est la forme la plus commune et la plus toxique des aflatoxines. Elle est métabolisée principalement dans le foie en forme AFB1-8,9-exo-époxyde, qui produit un ADN pro-mutagène AFB1-N7-guanine qui se traduit par une mutation transversion « G>T » dans le codon 249 du gène suppresseur de tumeur *TP53* (Wild *et al.*, 2002). Des données montrent que l'exposition à l'AFB1 et l'infection par le VHB jouent un rôle synergique dans la carcinogénèse hépatique, le risque de développer un CHC étant 10 fois supérieure en cas d'exposition double (Kew M.C., 2003). Cependant, le mécanisme biologique de cette interaction n'est pas entièrement éclairé. Plusieurs mécanismes possibles ont été proposés : (1). la fixation des mutants induites par l'AFB1 en présence de la régénération hépatique et de l'hyperplasie induite par l'infection chronique de VHB; (2). la prédisposition des hépatocytes infectés par le VHB à l'altération d'ADN induite par l'AFB1; (3). une augmentation de la susceptibilité à l'infection chronique par le VHB chez les sujets pré-exposés à l'AFB1; et (4). le stress oxydatif exacerbé par la co-exposition à l'AFB1 et le VHB (Wild *et al.*, 2009). Dans notre série, la présence de la mutation somatique R249S était essentiellement observée chez les patients ayant un CHC développé sur un foie non cirrhotique (86%,12/14), ce qui suggère que la mutation R249S pourraient coopérer avec le VHB dans l'hépatocarcinogénèse, sans nécessairement traverser le stade de cirrhose.

Dans le CHC, la valeur pronostique des mutations de *TP53* a fait l'objet de plusieurs publications, avec des résultats controversés. Dans une étude faite en Italie, les mutations *TP53* ont été retrouvées distribuées uniformément dans les deux groupes de CHC liés à l'infection du VHB et VHC, sans corrélation significative avec les données cliniques des patients (Tornesello *et al.*, 2013). Par contre, selon une autre étude réalisée par Honda et ses collaborateurs, ils ont montré une valeur pronostique des mutations *TP53* par rapport au type sauvage chez des patients atteints de CHC avec des étiologies mixtes (VHB/VHC/Alcool) (Honda K. *et al.*, 1998). Woo et ses collaborateurs ont aussi montré que les mutations de *TP53* étaient associées à une survie globale réduite chez les patients ayant un CHC liés à VHB (Woo *et al.*, 2011). En plus, ils ont montré que le pronostic des patients porteurs d'une mutation R249S était plus mauvais que ceux porteurs d'un autre type de mutation de *TP53*. Plus récemment, Cleary *et al.* a reproduit ces résultats en démontrant la valeur pronostique des mutations de *TP53* dans une série nord-américaine de patients atteints de CHC liés à une infection par le VHB ou le VHC (Cleary, Jeck, Zhao, Kuichen, *et al.*, 2013). D'une manière intéressante, dans notre série, nous avons observé que les mutations de *TP53* étaient un prédicteur indépendant de survie uniquement dans le groupe de patients infectés par le VHB, mais non dans les groupes de patients ayant un CHC liés à d'autres étiologies.

En conclusion, les CHC liés à l'infection par le VHB et mutés pour *TP53* constituent une entité tumorale particulièrement agressive. La recherche de mutation de *TP53* pourrait donc avoir des implications cliniques importantes dans la prise en charge des patients atteints de CHC et infectés par le VHB. Elle permettra la stratification du risque, la surveillance personnalisée, et finalement les interventions adjuvantes ou néoadjuvantes personnalisées chez les patients atteints de CHC liés au VHB.

4. Expression prédominante et anormale des gènes onco-fœtaux/progéniteurs

Dans notre étude, les CHC liés au VHB présentaient une signature transcriptionnelle particulière, caractérisée par une forte surexpression de marqueurs de gènes normalement exprimés au cours de la vie embryonnaire/ fœtale, et aussi par les cellules progénitrices hépatiques, tels que KRT19 (Kératine 19), AFP (α -foetoprotéine) et EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) (Article 1 ; Figure 4), ce qui suggère que l'infection par le VHB pourrait provoquer un blocage dans la maturation des cellules hépatiques immatures, ou induire une dé-différenciation des hépatocytes matures.

L'hypothèse de la cellule souche du cancer (cancer stem cell, CSC), suggérant qu'un sous-ensemble de cellules portant des caractéristiques « stem cell like » est indispensable au développement de la tumeur et des métastases, a récemment été proposée par différentes équipes de recherche (Yamashita *et al.*, 2013). Depuis, plusieurs études ont montré l'existence de CSC dans des lignées cellulaires de cancer du foie et dans le CHC à l'aide de divers marqueurs de cellules souches (Gaudio *et al.*, 2009). Selon cette hypothèse, il a été démontré que parmi les CHC ayant des caractéristiques histomorphologiques classiques, il existe un sous-type de tumeur caractérisé par l'expression de marqueurs « stem cell-like », tels que KRT19, AFP et EpCAM, et qu'il est associé à un moins bon pronostic, contrairement au groupe de CHC sans ces marqueurs (Kim H. *et al.*, 2011; Yamashita *et al.*, 2008). EpCAM est fortement exprimée dans de nombreux cancers humains avec une origine épithéliale. La fonction d'EpCAM et la régulation de son expression ne sont pas encore éclaircies. Dans le foie adulte, les hépatocytes sont négatifs pour l'expression d'EpCAM. Toutefois, dans le foie embryonnaire, la majorité des hépatocytes exprime EpCAM. Et dans le foie cirrhotique, EpCAM est exprimée dans les voies biliaires prolifératives qui sont considérées comme dérivées des cellules progénitrices hépatiques (hepatic progenitor cells, HPC). La même observation est faite pour l'AFP (environ 60% des patients ayant un CHC ont un taux d'AFP sérique élevé) et KRT19, qui sont exprimés principalement dans le foie embryonnaire et sont silencieux dans le foie adulte.

Les études précédentes sur l'expression *de novo* de ce type de gènes dans les CHC ne comportent que très peu de tumeurs associées à différents facteurs de risque de CHC, et ne permettent donc pas d'établir des associations entre certains facteurs de risque et l'induction de ce phénotype progéniteur (Lee J. S. *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2008; Yang Z. F. *et al.*, 2008; Zender *et al.*, 2005). Notre étude a inclus des CHC de toutes étiologies, donc a permis de mettre en évidence que la survenue de ce phénotype est très fortement associée à l'infection par le VHB. D'autre part, cette hypothèse est renforcée par le fait que les CHC liés au VHB, dans notre série, présentait un aspect histologique moins bien différencié par rapport aux CHC liés à d'autres étiologies (Article 1 ; Table 1 : 58% vs.45%, p=0.05).

5. Classification transcriptomique des CHC liés au VHB

Notre série de 86 CHC liés au VHB ont ensuite été classées uniformément dans les 6 groupes transcriptomiques G1-G6, précédemment identifiés au sein du laboratoire, avec un enrichissement dans les groupes G1-G3 (Article 1 ; Figure 5). Cette distribution est un peu

différent par rapport à la première publication du laboratoire concernant la classification transcriptomique (Boyault *et al.*, 2007), dans laquelle des CHC liés au VHB (36 échantillons) étaient présents dans les groupes G1 et G2. Le groupe G3 partage avec les groupes G1 et G2 les caractéristiques suivantes : une forte instabilité chromosomique, la survenue de mutation de *TP53* et une surexpression importante de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme *NEU1*, *BIRC5*, *CCNB1* et *AURKA*. G3 représente également un type de tumeurs de mauvais pronostic (Boyault *et al.*, 2007; Villanueva *et al.*, 2011), qui sont caractérisées par la mutation *TP53*, surtout la mutation R249S qui est classiquement liée à l'intoxication par l'AFB1.

De manière intéressante, les mutations inactivatrices d'*HBx* que nous avons identifiées étaient essentiellement retrouvées dans les tumeurs appartenant à ces sous groupes (G1 à G3). Par contre, des CHC liés au VHB, mais classés dans les groupes G4-G6, présentent une association étroite avec les co-facteurs comme une co-infection par le VHC, une consommation excessive d'alcool ou bien une stéato-hépatite non-alcoolique, suggérant un lien entre les altérations du génome viral et la classification transcriptionnelle.

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine a été retrouvée activée pour les CHC liés au VHB mais retrouvés dans les groupes transcriptomiques G5-G6 (Boyault *et al.*, 2007), ceci pourrait confirmer la corrélation inverse entre les mutations de *CTNNB1* et l'infection par le VHB (Guichard *et al.*, 2012).

Toutes ces études soutiennent fermement l'idée que le VHB interagit dans le processus d'hépatocarcinogénèse d'une manière différente que les CHC avec d'autres étiologies, et sous-entendent une prise en charge différente dans la pratique clinique des patients ayant un CHC lié au VHB.

II. LES SNPS ASSOCIES AU RISQUE DE SURVENUE DU CHC DANS LES COHORTES EUROPEENNES

Les études d'association pangénomique (GWAS) ont bien avancé au cours des dix dernières années en tant qu'outil puissant pour étudier l'architecture génétique de la maladie humaine. Le but ultime des études de GWAS est d'utiliser les facteurs de risque génétiques pour prédire la population à risque, et d'identifier les bases biologiques de la susceptibilité à la maladie pour élaborer de nouvelles stratégies de prévention et de traitement. Ce type de recherche génétique a donné lieu à un nouveau champ appelé la médecine personnalisée qui vise à adapter les soins de santé aux patients en fonction de leur fond génétique et d'autres caractéristiques biologiques. Dans le domaine des CHC, plusieurs études asiatiques ont identifié des SNPs spécifiquement liés à certaines étiologies, et nous les avons validé dans nos séries de patients européens. Nos résultats montrent une association différente au risque de survenue du CHC suivant différentes étiologies que ceux qui ont été identifiés initialement dans la population asiatique.

1. KIF1B-rs17401966

Un SNP intronique (rs17401966, G/A) dans le gène *KIF1B* sur le chromosome 1p36.22 a été montré fortement associé au CHC lié au VHB (A= allèle à risque) dans une population chinoise (Zhang *et al.*, 2010).

Concernant le SNP rs17401966-*KIF1B*, il a été étudié dans plusieurs études asiatiques dans des populations différentes, telle que Arabie Saoudite (Al-Qahtani *et al.*, 2012), japonaise, coréenne, et HongKong (Sawai *et al.*, 2012), avec des conclusions controversées. Récemment, une méta-analyse a été publiée par Wang et collaborateurs, comprenant au total 5 études contenant 13 cohortes de 5773 cas et 6404 contrôles dont 12 sur 13 étaient Asiatiques (Wang Z. C. *et al.*, 2013). Les analyses de ces sous-groupes ont été réalisées selon les ethnies des patients, la taille des échantillons et les scores de qualité des études. Dans l'ensemble, l'allèle G du SNP rs17401966-*KIF1B* est associé à un risque significativement diminué de développer un CHC (OR=0.83, IC 95%: 0.76-0.91, p=0.003) (tableau 16).

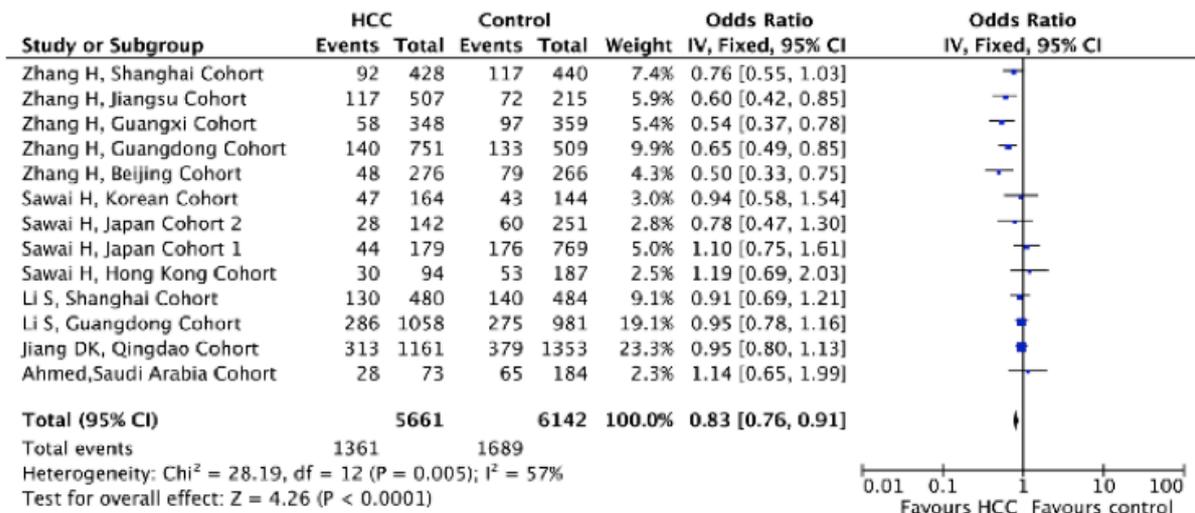


Tableau 16. Méta-analyse de l'allèle G du SNP rs17401966-*KIF1B* ('Events') et susceptibilité au CHC dans les 13 cohortes publiées.(Wang Z. C. *et al.*, 2013).

En outre, les analyses de sous-groupe a montré que l'allèle G réduit significativement le risque de CHC dans les cohortes chinoises (OR=0.76, IC 95%: 0.64-0.90, p=0.002), les cohortes avec de grande taille d'échantillons (OR=0.80, IC 95%: 0.73-0.88, p<0.01) et des cohortes de haute qualité (OR=0.78, IC 95% : 0.71-0.87, p<0.01). Cependant, aucune association significative n'a été observée dans les cohortes avec une petite taille d'échantillons, les études avec un score de faible qualité et aussi avec exclusion des cohortes de l'étude initiale faite par Zhang et collaborateurs.

La différence remarquable dans la fréquence de l'allèle G entre les différentes cohortes est due à des hétérogénéités parmi les populations étudiées. Cependant, les petites tailles d'échantillons doivent également être prises en considération. Par rapport à l'étude initiale faite par Zhang et collaborateurs, la taille des échantillons des études suivantes était relativement faible. Conformément à ces études, nos résultats ont confirmé que ce SNP est également associée à la CHC liée au VHB dans la cohorte cas-témoins de patients traités en France (Article 2 ; Tableau 3). D'autres études prospectives, comprenant plus d'échantillons de différentes ethnies sont nécessaires avant qu'une conclusion globale puisse être faite. Il faudrait également développer des études de fonctionnalité de gène *KIF1B in vitro* et *in vivo*.

2. STAT4-rs7574865

Un autre SNP rs7574865 (G/T) dans le 3^{ème} intron du gène *STAT4*, a été identifié par Jiang et collaborateurs dans une autre population chinoise, qui est également associé à CHC liée au VHB (G= allèle à risque) (Jiang *et al.*, 2013).

Cette étude chinoise a été ensuite reproduite par Clark et collaborateurs dans une cohorte vietnamienne avec 667 patients classés en trois groupes (Clark *et al.*, 2013): des patients porteurs de l'hépatite B chronique (n=206), des patients cirrhotiques (n=222) et des patients ayant un CHC (n=239) liés au VHB. L'allèle G de rs7574865 du *STAT4* a été légèrement associé au CHC par rapport aux patients porteurs de l'hépatite B chronique (OR=0.84, IC 95% : 0.7-0.99, p=0.048) (tableau 17).

<i>STAT4</i> rs7574865G/T	CHB n = 206 (%)	LC n = 222 (%)	HCC n = 239 (%)	HCC vs. LC		HCC vs. CHB		LC vs. CHB		HCC vs. CHB + LC	
				OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value
GG	86 (41.7)	112 (50.5)	117 (49)	Reference		Reference		Reference		Reference	
GT	92 (44.7)	87 (39.2)	102 (42.7)	1.04 (0.7–1.5)	0.84	0.9 (0.7–1.15)	0.41	0.9 (0.56–1.5)	0.76	0.99 (0.8–1.2)	0.9
TT	28 (13.6)	23 (10.3)	20 (8.3)	0.78 (0.4–1.5)	0.46	0.7 (0.45–0.98)	0.039	0.76 (0.4–1.6)	0.47	0.8 (0.6–1.1)	0.2
<i>Allele</i>											
G	264 (64.1)	311 (70)	336 (70.3)	Reference		Reference		Reference		Reference	
T	148 (35.9)	133 (30)	142 (29.7)	0.94 (0.7–1.25)	0.7	0.84 (0.7–0.99)	0.048	0.88 (0.6–1.2)	0.5	0.9 (0.8–1.1)	0.3
<i>Dominant</i>											
GG	86 (41.7)	112 (50.5)	117 (49)	Reference		Reference		Reference		Reference	
GT + TT	120 (58.3)	110 (49.5)	122 (51)	0.99 (0.7–1.4)	0.96	0.85 (0.7–1.1)	0.16	0.88 (0.55–1.4)	0.6	0.96 (0.8–1.13)	0.6
<i>Recessive</i>											
GG + GT	178 (86.4)	199 (89.6)	219 (91.6)	Reference		Reference		Reference		Reference	
TT	28 (13.6)	23 (10.4)	20 (8.4)	0.77 (0.4–1.45)	0.4	0.7 (0.5–0.99)	0.047	0.8 (0.4–1.6)	0.53	0.83 (0.6–1.1)	0.2

CHB: chronic hepatitis B; LC: liver cirrhosis; HCC: hepatocellular carcinoma. n = number of chromosomes; Odds ratio and P value were calculated by using binary logistic regression model and adjusted for age and gender. Bold values present the statistical significance.

Tableau 17. Association de rs7574865 du *STAT4* avec la progression de l'infection par le VHB (Clark *et al.*, 2013).

Conformément à ces études, nos résultats ont confirmé que le STAT4-rs7574865 est associé au risque du CHC lié au VHB dans notre série de 700 CHC réséqués par rapport à la population générale européenne (Article 2 ; Tableau 3). D'une manière surprenante, nous avons remarqué un rôle protecteur pour les homozygotes deux G-allèles en l'occurrence de CHC dans la cohorte prospective des patients cirrhotiques d'étiologie VHC (Article 2 ; Figure 1), ce qui est en contraste avec les résultats des études publiées (qui sont présentent tous une étiologie liée au VHB). Ces résultats contradictoires dans nos deux séries ont bien démontrés l'importance de l'influence par différentes étiologies dans l'hépatocarcinogénèse. D'autres études (e.g. une cohorte prospective d'étiologie VHB) sont nécessaires pour valider nos résultats.

3. MICA-rs2596542

Une autre étude GWAS faite par Kumar et al. a montré que le risque allèle T du rs2596542 dans le gène *MICA* est plus fréquent chez les patients japonais ayant un CHC lié au VHC (Kumar *et al.*, 2011). D'une manière intéressante, juste après la publication de cet article, le même groupe de chercheurs s'est intéressé à l'implication possible de *MICA* dans la carcinogenèse hépatique liée au VHB (Kumar *et al.*, 2012). Ce SNP a donc été validé dans une cohorte de patients japonais, composé de 407 patients ayant un CHC lié au VHB, de 699 patients atteints d'une hépatite B chronique et de 5657 contrôles de la population générale. L'analyse d'association génétique a révélé une association de l'allèle C du rs2596542 (contrairement à l'étude VHC précédente dans laquelle l'allèle de risque était l'allèle T) avec une augmentation du risque de CHC induit par le VHB, malgré une faible valeur d'OR (1.13 et 1.19) (tableau 18).

SNP	Comparison	Chr	Locus	Case MAF	Control MAF	P*	OR*	95% CI
rs2596542	HCC vs. Healthy control	6	<i>MICA</i>	0.294	0.332	0.029	1.19	1.02-1.4
rs2596542	HCC vs. CHB	6	<i>MICA</i>	0.294	0.320	0.197	1.13	0.94-1.36

Note: 407 HCC cases, 699 CHB subjects and 5,657 non-HBV controls were used in the analysis.
 Chr., chromosome; MAF, minor allele frequency; OR, odds ratio for minor allele; CI, confidence interval.
 *Obtained by Armitage trend test.

Tableau 18. Association entre rs2596542 et CHC. (Kumar *et al.*, 2012).

En plus, dans cette étude VHB, les auteurs ont constaté un niveau sérique de MICA plus élevé chez les patients avec CHC, de moins bon pronostic ($p=0.008$) (figure 21). Au contraire, cet effet n'a pas été démontré dans les CHC liés au VHC.

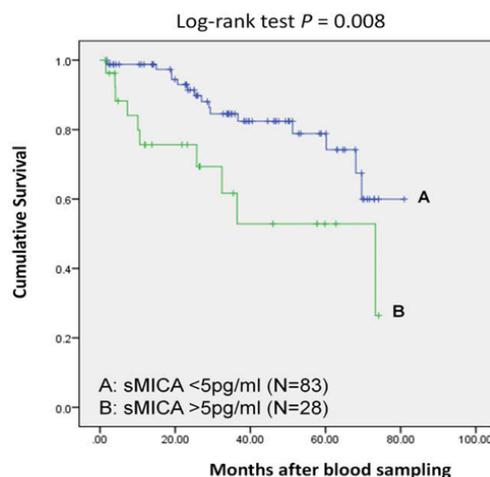


Figure 21. Courbe de Kaplan-Meier selon le niveau sérique de MICA chez les patients ayant un CHC lié au VHB. (Kumar *et al.*, 2012).

MICA (MHC class I polypeptide-related chain A) est surexprimé dans les cellules infectées par le virus ou des cellules cancéreuses. Sa forme membranaire agit en tant que ligand de NKG2D pour activer des effets antitumoraux de cellules NK (nature killer cells) et des lymphocytes T (CD8+) (Bauer *et al.*, 1999; Jinushi *et al.*, 2003). Les métalloprotéases matricielles (MMPs) peuvent cliver MICA dans son domaine transmembranaire (Salih *et al.*, 2002) et libérer des protéines MICA sérique dans le sang. MICA sérique a été décrite pour inhiber les effets antitumoraux de cellules NK et des lymphocytes T/CD8+ en diminuant leur affinité aux cellules cibles (Groh *et al.*, 2002; Jinushi *et al.*, 2005). Donc les fonctions de MICA peuvent être modulées par l'expression des MMPs.

Partant de cette hypothèse, Kumar et collaborateurs ont proposé que pour les personnes infectées par le VHC, porteurs de l'allèle C du MICA-rs2596542 exprimeraient des niveaux élevés de MICA membranaire, ce qui conduirait à l'activation des cellules immunitaires contre l'infection par le VHC et des cellules cancéreuses (figure 22).

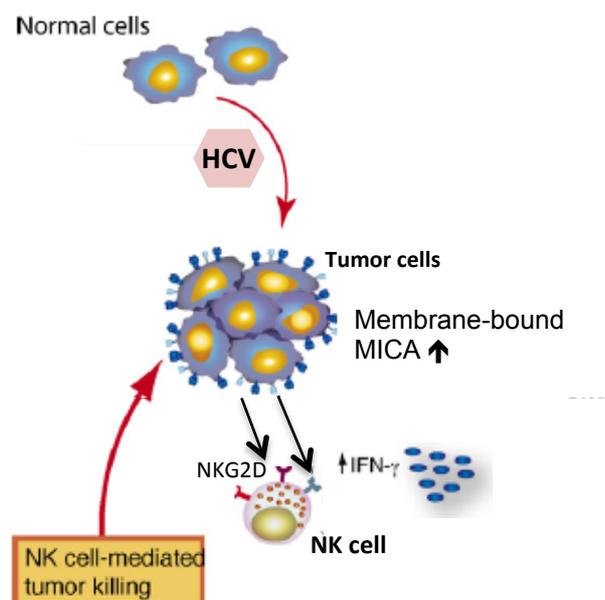


Figure 22. Chez les personnes ayant un CHC induite par le VHC, porteurs de l'allèle C du MICA-rs2596542 exprimeraient des niveaux élevés de MICA membranaire par les cellules tumorales, ce qui conduirait à l'activation des cellules NK et la sécrétion de l'IFN γ pour contre l'infection par le VHC et l'élimination des cellules tumorales. Figure adaptée selon (Zwirner *et al.*, 2007).

D'autre part, l'infection par le VHB peut augmenter l'expression de MICA membranaire comme dans le cas du VHC, mais en même temps la protéine virale d'HBx peut aussi activer des MMPs (Lara-Pezzi *et al.*, 2002), aboutissant à une élévation de MICA sérique et un feed-back aboutissant à une diminution de MICA membranaire. Par conséquent, MICA sérique pourrait bloquer les cellules NK et CD8+ lymphocytes T et donc

freiner la capacité d'élimination des cellules infectées par le système de surveillance de l'hôte. Autrement dit, à l'inverse du VHC, le VHB peut utiliser cette stratégie pour échapper à la réponse immunitaire. Donc, des niveaux plus élevés de MICA sériques pourraient être associés à une survie plus courte chez des patients ayant un CHC liés au VHB (figure 23).

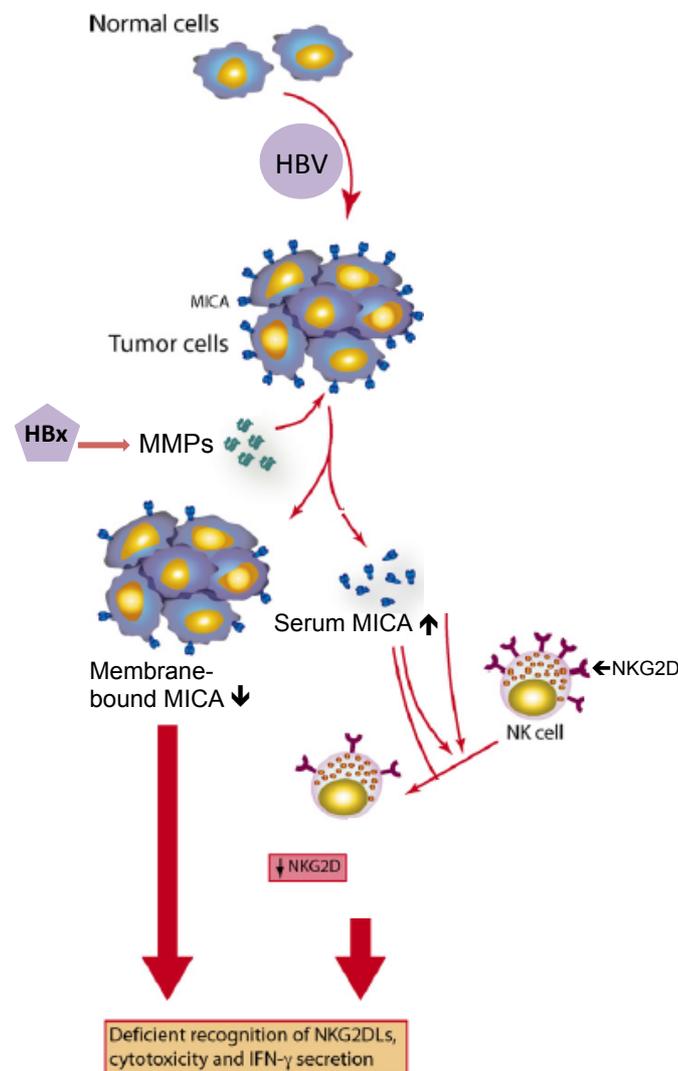


Figure 23. Chez les personnes ayant un CHC induite par le VHB, porteurs de l'allèle C du *MICA*-rs2596542 exprimeraient des niveaux élevés de MICA membranaire par les cellules tumorales. Le même temps la protéine virale d'HBx peut aussi activer des MMPs, aboutissant à une élévation de MICA sérique et un feed-back aboutir une diminution de MICA membranaire. Figure adaptée selon (Zwirner *et al.*, 2007).

En regardant ces études faites par Kumar *et al.*, nos résultats ont confirmé que le *MICA*-rs2596542 est associé au risque du CHC lié au VHC dans notre série de 700 CHC réséqués; par contre, il n'est pas significatif dans le groupe de CHC liés au VHB par rapport à la population générale Européenne (Article 2 ; Tableau 3). D'une manière surprenante, cette association au risque du CHC lié au VHC est disparue en analysant la survenue du

CHC dans la cohorte prospective avec des patients cirrhotiques infectés par le VHC (Article 2 ; Supplementary Figure 2). Au contraire, nous avons remarqué une association pour les homozygotes deux C-allèles en l'occurrence de CHC dans la cohorte prospective des patients cirrhotiques d'étiologie alcoolique (Article 2 ; Figure 2), ce qui est en contraste avec le résultat de l'étude VHC fait par Kumar *et al.* (T=Allèle à risque), mais en concordant avec le résultat de l'étude VHB fait par le même groupe de chercheurs (C=Allèle à risque). Ces résultats contradictoires dans nos deux séries ont bien démontrés l'importance de l'influence par différentes étiologies dans l'hépatocarcinogenèse, et encore une fois démontrent l'hétérogénéité du CHC. Tous ces résultats doivent être confirmés par d'autres études dans des cohortes homogènes plus élargies et le mécanisme d'action doit être exploré ultérieurement.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble de ce travail nous a permis d'apporter de nouveaux éléments dans la caractérisation des tumeurs hépatocellulaires et, en particulier, celle des carcinomes hépatocellulaires associés à l'infection par le virus de l'hépatite B.

Nous avons caractérisé une série importante de CHC associés à l'infection par le VHB sur le plan clinique, moléculaire et viral. Nos données suggèrent que les CHC liés au VHB présentent des caractéristiques cliniques et pathologiques différentes des CHC non liés au VHB. Nous avons identifié des mutations inactivatrices du gène *HBx* dans 70% des tumeurs et dans 32% des tissus non tumoraux adjacents. Dans 63% des cas, le nombre de copies virales dans les tumeurs est plus faible que dans les tissus non tumoraux. Le gène *TP53* est le plus fréquemment muté dans les CHC liés au VHB, tandis que le gène *CTNNB1* est le plus fréquemment muté dans les CHC non liés au VHB. La mutation R249S du *TP53* (classiquement associée à la consommation d'aflatoxine B1) est présente exclusivement dans le groupe VHB. Nous avons aussi observé que les mutations de *TP53* sont un prédicteur indépendant de survie uniquement pour les patients infectés par le VHB.

En ce qui concerne les groupes transcriptomiques (G1-G6), les CHC liés au VHB sont le plus souvent classés dans les groupes G1-G3. Globalement, dans les groupes G1-G2, nous avons observé une présence de mutations inactives d'*IRF2*. Les groupes G2-G3 sont fortement associés à des mutations de *TP53* et particulièrement à la mutation R249S. Enfin, dans les groupes G1-G3, les tumeurs sont de plus grande taille, présentent des mutations inactivatrices du gène *AXIN1* et des mutations inactivatrices d'*HBX*. Les groupes G5-G6 constituent un groupe de CHC homogène, fortement lié aux mutations activatrices de *CTNNB1*. En général, les groupes G4-G6 sont caractérisés par des tumeurs de petite taille et sont liés à d'autres cofacteurs (Alcool/VHC/NASH). De plus, tous les CHC liés au VHB classés dans les groupes G1-G3 sont caractérisés par une surexpression de plusieurs gènes impliqués dans le cycle cellulaire et de gènes codant pour des protéines oncofœtales comme EPCAM, KRT19 et AFP.

Nous avons d'autre part validé quatre SNPs précédemment identifiés par des études pangénomiques (GWAS) asiatiques dans la population européenne. Les distributions alléliques semblent varier selon l'étiologie de la pathologie hépatique. Ces résultats soulignent la complexité de la prédisposition génétique au CHC. L'étude doit prendre en considération l'origine géographique des patients ainsi que les facteurs de risque associés.

En conclusion, la caractérisation génomique intégrée du CHC lié ou non lié au VHB souligne la grande diversité moléculaire de CHC étroitement liés aux étiologies. Par conséquent, l'identification de marqueurs pronostiques et de cibles thérapeutiques dans le CHC doit être validé dans des cohortes de patients infectés par le VHB ou non. Une classification moléculaire du CHC est nécessaire pour aboutir à des soins plus personnalisés des patients en tenant compte de la diversité moléculaire des tumeurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abecasis, G. R., Altshuler, D., Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Gibbs, R. A., *et al.* (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319), 1061-1073.
- Al-Qahtani, A., Al-Anazi, M., Viswan, N. A., Khalaf, N., Abdo, A. A., Sanai, F. M., *et al.* (2012). Role of single nucleotide polymorphisms of KIF1B gene in HBV-associated viral hepatitis. *PLoS One*, 7(9), e45128.
- Alexopoulou, A., & Karayiannis, P. (2014). HBeAg negative variants and their role in the natural history of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, 20(24), 7644-7652.
- Altshuler, D. M., Gibbs, R. A., Peltonen, L., Altshuler, D. M., Gibbs, R. A., Peltonen, L., *et al.* (2010). Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*, 467(7311), 52-58.
- Arzumanyan, A., Reis, H. M., & Feitelson, M. A. (2013). Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Cancer*, 13(2), 123-135.
- Bagchi, A., & Mills, A. A. (2008). The quest for the 1p36 tumor suppressor. *Cancer Res*, 68(8), 2551-2556.
- Balsara, B. R., Pei, J., De Rienzo, A., Simon, D., Tosolini, A., Lu, Y. Y., *et al.* (2001). Human hepatocellular carcinoma is characterized by a highly consistent pattern of genomic imbalances, including frequent loss of 16q23.1-24.1. *Genes Chromosomes Cancer*, 30(3), 245-253.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., *et al.* (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285(5428), 727-729.
- Boender, P. J., Schalm, S. W., & Heijtkink, R. A. (1985). Detection of integration during active replication of hepatitis B virus in the liver. *J Med Virol*, 16(1), 47-54.
- Boige, V., Laurent-Puig, P., Fouchet, P., Flejou, J. F., Monges, G., Bedossa, P., *et al.* (1997). Concerted nonsyntenic allelic losses in hyperploid hepatocellular carcinoma as determined by a high-resolution allelotyping. *Cancer Res*, 57(10), 1986-1990.
- Bollyky, P. L., Rambaut, A., Harvey, P. H., & Holmes, E. C. (1996). Recombination between sequences of hepatitis B virus from different genotypes. *J Mol Evol*, 42(2), 97-102.
- Bolondi, L., Sofia, S., Siringo, S., Gaiani, S., Casali, A., Zironi, G., *et al.* (2001). Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis. *Gut*, 48(2), 251-259.
- Borie, F., Tretarre, B., Bouvier, A. M., Faivre, J., Binder, F., Launoy, G., *et al.* (2009). Primitive liver cancers: epidemiology and geographical study in France. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 21(9), 984-989.
- Bosch, F. X., Ribes, J., Diaz, M., & Cleries, R. (2004). Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*, 127(5 Suppl 1), S5-S16.
- Boyault, S., Rickman, D. S., de Reynies, A., Balabaud, C., Rebouissou, S., Jeannot, E., *et al.* (2007). Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*, 45(1), 42-52.
- Brechot, C. (2004). Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology*, 127(5 Suppl 1), S56-61.
- Brechot, C., Kremsdorf, D., Soussan, P., Pineau, P., Dejean, A., Paterlini-Brechot, P., *et al.* (2010). Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): molecular mechanisms and novel paradigms. *Pathol Biol (Paris)*, 58(4), 278-287.
- Brechot, C., Pourcel, C., Louise, A., Rain, B., & Tiollais, P. (1980). Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature*, 286(5772), 533-535.
- Bressac, B., Galvin, K. M., Liang, T. J., Isselbacher, K. J., Wands, J. R., & Ozturk, M. (1990). Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(5), 1973-1977.
- Brunetto, M. R., Giarin, M., Saracco, G., Oliveri, F., Calvo, P., Capra, G., *et al.* (1993). Hepatitis B virus unable to secrete e antigen and response to interferon in chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 105(3), 845-850.
- Chan, K. Y., Wong, C. M., Kwan, J. S., Lee, J. M., Cheung, K. W., Yuen, M. F., *et al.* (2011). Genome-wide association study of hepatocellular carcinoma in Southern Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *PLoS One*, 6(12), e28798.

- Chang, M. H., Chen, C. J., Lai, M. S., Hsu, H. M., Wu, T. C., Kong, M. S., *et al.* (1997). Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med*, 336(26), 1855-1859.
- Chen, J. G., & Zhang, S. W. (2011). Liver cancer epidemic in China: past, present and future. *Semin Cancer Biol*, 21(1), 59-69.
- Chiang, D. Y., Villanueva, A., Hoshida, Y., Peix, J., Newell, P., Minguez, B., *et al.* (2008). Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 68(16), 6779-6788.
- Chiu, J. H., Kao, H. L., Wu, L. H., Chang, H. M., & Lui, W. Y. (1992). Prediction of relapse or survival after resection in human hepatomas by DNA flow cytometry. *J Clin Invest*, 89(2), 539-545.
- Clark, A., Gerlach, F., Tong, H., Hoan, N. X., Song le, H., Toan, N. L., *et al.* (2013). A trivial role of STAT4 variant in chronic hepatitis B induced hepatocellular carcinoma. *Infect Genet Evol*, 18, 257-261.
- Cleary, S. P., Jeck, W. R., Zhao, X., Chen, K., Selitsky, S. R., Savich, G. L., *et al.* (2013). Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing. *Hepatology*, 58(5), 1693-1702.
- Cleary, S. P., Jeck, W. R., Zhao, X., Kuichen, Selitsky, S. R., Savich, G. L., *et al.* (2013). Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing. *Hepatology*.
- Clifford, R. J., Zhang, J., Meerzaman, D. M., Lyu, M. S., Hu, Y., Cultraro, C. M., *et al.* (2010). Genetic variations at loci involved in the immune response are risk factors for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 52(6), 2034-2043.
- Cougot, D., Neuveut, C., & Buendia, M. A. (2005). HBV-induced carcinogenesis. *Journal of Clinical Virology*, 34 Suppl. 1, 75-78.
- Dandri, M., & Locarnini, S. (2012). New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut*, 61 Suppl 1, i6-17.
- de La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C. A., Buendia, M. A., Soubrane, O., *et al.* (1998). Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15), 8847-8851.
- De Maria, N., Manno, M., & Villa, E. (2002). Sex hormones and liver cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 193(1-2), 59-63.
- De Souza, A. T., Hankins, G. R., Washington, M. K., Orton, T. C., & Jirtle, R. L. (1995). M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nat Genet*, 11(4), 447-449.
- Di Maio, M., Daniele, B., Pignata, S., Gallo, C., De Maio, E., Morabito, A., *et al.* (2008). Is human hepatocellular carcinoma a hormone-responsive tumor? *World J Gastroenterol*, 14(11), 1682-1689.
- Ding, D., Lou, X., Hua, D., Yu, W., Li, L., Wang, J., *et al.* (2012). Recurrent targeted genes of hepatitis B virus in the liver cancer genomes identified by a next-generation sequencing-based approach. *PLoS Genet*, 8(12), e1003065.
- Edmondson, H. A., & Steiner, P. E. (1954). Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*, 7(3), 462-503.
- El-Serag, H. B. (2011). Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 365(12), 1118-1127.
- El-Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557-2576.
- European Association for the Study of the Liver, E. O. f. R. a. T. o. C. (2012). EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 56, 908-943.
- Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., & Donato, F. (2004). Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 127(5 Suppl 1), S35-50.
- Forner, A., Llovet, J. M., & Bruix, J. (2012). Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 379(9822), 1245-1255.
- Frazer, K. A., Ballinger, D. G., Cox, D. R., Hinds, D. A., Stuve, L. L., Gibbs, R. A., *et al.* (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, 449(7164), 851-861.
- Fujii, H., Moriyama, K., Sakamoto, N., Kondo, T., Yasuda, K., Hiraizumi, Y., *et al.* (1992). Gly145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 184(3), 1152-1157.
- Fujimoto, Totoki, Y., Abe, T., Boroevich, K. A., Hosoda, F., Nguyen, H. H., *et al.* (2012). Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet*, 44(7), 760-764.

- Ganne-Carrie, N., Williams, V., Kaddouri, H., Trinchet, J. C., Dziri-Mendil, S., Alloui, C., *et al.* (2006). Significance of hepatitis B virus genotypes A to E in a cohort of patients with chronic hepatitis B in the Seine Saint Denis District of Paris (France). *J Med Virol*, 78(3), 335-340.
- Gaudio, E., Carpino, G., Cardinale, V., Franchitto, A., Onori, P., & Alvaro, D. (2009). New insights into liver stem cells. *Dig Liver Dis*, 41(7), 455-462.
- Gottlob, K., Pagano, S., Levrero, M., & Graessmann, A. (1998). Hepatitis B virus X protein transcription activation domains are neither required nor sufficient for cell transformation. *Cancer Res*, 58(16), 3566-3570.
- Gozuacik, D., Murakami, Y., Saigo, K., Chami, M., Mugnier, C., Lagorce, D., *et al.* (2001). Identification of human cancer-related genes by naturally occurring Hepatitis B Virus DNA tagging. *Oncogene*, 20(43), 6233-6240.
- Grimaldi, C., Bleiberg, H., Gay, F., Messner, M., Rougier, P., Kok, T. C., *et al.* (1998). Evaluation of antiandrogen therapy in unresectable hepatocellular carcinoma: results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer multicentric double-blind trial. *J Clin Oncol*, 16(2), 411-417.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., & Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, 419(6908), 734-738.
- Guan, X. Y., Fang, Y., Sham, J. S., Kwong, D. L., Zhang, Y., Liang, Q., *et al.* (2000). Recurrent chromosome alterations in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 29(2), 110-116.
- Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I. B., *et al.* (2012). Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 44(6), 694-698.
- Guidotti, L. G., & Chisari, F. V. (2006). Immunobiology and Pathogenesis of Viral Hepatitis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1, 23-61.
- Halfon, p., Pol, S., Bourlière, M., & Cacoub, P. (2002). Les génotypes du virus de l'hépatite B: implication cliniques, épidémiologiques et thérapeutiques. *Gastroenterol Clin Biol*, 26, 1005-1012.
- Hannoun, C., Krogsgaard, K., Horal, P., Lindh, M., & Groupa, t. I. T. (2002). Genotype Mixtures of Hepatitis B Virus in Patients Treated with Interferon. *The Journal of Infectious Diseases*, 186, 752-759.
- Herceg, Z., & Paliwal, A. (2011). Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. *Mutat Res*, 727(3), 55-61.
- Higgs, M. R., Chouteau, P., & Lerat, H. (2014). 'Liver let die': oxidative DNA damage and hepatotropic viruses. *J Gen Virol*, 95(Pt 5), 991-1004.
- Higuchi, M., Tanaka, E., & Kiyosawa, K. (2002). Epidemiology and clinical aspects on hepatitis C. *Jpn J Infect Dis*, 55, 69-77.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., & Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(10), 682-696.
- Hirschfield, G. M., Liu, X., Xu, C., Lu, Y., Xie, G., Lu, Y., *et al.* (2009). Primary biliary cirrhosis associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 variants. *N Engl J Med*, 360(24), 2544-2555.
- Honda, K., Sbisà, E., Tullo, A., Papeo, P. A., Saccone, C., Poole, S., *et al.* (1998). p53 mutation is a poor prognostic indicator for survival in patients with hepatocellular carcinoma undergoing surgical tumour ablation. *Br J Cancer*, 77(5), 776-782.
- Honda, M., Yamashita, T., Ueda, T., Takatori, H., Nishino, R., & Kaneko, S. (2006). Different signaling pathways in the livers of patients with chronic hepatitis B or chronic hepatitis C. *Hepatology*, 44(5), 1122-1138.
- Horras, C. J., Lamb, C. L., & Mitchell, K. A. (2011). Regulation of hepatocyte fate by interferon-gamma. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22(1), 35-43.
- Hoshida, Y., Nijman, S. M., Kobayashi, M., Chan, J. A., Brunet, J. P., Chiang, D. Y., *et al.* (2009). Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 69(18), 7385-7392.
- Hui, A. M., Sakamoto, M., Kanai, Y., Ino, Y., Gotoh, M., Yokota, J., *et al.* (1996). Inactivation of p16INK4 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 24(3), 575-579.
- Iavarone, M., Trabut, J. B., Delpuech, O., Carnot, F., Colombo, M., Kremsdorf, D., *et al.* (2003). Characterisation of hepatitis B virus X protein mutants in tumour and non-tumour liver cells using laser capture microdissection. *J Hepatol*, 39(2), 253-261.
- Imbeaud, S., Ladeiro, Y., & Zucman-Rossi, J. (2010). Identification of novel oncogenes and tumor suppressors in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*, 30(1), 75-86.

- Jiang, D. K., Sun, J., Cao, G., Liu, Y., Lin, D., Gao, Y. Z., *et al.* (2013). Genetic variants in STAT4 and HLA-DQ genes confer risk of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 45(1), 72-75.
- Jin, F., Xiong, W. J., Jing, J. C., Feng, Z., Qu, L. S., & Shen, X. Z. (2011). Evaluation of the association studies of single nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a systematic review. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137(7), 1095-1104.
- Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Hiramatsu, N., Sakamori, R., Yamaguchi, S., *et al.* (2005). Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol*, 43(6), 1013-1020.
- Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Groh, V., Spies, T., *et al.* (2003). Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int J Cancer*, 104(3), 354-361.
- Kan, Z., Zheng, H., Liu, X., Li, S., Barber, T. D., Gong, Z., *et al.* (2013). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Res*, 23(9), 1422-1433.
- Kariuki, S. N., Kirou, K. A., MacDermott, E. J., Barillas-Arias, L., Crow, M. K., & Niewold, T. B. (2009). Cutting edge: autoimmune disease risk variant of STAT4 confers increased sensitivity to IFN-alpha in lupus patients in vivo. *J Immunol*, 182(1), 34-38.
- Kato, H., Ruzibakiev, R., Yuldasheva, N., Hegay, T., Kurbanov, F., Achundjanov, B., *et al.* (2002). Hepatitis B virus genotypes in Uzbekistan and validity of two different systems for genotyping. *J Med Virol*, 67(4), 477-483.
- Kew, M. C. (2003). Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver International* 23, 405-409.
- Kew, M. C. (2011). Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 26 Suppl 1, 144-152.
- Kim, C. M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., & Jay, G. (1991). HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*, 351(6324), 317-320.
- Kim, H., Choi, G. H., Na, D. C., Ahn, E. Y., Kim, G. I., Lee, J. E., *et al.* (2011). Human hepatocellular carcinomas with "Stemness"-related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis. *Hepatology*, 54(5), 1707-1717.
- Kim, Y. C., Song, K. S., Yoon, G., Nam, M. J., & Ryu, W. S. (2001). Activated ras oncogene collaborates with HBx gene of hepatitis B virus to transform cells by suppressing HBx-mediated apoptosis. *Oncogene*, 20(1), 16-23.
- Kohga, K., Takehara, T., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Miyagi, T., Hiramatsu, N., *et al.* (2008). Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 99(8), 1643-1649.
- Koike, K. (2002). Hepatocarcinogenesis in hepatitis viral infection: lessons from transgenic mouse studies. *J Gastroenterol*, 37 Suppl 13, 55-64.
- Kumar, V., Kato, N., Urabe, Y., Takahashi, A., Muroyama, R., Hosono, N., *et al.* (2011). Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 43(5), 455-458.
- Kumar, V., Yi Lo, P. H., Sawai, H., Kato, N., Takahashi, A., Deng, Z., *et al.* (2012). Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 7(9), e44743.
- Lara-Pezzi, E., Gomez-Gavira, M. V., Galvez, B. G., Mira, E., Iniguez, M. A., Fresno, M., *et al.* (2002). The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest*, 110(12), 1831-1838.
- Laurent-Puig, P., Legoix, P., Bluteau, O., Belghiti, J., Franco, D., Binot, F., *et al.* (2001). Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 120(7), 1763-1773.
- Laurent-Puig, P., & Zucman-Rossi, J. (2006). Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene*, 25(27), 3778-3786.
- Lee, J. S., Heo, J., Libbrecht, L., Chu, I. S., Kaposi-Novak, P., Calvisi, D. F., *et al.* (2006). A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med*, 12(4), 410-416.
- Lee, S., Nakamura, E., Yang, H., Wei, W., Linggi, M. S., Sajan, M. P., *et al.* (2005). Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer. *Cancer Cell*, 8(2), 155-167.

- Lencioni, R. (2010). Surveillance and early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*, 42 Suppl 3, S223-227.
- Li, Zhao, H., Zhang, X., Wood, L. D., Anders, R. A., Choti, M. A., *et al.* (2011). Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 43(9), 828-829.
- Li, S., & Mao, M. (2013). Next generation sequencing reveals genetic landscape of hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett*, 340(2), 247-253.
- Li, S., Qian, J., Yang, Y., Zhao, W., Dai, J., Bei, J. X., *et al.* (2012). GWAS identifies novel susceptibility loci on 6p21.32 and 21q21.3 for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *PLoS Genet*, 8(7), e1002791.
- Li, S. P., Wang, H. Y., Li, J. Q., Zhang, C. Q., Feng, Q. S., Huang, P., *et al.* (2001). Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in hepatocellular carcinoma in Southern China. *J Hepatol*, 34(6), 840-849.
- Liu, C.-J., Kao, J.-H., & Chen, D.-S. (2006). Mixed Hepatitis B Virus Genotype Infections: The More, the Worse? *hepatology*, 770.
- Llovet, J. M., & Bruix, J. (2008). Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 48(4), 1312-1327.
- Llovet, J. M., & Hernandez-Gea, V. (2014). Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III failure and novel perspectives on trial design. *Clin Cancer Res*, 20(8), 2072-2079.
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., *et al.* (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 359(4), 378-390.
- Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., *et al.* (2011). Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol*, 55(5), 996-1003.
- Lugassy, C., Bernuau, J., Thiers, V., Krosgaard, K., Degott, C., Wantzin, P., *et al.* (1987). Sequences of hepatitis B virus DNA in the serum and liver of patients with acute benign and fulminant hepatitis. *J Infect Dis*, 155(1), 64-71.
- Lupberger, J., & Hildt, E. (2007). Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol* 7; 13(1):, 74-81.
- Ma, S., Chan, K. W., Hu, L., Lee, T. K., Wo, J. Y., Ng, I. O., *et al.* (2007). Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology*, 132(7), 2542-2556.
- MacAskill, A. F., & Kittler, J. T. (2010). Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends Cell Biol*, 20(2), 102-112.
- Manolio, T. A. (2010). Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *N Engl J Med*, 363, 166-176.
- Marchio, A., Meddeb, M., Pineau, P., Danglot, G., Tiollais, P., Bernheim, A., *et al.* (1997). Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 18(1), 59-65.
- Mayerat, C., Mantegani, A., & Frei, P. C. (1999). Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat*, 6(4), 299-304.
- McCarthy, M. I., Abecasis, G. R., Cardon, L. R., Goldstein, D. B., Little, J., Ioannidis, J. P., *et al.* (2008). Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet*, 9(5), 356-369.
- Mells, G. F., Floyd, J. A., Morley, K. I., Cordell, H. J., Franklin, C. S., Shin, S. Y., *et al.* (2011). Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat Genet*, 43(4), 329-332.
- Midorikawa, Y., Yamamoto, S., Tsuji, S., Kamimura, N., Ishikawa, S., Igarashi, H., *et al.* (2009). Allelic imbalances and homozygous deletion on 8p23.2 for stepwise progression of hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 49(2), 513-522.
- Miki, D., Ochi, H., Hayes, C. N., Abe, H., Yoshima, T., Aikata, H., *et al.* (2011). Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. *Nat Genet*, 43(8), 797-800.
- Miki, D., Ochi, H., Hayes, C. N., Aikata, H., & Chayama, K. (2012). Hepatocellular carcinoma: towards personalized medicine. *Cancer Sci*, 103(5), 846-850.
- Murakami, Y., Saigo, K., Takashima, H., Minami, M., Okanoue, T., Brechot, C., *et al.* (2005). Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut*, 54(8), 1162-1168.
- Nagai, H., Pineau, P., Tiollais, P., Buendia, M. A., & Dejean, A. (1997). Comprehensive allelotyping of human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 14(24), 2927-2933.

- Nahon, P., Sutton, A., Rufat, P., Faisant, C., Simon, C., Barget, N., *et al.* (2007). Lack of association of some chemokine system polymorphisms with the risks of death and hepatocellular carcinoma occurrence in patients with alcoholic cirrhosis: a prospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 19(5), 425-431.
- Nakagawa, H., & Maeda, S. (2012). Molecular mechanisms of liver injury and hepatocarcinogenesis: focusing on the role of stress-activated MAPK. *Patholog Res Int*, 2012, 172894.
- Nakamura, T., Iwamura, Y., Kaneko, M., Nakagawa, K., Kawai, K., Mitamura, K., *et al.* (1991). Deletions and rearrangements of the retinoblastoma gene in hepatocellular carcinoma, insulinoma and some neurogenic tumors as found in a study of 121 tumors. *Jpn J Clin Oncol*, 21(5), 325-329.
- Nault, J. C., De Reynies, A., Villanueva, A., Calderaro, J., Rebouissou, S., Couchy, G., *et al.* (2013). A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection. *Gastroenterology*, 145(1), 176-187.
- Nault, J. C., Mallet, M., Pilati, C., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Laurent, C., *et al.* (2013). High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun*, 4, 2218.
- Nault, J. C., & Zucman-Rossi, J. (2011). Genetics of hepatobiliary carcinogenesis. *Semin Liver Dis*, 31(2), 173-187.
- Nault, J. C., & Zucman-Rossi, J. (2014). Genetics of hepatocellular carcinoma: the next generation. *J Hepatol*, 60(1), 224-226.
- Neuveut, C., Wei, Y., & Buendia, M. A. (2010). Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology* 52, 594-604.
- Ng, S. A., & Lee, C. (2011). Hepatitis B virus X gene and hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol*, 46(8), 974-990.
- Nowak, A. K., Stockler, M. R., Chow, P. K., & Findlay, M. (2005). Use of tamoxifen in advanced-stage hepatocellular carcinoma. A systematic review. *Cancer*, 103(7), 1408-1414.
- O'Shea, J. J., Holland, S. M., & Staudt, L. M. (2013). JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med*, 368(2), 161-170.
- Ohnishi, S., Murakami, T., Moriyama, T., Mitamura, K., & Imawari, M. (1986). Androgen and estrogen receptors in hepatocellular carcinoma and in the surrounding noncancerous liver tissue. *Hepatology*, 6(3), 440-443.
- Patel, A., & Sun, W. (2014). Molecular Targeted Therapy in Hepatocellular Carcinoma: From Biology to Clinical Practice and Future. *Curr Treat Options Oncol*.
- Paterlini-Brechot, P., Saigo, K., Murakami, Y., Chami, M., Gozuacik, D., Mugnier, C., *et al.* (2003). Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene*, 22(25), 3911-3916.
- Perfumo, S., Amicone, L., Colloca, S., Giorgio, M., Pozzi, L., & Tripodi, M. (1992). Recognition efficiency of the hepatitis B virus polyadenylation signals is tissue specific in transgenic mice. *J Virol*, 66(11), 6819-6823.
- Pez, F., Lopez, A., Kim, M., Wands, J. R., Caron de Fromentel, C., & Merle, P. (2013). Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *J Hepatol*, 59(5), 1107-1117.
- Pilati, C., Letouze, E., Nault, J. C., Imbeaud, S., Boulai, A., Calderaro, J., *et al.* (2014). Genomic profiling of hepatocellular adenomas reveals recurrent FRK-activating mutations and the mechanisms of malignant transformation. *Cancer Cell*, 25(4), 428-441.
- Pollicino, T., Raffa, G., Costantino, L., Lisa, A., Campello, C., Squadrito, G., *et al.* (2007). Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 45(2), 277-285.
- Raimondo, G., Pollicino, T., Cacciola, I., & Squadrito, G. (2007). Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 46(1), 160-170.
- Rehermann, B. (2013). Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat Med*, 19(7), 859-868.
- Rehermann, B., & Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 5(3), 215-229.
- Remmers, E. F., Plenge, R. M., Lee, A. T., Graham, R. R., Hom, G., Behrens, T. W., *et al.* (2007). STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 357(10), 977-986.
- Roberts, R., Wells, G. A., Stewart, A. F., Dandona, S., & Chen, L. (2010). The genome-wide association study--a new era for common polygenic disorders. *J Cardiovasc Transl Res*, 3(3), 173-182.

- Roncalli, M. (2004). Hepatocellular nodules in cirrhosis: focus on diagnostic criteria on liver biopsy. A Western experience. *Liver Transpl*, 10(2 Suppl 1), S9-15.
- Saigo, K., Yoshida, K., Ikeda, R., Sakamoto, Y., Murakami, Y., Urashima, T., *et al.* (2008). Integration of hepatitis B virus DNA into the myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL4) gene and rearrangements of MLL4 in human hepatocellular carcinoma. *Hum Mutat*, 29(5), 703-708.
- Sakamoto, M., Hirohashi, S., & Shimosato, Y. (1991). Early stages of multistep hepatocarcinogenesis: adenomatous hyperplasia and early hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*, 22(2), 172-178.
- Salih, H. R., Rammensee, H. G., & Steinle, A. (2002). Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol*, 169(8), 4098-4102.
- Sangiovanni, A., Del Ninno, E., Fasani, P., De Fazio, C., Ronchi, G., Romeo, R., *et al.* (2004). Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. *Gastroenterology*, 126(4), 1005-1014.
- Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., *et al.* (2000). AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet*, 24(3), 245-250.
- Sawai, H., Nishida, N., Mbarek, H., Matsuda, K., Mawatari, Y., Yamaoka, M., *et al.* (2012). No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet*, 13, 47.
- Schuppan, D., & Afdhal, N. H. (2008). Liver cirrhosis. *Lancet*, 371(9615), 838-851.
- Schuster, R., Gerlich, W. H., & Schaefer, S. (2000). Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene*, 19(9), 1173-1180.
- Seng, T. J., Ichimura, K., Liu, L., Tingby, O., Pearson, D. M., & Collins, V. P. (2005). Complex chromosome 22 rearrangements in astrocytic tumors identified using microsatellite and chromosome 22 tile path array analysis. *Genes Chromosomes Cancer*, 43(2), 181-193.
- Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36.
- Sheu, J. C., Lin, Y. W., Chou, H. C., Huang, G. T., Lee, H. S., Lin, Y. H., *et al.* (1999). Loss of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Br J Cancer*, 80(3-4), 468-476.
- Sumi, H., Yokosuka, O., Seki, N., Arai, M., Imazeki, F., Kurihara, T., *et al.* (2003). Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology*, 37(1), 19-26.
- Sung, W. K., Zheng, H., Li, S., Chen, R., Liu, X., Li, Y., *et al.* (2012). Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 44(7), 765-769.
- Syvänen, A. C. (2001). Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *nature*, 2, 930-942.
- Tanaka, Y., Esumi, M., & Shikata, T. (1988). Frequent integration of hepatitis B virus DNA in noncancerous liver tissue from hepatocellular carcinoma patients. *J Med Virol*, 26(1), 7-14.
- Tatematsu, K., Tanaka, Y., Kurbanov, F., Sugauchi, F., Mano, S., Maeshiro, T., *et al.* (2009). A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*, 83(20), 10538-10547.
- Thibault, V., Benhamou, Y., Seguret, C., Bochet, M., Katlama, C., Bricaire, F., *et al.* (1999). Hepatitis B virus (HBV) mutations associated with resistance to lamivudine in patients coinfecting with HBV and human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol*, 37(9), 3013-3016.
- Thomas, R. M., Berman, J. J., Yetter, R. A., Moore, G. W., & Hutchins, G. M. (1992). Liver cell dysplasia: a DNA aneuploid lesion with distinct morphologic features. *Hum Pathol*, 23(5), 496-503.
- Toan, N. L., Song le, H., Kreamsner, P. G., Duy, D. N., Binh, V. Q., Koeberlein, B., *et al.* (2006). Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam. *Hepatology*, 43(6), 1375-1384.
- Toh, S. T., Jin, Y., Liu, L., Wang, J., Babrzadeh, F., Gharizadeh, B., *et al.* (2013). Deep sequencing of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma patients reveals enriched integration events, structural alterations and sequence variations. *Carcinogenesis*, 34(4), 787-798.
- Tokino, T., Fukushige, S., Nakamura, T., Nagaya, T., Murotsu, T., Shiga, K., *et al.* (1987). Chromosomal translocation and inverted duplication associated with integrated hepatitis B virus in hepatocellular carcinomas. *J Virol*, 61(12), 3848-3854.
- Tornesello, M. L., Buonaguro, L., Tatangelo, F., Botti, G., Izzo, F., & Buonaguro, F. M. (2013). Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Genomics*, 102(2), 74-83.

- Trinchet, & Ziol, M. (2012). Diagnostic des nodules sur cirrhose. Quelle est la place de la biopsie ? *Post'U*, 191-200.
- Trinchet, J. C., Chaffaut, C., Bourcier, V., Degos, F., Henrion, J., Fontaine, H., *et al.* (2011). Ultrasonographic surveillance of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a randomized trial comparing 3- and 6-month periodicities. *Hepatology*, 54(6), 1987-1997.
- Tsuei, D. J., Chang, M. H., Chen, P. J., Hsu, T. Y., & Ni, Y. H. (2002). Characterization of integration patterns and flanking cellular sequences of hepatitis B virus in childhood hepatocellular carcinomas. *J Med Virol*, 68(4), 513-521.
- Valsamakis, A. (2007). Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Rev*, 20(3), 426-439, table of contents.
- Venard, V., Corsaro, D., Kajzer, C., Bronowicki, J. P., & Le Faou, A. (2000). Hepatitis B virus X gene variability in French-born patients with chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. *J Med Virol*, 62(2), 177-184.
- Villanueva, A., Hoshida, Y., Battiston, C., Tovar, V., Sia, D., Alsinet, C., *et al.* (2011). Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 140(5), 1501-1512 e1502.
- Wang, D. G. (1998). Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science*, 280(5366), 1077-1082.
- Wang, Z. C., Gao, Q., Shi, J. Y., Yang, L. X., Zhou, J., Wang, X. Y., *et al.* (2013). Genetic polymorphism of the kinesin-like protein KIF1B gene and the risk of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 8(4), e62571.
- Wild, C. P., & Montesano, R. (2009). A model of interaction: aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. *Cancer Lett*, 286(1), 22-28.
- Wild, C. P., & Turner, P. C. (2002). The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 17(6), 471-481.
- Wong, N., Lai, P., Pang, E., Fung, L. F., Sheng, Z., Wong, V., *et al.* (2000). Genomic aberrations in human hepatocellular carcinomas of differing etiologies. *Clin Cancer Res*, 6(10), 4000-4009.
- Woo, H. G., Wang, X. W., Budhu, A., Kim, Y. H., Kwon, S. M., Tang, Z. Y., *et al.* (2011). Association of TP53 mutations with stem cell-like gene expression and survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 140(3), 1063-1070.
- Yamashita, T., Forgues, M., Wang, W., Kim, J. W., Ye, Q., Jia, H., *et al.* (2008). EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 68(5), 1451-1461.
- Yamashita, T., Honda, M., Nakamoto, Y., Baba, M., Nio, K., Hara, Y., *et al.* (2013). Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 57(4), 1484-1497.
- Yang, J., Xing, K., Deng, R., Wang, J., & Wang, X. (2006). Identification of Hepatitis B virus putative intergenotype recombinants by using fragment typing. *J Gen Virol*, 87(Pt 8), 2203-2215.
- Yang, Z. F., Ngai, P., Ho, D. W., Yu, W. C., Ng, M. N., Lau, C. K., *et al.* (2008). Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology*, 47(3), 919-928.
- Ye, L., Dong, N., Wang, Q., Xu, Z., Cai, N., Wang, H., *et al.* (2008). Progressive changes in hepatoma cells stably transfected with hepatitis B virus X gene. *Intervirology*, 51(1), 50-58.
- Yim, H. J., & Lok, A. S. (2006). Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*, 43(2 Suppl 1), S173-181.
- Yokosuka, O., & Arai, M. (2006). Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. *Med Mol Morphol*, 39(3), 113-120.
- Yoo, C. B., & Jones, P. A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, 5(1), 37-50.
- Zender, L., Xue, W., Cordon-Cardo, C., Hannon, G. J., Lucito, R., Powers, S., *et al.* (2005). Generation and analysis of genetically defined liver carcinomas derived from bipotential liver progenitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 70, 251-261.
- Zhang, H., Zhai, Y., Hu, Z., Wu, C., Qian, J., Jia, W., *et al.* (2010). Genome-wide association study identifies 1p36.22 as a new susceptibility locus for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *Nat Genet*, 42(9), 755-758.
- Zwirner, N. W., Fuertes, M. B., Girart, M. V., Domaica, C. I., & Rossi, L. E. (2007). Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rev*, 18(1-2), 159-170.