UNIVERSITÉ PARIS-DESCARTES (Paris 5)

École doctorale : Biologie et Biotechnologie

Institut Universitaire d'Hématologie

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS 5

Spécialité : Bases Fondamentales de l'Oncogenèse

Présentée par

Jean-Charles NAULT

Identification de nouveaux mécanismes de carcinogenèse et facteurs pronostiques des tumeurs hépatocellulaires

Thèse dirigée par le Pr. Jessica Zucman-Rossi

Soutenue le 20 octobre 2015

Président Pr. Pierre LAURENT-PUIG

Rapporteur Pr. Chris VERSLYPE

Rapporteur Pr. Fabien ZOULIM

Examinateur Dr. Olivier DELATTRE

Examinateur Pr. Valérie PARADIS

Directrice de thèse Pr. Jessica ZUCMAN-ROSSI

Remerciements

Je tiens à remercier vivement le Pr Fabien Zoulim et le Pr Chris Verslype pour l'intérêt qu'ils ont portés à ce travail en acceptant d'être rapporteurs.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Professeur Valérie Paradis et au Docteur Olivier Delattre pour avoir accepté d'examiner ce travail.
Je remercie le Professeur Pierre Laurent-Puig (que j'appelle Pierre dans la vraie vie) de m'avoir fait l'honneur d'être le président de mon jury.

Bien sur je tiens à remercier plus que tout Jessica qui m'as transmis depuis mon master 2 et puis tout au long de la thèse sa rigueur et sa passion scientifique. Tu étais quasiment disponible 24 heures/24 heures (c'est la hot line « génétique et cancer ») pour parler science et faire avancer tous ses projets. Tout ceci n'est rien sans évoquer les moments passés à travers le monde : Giverny et le séjour avec le labo en M2 (bonne entrée en matière je trouve), Hong Kong et les poissons vivants tués à coup de hachoir, Montréal et sa déprime chronique, l'interview alcool à Jean Verdier par Clara, Kyoto et le karaoké, Washington, San Francisco, Berlin, Rennes, Bordeaux….

A toutes les personnes qui sont actuellement au Laboratoire : Eric, Sandra, Jay, Jocelyn, Emilie, Kornelius, Robin, Lisa, Didier, Annie, Clément, Marie Claude, Many, Stéfano, Andréa, Tiziana (j'étais sur que le bureau devant les ascenseurs restera à jamais une annexe de l'Italie), Julien, Emmanuel, Yoann. Bien sur un grand remerciement à Annie (tu vas nous manquer au quotidien) et Didier (qui a toujours écouté mes blablatages scientifiques).

A Gabrielle qui m'a appris à faire des manips pendant mon M2

A Maxime et Benjamin pour le travail sur TERT, quand même ce n'est pas rien.

A Guillaume, mon pote depuis le début de mon internat, qui a une des meilleures qualités chez un être humain, on peut toujours compter sur son aide en toutes circonstances.

A toutes les personnes qui ont été auparavant au laboratoire : Yannick (j'ai découvert grâce à toi le fétichisme Mohair), Thomas (Triforce forever), Laura (ma voisine de bureau de M2, la pauvre elle a subit), Giuli (un des piliers de la première Italian Team), Michel (un

neurochirurgien qui fait des souris transgéniques c'est quand même cool), Shalini, Cécile, Anne, Lucie, Ichrafe, Ilyr, Benoit, Anaïs.

A l'équipe de Bondy qui a su m'accueillir dans le 93 (Seine Saint-Denis Style, La Seine Saint-Denis c'est de la bombe baby): Nathalie, Pierre, Véronique, Gisèle, Valérie, Olivier, Marianne, Jean-Claude.
A Michel Beaugrand, si Jessica m'a appris la génétique des cancers, vous m'avez appris l'hépatologie. De plus le séjour à Uzes avec Cécile était incroyable.
A Philippe et Laurence pour notre semestre à Saint-Louis et les bouffes après
A Sandrine, Nils, Pauline, Samia pour les soirées post-hosto

A Camilla avec qui j'ai vécu une grande partie de ma thèse de science et toute la sienne. Même si tout ça c'est du passé, c'était bien quand même.

A Iadh, j'espère que tu vas te plaire au labo autant que je m'y plais.

Aux potes à Paris et ailleurs: Julien (de Saint Geneviève des Bois à NYC), les 3 Thomas (l'âme damné de Dominique Farrugia, l'écrivain, le prof), Benoit, Antoine, Alix, Alexandra.

Aux potes de niçe : Julien et Xavier.

A Manon qui est auprès de moi et m'apporte réconfort et contradictions

A mon père, mon oncle Jean, à ma tante Camille qui est décédé trop tôt.

A ma mère et à ma tante Mathilde qui m'ont élevé et m'ont apporté leur soutien toute ma vie et que j'aime.

A l'adeno-associated virus de type 2, au promoteur de la telomerase reverse transcriptase à Pablo Neruda, à Joey Starr et à la charcutière.

Sommaire

Sommaire 5
Abréviations 8
Index des figures 11
INTRODUCTION 13
Généralités sur les carcinomes hépatocellulaires 14
A. Epidémiologie 14
B. Etiologies 15
C. Diagnostic 16
D. Caractéristiques anatomopathologiques 17
E. Arbre décisionnel thérapeutique 19
F. Traitement curatif 19
G. Traitement palliatif 20
Classification moléculaire des carcinomes hépatocellulaires 21
A. Anomalies chromosomiques 21
B. Principales altérations génétiques et voies de signalisation dysrégulées dans le CHC 22
1. **Généralités** 22
2. **Voie de signalisation Wnt/β-caténine** 23
3. **Gène du cycle cellulaire (P53/RB)** 25
4. **Gène de remodelage de la chromatine et histone methyltransferase** 26
5. **Voie de signalisation du stress oxydatif NRF2/KEAP1** 27
6. **Voie de signalisation AKT/MTOR et RAS/RAF/MAP kinase** 28

C. Rôle du VHB dans la carcinogénèse hépatique 30
1. **Généralité sur le virus de l'hépatite B** 30
2. **Rôle des protéines virales dans la carcinogénèse** 31
3. **Mutagénèse insertionnelle et VHB** 31

D. Télomères et de la télomérase dans la carcinogénèse hépatique 32
1. **Généralités sur les télomères et la télomérase** 32
2. **Rôle des télomères et la télomérase dans le développement de la cirrhose et la carcinogénèse hépatique** 33

E. Classification transcriptomique non supervisée des CHC 34
Généralités sur les adénomes hépatocellulaires 36
A. Epidémiologie 36
B. Facteurs de risque 37
C. Anatomopathologie 38
D. Diagnostic et prise en charge 39

Classification moléculaire des adénomes hépatocellulaires 41

A. Généralités sur la classification génotype/phénotype 41

B. Adénome muté *HNF1A* 41

C. Adénome inflammatoire 44

D. Adénome muté β-caténine 45

E. Adénome non classé 47

Contexte du projet de recherche et objectifs 49

RESULTATS 51

1. Identification de nouveaux oncogènes dans les adénomes inflammatoires . 52

Article 1: GNAS-activating mutations define a rare subgroup of inflammatory liver tumors characterized by STAT3 activation. 55

Article 2: Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas. 69

Article 3: Biochemical and functional analyses of gp130 mutants unveil JAK1 as a novel therapeutic target in human inflammatory hepatocellular adenoma. 78

Article 4: Hepatocellular benign tumors-from molecular classification to personalized clinical care. 88

Article 5: Molecular classification of hepatocellular adenomas. 105

2. Rôle des mutations activatrices du promoteur de *TERT* dans la transformation maligne sur foie sain et cirrhotique 114

Article 6: High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. 116

Article 7: Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. 123

Article 8: Genomic profiling of hepatocellular adenomas reveals recurrent FRK-activating mutations and the mechanisms of malignant transformation. 134

Article 9: Overexpression and promoter mutation of the TERT gene in malignant pleural mesothelioma. 150

Article 10: High incidence of activating TERT promoter mutations in meningiomas undergoing malignant progression 155

3. Diversité et pronostic moléculaire des carcinomes hépatocellulaires 162

Article 11: A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection. 164

Article 12: Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. 179

Article 13: ALDH3A1 is overexpressed in a subset of hepatocellular carcinoma characterised by activation of the Wnt/ß-catenin pathway. 190

Article 14: Overexpression of phosphatidylinositol 4-kinase type IIIα is associated with undifferentiated status and poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. 198

Article 15: Characterization of a novel PXR isoform with potential dominant-negative properties. 208

Article 16: Genetics of hepatobiliary carcinogenesis. 217

Article 17: Molecular profiling of liver tumors: classification and clinical translation for decision making. 233

Article 18: The genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. 248

4. Rôle oncogénique de l'adéno-associated virus de type 2 et du virus de l'hépatite B dans la carcinogénèse hépatique 273

Article 19: Recurrent adeno-associated virus 2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas 275

Article 20: Integration of tumour and viral genomic characterizations in HBV-related hepatocellular carcinomas. 286

DISCUSSION 297

A. Inflammation induite par des oncogènes dans les adénomes hépatocellulaires : des gènes aux thérapies ciblées 298

1. Le locus *GNAS* 298
2. La voie de signalisation de l'AMP cyclique via les protéines G 299
3. Les mutations activatrices de *GNAS* dans la tumorigénèse humaine 299
4. Inflammation induite par des oncogènes 301
5. Thérapies ciblées dirigées contre les oncogènes de la voie IL6/JAK/STAT 303

B. Impact clinique de la signature pronostique moléculaire à 5-gènes 304

1. Généralités sur le pronostic des patients avec carcinome hépatocellulaire 304
2. Signature pronostique moléculaire tumorale 305

C. Rôle des mutations du promoteur de *TERT* dans la transformation maligne sur foie sain et sur foie cirrhotique 308

1. Différents mécanismes de réactivation de la télomérase dans la carcinogénèse hépatique 308
- Mutations du promoteur de *TERT* dans les cancers solides 308
- Mutations somatiques du promoteur de *TERT* dans les CHC 310
- Insertion du virus de l'hépatite B dans *TERT* 310
- Amplification de *TERT* 311

2. Mécanismes de transformation maligne sur foie sain et cirrhotique 311
3. Thérapie ciblée anti télomérase 313

D. Mécanismes d'action d'AAV2 comme virus oncogénique dans la carcinogénèse hépatique 313

1. Généralités et structure d'AAV2 314
2. Réplication et cycle cellulaire d'AAV2 315
3. AAV2 comme vecteur de thérapie génique 316
4. Virus et cancer : généralités 318
5. Rôle oncogénique et mécanismes d'action potentiel d'AAV2 dans la carcinogénèse humaine 320

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 324

Références 326

Abréviations

4EBP	4E-binding protein
AAV2	Adeno-associated virus type 2
AAVS1	Adeno-associated virus integration site 1
AFP	Alphafoetoprotéine
AHC	Adénome hépatocellulaire
ALDH3A1	Aldehyde Dehydrogenase 3 Family, Member A1
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
APC	Adenomatous polyposis coli
ARID1A	AT Rich Interactive Domain 1A
ARID1B	AT Rich Interactive Domain 1B
ARID2	AT Rich Interactive Domain 2
AXIN1	Axis Inhibitor 1
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BRD7	Bromodomain containing 7
cccDNA	Covalently closed circular DNA
CCND1	Cyclin D1
CCNE1	Cyclin E1
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CGH-SNP	Comparative Genomic Hybridization plus Single Nucleotide Polymorphism
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CRP	C-reactive protein
CTNNB1	Catenin (Cadherin- Associated Protein), Beta 1
CUL3	Cullin 3
EBNAs	Epstein-Barr virus nuclear antigens
EBV	Epstein-Barr virus
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK1/2	Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2
ETS/TCF	E-twenty -six/ternary complex factor
FGF19	Fibroblast Growth Factor 19
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FRK	Fyn-related kinase
G6PC	Glucose-6-Phosphatase, Catalytic Subunit
GABP	Facteur de transcription A-binding protein
GDP	Guanosine diphosphate
GLUL	Glutamate-Ammonia Ligase
GNAS	Guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating
gp130	Glycoprotein 130
gp80	Glycoprotein 80
GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta

GTP	Guanosine triphosphate
HHV8	Human Herpesvirus - 8
HNF1A	Hepatocyte nuclear factor 1 alpha
HPV	Human papilloma virus
HTLV1	Human T cell leukemia / lymphoma virus type 1
IDH1/2	Isocitrate Dehydrogenase 1/2
IGFR	Insulin-like growth factor receptor
IL6	Interleukine 6
IL6R	Interleukine 6 receptor
IL6ST	Interleukin 6 Signal Transducer
IRF2	Interferon regulatory factor 2
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ITR	Inverse tandem repeat
JAK1/2	Janus Kinase 1 et 2
JNK	Jun N-terminal protein kinase
KEAP1	Kelch-Like ECH-Associated Protein 1
LANA	Latency-associated nuclear antigen
LFABP	Liver fatty acid binding protein
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
LMPs	Latent membrane proteins
MCA	McCune Albright
MLL	Mixed-lineage leukemia
MODY3	Maturity-onset diabetes of the young type 3
MTOR	Mammalian target of rapamycin
NASH	Non alcoholic steatohepatitis
NESP55	Neuroendocrine-specific protein of 55 kDa
NFE2L2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NFKB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NRF2	NF-E2-related factor 2
ORF	Open reading frame
PBAF	Polybromo-associated BAF
PBRM1	Protein polybromo-1
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptors
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
POT1	Protection of telomeres 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PXR	Nuclear Pregnane X Receptor
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAP1	Ras-related protein 1
RARB	Retinoic Acid Receptor, Beta
RB1	Retinoblastoma 1
RBE	Rep Binding Element
RGS	Regulators of G protein signaling
RPS6KA3	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3
RSK2	Ribosomal S6 kinase 2

RT-PCR Q	Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
S6K	S6 kinase
SAA	Serum Amyloid A
SOS	Son of Sevenless
STAT1/3	Signal transducer and activator of transcription 1/3
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TDM	Tomodensitométrie
TERC	Telomerase RNA component
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TGFB	Transforming growth factor beta
TIN2	TERF1-interacting nuclear factor 2
TNFSF10	Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 10
TP53	Tumor Protein P53
TPP1	Tripeptidyl Peptidase I
TRF1/2	Telomeric repeat-binding factor 1/2
TSC1/2	Tuberous Sclerosis 1/2
UGT2B7	UDP-Glucuronosyltransferase-2B7
UTR	UnTranslated Region
Bcl2	B-cell lymphoma 2
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
GPCR	G protein–coupled receptors
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
MIPs	Macrophage Inflammatory Proteins

Index des figures

Figure 1 : incidence du carcinome hépatocellulaire (nombres de cas/100 000 habitants) en fonction des pays dans le monde....15
Figure 2 : algorithme diagnostique non invasif des recommandations de l'American Association of the Study of the Liver AASLD sur le diagnostic du CHC....16
Figure 3 : processus multi-étapes de carcinogénèse sur cirrhose....18
Figure 4 : prise en charge thérapeutique d'après la classification BCLC....19
Figure 5 : survie globale dans l'essai randomisé SHARP comparant le sorafenib versus placebo chez les patients avec CHC avancés. 21
Figure 6: Principales altérations chromosomiques des CHC et corrélation avec les caractéristiques cliniques et mutationnelles....22
Figure 7 : Voies de signalisation altérées dans les carcinomes hépatocellulaires....23
Figure 8 : voie de signalisation Wnt/ β-caténine....24
Figure 9 : Complexe SWI/SNF de remodelage de la chromatine....26
Figure 10 : Voie de signalisation NRF2/KEAP1....28
Figure 11 : voie de signalisation PI3K/AKT/MTOR et RAS/ARF/MAPK kinase....29
Figure 12 : Structure du virus de l'hépatite B....30
Figure 13 : Structure du complexe télomérase....33
Figure 14: Classification moléculaire G1-G6 des carcinomes hépatocellulaires....35
Figure 15: facteurs de risque génétique et environnementaux prédisposant à la survenue d'adénomes hépatocellulaires....38
Figure 16: Classification génotype/phénotype des adénomes hépatocellulaires....41
Figure 17: Aspect histologique des adénomes inactivés HNF1A....43
Figure 18: Dérégulation du métabolisme lipidique, glucidique et de voies de la prolifération dans les adénomes inactivées HNF1A....43
Figure 19: Activation de la voie IL6/JAK/STAT dans les adénomes inflammatoires. 44
Figure 20: Mutations activatrices de *CTNNB1*....46
Figure 21: Transduction du signal via les protéines G et activation de la voie de l'AMPc et effet des mutations activatrices de *GNAS*....301
Figure 22 : Thérapies ciblées dirigées contre les principaux oncogènes activant la voie JAK/STAT dans les AHC inflammatoires....304
Figure 23: Survie liée au CHC et récidive précoce dans une cohorte de 205 CHC liés à l'hépatite B et traités par résection hépatique en Corée du Sud....308
Figure 24: Mécanismes de réactivation de la télomérase par mutations dans le promoteur de *TERT*....309
Figure 25: mécanismes de transformation maligne sur foie sain et cirrhotique....313
Figure 26: Structure du génome d'AAV2....314
Figure 27: Conformation en flip et en flop des ITR d'AAV2....315
Figure 28: AAV recombinant utilisé en thérapie génique....318
Figure 29: Comparaison des sites d'insertion virales d'HBV et AAV2....321

INTRODUCTION

Généralités sur les carcinomes hépatocellulaires

A. Epidémiologie

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est une tumeur d'origine hépatocytaire et représente la première tumeur maligne primitive du foie en terme d'incidence[1]. Le cholangiocarcinome est la seconde tumeur hépatique primitive du foie par ordre de fréquence et se développe à partir de l'épithélium biliaire[2]. Les autres tumeurs hépatiques primitives sont extrêmement rares : le carcinome fibrolamellaire, l'angiosarcome, l'hémangioendothéliome épithélioide et le cystadénocarcinome [3]. Le CHC est le 5 ème cancer au monde en terme d'incidence et le 2ème en terme de mortalité et pose donc un problème de santé publique au niveau mondial [4]. La prévalence du CHC est extrêmement liée à l'épidémiologie des étiologies sous-jacentes. En effet, une forte prévalence des CHC est observée dans les pays ayant une incidence importante d'infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB) plus particulièrement en Asie et en Afrique (figure 1) [4]. En revanche, les pays occidentaux ayant un faible taux d'infection chronique par le VHB ont un nombre annuel de CHC plus faible [5]. Cependant, le nombre de nouveaux cas de CHC s'est accru ces 10 dernières années en occident du fait de l'épidémie d'infections par le virus de l'hépatite C (VHC) et de l'augmentation de la prévalence du syndrome métabolique (figure 2) [1 6]. En France, l'incidence chez l'homme est de 9.5 cas pour 100 000 personnes et chez la femme 3.1 cas pour 100 000 personnes [7].

Figure 1 : incidence du carcinome hépatocellulaire (nombres de cas/100 000 habitants) en fonction des pays dans le monde

D'après El-serag H. [1].

En occident, le CHC se développe dans plus de 90 % des cas sur un foie cirrhotique. Dans moins de 10 % des cas, les CHC se développent soit sur un foie fibreux non cirrhotique soit sur un foie sain [8].

B. Etiologies

Les principales étiologies de l'hépatopathie sous-jacente sont les hépatites virales B et C, l'alcool, la non-alcoholic steatohepatitis (NASH) et l'hémochromatose [4]. Néanmoins, la cirrhose, quelle soit son étiologie prédispose à la survenue de CHC (2 à 5% par an) [9] [10]. L'infection par le VHB est la principale cause de la maladie du foie sous-jacente en Afrique et en Asie. Dans les pays occidentaux, l'infection chronique par le virus de l'hépatite C, l'alcool et le syndrome métabolique constituent les principales causes de survenue de CHC, principalement par la constitution d'une cirrhose [11] [12]. Le syndrome métabolique, via la NASH, constitue une cause émergente de survenue de CHC [13]. Une étude a montrée que le CHC est le cancer chez l'homme le plus fortement associé à l'obésité (odds ratio OR : 4.52 [2.94–6.94]) [14] et une seconde étude que le diabète était un facteur de risque majeur de CHC (OR : 2.16 [1.62–2.88]) [15]. De manière intéressante, les CHC dus à la NASH se développent plus fréquemment sur un foie fibreux non cirrhotique comparé aux CHC d'autres étiologies en Europe [16]. En France, un observatoire national (observatoire CHANG) a mis en évidence une prédominance de l'étiologie

alcoolique, largement devant les autres étiologies. L'exposition à l'aflatoxine B1 est aussi impliquée dans le développement de CHC. L'aflatoxine B1 est un métabolite d'un champignon, l'aspergillus flavus, contaminant les céréales et les arachides en Afrique et en Chine [17]. Le fait que le CHC se développe le plus souvent sur une cirrhose et que son incidence annuelle est élevée, a promu l'idée du dépistage afin d'identifier des tumeurs de petites tailles accessibles à un traitement curatif [18]. Les sociétés savantes européennes et américaines proposent un dépistage semestriel par échographie hépatique seule [19 20].

C. Diagnostic

Des critères dits « non invasifs » de diagnostic du CHC ont été développés et validés dans des séries européennes et représentent à présent la référence (Figure 2) [21]. Chez les patients atteints de cirrhose ayant un nodule de plus de 1 cm, la présence d'une imagerie (tomodensitométrie [TDM] ou imagerie par résonnance magnétique [IRM] hépatique) avec hypervascularisation du nodule au temps artériel associée à un wash out au temps portal permet d'affirmer le diagnostic de CHC [19 20,22]. Dans les autres cas, une biopsie est nécessaire pour faire le diagnostic de CHC [23]. Ces critères ne s'appliquent pas aux CHC développés sur foie non cirrhotique qui nécessitent dans tous les cas une biopsie hépatique en foie tumoral et non tumoral.

Figure 2 : algorithme diagnostique non invasif des recommandations de l'American Association of the Study of the Liver AASLD sur le diagnostic du CHC

D'après Bruix J, et al [20].

D. Caractéristiques anatomopathologiques

- **Carcinogénèse hépatique multi-étapes sur cirrhose**

Sur cirrhose, la carcinogénèse hépatique est un processus multi-étapes entrainant l'apparition séquentielle des lésions tumorales suivantes : nodule dysplasique de bas grade>nodule dysplasique de haut grade>CHC précoce>CHC avancé (Figure 3) [24]. Pendant longtemps, une combinaison de caractéristiques histologiques (densité cellulaire, formation pseudo-glandulaire, stéatose, présence d'espaces portes, invasion stromale, atypie nucléaire, artère isolée etc…) permettait de différencier ces lésions même si la variabilité interindividuelle pour le diagnostic de nodules dysplasiques de haut grade par rapport aux CHC précoces restait importante [24]. L'équipe de Massimo Roncalli a démontré que l'utilisation de 3 marqueurs en immunohistochimie (glypican 3, glutamine synthase et heat shock protein 70) permettait de différencier les nodules dysplasiques de haut grade des CHC précoces avec une sensibilité de 33 à 72% et une spécificité de 100% quand 2 au moins de ses 3 marqueurs étaient positifs [25] [26]. L'addition de marqueurs immunohistochimiques supplémentaires tel ezh2 ou la clathrin heavy chain pourrait améliorer la performance du panel diagnostique initial mais des validations externes restent nécessaires [27] [28].

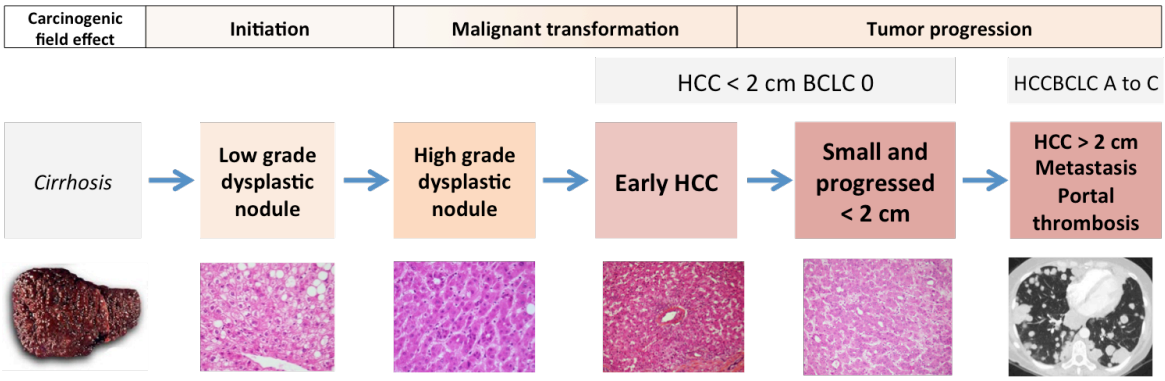


Figure 3 : processus multi-étapes de carcinogénèse sur cirrhose

La carcinogénèse sur cirrhose suit un processus multi-étapes avec l'apparition successive de nodule dysplasique de bas grade, nodule dysplasique de haut grade, de CHC précoce et de CHC avancé.

- **Histologie du carcinome hépatocellulaire**

Au niveau macroscopique, le CHC peut aller de la lésion centimétrique à des tumeurs de plus de 20 cm de diamètre de couleur variable, vert en présence bile, jaune en présence d'une stéatose ou noir/rouge du à des remaniements nécrotico-hémorragiques[29]. Au niveau microscopique, le CHC est une tumeur épithéliale avec des cellules ressemblant à des hépatocytes et vascularisée par voie artérielle. L'aspect le plus fréquemment retrouvé est celui dit « trabéculaire » définit par des travées hépatocytaires épaissies séparées par des sinusoïdes [29]. La forme acinaire est composée d'hépatocytes tumoraux en amas autour de canalicules dilatés contenant de la bile [30]. D'autres variants plus rares ont été décrits tel les CHC à cellules claires riche en glycogènes ou les CHC sarcomatoïdes avec cellules fusiformes [30]. Une classification en fonction du degré de différenciation a été proposée par l'organisation mondiale de la santé en trois grade : bien, moyennement et peu différencié. Cela recoupe la classification proposée par Edmonson en 1954 utilisant le degré de différenciation et le type d'atypie des cellules tumorales allant du grade 1 (très bien différencié) au grade 4 (peu différencié, anaplasique) [31] [32].

E. Arbre décisionnel thérapeutique

En occident, la classification Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) s'est imposée comme l'arbre décisionnel principal thérapeutique du CHC (Figure 4) [33]. Ce système a pour avantage d'être une classification à la fois pronostique et guidant aussi les choix thérapeutiques. Trois types d'informations sont intégrés dans la classification BCLC : les caractéristiques tumorales (taille, nombre, envahissement vasculaire, métastase), la gravité de la maladie du foie sous jacente (Child Pugh) et l'état général du patient (performance status). D'autres classifications (CLIP, HKLC, GRETCH…) ont été proposées et parfois validées dans des études prospectives mais sont nettement moins utilisées en pratique [34] [35] [36].

Figure 4 : prise en charge thérapeutique d'après la classification BCLC
D'après Bruix J, et al [20].

F. Traitement curatif

- **La résection chirurgicale** est un des principaux traitements curatifs des CHC uniques sur cirrhose Child-Pugh A sans hypertension portale dans les recommandations européennes et américaines [20] [19] [37]. Toutefois, il existe un taux important de récidive tumorale (50 à 70 % à 5 ans) et de décès (30 à 50 % à 5 ans) nécessitant l'identification de nouveaux biomarqueurs afin de prédire la récidive et de pouvoir adapter la sélection des patients et de stratifier des essais adjuvants [38] [39].
- **Le traitement percutané** est principalement composé de la radiofréquence qui entraine une nécrose cellulaire par coagulation thermique [40]. En occident,

une étude a rapporté une série de 235 patients cirrhotiques traités par radiofréquence dans les CHC de moins de 5 cm avec une survie globale de 40 % à 5 ans [41].

- **La transplantation hépatique** pour CHC dans les critères dit de Milan (un CHC < 5 cm ou au maximum 3 nodules de moins de 3 cm) a permis de sélectionner un groupe de patients permettant de bénéficier de la transplantation hépatique avec un faible taux de récidive (8 %) et une survie globale excellente (75 % à 4 ans) [42]. D'autres centres ont essayé d'élargir les critères de Milan en augmentant la taille et/ou le nombre de tumeurs ou en utilisant le taux sérique d'alphafoetoprotéine (AFP) [43] [44]. La découverte de biomarqueurs moléculaires ou sériques prédictifs de l'agressivité tumorale, de la présence d'une invasion vasculaire et de la récidive post transplantation serait d'un intérêt certain pour affiner la sélection des patients [45].

G. Traitement palliatif

- **La chimioembolisation intra-artérielle** peut bénéficier aux patients non accessibles à un traitement curatif ayant une bonne fonction hépatique et un tronc porte perméable [46]. Ce traitement associe l'embolisation d'une des branches de l'artère hépatique nourrissant la tumeur avec l'injection dans le même temps d'une chimiothérapie (doxorubicine, cisplatine…) [46]. Une méta-analyse de 7 études randomisées a montré un bénéfice à la chimio-embolisation par rapport au placebo avec une amélioration de la survie globale (RR : 0.53 [0.32-0.89] P=0.01) [47]. De nouvelles techniques ont été développées ces dernières années telles la radioembolisation ou la

chimioembolisation par DC beads mais leur intérêt dans l'arsenal thérapeutique actuel n'est pas encore validé [48] [49] [50] [51].

- **Le sorafenib**, un inhibiteur de tyrosine kinase anti VEGFR, anti RAS, RAF et anti PDGFR, est le premier traitement ayant montré une augmentation de la survie globale versus placebo (médiane de survie : 10.7 mois vs 7.9 mois p < 0.001) dans le CHC avancé avec thrombose porte tumorale, métastase ou progressant après chimioembolisation (Figure 5) [52] [53] [54]. A noter que le traitement par sorafenib n'entraine qu'exceptionnellement une réponse objective et agit en allongeant le temps de progression radiologique (5.5 mois VS 2.8 mois p < 0.001) [52]. Depuis cet essai, tous les essais randomisés de phase 3 en première ligne ou en seconde ligne dans les CHC avancés ont été des échecs et n'ont pas montré d'avantage de survie par rapport au sorafenib ou au placebo[55-57]. La réalisation d'un essai thérapeutique adapté aux altérations génétiques tumorales paraît une priorité dans ce contexte [57].

Figure 5 : survie globale dans l'essai randomisé SHARP comparant le sorafenib versus placebo chez les patients avec CHC avancés.

Courbe de Kaplan Meier de la survie globale et test du log rank d'après Llovet J, et al [52].

Classification moléculaire des carcinomes hépatocellulaires

A. Anomalies chromosomiques

L'analyse par allélotypage et Comparative Genomic Hybridization plus Single Nucleotide Polymorphism (CGH-SNP) a permis d'identifier les pertes et gains chromosomiques les plus fréquents dans les CHC avec les gains des bras 1q, 5,

6p, 7, 8q, 17q et du chromosome 20 et les pertes des bras 1p, 4q, 6q, 8p, 13q, 16, 17p et du chromosome 21 [58] [59] [60]. A l'inverse des cancers colorectaux, l'instabilité des microsatellites ne paraît pas impliquée dans la carcinogénèse hépatique. L'analyse des anomalies à l'échelle chromosomique effectuée précédemment au laboratoire a permis de dégager des grands groupes associés à des caractéristiques cliniques et mutationnelles (Figure 6) [59]. Les CHC avec instabilité chromosomique sont de mauvais pronostic et plus fréquents chez les patients avec une hépatite B chronique ayant des CHC peu différenciés et sont souvent associés à des mutations *TP53*. Les mutations *AXIN1* étaient associées à des pertes d'hétérozygoties du 1p, 4q, 16p et 16q tandis que les mutations *TP53* l'étaient avec la perte d'hétérozygotie du 13q. Les pertes d'hétérozygoties du 9p et 6q étaient associées à un particulièrement mauvais pronostic [59]. A l'inversion, les CHC avec stabilité chromosomique étaient plus fréquemment mutés *CTNNB1* (codant pour la β-caténine) [58].

Figure 6: Principales altérations chromosomiques des CHC et corrélation avec les caractéristiques cliniques et mutationnelles

D'après (Laurent Puig, et al. 2001) [59]

B. Principales altérations génétiques et voies de signalisation dysrégulées dans le CHC

1. Généralités

Chaque CHC est composé d'une combinaison unique de mutations somatiques survenant dans les zones codantes et non codantes du génome tumoral [45]. L'analyse des séquences codantes (par « whole exome sequencing »), de tout le génome (par « whole génome sequencing ») et le séquencage des transcrits (par « RNA seq ») a permis de décrire avec précision les altérations génétiques somatiques de ces tumeurs [60] [61] [62] [63] [64] [65]. Une moyenne de 35 à 80 mutations non synonymes dans les régions codantes du génome a été décrit dans les CHC touchant des gènes dit « drivers » jouant un rôle direct dans la carcinogénèse

hépatique mais aussi des gènes « passengers » non fonctionnels dans la carcinogénèse et conséquence d'une mutagénèse stochastique [66] [67]. Le CHC se situe dans la moyenne des tumeurs solides de l'adulte qui ont un nombre de mutations plus élevées en comparaison aux tumeurs hématologiques ou aux tumeurs solides de l'enfant [68]. Les altérations génétiques observées dans les CHC touchent de manière récurrente un nombre restreint de voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse hépatique qui sont détaillées ci dessous (Figure 7) [45].

Figure 7 : Voies de signalisation altérées dans les carcinomes hépatocellulaires (Zucman Rossi J, et al. 2015 [45])

Sont représentés en rouge, les mutations activatrices d'oncogène et en bleu les mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs. (*) signifie que ce gène est ciblé par des intégrations du virus de l'hépatite B

2. Voie de signalisation Wnt/β-caténine

La voie Wnt/β-caténine est une voie de signalisation impliquée dans la zonation hépatique, l'embryogénèse, le métabolisme des acides aminés, la régénération hépatique et l'interaction cellulaire [69] [70] [71]. A l'état basal inactif, β-caténine est phosphorylée par un complexe inhibiteur incluant AXIN1, APC et GSK3β puis est détruit par le protéasome [72]. Quand un ligand Wnt se lie à un récepteur frizzled, GSK3β est recruté sur le récepteur et par conséquent, le complexe inhibiteur est détruit. β-caténine qui n'est plus dégradée par le protéasome se transloque alors dans le noyau et agit comme un cofacteur de transcription de TCF/LEF [69] [72].

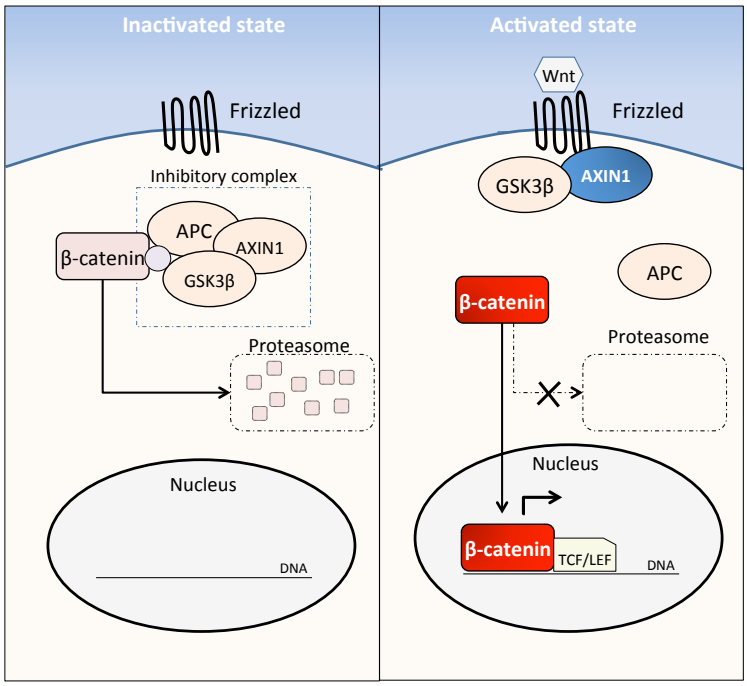


Figure 8 : voie de signalisation Wnt/ β-caténine

Lors que Wnt se lie à frizzled ou qu'il existe une mutation activatrice de *CTNNB1* ou inactivatrice *d'AXIN1*, β-catenine n'est plus phosphorylée par le complexe inhibiteur APC/AXIN1/GSK3B et donc n'est plus dégradée. β-caténine se transloque alors au noyau et agit comme un co-facteur de transcription pour TCF/LEF.

En plus de son rôle physiologique, β-caténine est aussi un oncogène clé de la carcinogénèse humaine [69]. Les mutations activatrices de la β-caténine (codé par *CTNNB1*) entrainent une activation non contrôlée de la voie Wnt/β-catenine et sont une des altérations génétiques les plus fréquentes des CHC (20-40%) [73] [61]. Ces CHC ont une surexpression transcriptomique de gènes cibles de la voie Wnt/β-caténine (GLUL et LGR5), une surexpression protéique de la glutamine synthase ainsi qu'une translocation nucléaire de la β-caténine en immunohistochimie [74] [75]. De plus, les CHC mutés β-caténine sont plus fréquemment bien différenciés avec une organisation microtrabeculo-acineuse homogène avec de la cholestase à histologie [74] [76]. Ces mutations surviennent au niveau de l'exon 3 sur le site de phosphorylation par le complexe inhibiteur APC/AXIN1/GSK3β et entrainent l'absence de phosphorylation de β-caténine, son absence de dégradation par le protéasome et sa translocation au noyau [76]. Les mutations de *CTNNB1* sont plus fréquentes dans les CHC avec stabilité chromosomique et sont significativement associées aux mutations *NFE2L2* (voie du stress oxydatif NRF2/KEAP1) et aux mutations du promoteur de *TERT* [60] [77]. Les modèles murins présentant une mutation activatrice

de la β-caténine au niveau hépatique ne développent ni adénome ni carcinome hépatocellulaire [78]. A l'inverse une inactivation d'*APC* ou la coexpression d'une mutation activatrice de β-caténine et de l'oncogène *HRAS* entraine la formation de CHC suggérant que les mutations de la β-caténine seule sont insuffisantes pour induire de la tumorigénèse hépatique dans des modèles murins [79] [80]. En plus des mutations de *CTNNB1*, de rares mutations inactivatrices d'*APC* ont été identifiées dans 1 à 2 % des CHC [60]. Cinq à 10% des CHC ont des mutations inactivatrices bi-alléliques d'*AXIN1*, un gène suppresseur de tumeur [81] [60]. Ces mutations ont une conséquence fonctionnelle différente des mutations de *CTNNB1*. Les CHC ayant des mutations AXIN1 n'ont pas de surexpression des gènes cibles classiques de la voie Wnt/β-caténine, tels GLUL et LGR5. Ils présentent une instabilité chromosomique et appartiennent à des groupes transcriptomiques différents de celui des CHC ayant des mutations de *CTNNB1* [82] [75] [59]. En conclusion, des mutations survenant dans des partenaires différents de la même voie de signalisation peuvent donc entraîner des conséquences fonctionnelles différentes.

3. Gène du cycle cellulaire (P53/RB)

Les gènes des voies P53 et du rétinoblastome (RB) sont altérés dans plus de 50% des CHC[83]. *TP53* est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire en particulier dans la régulation de la transition G1/S. Il est aussi impliqué dans des mécanismes de réparation de l'ADN et de contrôle de l'apoptose[84]. Douze à 48% des CHC ont des mutations somatiques de *TP53*[85] [86]. Les CHC survenant chez les patients exposés à l'aflatoxine B1 ont souvent une mutation en hot spot R249S de *TP53* [86]. Cette mutation constitue un marqueur spécifique permettant d'identifier l'exposition génotoxique à l'aflatoxine B1 [87]. L'absence d'exposition à l'aflatoxine B1 dans les pays occidentaux explique en partie la fréquence plus faible de mutations *TP53*. De plus, les mutations *TP53* sont plus fréquentes dans les CHC secondaires à l'infection chronique par le VHB et dans des groupes transcriptomiques caractérisés par une dérégulation des gènes du cycle cellulaire et ayant une instabilité chromosomique[88]. Des délétions homozygotes d'*IRF2* sont retrouvées dans 1-5% des CHC et sont exclusives des mutations *TP53* car responsable d'une inactivation fonctionnelle de P53[60]. Le gène *RB1* (retinoblastome) est un gène suppresseur de tumeur codant pour une protéine

contrôlant le cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S en inhibant le facteur de transcription E2F. Des mutations inactivatrices bi-alléliques de *RB1* ont été décrites dans 3 à 8% des CHC[89]. De plus 2 à 12% des CHC ont des mutations inactivatrices ou des délétions homozygotes de *CDKN2A*, un activateur de RB[60]. Les mutations de *CDKN2A* et de *RB1* entrainant une inactivation de la voie RB/P21 sont fréquentes dans les CHC de mauvais pronostic suggérant un rôle dans l'agressivité tumorale[61,89]. Enfin, des amplifications du locus *CCND1/FGF19* ont été identifiées dans 5 à 15% des CHC[90].

4. Gène de remodelage de la chromatine et histone methyltransferase

Le séquençage haut débit a identifié des mutations récurrentes dans des gènes impliqués dans la régulation épigénétique que ce soit des gènes du remodelage de la chromatine ou des gènes codant pour des protéines de type histone methyltranferases[45]. Le complexe SWItch/Sucrose Non-Fermentable (SWI/SNF) est composé de plusieurs complexes protéiques ayant une fonction de remodelage de la chromatine ATP dépendante avec 2 groupes dénommés BAF et PBAF composés de 9 à 12 sous-unités (Figure 9) [91]. Les principales fonctions du complexe SWI/SNF sont la modification des nucléosomes et de la conformation de l'ADN[91]. Un des premiers exemples du rôle des gènes de remodelage de la chromatine dans la carcinogénèse humaine a été apporté par l'identification de mutations inactivatrices bi-alléliques de *SMARCB1,* codant pour SNF5 une protéine impliquée à la fois dans le complexe BAF et PBAF, dans les tumeurs rhabdoides[92]. Dans les CHC, des mutations inactivatrices d'*ARID1A* et *ARID2* ont été identifiées dans 4-17% et 3-18% des cas respectivement[93]. Les mutations *ARID1A* étaient significativement associées avec les mutations inactivatrices de *AXIN1*[61]. L'identification des mutations *ARID1A* et *ARID2* dans les CHC s'ajoutent aux nombreuses autres tumeurs ayant des mutations dans des gènes de remodelage de la chromatine (cancer de l'ovaire à cellules claires, cancer gastrique, cancer du pancréas, etc…) suggérant un rôle important de cette famille de gènes dans la carcinogénèse humaine[94].

Figure 9 : Complexe SWI/SNF de remodelage de la chromatine (Wilson BG, et al. [91])

Les complexes SWI/SNF BAF et PBAF sont composés de sous-unités conservées indispensable à chaque complexe en vert, de sous unités parfois associés à ces 2 complexes en jaune clair et de sous-unités retrouvées uniquement dans un des deux complexes en bleu et rouge (*ARID1A* et *ARID1B* pour BAF et *PBRM1/BAF180*, *ARID2*/*BAF 200* et BRD7 pour PBAF). Le complexe SWI/SNF se lie à l'ADN et module la composition en nucléosome.

Des mutations inactivatrices de gènes avec une fonction histone methyltransferase *MLL/KMT2A* (3-4%), *MLL2/KMT2D* (2-3%), *MLL3/KMT2C* (3-6%) et *MLL4/KMT2B* (2-3%) ont été mises en évidence par plusieurs équipes[62,64]. De plus, des insertions du VHB dans *MLL4* sont observées dans 10% des CHC liés à ce virus[95,96]. Tous ces résultats soulignent le lien entre les altérations génétiques et les modifications épigénétiques dans la carcinogénèse hépatique.

5. Voie de signalisation du stress oxydatif NRF2/KEAP1

Une des voies de signalisation impliquée dans la réponse au stress oxydatif est la voie NRF2/KEAP1. NRF2 (codé par *NFE2L2*) est un facteur de transcription sensible au niveau intracellulaire en espèces réactives de l'oxygène[97]. Dans sa forme inactive, NRF2 est associé à un complexe inhibiteur composé de KEAP1 et CUL3. NRF2 est alors polyubiquitinylé et dégradé par le protéasome (Figure 10). Quand le niveau d'espèces réactives de l'oxygène augmente dans la cellule, KEAP1 se dissocie de NRF2, et NFR2 se transloque au noyau pour agir comme facteur de transcription et induire l'expression de gènes impliqués dans la réponse antioxydante[97]. Initialement, la voie de signalisation NRF2/KEAP1 a été reliée à des propriétés antitumorales dans des modèles murins exposés à du stress oxydatif chronique. Ainsi des souris inactivées pour NRF2 avaient une incidence plus élevée de cancer de la vessie et du colon après exposition à des agents carcinogènes[98]. Toutefois, l'identification de mutations somatiques activatrices de *NFE2L2* (codant pour NRF2, 3-6%) et inactivatrice de *KEAP1* (2-8%) entrainant une activation de la voie NRF2/KEAP1 dans les CHC et dans d'autres types tumoraux comme le cancer du poumon, l'hépatoblastome ou l'adénocarcinome de la vésicule biliaire a souligné le potentiel rôle protumorogenique de cette voie de signalisation[60,99-102]. Une étude menée in vitro a démontrée que l'activation constitutive de la voie

NRF2/KEAP1 promeut la survie des cellules tumorales et évite une mort cellulaire induite par l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène en activant une réponse antioxydante[103].

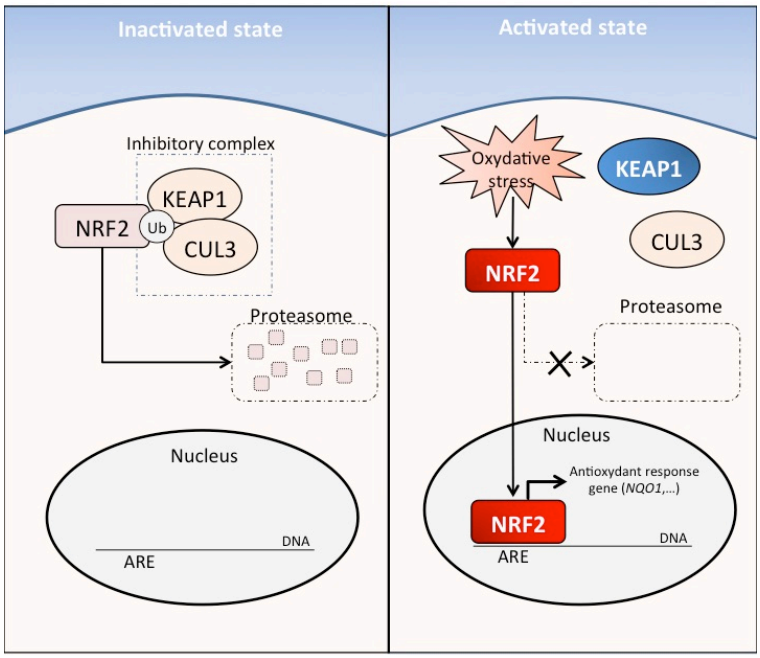


Figure 10 : Voie de signalisation NRF2/KEAP1

Quand le niveau d'espèces réactives de l'oxygène augmente dans la cellule ou en présence d'une mutation activatrice de *NFE2L2* ou inactivatrice de *KEAP1*, le facteur de transcription NRF2 se dissocie de KEAP1, n'est plus dégradé par le protéasome et se transloque au noyaux pour induire la transcription de gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante.

6. Voie de signalisation AKT/MTOR et RAS/RAF/MAP kinase

La voie PI3K/AKT/MTOR module le métabolisme cellulaire en activant l'anabolisme et en inhibant l'autophagie et module la prolifération cellulaire [104]. Lors qu'un ligand se lie à un récepteur tyrosine kinase comme EGFR ou IGFR, la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) et AKT sont activés [104]. Ensuite, AKT inhibe le complexe TSC1/2 (figure 11). L'inhibition de TSC1/2 entraine la levée de l'inhibition du complexe

mTOR et l'activation en aval de S6K et 4EBP. La voie AKT/MTOR est activée dans 20 à 50% des CHC mais les mutations activatrices de *PIK3CA* (0-2%), inactivatrices de *PTEN*, un inhibiteur de la voie AKT/MTOR (1-3%) ou inactivatrices de *TSC1*/2 (3-8%) sont rares [105 61]. Des mécanismes indirects d'activation de la voie PI3K/AKT/MTOR restent encore à être identifiés.

Une autre voie de signalisation clé de la carcinogénèse hépatique est la voie RAS/RAF/MAP kinase (Figure 11) [106]. Quand RAS et RAF sont activés par un signal d'amont, ils activent MEK1/2 puis ERK1/2 par phosphorylation ce qui induit une inhibition de l'apoptose et favorise la prolifération cellulaire [106]. RSK2 (codé par *RSP6KA3*) se situe en aval de ERK1/2 et est activé par phosphorylation induite par ERK1/2. RSK2 entraine un rétrocontrôle négatif en inhibant MEK1/2 via la phosphorylation de SOS. Dans 2-9% des CHC, on observe des mutations inactivatrices de *RPS6KA3* qui entrainent la levée du rétrocontrôle négatif et donc l'activation non contrôlée de la voie RAS/RAF/MAP kinase [60]. De rares mutations *KRAS* (1%) ont été aussi décrites dans les CHC [60].

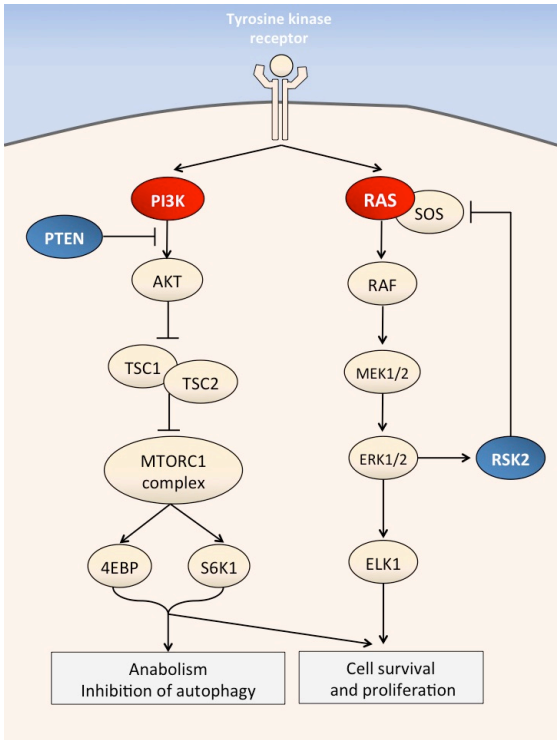


Figure 11 : voie de signalisation PI3K/AKT/MTOR et RAS/ARF/MAPK kinase

En présence d'un ligand sur un récepteur de tyrosine kinase, de mutations inactivatrices de *PTEN* ou de *TSC1/TSC2* ou activatrice de *PIK3CA*, la kinase PI3K active AKT qui va inactiver TSC1/2 et lever l'inhibition du complexe MTORC1 et entrainer l'activation 4EBP et S6K1. De même en présence d'un ligand sur un

récepteur de tyrosine kinase, d'une mutation activatrice de *RAS* ou inactivatrice de *RPS6KA3* (codant rsk2) entrainent l'activation de RAF par RAS puis des kinases MEK1/2 et ERK1/2 et favorisent la prolifération cellulaire. RSK2 est activé par ERK1/2 et entraine un rétrocontrôle négatif de la voie.

C. Rôle du VHB dans la carcinogénèse hépatique

En plus des altérations génétiques observées dans le génome tumoral, le VHB a un rôle direct et indirect dans la carcinogénèse hépatique.

1. Généralité sur le virus de l'hépatite B

L'hépatite B est un virus à ADN organisé de façon circulaire en double brin seulement sur une partie de son génome [107]. Le virus de l'hépatite B a une taille d'environ 3.2 kilobases et est composé de quatre cadres de lectures ouverts (open reading frame, ORF) (Figure 12) [108]. L'ORF Pre-S/S code pour 3 protéines de surface, l'ORF pre-C/C code pour l'antigène Hbe et Hbc, l'ORF-P code pour une polymérase virale. Enfin le gène X code pour une protéine virale de 17KDa impliquée dans la réplication virale. L'infection chronique par le VHB est associée à une augmentation de risque d'avoir un CHC 25 à 37 supérieure à la population générale [107]. Le CHC lié à l'hépatite B peut se développer sur foie cirrhotique mais aussi sur foie fibreux ou foie sain. Le mécanisme de carcinogénèse le plus fréquent est indirect via le développement d'une cirrhose due à l'inflammation chronique secondaire à une réponse cytotoxique des lymphocytes T dirigée contre les antigènes viraux [109]. Dans ce contexte, le stress oxydatif, l'inflammation chronique et le raccourcissement des télomères favorisent l'initiation tumorale [109]. Néanmoins il existe des mécanismes de carcinogénèses directs par un phénomène de mutagénèse insertionnelle virale et par l'effet oncogénique des protéines virales [110].

Figure 12 : Structure du virus de l'hépatite B (Neuveut C, et al. [109])

Le virus de l'hépatite B est composé d'un ADN double brin seulement sur une partie de son génome (brin – et brin +). Quatre cadres ouverts de lecture sont représentés par des flèches sur ce schéma.

2. Rôle des protéines virales dans la carcinogénèse

Les protéines Hbx et preS/S2 auraient un effet modulateur sur diverses voies de signalisation [109]. Le rôle oncogénique de la protéine Hbx reste néanmoins controversé. Hbx est impliquée dans la réplication virale et a une fonction transactivatrice via une interaction protéine-protéine [110]. De ce fait, Hbx a la possibilité de moduler l'activité de voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse ainsi que de moduler la prolifération cellulaire et l'apoptose en dérégulant l'activité d'oncogène comme c-myc, c-jun, fos et de facteurs de transcription comme NFκB[111]. La protéine HBX pourrait aussi inhiber l'activité cellulaire de P53 et l'apoptose par des mécanismes comme l'inhibition de caspase 3 et la surexpression de survivin [109]. De plus, des modèles in vitro utilisant des lignées cellulaires immortalisées ou des fibroblastes humains primaires ont montré que la protéine HBX augmente les propriétés métastatiques et d'invasion cellulaire, suggérant un rôle oncogénique de cette protéine virale [112]. Des études in vitro ont aussi proposé un rôle potentiel d'HBx dans la régulation de la formation du fuseau mitotique pouvant expliquer l'instabilité chromosomique observée dans les CHC liés à VHB [113]. Néanmoins d'autres modèles in vitro utilisant des fibroblastes de rats ont montrés soit l'absence d'effet oncogénique, soit un effet paradoxal suppresseur de tumeurs d'HBx [114] [115]. Enfin, les modèles murins transgéniques exprimant Hbx ont montrés soit un effet protumoral, soit l'absence d'effet oncogénique ou suppresseur de tumeurs. Ces différents résultats varient en fonction du fond génétique des souris utilisées [116] [117]. De plus, le séquençage du gène HBx dans les CHC a montré la présence de mutations tronquantes suggérant un profil de gène suppresseur de tumeurs (Cf Article 20 [118]).

3. Mutagénèse insertionnelle et VHB

Le VHB est à la fois stocké sous forme épisomale (covalently closed circular DNA cccDNA) et aussi sous forme d'ADN viral intégré dans le génome humain [108]. Cette intégration virale dans l'ADN humain peut entrainer des phénomènes de sélections clonales par modulation en cis de l'expression de gènes impliqués dans la carcinogénèse [109]. Ce phénomène nommé mutagénèse insertionnelle est observé de manière récurrente dans environ 70 à 80% CHC liés à l'hépatite B [96] [119]. Une

partie seulement du VHB est retrouvé intégré dans le génome tumoral, de ce fait l'ADN intégré n'est pas utilisé pour la réplication virale. L'insertion du VHB peut survenir partout dans le génome humain mais est plus fréquent près des sites fragiles, les zones répétées et les zones transcrites du génome [96] [120]. La partie 3' du gène HBx et 5' du gène pre-Core/core sont les parties du virus les plus fréquemment intégrées dans le génome tumoral[120] [121]. Des insertions récurrentes clonales somatiques de VHB dans le génome tumoral sont décrites dans *TERT*, *MLL4/KMT2B*, *CCNE1*, *CCNA2* et *RARB* [121] [122] [96] [123]. Le virus s'intègre de manière préférentielle dans les régions non codantes comme les promoteurs ou les introns et plus rarement dans les exons [110]. Une augmentation de l'expression des gènes insérés a été démontré en particulier dans le cas de *TERT* et *CCNE1* [96].

D. Télomères et de la télomérase dans la carcinogénèse hépatique

Plusieurs études menées dans des modèles murins et dans des tissus humains ont démontré l'importance des télomères et de la télomérase dans la survenue de la cirrhose et le développement du CHC.

1. Généralités sur les télomères et la télomérase

Le système de réplication de l'ADN aboutit à l'absence de réplication de l'extrémité des chromosomes entrainant leur diminution de taille au cours des cycles cellulaires [124]. Elizabeth Blackburn, Carol Greider et Jack Szostack ont découvert comment les cellules résolvent le problème de l'absence de réplication des extrémités chromosomiques et ont ainsi reçu le prix Nobel pour la découverte des télomères [125]. Présent dans toutes les cellules de l'organisme, les télomères sont des courtes séquences d'ADN (TTAGGG) répétées situées à l'extrémité des chromosomes et entourées d'un complexe protéique appelé shelterin et composé de 6 protéines: telomere repeat binding factor 1 (TRF1), TRF2, repressor/activator protein 1 (RAP1), TRF1-interacting nuclear protein 2 (TIN2), TIN2-interacting protein 1 (TPP1) et protection of telomeres 1 (POT1) [126]. Le rôle des télomères est

d'éviter la perte d'ADN codant lors des cycles cellulaires. Le raccourcissement des télomères lors des cycles cellulaires entraine l'arrêt des divisions cellulaires et induit la senescence cellulaire (phénomène connu sous le nom de limite de Hayflick). [126] A l'inverse si les gènes suppresseurs de tumeurs sont défaillants, le raccourcissement télomérique peut entrainer une l'instabilité chromosomique due à des fusions interchromosomiques par leurs extrémités [127]. La télomérase est le complexe impliqué dans la synthèse des télomères afin d'éviter la mort cellulaire, conséquence des cycles de divisions cellulaires en particulier durant l'embryogénèse ou lors des phénomènes de régénération d'organe [128]. La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique permettant l'allongement des télomères à partir de l'extrémité 3' libre. Ses principaux composants sont une sous-unité catalytique, codée par le gène *TERT* (telomerase reverse transcriptase), possédant une activité transcriptase inverse, et *TERC* (telomerase RNA component), un ARN non codant qui sert de matrice à l'extension de séquences télomériques et un complexe protéique composé de dyskerine, NHP2, NOP10, et GAR1(Figure 13) [129] [130]. TERT est le facteur limitant du complexe télomérase et est exprimé pendant l'embryogénèse et alors qu'elle ne l'est plus dans de nombreuses cellules adultes dont les hépatocytes [128].

Figure 13 : Structure du complexe télomérase (Calado R,et al. [130])

Le complexe télomérase est composé d'une sous-unité catalytique, codée par le gène *TERT* (telomerase reverse transcriptase), possédant une activité transcriptase inverse, et de *TERC* (telomerase RNA component), un ARN non codant qui sert de matrice et d'un complexe protéique (dyskerine, NHP2, NOP10, et GAR1).

2. Rôle des télomères et la télomérase dans le développement de la cirrhose et la carcinogénèse hépatique

Plusieurs études menées sur des tissus humains ont montré que la cirrhose était constituée d'hépatocytes sénescents ayant des télomères courts et n'exprimant plus la télomérase [131] [132] [133]. Des mutations inactivatrices germinales de *TERT* sont responsable d'un syndrome pédiatrique appelé « dyskeratosis congenita » qui associe des anomalies cutanées, une aplasie médullaire et parfois une fibrose pulmonaire et/ou une cirrhose [130]. De plus, des mutations constitutionnelles de *TERT*, prédit comme diminuant l'activité de la télomérase, ont été associé à la

survenue de cirrhose chez l'adulte [134] [135]. Les souris déficientes pour terc (terc -/-) et soumis à un modèle de fibrose chimique, chirurgicale ou génétique évoluent plus rapidement vers la cirrhose [136]. En résumé, l'absence d'activité télomérase et le raccourcissement des télomères induit par les lésions chroniques hépatiques, les divisions cellulaires et le stress oxydatif entrainent la sénescence hépatocytaire et favorisent la formation de cirrhose. Néanmoins, Farazi, et collaborateurs ont montré que les souris déficientes pour terc soumis à un modèle de carcinogénèse chimique ou génétique avait une incidence plus faible de CHC suggérant que dans un second temps la réactivation de la télomérase était nécessaire pour promouvoir la carcinogénèse hépatique [137]. Chez l'homme, plusieurs études ont montré que plus de 90% des CHC exprimaient *TERT* et avaient une augmentation de l'activité télomérase comparé au foie sain et cirrhotique [138] [139]. Au total, la réactivation de la télomérase et la reexpression de *TERT* sont nécessaires à la carcinogénèse hépatique afin de permettre aux cellules tumorales d'effectuer des cycles de division cellulaire non contrôlées et ceci sans entrainer d'apoptose ou de sénescence par raccourcissement télomérique [140]. Les principaux mécanismes responsables de la réactivation de la télomérase dans les CHC sont les mutations dans le promoteur de *TERT*, l'insertion d'HBV dans *TERT* et l'amplification de *TERT* (Cf articles 6 et 7) [141] [61] [123].

E. Classification transcriptomique non supervisée des CHC

A la fin des années 90, l'analyse du transcriptome à l'aide des techniques de microarray a permis d'identifier des sous groupes de tumeurs définis par des dérégulations d'expression génique [142].

Une des premières classifications transcriptomiques des CHC a été proposée en 2004 par le groupe de Snorri Thorgeisson en analysant une série de CHC liés au VHB et traités par résection [143]. Deux groupes principaux ont été identifiés, les CHC du cluster A dit prolifératifs et les CHC du cluster B dit non prolifératifs. De plus, les CHC du cluster A « prolifératif » étaient de plus mauvais pronostic [143]. Une autre étude du même groupe a identifié un sous groupe de CHC ayant une signature

transcriptomique de cellules progénitrices ressemblant à une signature d'hépatoblaste fœtaux de rat [144]. Ce sous groupe de tumeurs était associé à un mauvais pronostic [144]. D'autres classifications transcriptomiques, parfois reliées au pronostic et/ou à des voies de signalisation, ont été publiées: classification S1/S2/S3, TGFB, MET, AKT/MTOR, etc… [145 146 105 147 148]

En 2007, une classification transcriptomique des CHC en 6 groupes (G1 à G6) a été décrite dans le laboratoire [75]. Les différents sous groupes moléculaires étaient associés à des caractéristiques cliniques, mutationnelles et chromosomiques (Figure 14). Les groupes G1-G2-G3 étaient associés à des CHC avec instabilité chromosomique alors que les groupes G4-G5-G6 aux CHC avec stabilité chromosomique. Les groupes G1-G2 étaient majoritairement composés de CHC liés à l'infection par le VHB ayant des mutations *AXIN1* et une activation de la voie AKT/MTOR. Les CHC classés dans le groupe G1 avaient une signature de cellules progénitrices et survenaient chez les patients jeunes, d'origine africaine avec un taux élevé d'AFP. Les CHC classés dans le groupe G3 combinaient une mutation de *TP53* et l'inactivation de *CDKN2A* et étaient de mauvais pronostic. Le groupe G4 était composé de CHC bien différenciés, parfois mutés *HNF1A*. Enfin les CHC classés dans le groupe G5-G6 avaient une activation de la voie Wnt/β-caténine secondaire à des mutations activatrices de *CTNNB1* [75].

Figure 14: Classification moléculaire G1-G6 des carcinomes hépatocellulaires (Boyault S, et al. 2007 [75])

Une analyse transcriptomique a mis en évidence 6 groupes (G1 à G6) corrélés avec des caractéristiques cliniques, mutationnelles chromosomiques ainsi qu'avec l'activation de voies de signalisation.

Généralités sur les adénomes hépatocellulaires

A. Epidémiologie

Les principales tumeurs hépatiques bénignes sont par ordre de fréquence l'angiome hépatique, l'hyperplasie nodulaire focale et l'adénome hépatocellulaire (AHC) (Table 1) [149] [150]. Parfois, ces différentes tumeurs bénignes peuvent être observées de manière concomitante chez un même patient. Leur caractéristique commune est leur développement, dans la grande majorité des cas, sur un foie sain chez des sujets jeunes [149]. L'angiome hépatique est considéré comme une malformation vasculaire non clonale et l'hyperplasie nodulaire focale comme une prolifération réactionnelle polyclonale hépatocytaire secondaire à un apport artérielle exclusif [151]. A l'inverse, les AHC sont des tumeurs hépatiques bénignes dérivées de la prolifération monoclonale d'hépatocytes matures [151]. Comme les hyperplasies nodulaires focales, il existe une prédominance de femme dans les séries de patients atteints d'AHC avec un ratio femme/homme de 9/1 [152].

Avant la mise sur le marché de la contraception oestoprogestative, la survenue d'AHC était exceptionnelle. Depuis l'introduction de la contraception oestroprogestative, l'incidence des AHC a augmenté même si leur faible nombre en fait toujours une tumeur rare [153]. Dans des études épidémiologiques anciennes, l'incidence des AHC était évaluée à 3 pour 100000 patientes exposées à des contraceptifs oraux [152]. Cette association avec les contraceptifs oraux explique l'incidence faible des AHC dans les pays asiatiques du fait de la faible utilisation de ce type de contraception. Néanmoins, l'incidence actuelle chez les femmes exposées à des contraceptifs oraux microdosés est inconnue [154].

Table 1: Principales caractéristiques des tumeurs hépatiques bénignes (Nault JC, et al. Revue du praticien 2015)

	Angiome hépatique	**Hyperplasie nodulaire focale**	**Adénome hépatocellulaire**
Physiopathologie	Malformation vasculaire	Prolifération hépatocytaire polyclonale	Prolifération hépatocytaire monoclonale
Incidence	1/100	0.4/100	3/100 000
Ratio F/H	2/1	8/1	9/1
Contraception orale	Non lié	Non lié	Lié à la CO
Symptômes	Asymptomatique	Asymptomatique	Parfois douleurs abdominales
Biologie	Normale	Normale	Parfois cholestase anictérique ou syndrome inflammatoire
Diagnostic	Imagerie	Imagerie +/- histologie	Histologie
Complications	Exceptionnelles	Exceptionnelles	Rare hémorragie ou transformation maligne
Traitement	Abstention thérapeutique	Abstention thérapeutique	Surveillance ou résection

B. Facteurs de risque

- Hormones

Le principal facteur de risque de développement des AHC est l'exposition hormonale que ce soit aux androgènes ou aux oestrogènes [152] [155].

Les contraceptifs oraux, mais aussi la grossesse, favorise la croissances des AHC. De ce fait, l'arrêt des contraceptifs oraux est obligatoire dans ce contexte et l'on peut observer une régression tumorale après leurs arrêts [156].

La consommation d'androgène est aussi un facteur de risque que ce soit en tant que traitement par exemple dans l'anémie de Fanconi, en tant que produits dopants chez les bodybuilders ou secondaire à la production non contrôlée d'androgène endogène comme dans le syndrome de Klinefelter [157] [158]. Comme pour les oestrogènes, l'arrêt des androgènes peut parfois entrainer la disparition totale des adénomes [159].

- Obésité

Récemment, l'obésité et dans une moindre mesure la consommation chronique d'alcool ont été associé à la survenue d'AHC de sous type inflammatoire [160] [161].

L'impact de l'incidence croissante de l'obésité dans les pays occidentaux sur l'incidence des AHC, en particulier inflammatoire, reste à évaluer.

- Maladie vasculaire du foie

Les maladies vasculaires du foie comme l'agénésie de la veine porte, la thrombose porte chronique ou le syndrome de Budd-Chiari peuvent être associées à la survenue de forme atypique d'hyperplasie nodulaire focale (dit HNF-like) mais aussi d'AHC ou de CHC [162].

- Maladie génétique constitutionnelle

La survenue d'AHC peut être associée à différentes maladies génétiques tel la glycogénose de type 1, le diabète de type MODY3 ou le syndrome de Mc-Cune Albright. La glycogénose de type 1 est une maladie génétique secondaire à des mutations germinales récessives de la glucose 6 phosphatase (*G6PC*). Cette maladie entraîne des hypoglycémies néonatales et un retard de croissance. A l'âge adulte, 50% des patients développent des adénomes, parfois dans une forme multiple [163] [164]. Les patients ayant une mutation germinale *HNF1A* sont à risque de développer un diabète de type MODY3 mais aussi des AHC inactivés *HNF1A* et des adénomatoses familiales dans un faible nombre de cas [165].

Enfin, le syndrome de McCuneAlbright est secondaire à une mutation activatrice du gène *GNAS* en mosaïque entrainant des malformations osseuses, des taches cutanés cafés au lait et des adénomes hypophysaires et thyroïdiens [166]. Il existe une association entre ce syndrome rare et la survenue d'adénomes mutés *GNAS*.

Figure 15: facteurs de risque génétique et environnementaux prédisposant à la survenue d'adénomes hépatocellulaires (Cf article 4, Nault JC, et al. 2013 [151]

C. Anatomopathologie

L'adénome est une prolifération hépatocytaire monoclonale bénigne développée habituellement sur foie sain [151]. Au niveau macroscopique, l'AHC est une masse arrondie le plus souvent non encapsulée comportant parfois des zones de nécrose ou d'hémorragie. Les tailles des nodules varient de manière importante et peuvent aller de forme microscopique (ou microadénomes) à des adénomes de plus de 10 à 15 cm de diamètre [167]. Chez un même patient, l'AHC est souvent unique mais des

formes multiples (>2) peuvent être observées dans 30 à 40% des cas. Une forme particulière dénommé adénomatose hépatique a été décrit dans les années 1980 par JF Fléjou et est définit arbitrairement comme la présence de plus de 10 AHC de taille variable dont certains sont visibles à l'imagerie et d'autres uniquement à l'examen macroscopique [168]. Des microadénomes sont souvent visibles à l'examen histologique [169]. De façon intéressante, l'adénomatose hépatique n'est pas relié à la prise de contraceptifs oraux [168].

La vascularisation des AHC est principalement artérielle avec des gros vaisseaux en périphérie et des petits vaisseaux intratumoraux à paroi souvent fine. Au niveau histologique, on observe une prolifération d'hépatocytes avec un rapport nucléo-cytoplasmique normal et un épaississement des travées hépatocytaires sans triade portale ni ductule interlobulaire [31]. Parfois, on peut observer de la stéatose hépatique et des dilatations sinusoïdales. Dans certains cas, il existe des atypies nucléaires et/ou des formations pseudo-glandulaires et le diagnostic avec un CHC très bien différencié développé sur foie sain peut être difficile en particulier chez les hommes.

D. Diagnostic et prise en charge

L'AHC peut être révélé par des douleurs abdominales, découvert de manière fortuite à l'imagerie ou plus rarement par une complication hémorragique (saignement intratumoral ou intrapéritonéal) ou une transformation maligne en CHC [170] [171]. La biologie hépatique usuelle et les marqueurs tumoraux sont normaux. Néanmoins, dans certains cas, on peut observer une cholestase anictérique ou un syndrome inflammatoire biologique. Une anémie inflammatoire ou une fièvre peut être associé au syndrome inflammatoire biologique. A l'imagerie, l'aspect de l'AHC est le plus souvent celui d'une tumeur hypervasculaire avec des caractéristiques qui dépendent du sous-groupe d'AHC [172]. Le diagnostic définitif d'AHC requiert actuellement une analyse histologique, que ce soit sur biopsie ou sur pièce de résection chirurgicale. La prise en charge thérapeutique des AHC est guidée par le risque de complications (hémorragie et transformation maligne) [151]. Le risque hémorragique est principalement lié à la taille de la tumeur alors que le risque de

transformation maligne (estimé à 4-5% dans des séries chirurgicales) est lié à la taille et au sexe masculin [173]. De ce fait, la prise en charge de ces patients est principalement guidée par la taille de la tumeur (>5cm) et le sexe (masculin) qui sont des indications à une exérèse chirurgicale de la tumeur [174]. D'autres alternatives thérapeutiques sont possibles tel l'embolisation intra-artérielle, la radiofréquence percutanée ou la transplantation hépatique même si leur place dans l'algorithme thérapeutique est moins consensuel [175]. La description de la classification génotype/phénotype a permis d'affiner la prise en charge de ces patients en identifiant de nouveaux facteurs de risque, et en apportant une aide au diagnostic et à la stratification thérapeutique [161 176].

Classification moléculaire des adénomes hépatocellulaires

A. Généralités sur la classification génotype/phénotype

Avant 2006, les AHC étaient une entité homogène dont le principal facteur de risque était hormonal, la prise en charge thérapeutique était guidée principalement par la taille de la tumeur et le sexe. L'identification dans le laboratoire des altérations génétiques des AHC a permis de séparer ces tumeurs en groupes moléculaires associés fortement à des caractéristiques cliniques, histologiques et radiologiques (Figure 16) [161] [151]. En 2006, une classification génotype/phénotype a permis de diviser les AHC en 4 sous-groupes : les AHC avec des mutations inactivatrices du gène *HNF1A*, les AHC avec des mutations activatrices de la β-caténine (codé par *CTNNB1*), les AHC inflammatoires et les AHC inclassés [161]. Cette classification moléculaire a été validée par plusieurs équipes à travers le monde que ce soit en France, en Hollande, en Grande Bretagne, aux Etats unis ou au Japon chez plus de 900 patients [177] [178] [179] [180]. De plus, cette classification a permis d'affiner la prise en charge des patients que ce soit au niveau diagnostic ou thérapeutique.

Figure 16: Classification génotype/phénotype des adénomes hépatocellulaires

Chaque sous-groupe moléculaire d'AHC est relié aux caractéristiques histologiques et cliniques (corrélation génotype/phénotype) et identifié par imagerie par résonance magnétique et en immunohistochimie par un panel de 5 anticorps (FABP, SAA, CRP, ß-caténine et Glutamine synthétase). (Cf article 4, modifié d'après Nault JC, et al. 2013 [151])

B. Adénome muté *HNF1A*

En 2002, une analyse par allelotypage pangénomique a permis d'identifier au laboratoire une perte d'hétérozygotie récurrente du bras chromosomique 12q dans un sous-groupe d'AHC [181]. La région minimale délétée contenait le gène *HNF1A* et a permis d'identifier les premières mutations récurrentes somatiques dans ce type de tumeurs [181]. Le gène *HNF1A* code pour un facteur de transcription à homéodomaine impliqué dans le contrôle du métabolisme glucidique et lipidique. Des mutations inactivatrices du gène *HNF1A* ont été identifiées dans 30 à 40% des adénomes avec soit une mutation bi-allélique du gène soit l'association d'une mutation et d'une perte d'hétérozygotie suivant de ce fait le modèle en deux « hit » de Knudson caractéristiques des gènes suppresseurs de tumeurs [181] [161]. Les mutations observées étaient de type non sens entraînant un codon stop dans la moitié de cas et étaient exclusive des autres mutations identifiées par la suite dans les AHC (*CTNNB1*, *IL6ST*, *FRK*, *STAT3*, *GNAS*, *JAK1*) [182]. Dans certains cas, des mutations germinales mono-alléliques d'*HNF1A* ont été identifiées chez des patients ayant des AHC et atteints de diabète de type mody3, un diabète non insulinodépendant de transmission autosomique dominante [183] [165]. En effet les mutations germinales inactivatrices d'*HNF1A* sont associées à un diabète de type 2 du sujet jeune de transmission autosomique dominant [183]. Chez ces patients ayant une mutation germinale d'*HNF1A*, une seconde mutation cette fois ci somatique était identifiée dans les AHC, se manifestant parfois sous forme d'adénomatose familiale [165].

L'inactivation du gène *HNF1A* dans les AHC est associée à une dérégulation du métabolisme lipidique, glucidique et de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (mTor, CCND1 etc…) ainsi qu'à la présence d'une stéatose macrovésiculaire marquée au niveau histologique (Figure 17 et 18) [184]. Ces dérégulations ont été reproduites dans des lignées cellulaires dérivées de CHC transfectées par des siRNA *HNF1A* [184]. Les modèles murins avec une inactivation complète du gène *HNF1A* de Franck Gonzales et de Marco Pontoglio étaient caractérisées par une hépatomégalie stéatosique et par une augmentation de la prolifération hépatocytaire avec néanmoins l'absence de développement de tumeurs hépatiques [185] [186] [187]. De plus, les adénomes mutés *HNF1A* présentent une perte d'expression de *LFAPB* et de *UGT2B7*, deux gènes dont l'expression est

contrôlée par *HNF1A,* en PCR quantitative ainsi que de LFABP en immunohistochimie [188].

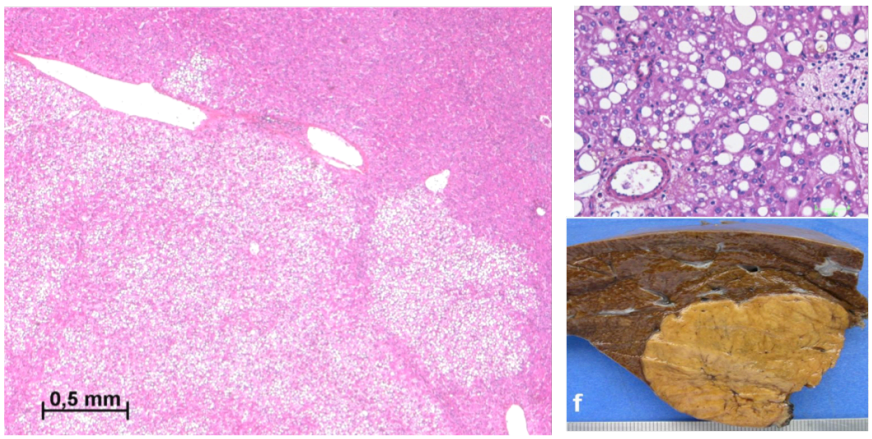


Figure 17: Aspect histologique des adénomes inactivés HNF1A

Présence d'une stéatose macrovésiculaire tumorale induite par l'inactivation bi-allélique d'*HNF1A*.

La stéatose observée dans ces adénomes peut être identifiée en séquence de saturation de graisse à l'IRM qui constitue une éventuelle méthode non invasive pour faire le diagnostic d' AHC inactivé *HNF1A* [189]. En terme clinique, les AHC mutés *HNF1A* ont un faible risque de transformation maligne en CHC [161]. De plus, les adénomatoses constituées d'AHC stéatosique avec perte de LFABP à l'immunohistochimie doivent faire recherche une mutation germinale *HNF1A* qui permettra de proposer un dépistage familiale et de rechercher un diabète de type MODY3 [151].

Figure 18: Dérégulation du métabolisme lipidique, glucidique et de voies de la prolifération dans les adénomes inactivées HNF1A.

Les gènes sous-exprimés et les gènes sur-exprimés dans des adénomes inactivés *HNF1A* sont indiqués en vert et en rouge, respectivement. Les mutations bi-alléliques activatrices d'*HNF1A* dans les hépatocytes sont à la base de défauts métaboliques : activation de la glycolyse (flèches pleines), répression de la gluconéogenèses (flèches pointillées) et activation de la synthèse d'acides gras. De plus, dans ce sous-type d'AHC on retrouve une activation de la voie mTOR et une dérégulation des gènes de cycle cellulaire. (Cf article 4, Nault JC, et al. 2013 [151])

C. Adénome inflammatoire

Initialement, les HNF télangiectasiques étaient un sous type d'hyperplasie nodulaire focale qui a été reclassé dans le groupe des AHC du fait de la démonstration de leur monoclonalité par test HUMARA [190] [191]. De plus, ces tumeurs correspondaient à des adénomes dit « inflammatoires » (aussi appelé télangiectasiques, et représentant 40 à 50% de tous les adénomes) présentant au niveau histologique des infiltrats inflammatoires polymorphes, de la dilatation sinusoïdale et des artères à parois dystrophiques[191] [161]. De plus, il existe une association possible entre adénome inflammatoire et mutations activatrices de la β-caténine [161] [188].

Figure 19: Activation de la voie IL6/JAK/STAT dans les adénomes inflammatoires (Cf Article 4, Nault et al. 2013[151]).

Dans un contexte physiologique, la liaison de l'IL-6 à son récepteur induit une homo-dimérisation de gp130. Par la suite, les protéines Jak kinases associées au co-récepteur se transactivent et catalysent la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription STAT3 qui se transloque au noyau.

L'analyse transcriptomique des AHC inflammatoires a mis en évidence une activation des voies IL6/JAK/STAT et de l'interféron (Figure 19) [192]. De plus, on note une augmentation de l'expression des protéines de la phase aigue de l'inflammation tel la CRP ou SAA que ce soit au niveau transcriptomique ou par immunohistochimie [188]. A l'IRM, les AHC inflammatoires présentent un hypersignal en T2 et une prise de contraste à la phase artérielle persistant à la phase tardive après injection de gadolinium [189]. Les AHC inflammatoires sont plus fréquemment associés à l'obésité ou à une consommation excessive d'alcool [190]. De plus, des syndromes « paranéoplasiques » secondaire à l'activation non contrôlée de la voie IL6/JAK/STAT peuvent être mis en évidence chez certains patients allant de l'augmentation de la CRP circulante, à la fièvre paranéoplasique jusqu'à l'anémie inflammatoire [190] [193]. La résection de ces AHC permet de faire régresser ces manifestations systémiques [193]. Dans le laboratoire, en 2009, il a été identifié dans 65% des AHC inflammatoires des mutations activatrices d'*IL6ST* (codant pour gp130) [192]. De rare cas de CHC avec une mutation activatrice de gp130 associée à

une mutation activatrice de la β-caténine ont été décrits suggérant une coopération entre ces deux voies de signalisation dans la transformation maligne [192]. Gp130 est le co récepteur du récepteur de l'IL6 (IL6R codant pour gp80) et s'hétérodimérise avec un autre complexe IL6R/gp130 quand l'IL6 vient se lier sur gp80 (Figure 19). Le complexe hexamérique (IL6/gp80/gp130 dimérisé) permet de recruter les kinases JAK1 et JAK2 qui se transactivent et catalysent la phosphorylation de STAT3 et/ou STAT1 entrainant leur homo ou heterodimérisation, sa translocation au noyau comme facteur de transcription [194]. L'activation de la voie IL6/JAK/STAT induit une production de cytokine et favorise la prolifération cellulaire. Environ 35% des AHC inflammatoires ne présentent pas de mutations d'*IL6ST*. Dans 5% des cas, des mutations activatrices de *STAT3* ont été identifiées (Cf article 2) ainsi que des mutations activatrices du gène *FRK* (Cf article 8), une src-like kinase, dans 10% des AHC inflammatoires. [195] Ces mutations entrainent une activation permanente de la voie JAK/STAT via la phosphorylation de STAT3 [196]. Des mutations activatrices du gène *GNAS* (5% des AHC inflammatoires), codant pour la sous-unité alpha de la protéine Gs, entrainent une production permanente d'AMP cyclique et une activation modérée de l'inflammation via une interaction avec la voie IL6/JAK/STAT (Cf article 1) [197]. Enfin, dans 2% des cas, nous avons identifié des mutations activatrices de *JAK1* (Cf article 8) [195]. Les mutations de *IL6ST*, *STAT3*, *FRK*, *GNAS* et *JAK1* sont exclusives les unes par rapport aux autres dans ces AHC. Dans 23% des AHC inflammatoires, aucune mutation somatique expliquant le phénotype n'a été identifiée pour l'instant.

D. Adénome muté β-caténine

En 2002, Chen et al. ont mis en évidence des mutations activatrices de β-caténine (codé par *CTNNB1*) dans 3 AHC sur 10 [198]. Dans la première série d'AHC de la classification génotype/phénotype publiée en 2006, des mutations activatrices de la voie Wnt/ β-caténine ont été retrouvées dans 10-15% des cas [161] (Figure 20).

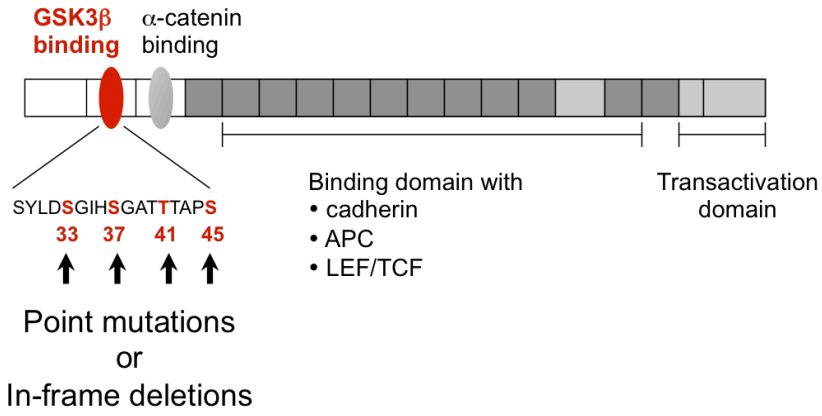


Figure 20: Mutations activatrices de *CTNNB1*

Les mutations activatrices de la β-caténine sont situées au niveau de l'exon 3 dans la zone de liaison avec GS3Kβ et sont soit des substitutions sur des résidus thréonines et sérines, soit des délétions n'entrainant pas de décalage du cadre de lecture. Ces mutations empêchent la phosphorylation par le complexe inhibiteur APC/AXIN1/GSK3β et empêchent donc la dégradation de la β-caténine par le protéasome.

Les hommes sont surreprésentés dans ce groupe d'AHC et dans 50% des cas, les AHC mutés β-caténine sont aussi inflammatoires [161]. De façon intéressante, les AHC survenant chez les patients exposés aux androgènes sont souvent mutés pour la β-caténine et peuvent régresser après l'arrêt du traitement hormonal [159]. Au niveau histologique, on note une association avec la présence de formation pseudoglandulaire, de cholestase et d'anomalies cytologiques [161]. Ces AHC ont une surexpression transcriptomique de *LGR5* et *GLUL*, deux gènes cibles de la voie Wnt/ β-caténine. En immunohistochimie, on note une surexpression homogène et diffuse de la glutamine synthase (75% de sensibilité et 100% de spécificité) et dans certains cas une translocation nucléaire au noyau de la β-caténine [188]. Ces AHC n'ont pas de caractéristiques typiques à l'imagerie soulignant l'intérêt de l'analyse histologique, immunohistochimique et moléculaire de la tumeur pour faire le diagnostic d'AHC muté β-caténine.

Ceci à d'autant plus d'intérêt que les AHC mutés β-caténines sont à haut risque de transformation maligne en CHC [161]. Ceci a été validé indépendamment par plusieurs équipes à travers le monde [199 200 201].

E. Adénome non classé

Dans 10% des cas, aucune mutation ni activation des voies de l'inflammation ne sont identifiées et ces tumeurs constituent le groupe des AHC dits « inclassés ».

Contexte du projet de recherche et objectifs

Mon projet de recherche s'est inscrit dans la continuité des travaux effectués au sein du laboratoire que ce soit sur la classification moléculaire des AHC et des CHC et aussi sur l'identification des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la tumorogénèse hépatique.

A mon arrivée au laboratoire en 2009 pour mon Master 2, les mutations activatrices de gp130 venaient d'être identifiées dans 65% des AHC inflammatoires [192]. Néanmoins, 35% des adénomes inflammatoires n'avaient pas de mutations retrouvées. De plus, si les mutations activatrices de la β-caténine avaient déjà été décrites comme impliquées dans la transformation maligne d'adénome en CHC, les mécanismes additionnels permettant cette transformation étaient encore inconnus. Dans ce contexte, j'ai poursuivi la recherche d'oncogènes mutés dans les AHC inflammatoires et dans un deuxième temps j'ai étudié les mécanismes impliqués dans la transformation maligne des AHC.

En même temps, à mon retour au laboratoire en thèse en 2011, le premier séquençage de nouvelle génération de tous les exons d'une série de 24 CHC avait été effectué et avait permis d'identifier de nouvelles voies de signalisations altérées dans la carcinogénèse hépatique [60]. J'ai poursuivi ce travail en recherchant de nouveaux gènes mutés de façon récurrente dans les CHC et leur rôle dans la transformation maligne sur foie cirrhotique.

Enfin, une classification transcriptomique en 6 sous groupes associés à des caractéristiques cliniques et génétiques avaient été publiée en 2006 par le laboratoire [75]. J'ai effectué un travail consistant à identifier une signature moléculaire à partir d'une analyse transcriptomique afin de prédire le pronostic des patients avec un CHC traité par résection hépatique.

Ces études avaient pour but d'identifier de nouvelles signatures moléculaires possiblement utilisable en pratique clinique et d'affiner notre compréhension de la carcinogénèse hépatique et en particulier des mécanismes de transformation maligne que ce soit sur foie sain et sur foie cirrhotique.

RESULTATS

1. Identification de nouveaux oncogènes dans les adénomes inflammatoires

Les mutations activatrices de gp130 (codé par *IL6ST*) ayant été retrouvées dans environ 65% des AHC inflammatoires dans notre laboratoire, nous avons cherché à identifier de nouvelles altérations génétiques dans les AHC inflammatoires non mutées gp130. En effet, les AHC inflammatoires sans mutations gp130 ressemblent fortement aux AHC mutés gp130 que ce soit au niveau transcriptomique et histologique suggérant des mécanismes communs d'activation des voies de l'inflammation.

L'identification d'AHC hépatocellulaires chez deux patients atteints du syndrome de McCune Albright nous a incité à rechercher des mutations *GNAS*, codant pour la sous-unité alpha de la protéine Gs, dans une large série d'AHC (Article 1). Les mutations activatrices du gène *GNAS* sont responsables dans une forme mosaïque du syndrome de McCune Albright, un syndrome rare diagnostiqué pendant l'enfance associant une dysplasie fibreuse osseuse, des macules cutanées café au lait et des tumeurs hypophysaires et thyroïdiennes. C'est la première fois qu'une association entre le syndrome de McCune Albright et des tumeurs hépatiques a été rapportée. Nous avons aussi identifié de façon récurrente des mutations somatiques du gène *GNAS* dans des AHC inflammatoires non mutés gp130. Nous avons observé dans les tumeurs humaines mais aussi in vitro une activation modérée de la voie JAK/STAT secondaire aux mutations activatrices *GNAS* confirmant une interaction entre la voie JAK/STAT et de l'AMP cyclique.

De plus, une approche gène candidat de séquençage des partenaires de la voie IL6/JAK/STAT nous a permis d'identifier des mutations activatrices *STAT3* dans les AHC non mutés gp130 (Article 2). Ces mutations de *STAT3*, décrit pour la première fois dans des tumeurs humaines, entrainaient une activation constitutive de la voie IL6/JAK/STAT en l'absence du ligand. De façon intéressante, si les mutants gp130

étaient sensibles à un inhibiteur de JAK1/JAK2 le ruxolitinib, les mutants *STAT3* ne l'étaient pas, suggérant des mécanismes de régulation différents entre les partenaires de la voie JAK/STAT (Article 3). L'actualisation de la classification moléculaire a été réalisée à travers 2 articles de revues sur le sujet cherchant à mettre en perspective l'utilisation en clinique de cette classification (Article 4 et 5).

Article 1: GNAS-activating mutations define a rare subgroup of inflammatory liver tumors characterized by STAT3 activation.

Nault JC, Fabre M, Couchy G, Pilati C, Jeannot E, Tran Van Nhieu J, Saint-Paul MC, De Muret A, Redon MJ, Buffet C, Salenave S, Balabaud C, Prevot S, Labrune P, Bioulac-Sage P, Scoazec JY, Chanson P, Zucman-Rossi J.

J Hepatol. 2012 Jan;56(1):184-91.

Article 2: Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas.

Pilati C, Amessou M, Bihl MP, Balabaud C, Nhieu JT, Paradis V, **Nault JC**, Izard T, Bioulac-Sage P, Couchy G, Poussin K, Zucman-Rossi J.

J Exp Med. 2011 Jul 4;208(7):1359-66.

Article 3: Biochemical and functional analyses of gp130 mutants unveil JAK1 as a novel therapeutic target in human inflammatory hepatocellular adenoma.

Poussin K, Pilati C, Couchy G, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Bacq Y, Paradis V, Leteurtre E, Sturm N, Ramos J, Guettier C, Bardier-Dupas A, Boulai A, Wendum D, Selves J, Izard T, **Nault JC**, Zucman-Rossi J.

Oncoimmunology. 2013 Dec 1

Article 4: Hepatocellular benign tumors-from molecular classification to personalized clinical care.

Nault JC, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J.
Gastroenterology. 2013 May;144(5):888-902.

Article 5: Molecular classification of hepatocellular adenomas.

Nault JC, Zucman Rossi J.

Int J Hepatol. 2013;2013:315947.

2. Rôle des mutations activatrices du promoteur de *TERT* dans la transformation maligne sur foie sain et cirrhotique

Le séquençage à haut débit de l'ensemble des exons effectué au laboratoire avait permis d'identifier les voies de signalisation altérées de façon récurrente dans les CHC (Wnt/ β-caténine, gène du cycle cellulaire, remodelage de la chromatine, stress oxydatif etc…).

La publication dans Science en 2013 de mutations somatiques du promoteur de *TERT* dans des mélanomes m'a fait rechercher ces mutations dans une large série de tumeurs hépatiques bénignes et malignes [202 203]. Ces mutations n'avaient pas pu être identifiés par le séquençage exome du fait de l'absence de couverture des régions non codantes.

Ainsi, j'ai identifié les mutations somatiques mono-alléliques du promoteur de *TERT* comme les altérations génétiques les plus fréquentes des CHC avec une fréquence de 60% (Article 6). Nous avons aussi montré que ces altérations génétiques survenaient dans les lésions prénéoplasiques développées sur cirrhose et que leur pourcentage augmentait dans les CHC « précoces » (Article 7). A l'inverse les mutations observées dans les oncogènes et suppresseurs de tumeurs classiquement mutées dans les CHC comme *TP53*, *CTNNB1*, *ARID1A*, *ARID2*, *RPS6KA3* n'étaient identifiés que dans les CHC avancés. Sur foie cirrhotique, cela suggère un rôle précoce des mutations du promoteur de *TERT* dans l'initiation tumorale et la transformation maligne et un rôle tardif des autres mutations telles *TP53*, *CTNNB1* ou *ARID1A* dans la progression tumorale.

De plus, dans une large série d'AHC classiques, nous n'avons pas trouvé de mutations dans le promoteur de *TERT*. A l'inverse, nous avons identifié des mutations dans le promoteur de *TERT* dans des AHC transformés en CHC et dans des formes frontières entre adénome et CHC (Article 8). Ces mutations étaient fréquemment associées à des mutations activatrices de la β-caténine. Ces résultats ont été confirmés par une étude de séquençage haut débit de la partie adénome et carcinome de sujet ayant une transformation maligne. Cette étude a démontré que les mutations activatrices de la β-caténine étaient des altérations génétiques

précoces identifiant les lésions à risque de transformation maligne mais que l'acquisition dans un second temps de mutations dans le promoteur de *TERT* était nécessaire pour entrainer la transformation en CHC.

Nous avons aussi identifié *TERT* comme le premier oncogène muté de façon récurrente dans les mésothéliomes humains (Article 9). Enfin, nous avons montré que les mutations dans le promoteur de *TERT* étaient impliquées dans l'évolution des méningiomes de bas grade en forme agressive de haut grade suggérant encore l'implication de ces mutations dans la transformation maligne (Article 9).

Article 6: High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions.

Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, Laurent A, Cherqui D, Balabaud C, Zucman-Rossi J.
Nat Commun. 2013;4:2218.

Article 7: Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis.

Nault JC*, Calderaro J*, Di Tommaso L, Balabaud C, Zafrani ES, Bioulac-Sage P, Roncalli M, Zucman-Rossi J. **Co-auteurs*
Hepatology. 2014 Dec;60(6):1983-92

Article 8: Genomic profiling of hepatocellular adenomas reveals recurrent FRK-activating mutations and the mechanisms of malignant transformation.

Pilati C, Letouzé E, **Nault JC**, Imbeaud S, Boulai A, Calderaro J, Poussin K, Franconi A, Couchy G, Morcrette G, Mallet M, Taouji S, Balabaud C, Terris B, Canal F, Paradis V, Scoazec JY, de Muret A, Guettier C, Bioulac-Sage P, Chevet E, Calvo F, Zucman-Rossi J.
Cancer Cell. 2014 Apr 14;25(4):428-41.

Article 9: Overexpression and promoter mutation of the TERT gene in malignant pleural mesothelioma.

Tallet A*, **Nault JC***, Renier A, Hysi I, Galateau-Sallé F, Cazes A, Copin MC, Hofman P, Andujar P, Le Pimpec-Barthes F, Zucman-Rossi J, Jaurand MC, Jean D.
**co-auteurs*
Oncogene. 2014 Jul 10;33(28):3748-52.

Article 10: High incidence of activating TERT promoter mutations in meningiomas undergoing malignant progression.

Goutagny S*, **Nault JC***, Mallet M, Henin D, Zucman-Rossi J, Kalamarides M.
Brain Pathol. 2014 Mar;24(2):184-9. * *co-auteurs*

3. Diversité et pronostic moléculaire des carcinomes hépatocellulaires

A mon arrivée au laboratoire, une classification transcriptomique en 6 groupes G1-G6 avait été publiée et avait mis en évidence la grande diversité génétique du CHC[75]. Le sous-groupe G3 était associé à un mauvais pronostic dans les CHC traités par résection hépatique. Néanmoins, les performances pronostiques de cette classification nous paraissant pouvoir être améliorées, nous avons effectué une étude dédiée à l'identification d'une signature pronostique moléculaire utilisable chez les patients avec CHC traités par résection hépatique. Premièrement, nous avons identifié des gènes dérégulés entre des CHC de bon et mauvais pronostic en utilisant une analyse transcriptomique. Puis, j'ai évalué l'expression de ces gènes par RT-PCR quantitative, créé un score à 5 gènes dans une cohorte française de test, et validé ce score à 5 gènes dans une cohorte française de validation (Article 11). Ces résultats ont été ensuite validés dans des cohortes externes à l'étranger (Etats-unis, Europe, Chine) sur des plateformes différentes (microarray, tissu en paraffine…) et ont démontré que le score à 5 gènes avait une valeur pronostique robuste et indépendante des caractéristiques cliniques et histologiques habituelles et pouvait être utilisé quelque soit l'étiologie du CHC et l'état du foie sous jacent.

Cette étude a permis d'affiner la classification moléculaire du CHC en ajoutant un outil pronostique robuste. De plus, nous avons effectué une analyse par séquençage haut débit d'une série de 243 CHC et lésions prénéoplasiques (Article 12) qui nous a permis d'affiner notre compréhension des voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse hépatique, d'identifier des signatures nucléotidiques reflets de l'exposition à des génotoxiques et de nouveaux mécanismes mutationnelles, et d'identifier des altérations génétiques potentiellement ciblables par des biothérapies. Nous avons effectué un travail sur la caractérisation du gène ALDH3A1 comme gène cible de la voie Wnt/β-caténine (Article 13). Nous avons aussi participé à des travaux collaboratifs permettant de proposer des outils pronostics moléculaires (niveau d'expression de la phosphatidylinositol 4-kinase de type IIIα) (Article 14) et d'améliorer la compréhension dans la physiologie hépatocytaire du rôle de small nuclear

Pregnane X Receptor (*sPXR*) une protéine impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques (Article 15). Les principales altérations génétiques du CHC et leur rôle dans la transformation maligne sur foie sain et cirrhotique, ainsi que les potentiels utilisations de ces connaissances en pratique clinique dans le futur, ont été décrites dans trois revues (Article 16, 17 et 18).

Article 11: A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection.

Nault JC*, De Reyniès A*, Villanueva A, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, Decaens T, Franco D, Imbeaud S, Rousseau F, Azoulay D, Saric J, Blanc JF, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Laurent A, Laurent-Puig P, Llovet JM, Zucman-Rossi J. **Co-auteurs*

Gastroenterology. 2013 Jul;145(1):176-87

Article 12: Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets.

Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, Meiller C, Shinde J, Soysouvanh F, Calatayud AL, Pinyol R, Pelletier L, Balabaud C, Laurent A, Blanc JF, Mazzaferro V, Calvo F, Villanueva A, **Nault JC**, Bioulac-Sage P, Stratton MR, Llovet JM, Zucman-Rossi J.
Nat Genet. 2015 May;47(5):505-11.

Article 13: ALDH3A1 is overexpressed in a subset of hepatocellular carcinoma characterised by activation of the Wnt/ß-catenin pathway.

Calderaro J, **Nault JC**, Bioulac-Sage P, Laurent A, Blanc JF, Decaens T, Zucman-Rossi J.
Virchows Arch. 2014 Jan;464(1):53-60.

Article 14: Overexpression of phosphatidylinositol 4-kinase type IIIα is associated with undifferentiated status and poor prognosis of human hepatocellular carcinoma.

Ilboudo A*, **Nault JC***, Dubois-Pot-Schneider H, Corlu A, Zucman-Rossi J, Samson M, Le Seyec J. * *Co-auteurs*

BMC Cancer. 2014 Jan 6;14:7.

Article 15: Characterization of a novel PXR isoform with potential dominant-negative properties.

Breuker C, Planque C, Rajabi F, **Nault JC**, Couchy G, Zucman-Rossi J, Evrard A, Kantar J, Chevet E, Bioulac-Sage P, Ramos J, Assenat E, Joubert D, Pannequin J, Hollande F, Pascussi JM.
J Hepatol. 2014 Sep;61(3):609-16.

Article 16: Genetics of hepatobiliary carcinogenesis.

Nault JC, Zucman-Rossi J.

Semin Liver Dis. 2011 May;31(2):173-87.

Article 17: Molecular profiling of liver tumors: classification and clinical translation for decision making.

Pinyol R, **Nault JC**, Quetglas IM, Zucman-Rossi J, Llovet JM.
Semin Liver Dis. 2014 Nov;34(4):363-75.

Article 18: The genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma.

Zucman-Rossi J, Villanueva A, **Nault JC**, Llovet JM.
Gastroenterology. 2015 Jun 19.

4. Rôle oncogénique de l'adéno-associated virus de type 2 et du virus de l'hépatite B dans la carcinogénèse hépatique

Lors du séquençage du promoteur de *TERT* dans une série de tumeurs hépatocellulaires, j'ai identifié un fragment viral de l'adeno-associated virus de type 2 (AAV2) inséré dans le promoteur de *TERT* dans un CHC alors que l'insertion virale était absente du foie non tumoral correspondant. Afin de comprendre si AAV2 était impliqué dans la carcinogénèse hépatique, nous avons ensuite étudié une série de 150 CHC et de foies non tumoraux correspondants par PCR afin de détecter la présence du génome d'AAV2. Nous avons ensuite effectué une capture virale et un séquençage haut débit sur 43 CHC et foies non tumoraux correspondants et analysé in silico des datas d'exome de 43 CHC supplémentaires afin d'identifier d'éventuelles insertions dans le génome humain. Parmi ces 193 tumeurs, nous avons identifié 11 CHC avec des insertions clonales d'AAV2 dans la tumeur non retrouvées dans le foie non tumoral correspondant. Ces insertions virales comportaient une région minimale incluant la partie terminale du virus dit 3'ITR (inverse tandem repeat) et ciblaient des gènes impliqués dans la carcinogénèse hépatique tel *TERT*, *CCNA2*, *CNNE1*, *KMT2B*/*MLL4* et *TNFSF10*. Nous avons observé une surexpression de ces gènes dans ces CHC et mis en évidence une augmentation de l'activité luciférase sous le contrôle du promoteur de *TERT* et du 3'UTR de *TNFSF10* quand la séquence virale était insérée suggérant un effet fonctionnel. De plus, ces insertions virales étaient observées dans des CHC développés sur foie sain sans étiologie suggérant un rôle d'AAV2 dans la carcinogénèse sur foie sain.

Cette étude nous a permis d'identifier le potentiel oncogénique de AAV2 dans la carcinogénèse hépatique qui constitue avec le VHB, le deuxième virus responsable de mutagénèse insertionnelle dans les CHC. Nous avons aussi effectué une analyse intégrée des caractéristiques virales, mutationnelles, transcriptomiques, cliniques, histologiques des CHC liés au VHB comparés aux CHC liés au VHB.

Ceci a permis d'identifier les caractéristiques moléculaires spécifiques au CHC due à l'hépatite B et de souligner leur grande diversité moléculaire.

Article 19: Recurrent adeno-associated virus 2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas

Nault JC*, Datta S*, Imbeaud S*, Franconi A, Mallet M, Couchy G, Letouzé E, Pilati C, Verret B, Blanc JF, Balabaud C, Calderaro J, Laurent A, Letexier M, Bioulac-Sage P, Calvo F, Zucman-Rossi J. * *Co-auteurs*

Nature Genetics, sous presse, 2015

Article 20: Integration of tumour and viral genomic characterizations in HBV-related hepatocellular carcinomas.

Amaddeo G, Cao Q, Ladeiro Y, Imbeaud S, **Nault JC**, Jaoui D, Gaston Mathe Y, Laurent C, Laurent A, Bioulac-Sage P, Calderaro J, Zucman-Rossi J.

Gut. 2015 May;64(5):820-9.

DISCUSSION

A. Inflammation induite par des oncogènes dans les adénomes hépatocellulaires : des gènes aux thérapies ciblées

Dans nos travaux, nous avons identifié des mutations récurrentes somatiques activatrices du gène *GNAS* dans des AHC et CHC ayant un phénotype inflammatoire.

1. Le locus *GNAS*

Le locus *GNAS* est un locus complexe situé dans la région chromosomique 20q13 permettant à partir de différents promoteurs et de l'épissage d'un premier exon variable sur une série d'exon commun (exon 2 à 13) de donner 5 transcrits et 3 protéines [204]. Ce locus est aussi sous le contrôle de modifications épigénétiques de type méthylation dépendante de l'allèle parental mais aussi parfois tissu-dépendant. Dans ce locus, le gène *GNAS* code pour la sous-unité alpha de la protéine Gs (s pour stimulatory), une protéine ubiquitaire. Il existe 2 formes, de fonction identique, de la sous-unité alpha de la protéine Gs : une forme longue et une forme courte du fait de la présence d'un épissage alternatif de l'exon 3 [204]. Dans certains tissus (ovaires, thyroïde, hypophyse et tubules rénaux proximaux) le gène *GNAS,* codant la sous-unité α de la protéine Gs, est exprimé uniquement à partir de l'allèle maternel du fait de modifications épigénétiques de type méthylation d'histones au niveau de l'allèle paternel [205]. Néanmoins, il a été démontré que dans le foie il n'existait pas de méthylation allèle dépendant et que donc les 2 allèles du gène *GNAS* étaient exprimés [204].

Dans ce locus des promoteurs différents génèrent des transcrits codant pour 2 autres protéines la protéine NESP55 (neuroendocrine-specific protein of 55 kDa) et la protéine XLαs, une isoforme longue de la protéine Gs avec un exon 1 différent. Ces 2 protéines subissent des modifications épigénétiques modulant l'expression d'un des allèles parentaux. De plus il a été décrit 2 transcrits non codants, le transcrit 1A et NESPAS dont le rôle pourrait être de contrôler les modifications épigénétiques du locus [206]. Néanmoins seul le gène *GNAS* codant pour la sous-

unité α de la protéine Gs ait été identifié comme oncogène et les autres protéines codées par le locus ne sont pas exprimées dans le foie [207].

2. La voie de signalisation de l'AMP cyclique via les protéines G

Les protéines G hétérotrimériques sont composées dans leurs forme inactive des sous-unités α, β et γ avec un GDP lié à la protéine α et sont situées sous la membrane basale à proximité des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G [208]. Lorsqu'un ligand (le glucagon ou l'hormone de croissance par exemple) se lie aux récepteurs couplés aux protéines G cela entraîne l'échange d'un GDP par un GTP au niveau de la sous-unité α et la séparation de celle-ci des sous-unités β et γ (figure 21). La sous-unité α de la protéine Gs (codée par le gène *GNAS*) sous sa forme active entraine la production d'AMPc par l'adénylate cyclase. L'AMPc intracellulaire en tant que second messager intracellulaire a de multiples effets dont l'un des principaux, est d'activer la protéine kinase A, une sérine-thréonine kinase. Les effets de l'augmentation de l'AMPc via l'adenylate cyclase sont variables selon le type cellulaire étudié avec des conséquences par exemple sur la prolifération, la neurotransmission ou la sécrétion hormonale [208 209]. Finalement, une GTP phosphatase située dans la sous-unité α de la protéine G entraîne l'hydrolyse du GTP en GDP, l'inactivation de la sous-unité α et la reformation de l'hétérotrimère α, β et γ. Ainsi, la sous-unité alpha de la protéine Gαs possède de façon intrinsèque dans sa structure son propre inhibiteur via la GTP phosphatase (GTPase) [208].

3. Les mutations activatrices de *GNAS* dans la tumorigénèse humaine

Les mutations activatrices somatiques mono-alléliques *GNAS* ont été décrites dans les adénomes pituitaires sécrétant de l'hormone de croissance [210 211]. Des études portant sur des lignées cellulaires ont confirmé que ces mutations étaient oncogéniques et celles-ci ont été décrites par la suite dans d'autres tumeurs, le plus souvent bénignes, telles que les adénomes thyroïdiens hypersécrétants, les adénomes surrénaliens et les myxomes musculaires, plus rarement dans des cancers thyroïdiens, coliques ou rénaux à cellules claires [204 166].

Les mutations activatrices *GNAS* sont aussi responsables dans une forme somatique mosaïque d'une maladie rare le syndrome de McCune Albright[166] [212]. Les mutations activatrices *GNAS* sont létales dans leurs formes germinales. La quantité de cellules mutées *GNAS* de manière somatique détermine la gravité du phénotype observé dans le MCA [212]. Les patients atteints de MCA sont plus enclins à développer des tumeurs bénignes, en particulier endocriniennes, mais jusqu'à présent, à notre connaissance, aucune association entre le MCA et la survenue de tumeurs hépatiques n'avait été mise en évidence.

Les mutations activatrices *GNAS* sont des substitutions situées dans l'exon 8 au niveau du codon 201 et plus rarement dans l'exon 9 au niveau du codon 227. Les mutations activatrices les plus fréquemment retrouvées ont comme conséquence la substitution de l'arginine 201 en cystéine ou histidine (R201C et R201H), d'autres sont plus rarement identifiés telles que les mutations R201L, G227R et G227L [204].

Ces mutations activatrices *GNAS* touchent le domaine de la GTPase intrinsèque de la sous-unité alpha de la protéine Gs entraînant l'inactivation de la GTPase et la persistance de la liaison GTP avec la sous-unité alpha de la protéine Gs [210]. Cela entraîne une activation permanente de l'adénylate cyclase et par conséquent de la production d'AMPc au niveau intracellulaire permettant alors l'activation de la protéine kinase A. L'effet de l'activation permanente de la voie de l'AMPc varie en fonction du type cellulaire pouvant favoriser la prolifération dans des lignées d'adénomes pituitaires et thyroïdiens [213].

Figure 21: Transduction du signal via les protéines G et activation de la voie de l'AMPc et effet des mutations activatrices de *GNAS* (Weinstein LS, et al. 2006 [214])

Lorsqu'un ligand se lie aux récepteurs couplés aux protéines G cela entraîne l'échange d'un GDP par un GTP au niveau de la sous-unité α et la séparation de celle-ci des sous-unités β et γ. La sous-unité α de la protéine Gs (codée par le gène GNAS) sous sa forme active entraine la production d'AMPc par l'adénylate cyclase. Une activité GTPase intrinsèque à la protéine G entraine la transformation du GTP en GDP et l'inactivation de la protéine G. Les mutations activatrices de *GNAS* induisent une inactivation de la GTPase et une activation permanente de l'adenylate cyclase.

De façon intéressante dans notre étude, les deux CHC avec une mutation *GNAS* étaient développés sur foie sain (à l'inverse de la majorité des CHC qui se développent sur hépatopathie chronique ou sur cirrhose) dont un était dérivé d'une dégénérescence d'un AHC, soulignant la possibilité d'une dégénérescence maligne dans les AHC mutées *GNAS*. Cependant, le fait d'avoir trouvé une mutation de la β-caténine dans l'un des CHC peut faire discuter la nécessité d'altérations génétiques supplémentaires pour entrainer la transformation maligne. En effet, les mutations activatrices *GNAS* ont été précédemment impliquées dans la tumorigenèse bénigne au niveau thyroïdien et pituitaire mais beaucoup plus rarement dans des cas de tumorigenèse maligne, de rare cas de cancers coliques, cancers thyroïdiens ou surrénaliens ayant été décrits [207] [215]. De plus, les patients atteints de MCA développent rarement des tumeurs malignes [216]. Une récente association a été mise en évidence entre le syndrome de McCune Albright avec des tumeurs pancréatiques de type tumeurs intracanalaires papillaires et mucineuses du pancréas, des tumeurs pancréatiques bénignes à risque de dégénérescence augmentant le spectre de tumeurs bénignes induites par les mutations somatiques mosaïques activatrices du gène *GNAS* [217].

4. Inflammation induite par des oncogènes

L'inflammation est considérée depuis de nombreuses années comme un promoteur de carcinogénèse en particulier via des mécanismes d'inflammation chronique due

à des infections virales (hépatite B, C), bactériennes (hélicobacter pylori), des agents environnementaux (tabac) ou des maladies chroniques inflammatoires (cholangite sclérosante primitive, maladie de Crohn ou rectocolite hémorragique…) [218].

En plus d'être un promoteur de carcinogenèse, l'inflammation peut aussi survenir en tant que conséquence du développement tumoral. La voie « intrinsèque » de l'inflammation est activée par les cellules tumorales elles-mêmes : la présence d'altérations génétiques touchant des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur induisent l'activation permanente des voies de l'inflammation et peuvent promouvoir la carcinogénèse

Ces dernières années, nous avons identifié au laboratoire les principales altérations génétiques oncogéniques responsables du phénotype inflammatoire par activation de la voie IL6/JAK/STAT dans les AHC : les mutations activatrices de *IL6ST* (65%), les mutations activatrices de *GNAS* (5%), les mutations activatrices de *STAT3* (5%) les mutations activatrices de *JAK1* (2%), les mutations activatrices de *FRK* (10%) [192 196 195 197]. Tous ces gènes sont mutés de manière exclusive les uns des autres suggérant une redondance fonctionnelle. Néanmoins, 23% des AHC inflammatoires restent pour l'instant dépourvus de mutations dans ces principaux gènes.

L'identification des mutations activatrices *GNAS* dans un sous groupe d'AHC inflammatoire est la première description phénotypique dans la tumorigenèse humaine de l'interaction entre la voie de l'AMPc et de la voie JAK/STAT, interaction mise en évidence depuis plusieurs années dans des modèles in vitro [219 220]. Plusieurs auteurs ont étudié in vitro comment la voie de l'AMPc interagit avec la voie JAK/STAT et ont mis en évidence le rôle de SRC, PKA, JNK (jun N-terminal protein kinase) et PI3Kb (Phosphoinositide 3-kinase).

En étudiant les gènes cibles des voies de l'inflammation en RT-PCR quantitative et en immunohistochimie, nous avons noté que les tumeurs mutées *GNAS* avaient un phénotype inflammatoire « atténué » par rapport aux AHC mutés *IL6ST* ainsi qu'une activation certes significative mais modérée des gènes cibles de l'inflammation et de STAT3 dans les lignées cellulaires. Le fait que GNAS active la voie JAK/STAT de manière indirecte tandis que gp130 (codée par IL6ST) est

directement impliquée dans l'activation de cette voie est peut être l'une des explications à ce phénomène. De plus, des mécanismes de modulation de l'activation de la voie de l'AMPc ont été mis en évidence dans d'autres lignées cellulaires transfectées avec le plasmide *GNAS* mutant. Ces mécanismes multiples sont la diminution de la transcription du gène *GNAS*, la synthèse de Gαi, forme inhibitrice de l'adénylate cyclase, l'augmentation de la transcription des phosphodiestérases inhibant l'AMPc ou l'augmentation de la transcription des RGS, protéines régulatrices des protéines G [221].

5. Thérapies ciblées dirigées contre les oncogènes de la voie IL6/JAK/STAT

L'identification d'oncogènes mutés et responsables de l'activation permanente de la voie IL6/JAK/STAT nous a permis de tester différents types de thérapie ciblée ayant pour but d'inhiber cette voie de signalisation. De manière intéressante, la réponse aux thérapies ciblées dépend non pas de la présence d'une activation de la voie JAK/STAT mais dépend du type d'altérations génétiques (Figure 22). En effet, les mutations gp130 sont sensibles à l'inhibition de la kinase *JAK1* par l'inhibiteur JAK1/JAK2, le ruxolitinib, alors qu'elles sont peu sensibles aux inhibiteurs spécifiques de JAK2 comme l'AG490. Les mutations activatrices de *JAK1* sont sensibles de la même façon à l'inhibiteur JAK1/JAK2, le ruxolitinib [221]. A l'inverse, les mutations *STAT3*, étant en aval de la voie, ne sont pas sensibles aux inhibiteurs JAK1/JAK2, de même que les mutations *FRK*. Les mutations activatrices de *FRK*, une src-like kinase entrainant la phosphorylation de STAT3, sont sensibles au inhibiteur Src comme le dasatinib [222].

En attendant d'avoir des inhibiteurs STAT3 efficaces avec un profil de tolérance correcte qui pourrait être éventuellement utilisés contre tous les types de mutations de la voie JAK/STAT, l'adaptation de la thérapie ciblée aux mutations paraît l'option la plus réaliste pour traiter des adénomatoses inflammatoires ou des volumineux adénomes inflammatoires centrohépatiques dont la résection est soit dangereuse soit impossible. De plus de rares CHC ont des mutations gp130 et pourrait être traitée par un inhibiteur JAK1/2.

Figure 22 : Thérapies ciblées dirigées contre les principaux oncogènes activant la voie JAK/STAT dans les AHC inflammatoires (adapté de Nault JC, et al. 2013 [151])

Le ruxolitinib, un inhibiteur JAK1/2, abolit l'activité des mutants gp130 et jak1 alors que le dasatinib, un inhibiteur src, abolit l'activité des mutants frk.

B. Impact clinique de la signature pronostique moléculaire à 5-gènes

1. Généralités sur le pronostic des patients avec carcinome hépatocellulaire

Le pronostic des patients avec CHC traités par résection est lié aux caractéristiques tumorales et non tumorales du foie adjacent [223]. Les études cliniques et moléculaires ont permis de décrire deux types de récidive tumorale 1) la récidive tumorale précoce survenant dans les 2 à 3 ans après la chirurgie et 2) la récidive tumorale tardive survenant après 2 à 3 ans suivant la chirurgie [39]. De plus, la possibilité de décéder des complications non liées au cancer de la cirrhose (insuffisance hépatocellulaire, hypertension portale) est un risque compétitif supplémentaire. La récidive tumorale précoce est principalement liée aux caractéristiques tumorales (invasion microvasculaire, nodule satellite, différentiation, groupe moléculaire) et à la survenue de métastases intrahépatiques. A l'inverse, la récidive tumorale tardive est principalement associée aux caractéristiques du foie non tumoral (présence d'une cirrhose, sévérité de la cirrhose, caractéristique moléculaire du foie cirrhotique) et à la survenue de nouveaux CHC par un mécanisme de carcinogénèse de novo sur cirrhose [223].

Cette dichotomie est bien admise pour les CHC traités par résection ou ablation percutanée. A l'inverse, du fait de l'exérèse complète du foie cirrhotique, le risque de récidive tumorale des patients avec CHC traités par transplantation hépatique est lié uniquement aux caractéristiques tumorales. Dans les CHC avancés, le pronostic est principalement lié à la progression tumorale [83]. Ces considérations ont un impact sur l'organisation du futur essai thérapeutique. La mise en place d'essai adjuvant de prévention de survenue de CHC de novo paraît intéressant dans les CHC traités par ablation percutanée ou résection mais n'a pas d'intérêt dans les

CHC avancés ou les CHC traités par transplantation hépatique. A l'inverse une thérapie adaptée à la biologie tumorale pourrait avoir un intérêt à chaque étape de la maladie.

L'identification et la translation en pratique clinique des signatures pronostiques moléculaires doivent être effectuées selon des critères stricts afin de s'assurer de la robustesse et la reproductibilité de ces biomarqueurs. Différentes guidelines ont décrites concernant les étapes nécessaires pour l'identification et la validation de biomarqueurs pronostiques [224 225] :

- le biomarqueur doit être identifié dans une cohorte de test et son intérêt pronostique doit être validé dans une cohorte de validation
- Sa valeur pronostique doit être indépendante des caractéristiques cliniques et histologiques habituellement considérés comme pronostiques. L'hétérogénéité de la sévérité de l'hépatopathie sous jacente ainsi que des étiologies associées aux CHC doivent être prise en compte.
- Ce biomarqueur doit être validé de manière indépendante par une équipe externe

2. Signature pronostique moléculaire tumorale

Plus de 20 signatures pronostiques moléculaires ont été publiées mais la plus grande partie d'entres elles ne répondent pas aux critères d'identification et de validation nécessaires aux nouveaux biomarqueurs pronostiques (critères REMARK, Table 2) [226]. Une étude reprenant une vingtaine de signatures moléculaires a démontré que la signature G3 était la meilleure signature pour prédire le risque de récidive tumorale après résection hépatique [226]. Des signatures moléculaires pronostiques basées sur l'analyse de l'expression des microARN ou des caractéristiques de méthylation tumorale ont été aussi publiées (Table 2). Par exemple, un niveau bas d'expression de mir26a dans des CHC liés à l'hépatite B et traités par résection était associé à un mauvais pronostique et à la réponse à un traitement adjuvant par interferon [227].

Table 2: Signature moléculaire pronostique dans le CHC (d'après Zucman Rossi, J. et al. 2015 [45])

		Etiologie(s)	Objectif primaire	Recommendations REMARK	Références
Développement avancé					
mRNA	5-gene signature	Alcool, VHC, VHB	Survie	OK	Nault et al. Gastroenterology 2013 [228]
	EpCAM-signature	VHB	Survie	OK	Yamashita et al. Cancer Res 2008 [229]
	186-gene signature (adjacent tissue)	VHC	Survival, HCC development	OK	Hoshida et al. NEJM 2008 [230]
miRNA-based	Down-regulation miR-26a	VHB	Survie	OK	Ji et al. NEJM 2009 [227]
En attente de validation					
mRNA	5-gene risk signature	VHC	Survie	OK	Villa et al. Gut 2015 [231]
	65-gene signature	VHB	Survie	OK	Kim et al. Hepatology 2012 [232]
	233-gene signature (non tumrorale)	VHB	Survie sans récidive, récidive tumorale tardive	OK	Kim et al. PLoS Med 2014 [233]
	Groupe G3	VHC, alcool	Survie	OK	Boyault et al. Hepatolgoy 2006 [75]
	Cluster A / Hepatoblast-like	VHB	Survie	OK	Lee et al. Nat Med 2006 [144]
	17-gene metastasis predictor (non tumorale)	VHB	Survie	OK	Budhu et al. Cancer Cell 2006 [234]
	Metastasis-related gene signature	VHB	Survie	OK	Roessler et al. Cancer Res 2010 [235]
	Cholangiocarcinoma-like	VHB	Survie	OK	Woo et al. Cancer Res 2010 [236]
	617-gene SP-ZEB signature	VHB	Survie	-	Marquardt et al. Hepatology 2011 [237]
miRNA	20-miRNA signature	VHB	Thrombose porte tumorale, survie	OK	Budhu et al. Hepatology 2008 [238]
	miR-122	VHB, VHC, alcohol	Survie	OK	Coulouarn et al. Oncogene 2009 [239]
	20-miRNA signature	VHB	Survie	OK	Wei et al. Clin Cancer Res 2013 [240]
	C19MC	VHC	Survie	-	Augello et al. Liver Int 2012 [241]
	Let-7 members	VHC	Récidive tumorale précoce	-	Viswanathan et al. Nat Genet 2009 [242]
	miR-125a	VHB	Survie	-	Li et al. Int J Cancer 2008 [243]
	19-miRNA signature	VHC, alcool	Survie	-	Jiang et al. Clin Cancer Res 2008 [244]
	miR-221	VHB	Récidive tumorale	-	Gramantieri et al. Clin Cancer Res 2009 [245]
Methylation	36 CpG DNA methylation signature	HCV	Survie	OK	Villanueva et al. Hepatology 2015 [246]
	Methylation signature	HBV, HCV	Survie	-	Hernandez-Vargas et al. PLoS One 2010 [247]
	Hypomethylation globale	HBV	Survie	-	Calvisi et al. Gastroenterology 2006 [248]
	Hypermethilation de E-cadherin ou GSTP1	HBV	Survie	-	Lee et al. Am J Pathol 2003 [249]
	Hypermethilation de E-cadherin	HBV	Récidive tumorale	-	Kwon et al. J Korean Med Sci 2005 [250]
	Hypermethilation de RIZ134	HBV	Survie sans progression	-	Lou et al Cancer Sci 2009 [251]

Dans notre étude, nous avons identifié un score à 5 gènes par RT-PCR quantitative associé à la récidive tumorale précoce et à la survie chez des patients dans une cohorte de test puis de validation en France [228]. Ce score à 5 gènes avait une meilleur valeur pronostique que notre signature moléculaire G3 et était associé de manière indépendante à la survie comparé aux caractéristiques cliniques et histologiques. De plus, ce score à 5 gènes a été validé de manière indépendante sur une cohorte de patient avec CHC de petites tailles développés sur cirrhose virale C en Europe et aux Etats-unis et analysés à partir de tissu en paraffine. Une deuxième cohorte externe de validation chez des patients asiatiques ayant des CHC liés au VHB et traités par résection hépatique a permis de confirmer la robustesse de la signature moléculaire.

De ce fait, le score à 5 gènes satisfait les prérequis des sociétés savantes sur les biomarqueurs pronostiques pour pouvoir proposer son implentation en pratique clinique dans le futur. Ce score pourrait être utilisé pour stratifier les patients dans des essais thérapeutiques adjuvants ou stratifier la prise en charge thérapeutique dans les indications limites de résection, ablation percutanée ou transplantation [83].

Actuellement, nous avons effectué une collaboration avec une équipe de Corée du sud (Pr Sung-Min Ahn) dans lequel nous avons testé notre signature à 5 gènes dans 205 CHC principalement liés au VHB et traités par résection hépatique. Quatre vingt un CHC étaient classés dans le groupe bon pronostic et 125 dans le groupe mauvais pronostic en utilisant le score 5 gènes. Le score à 5 gènes permettait de prédire la survie et la récidive précoce chez ces patients (P=0.038 et P=0.02 respectivement, Figure 23). Enfin, nous sommes actuellement en train de valider la signature 5 gènes chez les patients avec CHC traités par radiofréquence percutanée et par transplantation hépatique dans des séries françaises.

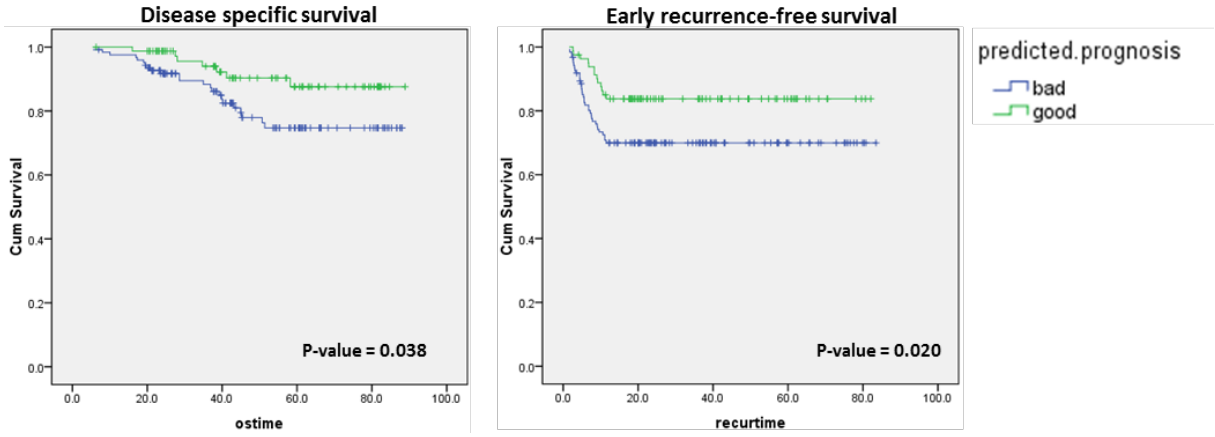


Figure 23: Survie liée au CHC et récidive précoce dans une cohorte de 205 CHC liés à l'hépatite B et traités par résection hépatique en Corée du Sud

La survie spécifique à la maladie (disease specific survival) et la survie sans récidive précoce (early recurrence free survival) sont représentées par une courbe de kaplan meier avec un test du log rank. (Collaboration Pr Sung-Min Ahn, Department of Oncology, Asan Medical Center)

C. Rôle des mutations du promoteur de *TERT* dans la transformation maligne sur foie sain et sur foie cirrhotique

1. Différents mécanismes de réactivation de la télomérase dans la carcinogénèse hépatique

La réactivation de la télomérase est un événement clé de la carcinogénèse humaine dont le but est d'éviter le raccourcissement télomérique et la senescence ou apoptose cellulaire. Environ 90% des CHC ont une réexpression de *TERT* et plusieurs mécanismes sont impliqués dans cette réactivation dont deux décrits dans des études effectuées au laboratoire (Cf article 6 et 12). De façon intéressante, ces mécanismes sont exclusifs entre eux suggérant clairement une redondance fonctionnelle

- **Mutations du promoteur de *TERT* dans les cancers solides**

En 2013, deux articles publiés dans Science ont décrit des mutations somatiques du promoteur de *TERT* dans 42% des mélanomes [203] [202]. Une de ces deux études a aussi rapporté la survenue de mélanomes sur plusieurs générations

dans une famille ayant une mutation germinale du promoteur de *TERT* [203]. Ces articles ont montré l'importance majeure des mutations du promoteur de *TERT* dans la réactivation de la télomérase. De plus, les auteurs ont démontré in *cellulo* que les mutations du promoteur de *TERT* augmentaient l'activité d'un rapporteur luciférase confirmant leur fonctionnalité. Les mutations dans le promoteur de *TERT* sont situées à deux hot-spots 124 paires de bases et 146 paires de bases avant l'ATG [252]. Ces mutations créent un site de consensus de liaison (TTCCGA) à un facteur de transcription ETS/TCF entrainant une augmentation de l'expression de *TERT* (Figure 24). Une étude a proposé que le facteur de transcription se liant au promoteur muté était le facteur de transcription A-binding protein (GABP) [253]. Comme *TERT* est le facteur limitant du complexe télomerase, la surexpression de *TERT* entraine une augmentation de l'activité télomérase et une synthèse des télomères. La surexpression de *TERT* dans les échantillons mutés a été confirmée dans certains types tumoraux comme les cancers urothéliaux même si l'existence d'autres mécanismes de réexpression de la télomérase dans certains cancers peut fausser ce type de comparaison [254 255].

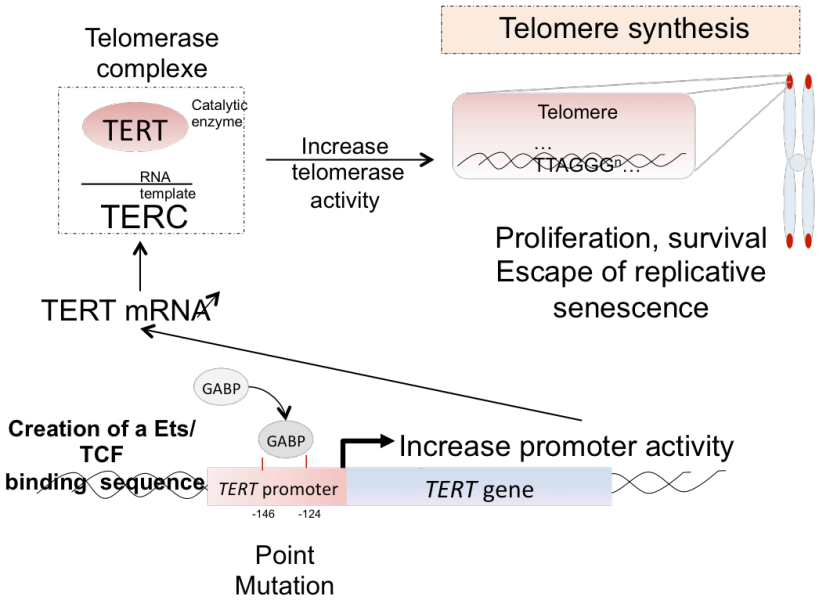


Figure 24: Mécanismes de réactivation de la télomérase par mutations dans le promoteur de *TERT*

La présence d'une mutation activatrice du promoteur de *TERT* crée un site consensus de fixation ETS/TCF qui va favoriser la fixation d'un facteur de transcription et active la transcription de *TERT* et de ce fait augmenter l'activité télomerase et la synthèse de télomères.

Des mutations somatiques du promoteur de *TERT* ont été identifiées dans plusieurs types tumoraux : glioblastome (69%), oligodendrogliome (68%), oligoastrocytome anaplasique (44%), liposarcome myxoide (76%), sarcome pléomorphe (76%), fibroxanthome atypique (93%), cancer de la vessie (66%), cancer thyroidien anaplasique (42%), carcinome épidermoïde cutanée (59%), carcinome basocellulaire (41%), mésotheliome (15%)[256 255 257 258 259 260].

- **Mutations somatiques du promoteur de *TERT* dans les CHC**

Dans nos travaux récents, nous avons identifié les mutations somatiques mono-alléliques du promoteur de *TERT* dans 60% des CHC et de ce fait, comme les altérations génétiques les plus fréquentes dans ce type de tumeurs [77]. Nous avons montré que ces mutations survenaient dans 95% des cas au niveau de la position -124 et dans 5% des cas dans la position -146. Une augmentation d'expression de *TERT* par rapport aux foies normaux et cirrhotiques était observée dans les CHC mutés mais sans différence significative par rapport aux CHC non mutés du fait de l'existence d'autres mécanismes de réactivation de la télomérase. Les mutations dans le promoteur de *TERT* étaient moins fréquentes dans les CHC liés au VHB probablement du fait de l'insertion du VHB dans *TERT* comme mécanisme alternatif de réactivation de la télomérase. A l'inverse, les mutations du promoteur de *TERT* étaient associées aux mutations β-caténine suggérant une coopération entre ces deux voies oncogéniques. Ces résultats ont été confirmés par d'autres équipes qui ont rapportés des taux de mutations entre 29 et 31% pour les CHC liés au VHB et 44 à 59% pour les CHC non liés au VHB[62 261 262]

- **Insertion du virus de l'hépatite B dans *TERT***

Le VHB est un virus à ADN pouvant rester dans le noyau sous forme d'ADNccc mais aussi s'intégrer dans le génome humain [109]. Le groupe de Christian Brechot a montré que le VHB pouvait entrainer un phénomène de mutagénèse insertionnelle dans les CHC [122 263]. Des insertions clonales somatiques d'VHB ont été décrites dans des gènes comme *TERT*, *MLL4* et *CCNE1* [96]. Dans *TERT*, le VHB s'insère le plus souvent dans le promoteur et entraine une surexpression de l'ARNm [96]. Les

insertions du VHB sont décrites dans 10 à 20% des CHC liés au VHB et sont exclusives des mutations dans le promoteur de *TERT* [264].

- **Amplification de *TERT***

Nous avons identifié dans 5% des CHC une amplification de *TERT* associée à une surexpression du transcrit et ceci a été confirmé par une équipe japonaise dans des pourcentages identiques [61 264]. Les amplifications de *TERT* sont exclusives des mutations dans le promoteur et de l'insertion d'VHB. Les mutations dans le promoteur de *TERT*, les amplifications de *TERT* et l'insertion du VHB expliquent plus de 2/3 des CHC ayant une surexpression de *TERT*. Néanmoins, des mécanismes de réexpression de la télomérase restent à identifier dans les cas restants. De plus dans 5 à 10% des CHC, aucune expression de *TERT* n'est mise en évidence suggérant que des mécanismes alternatifs d'élongation des télomères pourraient exister même si cela reste à démontrer [265].

2. Mécanismes de transformation maligne sur foie sain et cirrhotique

Jusqu'à récemment aucune altération génétique somatique récurrente n'avait été décrite dans les lésions prénéoplasiques développées sur cirrhose[24]. Nous avons identifié des mutations du promoteur de *TERT* dans 6% des nodules dysplasiques de bas grade, 19% des nodules dysplasiques de haut grade, 61% des CHC précoces et 41% des CHC avancés <2cm [266]. Cela suggère clairement que les mutations du promoteur de *TERT* sont impliquées dans l'initiation tumorale et la transformation maligne.

De plus, par séquençage classique de type Sanger de 10 gènes mutés de façon récurrente dans les CHC avancés et par une approche de séquençage haut débit de type exome, nous n'avons pas identifié de mutations récurrentes dans les gènes tels *TP53*, *CTNNB1*, *ARID1A*, *ARID2*, *RP6SKA3* dans les lésions prénéoplasiques et les CHC précoces [266 61]. Le nombre de mutations et le nombre de pertes et de gains de chromosomes augmentaient progressivement lors du phénomène de transformation maligne et de progression tumorale [61]. Dans les CHC

avancés de taille inférieur à 2 cm, des mutations dans ces gènes « drivers » étaient retrouvées soulignant leurs rôles dans la progression tumorale. De plus, les amplifications *FGF19* et les mutations *RB1* étaient associées à des CHC avancés de plus mauvais pronostic [61 89].

Sur foie sain, une partie des CHC dérivent de la transformation maligne d'AHC [170]. Une précédente étude menée dans notre laboratoire avait montré que les AHC ayant une mutation activatrice de la β-caténine avaient un risque plus élevé de transformation en CHC [161]. Nous n'avons trouvé aucune mutation du promoteur de *TERT* dans 250 AHC « classiques » et ces résultats ont été confirmés par une équipe indépendante [261]. En revanche, nous avons trouvé une mutation du promoteur de *TERT* dans 17% des AHC de diagnostic difficile avec un CHC (« forme frontière ») et 56% des AHC transformés en CHC [195 141]. L'analyse de la partie adénome et carcinome dans 5 cas a montré que les mutations *CTNNB1* étaient présentes dans la partie adénome et carcinome suggérant une apparition précoce de cette mutation [195].

A l'inverse, les mutations dans le promoteur de *TERT* n'étaient identifiées que dans la partie carcinomateuse suggérant que ces mutations étaient tardives et nécessaires pour entrainer une transformation maligne complète. De plus, le nombre d'altérations génétiques était plus important dans la partie carcinome comparée à la partie adénome suggérant un processus d'accumulation de mutations « passengers » lors de la transformation maligne. Nous avons aussi montré que les mutations dans le promoteur de *TERT* étaient impliquées dans la progression tumorale des méningiomes en forme histologique de plus haut grade suggérant encore le rôle de ces mutations dans la transformation maligne [267].

Au total, si les mutations dans le promoteur de *TERT* paraissent impliquées dans la transformation maligne sur foie sain et cirrhotique, l'ordre d'acquisition de ces altérations est différent avec une acquisition précoce sur cirrhose et tardive sur foie sain (Figure 25). Dans la cirrhose, la nécessité de réactiver très précocement la télomérase pour promouvoir la prolifération et la transformation des hépatocytes cirrhotiques qui sont sénescents et avec des télomères courts pourrait être une des explications de ces observations. A l'inverse sur foie sain, le potentiel prolifératif ou de survie des hépatocytes est plus important, l'activation de la voie Wnt/β-caténine

seule peut promouvoir la prolifération bénigne tandis que la réactivation télomérase est nécessaire au stade tardif de transformation en CHC [268].

Figure 25: mécanismes de transformation maligne sur foie sain et cirrhotique (Zucman Rossi J, et al. 2015 [45])

3. Thérapie ciblée anti télomérase

La présence d'une réactivation de la télomérase dans environ 90% des CHC et son implication dans la transformation maligne en font une cible idéale pour des thérapies ciblées. Plusieurs thérapies dirigées contre la télomérase, incluant des inhibiteurs de la télomérase, des oligonucléotides anti-sense, des vaccins anti télomérases, ont été utilisées dans des phases pré-cliniques et dans des essais cliniques mais jusqu'à présent aucun des ces traitements n'a montré d'efficacité anti tumorale [269]. De plus, une immunothérapie basée sur un vaccin anti télomérase associé à du cyclophosphamide avait été testée dans les CHC avancés mais n'a pas montrée d'efficacité [270].

Néanmoins, de nouveaux inhibiteurs de télomérase sont actuellement en développement et leurs efficacités et profils de toxicité doivent être testés dans les CHC et stratifiés en fonction de la présence de mutations dans le promoteur de *TERT*.

D. Mécanismes d'action d'AAV2 comme virus oncogénique dans la carcinogénèse hépatique

1. Généralités et structure d'AAV2

AAV2 a été identifié en 1965 comme un contaminant de cultures cellulaires infectées par un adénovirus [271]. Les virus AAV ont été classés comme appartenant à la branche des parvoviridae de sous type Dependovirus et sont constitués de 10 sérotypes différents (AAV1 à AAV10) infectant l'être humain, des sérotypes 11, 12 et 13 ayant été décrit seulement dans des publications uniques [272] . AAV2 est un virus de petite taille (environ 22nm) ayant une capsule non enveloppée [273]. C'est un virus à ADN considéré comme défectif nécessitant une infection par un virus de la famille adenovirus ou un herpes simplex virus pour se répliquer. AAV2 est transmis par voie respiratoire et considéré comme non pathogénique chez l'homme et de ce fait 40 à 70% de la population générale possède une sérologie AAV2 positive [274 275]. AAV2 est un virus à ADN monobrin de 4779 paires de bases avec deux gènes *REP* et *CAP* (Figure 26).

Figure 26: Structure du génome d'AAV2 (Kotterman M, et al. 2014) [276]

En bleu, le gène *REP* a deux promoteurs P5 et P19 associés à un phénomène de d'épissage alternatif qui codent 4 protéines de tailles différentes Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40. En orange, le gène *CAP* utilise un seul promoteur « P40 » pour coder 3 protéines structurales VP1, VP2 et VP3. Deux inverse tandem repeats (ITR) se situent aux extrémités 5' et 3.

Le gène *REP* utilise deux promoteurs P5 et P19 associés à un splice alternatif pour coder 4 protéines de tailles différentes Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40 [272]. Ces protéines ont une activité ATPase, hélicase et endonucléase mais n'ont pas d'activité polymérase car c'est l'activité polymérase de la cellule humaine qui sera utilisée lors de la réplication. De plus, les protéines rep78 et rep68 sont impliquées dans la réplication virale en se liant aux extrémités du virus [273]. Les protéines Rep52 et Rep40 sont impliquées lors de la réplication dans le passage de la forme ADN double brin intermédiaire à la forme simple brin finale [277].

Le gène *CAP* utilise un seul promoteur « P40 » et code pour des protéines structurales. Un épissage alternatif permet de produire trois protéines de taille différentes VP1, VP2 et VP3 de 87, 72 et 62 kilo daltons respectivement qui s'assemblent ensemble pour former la capside du virus. De plus, VP1 aurait une activité lipoproteine lipase utilisée par le virus pour infecter les cellules [273].

Enfin les extrémités 5' et 3' du virus dit en inverse tandem repeat (ITR) sont constituées de 145 nucléotides avec des séquences palindromiques qui forment une boucle (hairpin) en forme de T (Figure 27). L'ITR est constitué de deux palindromes (B et B' et C et C') qui forme la boucle en T puis d'un palindrome A et A' où se situe le rep binding element (RBE) où se lie les protéines rep68 et 78 pour initier la réplication et où se situe le terminal resolution site (trs) coupé par l'activité endonucléase des protéine rep68 et 78. Enfin en 5' se situe une séquence non palindromique monobrin appelé « D ». L'ITR peut avoir deux configurations en flip et flop en fonction de la localisation des palindrome B et B' et C et C' par rapport à l'extrémité 3' [272]. Lors de la réplication du virus, l'ordre des palindromes s'inverse et passe de flip à flop ou vice versa.

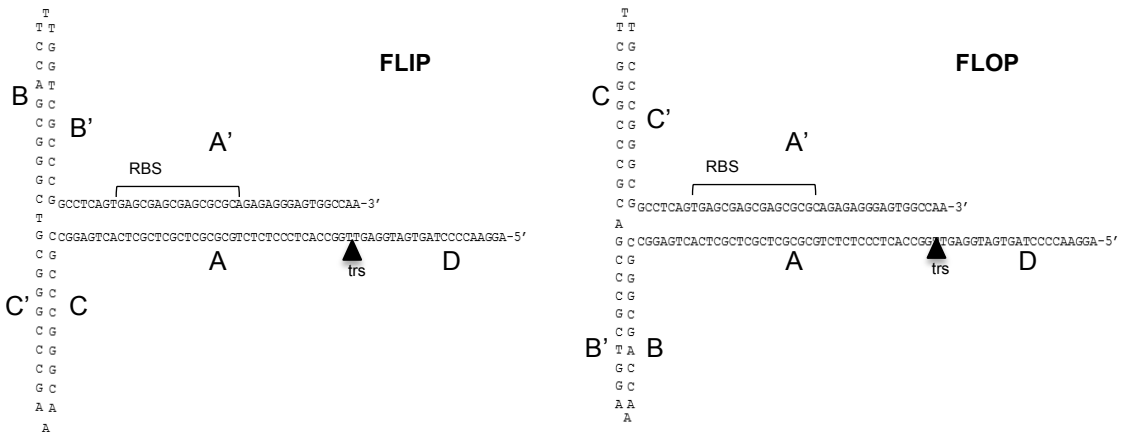


Figure 27: Conformation en flip et en flop des ITR d'AAV2 (modifié d'après Nault JC, Datta S, Imbeaud S, et al. 2015)

L'ITR peut exister en deux configurations (flip et flop) en fonction de la localisation des palindrome B et B' et C et C' par rapport à l'extrémité 3'

2. Réplication et cycle cellulaire d'AAV2

Les particules d'AAV2 se lient à des récepteurs de surface de type protéoglycanes héparanes sulfates et utilisent des corécepteurs de type intégrine, FGFR1 et cMET pour pénétrer dans la cellule [272]. Le virus serait transporté vers le noyau via un mécanisme d'internalisation dépendant des clathrines. Par la suite, AAV2 s'intégrerait dans le génome humain préférentiellement au niveau d'un locus appelé *AAVS1* situé sur le bras long du chromosome 19 (19q13.3) et resterait quiescent en l'absence d'infection par un virus auxiliaire (dit « helper ») [278] [279] [280]. L'intégration virale dans ce locus serait dépendante des régions ITR du virus associées à l'action des protéines rep78 et rep68 guidées par la présence au niveau du locus du chromosome 19 d'un site de liaison à la protein rep (Rep Binding site) associé à une séquence de trs qui serait la cible de l'activité endonucléase des protéines rep permettant ensuite l'intégration du génome viral [277] [273]. Un mécanisme de recombinaison non homologue a été suggéré du fait de la présence de microhomologies au niveau des jonctions virus-ADN humain et de délétion ou d'insertion de quelques paires de bases du génome humain au niveau de la zone d'insertion virale [281]. Certaines études ont montré la persistance du virus sous une forme épisomale même si celui ci paraît être plus fréquent dans les formes recombinantes d'AAV utilisées comme vecteur pour thérapie génique [282].

Quand un virus auxiliaire de type adenovirus ou herpes simplex virus surinfecte la cellule, ce virus entraine la transcription des gènes d'AAV2 et par conséquence le programme de réplication et d'assemblage de AAV2 s'enclenche [283]. La liaison d'une protéine REP au niveau du rep binding element (REB) de l'ITR entraine la coupure de l'ADN au niveau du site trs puis une polymérase va répliquer le mono brin d'ADN en double brin d'ADN jusqu'à l'ITR de l'autre extrémité où la coupure de l'ADN au niveau du site trs va pouvoir faire séparer les deux monobrins de virus [283]. Par la suite la capside virale composée des protéines virales VP1, 2 et 3 va séquestrer le virus néoformé qui sera libéré lors de la lyse cellulaire induite par le virus helper. Le virus AAV2 ainsi libéré pourra infecter de nouvelles cellules.

3. AAV2 comme vecteur de thérapie génique

L'efficacité certaine en terme de transfection, son caractère défectif et l'absence de maladies associées ont fait de la famille AAV des vecteurs idéaux utilisés pour la thérapie génique [276]. Des AAV recombinants ont été utilisés pour transduire des gènes modifiés dans le génome de cellules humaines, dans des modèles murins et enfin chez l'homme [284]. Dans l'AAV recombinant, les protéines cap et rep sont remplacées par le gène d'intérêt. Les protéines cap et rep sont introduites ensuite séparément associées à des éléments du virus auxiliaire pour entrainer la production d'AAV recombinant (Figure 28) [276] [285]. Ces AAV recombinants peuvent transduire des cellules n'étant pas en division cellulaire et la présence de l'ITR viral est suffisante pour permettre une transduction et une insertion dans le génome humain [273] [285]. De plus, il a été montré qu'après transduction, l'AAV recombinant persistait à la fois sous une forme épisomale mais aussi intégré dans l'ADN humain par un mécanisme de recombinaison non homologue indépendant de la protéine rep [286].

De façon intéressante, l'intégration virale dans des lignées cellulaires cancéreuses dans le hot spot *AAVS1* sur le chromosome 19 traditionnellement décrit dans l'infection par le virus sauvage n'a pas été identifiée dans une étude chez l'homme portant sur les zones d'insertion de l'AAV recombinant probablement du fait de l'absence de co-transfection avec la protéine rep [287]. Ces constations suggèrent la possibilité d'insertion au hasard dans le génome humain augmentant la possibilité d'un effet oncogénique par mutagénèse insertionnelle. L'AAV recombinant aurait tendance à s'intégrer dans des chromosomes subissant des réarrangements qui serait facilité par la présence de lésions de l'ADN [288]. De plus, les zones transcrites du génome ayant une chromatine ouverte faciliteraient aussi l'intégration virale comme démontrée dans des modèles murins ou in *cellulo* [289] [290] [291]. Différents essais cliniques chez l'humain publiés ou en cours de publication, ont montré la possibilité d'utiliser des vecteurs AAV pour la thérapie génique que ce soit dans l'hémophilie B, la maladie de parkinson, l'amaurose congénitale de Lebert, la dystrophie musculaire de Duchenne, le déficit en alpha 1 antitrypsine, le déficit en lipoproteine lipase [292] [293] [294]. Ces différents essais thérapeutiques ont montré une efficacité clinique dans certains cas, associée à une innocuité au moins à moyen terme, en particulier vis à vis du risque d'induire des cancers par mutagénèse insertionnelle.

Figure 28: AAV recombinant utilisé en thérapie génique (Vasileva A, et al. 2005 [285])

Les protéines cap et rep sont remplacées par le gène d'intérêt et introduites séparément, associées à des éléments du virus auxiliaire pour produire de l'AAV recombinant.

4. Virus et cancer : généralités

« Another difficulty to understanding viruses in human cancer has been the slow realization that virus infection alone is never sufficient for tumorigenesis, an unsurprising fact that is also true for non- neoplastic viral diseases »
Patrick S. Moore and Yuan Chang Nature Review Cancer 2010 [295]

A ce jour, 7 virus ont été identifiés comme associés à la survenue de cancers solides ou d'hémopathies chez l'homme : l'hépatite B et C et le CHC, HTLV1 et la leucémie aigue T, EBV et le lymphome de Burkitt ou le carcinome nasopharyngé ou les syndromes lymphoprolifératifs, le human papilloma virus (HPV) et les cancers du col de l'utérus ou ORL, human herpes virus de type 8 (HHV8) et le sarcome de kaposi ou la maladie de castelman multicentrique ou le lymphome primitif des séreuses et le polyomavirus de merkel et le carcinome à cellules de merkel (Table 3) [295]. Différents mécanismes directs et indirects ont été impliqués dans la carcinogénèse d'origine virale [296]. L'inflammation chronique induite par la réponse immunitaire dirigée contre les protéines virales favorise le développement du cancer du col de l'utérus chez les patientes infectées par le HPV ou le CHC chez les patients infectés par le VHB et VHC [296] [218]. De plus, l'inflammation chronique induite par le VHB et VHC peut induire une cirrhose, un terrain pro carcinogénèse.

En plus de ces mécanismes indirects, des mécanismes directs par l'action oncogénique virale ont été décrits. Dans le cas du HPV, la protéine HPV E7 a la capacité d'inactiver RB1, un gène suppresseur de tumeur et la protéine HPV E6

d'inactiver P53 [297] [298]. Dans le cas du virus EBV, les protéines Espstein—Barr virus nuclear antigens (EBNAs) et latent membrane proteins (LMPs) modulent le cycle cellulaire, activent la voie NFKB et ont une activité anti apoptotique [299]. Le virus HHV8 causant le sarcome de Kaposi code pour de multiples oncogènes vGPCR, vIL-6, vBcl2, vMIPs, vCyclin LANA ayant une activité proprolifératifs et proangiogéniques [295]. De plus, la mutagénèse insertionnelle est un des mécanismes clés de carcinogénèse directe des virus à ADN. Ce phénomène a été mis en évidence dans le VHB, le polyomavirus de Merkel et le HPV [300] [301] [96]. Ces événements de mutagénèse insertionnelle touchent des gènes impliqués dans la carcinogénèse comme *TERT* ou *CCNE1* dans le cas d'VHB [96].

Table 3: Caractéristiques des virus oncogéniques chez l'homme

	Famille	Génome	Cancer	Mécanismes	Oncogènes viraux	Références
Epstain Barr Virus (EBV)	Herpesviridae	ADN double brin	Lymphome de Burkitt, carcinome nasopharyngée, syndrome lymphoprolifératif	Oncogènes viraux	LMP-1	Epstein MA, et al. Lancet 1965 [302]
Human Papilloma Virus (HPV)	Papiloma viridae	ADN double brin	Cancer du col de l'utérus, cancer de l'oropharynx	Inflammation chronique, oncogènes viraux, mutagénèse insertionnelle	E6, E7	Durst M, et al. PNAS 1983 [303]
Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV1)	Retroviridae	ARN mono brin	Leucémie aigue T	Oncogènes viraux	Tax	Poiisz BJ, et al PNAS 1980 [304]
Kaposi's sarcoma-associated herpes virus (KSHV=HHV8)	Herpes viridae	ADN double brin	Sarcome de Kaposi, maladie de castelman multicentrique, lymphome primitif des séreuses	Oncogènes viraux	vGPCR, vIL-6, vBcl2, vMIPs, vFlip, vCyclin, LANA	Chang Y, et al Science 1994 [305]
Merkel cell polyomavirus	Polyomavirus	ADN double brin	Carcinome cutané de Merkel	Oncogènes viraux, mutagénèse insertionnelle	large T antigen muté	Feng H, et al. Science 2008 [301]
Hepatitis B virus (HBV)	Hepadnaviridae	ADN mono et double brin	CHC	Inflammation chronique, oncogènes viraux, mutagénèse insertionnelle	Hbx	Blumberg BS, et al. JAMA 1965 [306]
Hepatitis C virus (HCV)	Flaviviridae	ARN monobrin	CHC, lymphome	Inflammation chronique	NA	Choo QL, et al. Science 1989 [307]
Adeno-associated virus type 2 (AAV2)	parvoviridae	ADN monobrin	CHC	Mutagénèse insertionnelle	NA	Atchison, R.W, et al. Science 1965 [271]

5. Rôle oncogénique et mécanismes d'action potentiel d'AAV2 dans la carcinogénèse humaine

L'identification du rôle oncogénique d'AAV2 dans la carcinogénèse sur foie sain en fait donc le 8ème virus associé à la survenue de cancer chez l'homme. Le premier paradoxe est la différence observée entre la rareté des CHC induits par AAV2 et la fréquence de l'infection d'AAV2 dans la population générale. En effet, 40 à 60% de la population a une sérologie AAV2 positive suggérant qu'une infime fraction des personnes infectées développeront un CHC [275]. Ceci ressemble à ce qui est observé avec l'EBV qui est une infection fréquente dans la population générale mais qui donne très rarement des lymphomes de Burkitt ou des carcinomes nasopharyngées suggèrant que des facteurs génétiques, immuns ou environnementaux sont nécessaires en plus de l'infection virale [295]. Le même paradoxe est observé entre l'infection fréquente par polyomavirus de merkel et la rareté du carcinome cutané de merkel [301]. Nous avons identifiés des variations nucléotidiques au niveau des AAV2 intégrés clonalement dans les tumeurs. Il reste pour l'instant à déterminer si ces variations définissent un sous type d'AAV2 plus à risque de mutagénèse insertionnelle ou si cela constitue des variations fréquemment observées dans l'infection par AAV2 en population générale.

Le principal mécanisme reliant l'infection par AAV2 et la survenue de CHC est la mutagénèse insertionnelle. Nous avons identifié des insertions clonales dans des gènes impliqués dans la carcinogénèse comme *TERT*, *KMT2B* (aussi appelé

MLL4), *CCNE1*, *CCNA2* et *TNFSF10*. Ces insertions n'étaient pas observées dans le tissu non tumoral adjacent suggérant un processus de sélection clonale. De manière intéressante, ces insertions virales survenaient dans des régions non codantes (intron, promoteur, 3'UTR) comme ce qui est observé dans la majorité des cas dans les autres virus induisant de la mutagénèse insertionnelle comme HPV, VHB et le polyomavirus de Merkel [301 308 300].

Les insertions clonales d'AAV2 surviennent dans des gènes importants dans la carcinogénèse hépatique : *TERT* codant pour la télomerase reverse transcriptase et qui peut être modifié par des mutations dans son promoteur ou par amplification, *CCNE1* et *CCNA2* qui codent pour la cyclin E et A, deux protéines importantes dans la progression du cycle cellulaire de G1 à G2 pour cyclin E et G2 à S pour cyclin A [309]. Un autre gène modifié par insertion virale est *KMT2B* (*MLL4*) qui est une histone methyltransferase appartenant à la famille de gènes *MLL* qui sont fréquemment mutés dans les CHC [64]. Enfin, *TNFSF10* code pour le ligand TRAIL dont l'activation de la voie de signalisation peut avoir des propriétés pro apoptotiques mais peut aussi activer des voies impliquées dans la prolifération cellulaire comme la voie AKT/Mtor ou la voie des MAP kinase [310].

De façon intéressante, *TERT*, *CCNE1*, *CCNA2* et *KMT2B* ont été décrits comme des cibles d'insertion récurrente par VHB [96 308]. De même, les zones d'insertion d'AAV2 dans ces gènes sont de façon marquante très proches des zones cibles d'insertions par le VHB: le promoteur pour *TERT*, l'exon et l'intron 3 dans *KMT2B* et le début du gène pour *CCNE1* (Figure 29) [96 308].

Figure 29: Comparaison des sites d'insertion virales d'HBV et AAV2 (Nault Jc, Datta S, Imbeaud S, et al. 2015, Cf Article 19)

En jaune et orange sont représentés les sites d'intégration du virus de l'hépatite B dans les CHC et en bleu, les sites d'intégration du virus AAV2

De façon intéressante, tous les gènes avec une insertion clonale d'AAV2 étaient surexprimées comparés aux foies non tumoraux adjacents ou à des foies sains suggérant que l'insertion d'AAV2 pourraient être responsable de cette surexpression. Nous avons montré dans des modèles *in cellulo* que l'insertion d'AAV2 dans le promoteur de *TERT* ou dans le 3'UTR de *TNFSF10* entrainait une activation du rapporteur luciferase sous le contrôle du promoteur et du 5'UTR respectivement alors que la séquence virale modifiée n'avait aucun effet suggérant un effet fonctionnel du virus. Les mécanismes expliquant cette surexpression restent néanmoins à explorer.

L'analyse des transcripts par séquençage de nouvelle génération (« RNAseq ») de plusieurs cas nous a permis de mettre en évidence une interaction entre le virus et l'ARNm des gènes insérés. Dans les deux cas avec une insertion dans le 3'UTR de *TNFSF10*, les transcrits utilisaient non plus le polyA humain mais le polyA viral pour terminer sa transcription. Une augmentation de la stabilité de l'ARNm par utilisation du polyA viral pourrait être une des explications de la surexpression de *TNFSF10* dans ces 2 cas. Dans les 3 CHC avec une insertion virale d'AAV2 dans *CCNA2*, le séquençage haut débit a montré une surexpression de transcrit mature, associé dans 2 cas sur 3 à une augmentation de transcrits immatures dont la terminaison précoce de la transcription est due à l'utilisation du polyA virale. Dans 1 des cas, une modification nucléotidique au niveau viral entraine la création d'un nouveau polyA entrainant la fin précoce de la transcription de certains transcrits. Cela démontre que le virus AAV2 a un effet direct sur la transcription au niveau de l'allèle inséré. Des mécanismes activateurs (dit « enhancers ») entrainant la surexpression de transcrits matures et immatures pourraient être évoqué même si des travaux supplémentaires seront requis pour démontrer cela. Enfin l'analyse des CHC avec de l'AAV2 inséré dans *CCNE1* a monté une augmentation de l'expression des transcrits matures sans la présence de transcrits immatures.

Dans 10 des 11 CHC, la zone insérée d'AAV2 contenait le 3'ITR et la zone minimale insérée contient 181 pb à cheval au niveau du début du 3'ITR. Cette zone

minimale contient la jonction A/D du 3'ITR. Baudard et al ont montré que l'ITR avait une activité promotrice potentielle dans des modèles in cellulo [311]. Haberman et al ont identifié une région de 37 nucléotides ayant une activité de contrôle de la transcription au niveau du 3'ITR au niveau la jonction A/D [312]. Cette région est inclue dans la zone minimale insérée de AAV2 dans les CHC et pourrait être impliqué dans la régulation de l'expression des gènes auprès desquels le virus est intégré.

Des modèles murins avaient précédemment apporté des arguments en faveur du potentiel oncogénique d'AAV en particulier lors de son utilisation comme vecteur pour les thérapies géniques. Un premier article publié par Donsante et al a démontré une incidence élevée de CHC chez des souris male C57Bl/6 traités par de AAV recombinant comparé à des vecteurs contrôles [313]. Néanmoins, Li et al ont publié une étude montrant l'absence d'augmentation de l'incidence de CHC chez des souris C57BL/6 traité par AAV recombinant dans le cadre d'une thérapie génique pour l'hémophilie B, cette différence pouvant peut être expliquée par le timing différent de l'injection de l'AAV recombinant dans les deux études (foie néonatal versus foie adulte) [314]. Une étude publiée dans Science en 2007 par Donsante A et al a démontré que le développement de CHC dans ces modèles murins était induit par un mécanisme de mutagénèse insertionnelle du 5'ITR de l'AAV recombinant dans le locus Dlk1–Dio3 du chromosome 12 [315]. Ce locus contient entre autres, des microARN et small nucleolar RNA dont certains sont surexprimés comme Rian et Mirg. Ces observations ont été confirmées par deux autres équipes indépendantes utilisant des modèles murins différents [316] [317]. Des différences notables existent entre les mécanismes de mutagénèse insertionnelle chez l'homme et la souris avec une prédominance d'insertion du 5'ITR chez la souris et du 3'ITR chez l'homme et l'absence d'insertion clonale d'AAV2 chez l'homme dans le locus du chromosome 14, l'équivalent du chromosome 12 murin [316] [315].

Une vigilance accrue envers le risque de carcinogénèse hépatique paraît nécessaire dans les essais de thérapie génique utilisant des vecteurs AAV chez l'homme. Néanmoins, en dehors de la thérapie génique, le risque de développer des CHC paraît faible en comparaison de la fréquence de l'infection dans la

population générale. Au final, la survenue de CHC par un mécanisme de mutagénèse insertionnelle chez les souris traitées par de l'AAV recombinant et de CHC sur foie sain chez l'homme du à la présence d'insertions clonales dans des gènes clés de la carcinogénèse comme *TERT*, *CNNA2*, *CCNE1, KMT2B/MLL4* et *TNFSF10* souligne le rôle oncogénique potentiel d'AAV2.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'ensemble de ces travaux nous a permis d'identifier de nouveaux mécanismes impliqués dans la tumorigénèse hépatocellulaire bénigne et maligne. Nous avons trouvé des mutations activatrices somatiques du gène *GNAS* dans les AHC inflammatoires, se rajoutant aux mutations *IL6ST*, *JAK1*, *FRK* et *STAT3* dans la liste des oncogènes responsables du phénotype inflammatoire de ces tumeurs. L'identification de ces gènes a permis de proposer l'utilisation de thérapies ciblées adaptées aux altérations génétiques qui pourrait être testées dans le futur dans certaines situations cliniques. Nous sommes actuellement en train d'étendre l'analyse génotype/phénotype à une série de 550 AHC afin d'identifier de nouveaux facteurs de risque de survenue d'AHC, d'hémorragie tumorale et de transformation maligne et de caractériser l'hétérogénéité intertumorale dans les formes multiples d'AHC.

Nous avons aussi mis en évidence une signature pronostique moléculaire à 5 gènes permettant de prédire la récidive tumorale et la survie globale après résection hépatique pour CHC. Cette signature pronostique moléculaire a été validée dans plus de 900 CHC à travers le monde traités par résection dont récemment dans une cohorte de patients coréens traités par résection pour CHC

liés au VHB. Une validation du score 5-gènes est en cours dans une série de patients traités par radiofréquence percutanée et par transplantation hépatique afin de confirmer la capacité du score 5-gènes à prédire le pronostic dans tous les types de traitements curatifs.

Nous avons identifié les mutations somatiques du promoteur de *TERT* comme la principale cause de réactivation de la télomérase et la plus fréquente altération génétique des CHC. De plus, les mutations du promoteur de *TERT* sont aussi présentes dans des lésions prénéoplasiques sur cirrhose suggérant leur rôle dans l'initiation tumorale et la transformation maligne. Les mutations du promoteur de *TERT* étaient impliquées en association avec les mutations activatrices de la β-caténine dans la transformation maligne des AHC en CHC. Clairement, le rôle clé dans les mutations du promoteur de *TERT* dans la carcinogénèse hépatique en font un biomarqueurs du risque de transformation maligne qui pourrait être utilisé en pratique clinique et qui pourrait être une cible pour de futur essais de thérapies anti télomérase.

Enfin, nous avons mise en évidence le potentiel oncogénique du virus AAV2 et son implication dans la carcinogénèse sur foie sain par un mécanisme de mutagénèse insertionnelle. Cette découverte pose de nombreuses questions sur les mécanismes de carcinogénèse induits par l'insertion virale d'un fragment d'AAV2 dans le génome humain. De plus, les causes pouvant expliquer la différence observée entre la fréquence importante de l'infection par AAV2 dans la population générale et le nombre faible de cas de CHC liés à AAV2 restent à explorer. L'impact potentiel des AAV recombinants utilisés en thérapie génique doit être aussi évaluer à long terme et contrebalancer par rapport aux maladies graves auxquels ses thérapies géniques s'adressent. Une extension de cette étude est en cours au laboratoire pour augmenter le nombre de CHC analysés afin d'identifier de nouveaux cas et évaluer le rôle éventuel d'AAV2 dans d'autres tumeurs hépatiques.

Références

1. El-Serag, H.B. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **365**, 1118-27 (2011).
2. Razumilava, N. & Gores, G.J. Cholangiocarcinoma. *Lancet* **383**, 2168-79 (2014).
3. Bioulac-Sage, P., Laumonier, H., Laurent, C., Blanc, J.F. & Balabaud, C. Benign and malignant vascular tumors of the liver in adults. *Semin Liver Dis* **28**, 302-14 (2008).
4. El-Serag, H.B. & Rudolph, K.L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* **132**, 2557-76 (2007).
5. Forner, A., Llovet, J.M. & Bruix, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* **379**, 1245-55 (2012).
6. El-Serag, H.B. & Mason, A.C. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* **340**, 745-50 (1999).
7. Borie, F. *et al.* Primitive liver cancers: epidemiology and geographical study in France. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **21**, 984-9 (2009).
8. Grando-Lemaire, V., Guettier, C., Chevret, S., Beaugrand, M. & Trinchet, J.C. Hepatocellular carcinoma without cirrhosis in the West: epidemiological factors and histopathology of the non-tumorous liver. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hepatocellulaire. *J Hepatol* **31**, 508-13 (1999).
9. Trinchet, J.C. *et al.* Complications and competing risks of death in compensated viral cirrhosis (ANRS CO12 CirVir prospective cohort). *Hepatology* (2015).
10. Ganne-Carrie, N. *et al.* Predictive score for the development of hepatocellular carcinoma and additional value of liver large cell dysplasia in Western patients with cirrhosis. *Hepatology* **23**, 1112-8 (1996).

11. Nault, J.C. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma according to aetiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **28**, 937-47 (2014).
12. Degos, F. *et al.* Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut* **47**, 131-6 (2000).
13. Ascha, M.S. *et al.* The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **51**, 1972-8 (2010).
14. Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. & Thun, M.J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* **348**, 1625-38 (2003).
15. Emerging Risk Factors, C. *et al.* Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N Engl J Med* **364**, 829-41 (2011).
16. Paradis, V. *et al.* Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology* **49**, 851-9 (2009).
17. Hsia, C.C. *et al.* Mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma: roles of hepatitis B virus and aflatoxin contamination in the diet. *J Natl Cancer Inst* **84**, 1638-41 (1992).
18. Trinchet, J.C. *et al.* Ultrasonographic surveillance of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a randomized trial comparing 3- and 6-month periodicities. *Hepatology* **54**, 1987-97 (2011).
19. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **56**, 908-43 (2012).
20. Bruix, J. & Sherman, M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* **53**, 1020-2 (2011).
21. Forner, A. *et al.* Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **47**, 97-104 (2008).
22. Bruix, J. *et al.* Clinical decision making and research in hepatocellular carcinoma. Pivotal role of imaging techniques. *Hepatology* (2011).
23. Torbenson, M. & Schirmacher, P. Liver cancer biopsy--back to the future?! *Hepatology* **61**, 431-3 (2015).
24. Di Tommaso, L. *et al.* Advanced precancerous lesions in the liver. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **27**, 269-84 (2013).
25. Di Tommaso, L. *et al.* Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. *Hepatology* **45**, 725-34 (2007).
26. Di Tommaso, L. *et al.* The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **50**, 746-54 (2009).
27. Di Tommaso, L. *et al.* Diagnostic accuracy of clathrin heavy chain staining in a marker panel for the diagnosis of small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **53**, 1549-57 (2011).
28. Cai, M.Y. *et al.* EZH2 protein: a promising immunomarker for the detection of hepatocellular carcinomas in liver needle biopsies. *Gut* **60**, 967-76 (2011).
29. Pittman, M.E. & Brunt, E.M. Anatomic pathology of hepatocellular carcinoma: histopathology using classic and new diagnostic tools. *Clin Liver Dis* **19**, 239-59 (2015).
30. Paradis, V. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *Recent Results Cancer Res* **190**, 21-32 (2013).

31. Terminology of nodular hepatocellular lesions. International Working Party. *Hepatology* **22**, 983-93 (1995).
32. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* **49**, 658-64 (2009).
33. Llovet, J.M., Bru, C. & Bruix, J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* **19**, 329-38 (1999).
34. Chevret, S. *et al.* A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hepatocellulaire. *J Hepatol* **31**, 133-41 (1999).
35. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* **28**, 751-5 (1998).
36. Yau, T. *et al.* Development of Hong Kong Liver Cancer staging system with treatment stratification for patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **146**, 1691-700 e3 (2014).
37. Llovet, J.M., Fuster, J. & Bruix, J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology* **30**, 1434-40 (1999).
38. Kluger, M.D. *et al.* Liver resection for hepatocellular carcinoma in 313 Western patients: tumor biology and underlying liver rather than tumor size drive prognosis. *J Hepatol* **62**, 1131-40 (2015).
39. Villanueva, A. *et al.* New strategies in hepatocellular carcinoma: genomic prognostic markers. *Clin Cancer Res* **16**, 4688-94 (2010).
40. Seror, O. Percutaneous hepatic ablation: What needs to be known in 2014. *Diagn Interv Imaging* (2014).
41. N'Kontchou, G. *et al.* Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: long-term results and prognostic factors in 235 Western patients with cirrhosis. *Hepatology* **50**, 1475-83 (2009).
42. Mazzaferro, V. *et al.* Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* **334**, 693-9 (1996).
43. Duvoux, C. *et al.* Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a model including alpha-fetoprotein improves the performance of Milan criteria. *Gastroenterology* **143**, 986-94 e3; quiz e14-5 (2012).
44. Mazzaferro, V. *et al.* Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol* **10**, 35-43 (2009).
45. Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.C. & Llovet, J.M. The genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* (2015).
46. Forner, A., Gilabert, M., Bruix, J. & Raoul, J.L. Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* **11**, 525-35 (2014).
47. Llovet, J.M. & Bruix, J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* **37**, 429-42 (2003).
48. Salem, R. *et al.* Radioembolization for hepatocellular carcinoma using Yttrium-90 microspheres: a comprehensive report of long-term outcomes. *Gastroenterology* **138**, 52-64 (2010).

49. Salem, R. *et al.* Radioembolization results in longer time-to-progression and reduced toxicity compared with chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **140**, 497-507 e2 (2011).
50. Lammer, J. *et al.* Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study. *Cardiovasc Intervent Radiol* **33**, 41-52 (2010).
51. van Malenstein, H. *et al.* A randomized phase II study of drug-eluting beads versus transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Onkologie* **34**, 368-76 (2011).
52. Llovet, J.M. *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **359**, 378-90 (2008).
53. Cheng, A.L. *et al.* Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* **10**, 25-34 (2009).
54. Verslype, C., Rosmorduc, O., Rougier, P. & Group, E.G.W. Hepatocellular carcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **23 Suppl 7**, vii41-8 (2012).
55. Johnson, P.J. *et al.* Brivanib versus sorafenib as first-line therapy in patients with unresectable, advanced hepatocellular carcinoma: results from the randomized phase III BRISK-FL study. *J Clin Oncol* **31**, 3517-24 (2013).
56. Llovet, J.M. *et al.* Brivanib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma Who Were Intolerant to Sorafenib or for Whom Sorafenib Failed: Results From the Randomized Phase III BRISK-PS Study. *J Clin Oncol* (2013).
57. Llovet, J.M. & Hernandez-Gea, V. Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III failure and novel perspectives on trial design. *Clin Cancer Res* **20**, 2072-9 (2014).
58. Legoix, P. *et al.* Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity. *Oncogene* **18**, 4044-6 (1999).
59. Laurent-Puig, P. *et al.* Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* **120**, 1763-73 (2001).
60. Guichard, C. *et al.* Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* **44**, 694-8 (2012).
61. Schulze, K. *et al.* Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet* **47**, 505-11 (2015).
62. Totoki, Y. *et al.* Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet* **46**, 1267-73 (2014).
63. Fujimoto, A. *et al.* Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet* **44**, 760-4 (2012).
64. Cleary, S.P. *et al.* Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing. *Hepatology* (2013).
65. Kan, Z. *et al.* Whole genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Res* (2013).
66. McDermott, U., Downing, J.R. & Stratton, M.R. Genomics and the continuum of cancer care. *N Engl J Med* **364**, 340-50 (2011).

67. Stratton, M.R., Campbell, P.J. & Futreal, P.A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719-24 (2009).
68. Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546-58 (2013).
69. Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192-205 (2012).
70. Decaens, T. *et al.* Stabilization of beta-catenin affects mouse embryonic liver growth and hepatoblast fate. *Hepatology* **47**, 247-58 (2008).
71. Benhamouche, S. *et al.* Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell* **10**, 759-70 (2006).
72. Thompson, M.D. & Monga, S.P. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* **45**, 1298-305 (2007).
73. de La Coste, A. *et al.* Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8847-51 (1998).
74. Terris, B. *et al.* Close correlation between beta-catenin gene alterations and nuclear accumulation of the protein in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene* **18**, 6583-8 (1999).
75. Boyault, S. *et al.* Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* **45**, 42-52 (2007).
76. Cieply, B., Zeng, G., Proverbs-Singh, T., Geller, D.A. & Monga, S.P. Unique phenotype of hepatocellular cancers with exon-3 mutations in beta-catenin gene. *Hepatology* **49**, 821-31 (2009).
77. Nault, J.C. *et al.* High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun* **4**, 2218 (2013).
78. Cadoret, A. *et al.* Hepatomegaly in transgenic mice expressing an oncogenic form of beta-catenin. *Cancer Res* **61**, 3245-9 (2001).
79. Colnot, S. *et al.* Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17216-21 (2004).
80. Harada, N. *et al.* Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Ha-ras gene mutations. *Cancer Res* **64**, 48-54 (2004).
81. Satoh, S. *et al.* AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* **24**, 245-50 (2000).
82. Zucman-Rossi, J. *et al.* Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene* **26**, 774-80 (2007).
83. Pinyol, R., Nault, J.C., Quetglas, I.M., Zucman-Rossi, J. & Llovet, J.M. Molecular profiling of liver tumors: classification and clinical translation for decision making. *Semin Liver Dis* **34**, 363-75 (2014).
84. Wade, M., Li, Y.C. & Wahl, G.M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **13**, 83-96 (2013).
85. Bressac, B., Kew, M., Wands, J. & Ozturk, M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* **350**, 429-31 (1991).
86. Hsu, I.C. *et al.* Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* **350**, 427-8 (1991).

87. Hussain, S.P. & Harris, C.C. p53 mutation spectrum and load: the generation of hypotheses linking the exposure of endogenous or exogenous carcinogens to human cancer. *Mutat Res* **428**, 23-32 (1999).
88. Woo, H.G. *et al.* Association of TP53 mutations with stem cell-like gene expression and survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **140**, 1063-70 (2011).
89. Ahn, S.M. *et al.* A genomic portrait of resectable hepatocellular carcinomas: Implications of RB1 and FGF19 aberrations for patient stratification. *Hepatology* (2014).
90. Sawey, E.T. *et al.* Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening. *Cancer Cell* **19**, 347-58 (2011).
91. Wilson, B.G. & Roberts, C.W. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer* **11**, 481-92 (2011).
92. Versteege, I. *et al.* Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* **394**, 203-6 (1998).
93. Li, M. *et al.* Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* **43**, 828-9 (2011).
94. Waddell, N. *et al.* Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* **518**, 495-501 (2015).
95. Saigo, K. *et al.* 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**, 703-8 (2008).
96. Sung, W.K. *et al.* Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* **44**, 765-9 (2012).
97. Sporn, M.B. & Liby, K.T. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer* **12**, 564-71 (2012).
98. Ramos-Gomez, M. *et al.* Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3410-5 (2001).
99. Shibata, T. *et al.* Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13568-73 (2008).
100. Shibata, T. *et al.* Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology* **135**, 1358-1368, 1368 e1-4 (2008).
101. Cancer Genome Atlas Research, N. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* **489**, 519-25 (2012).
102. Eichenmuller, M. *et al.* The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features. *J Hepatol* **61**, 1312-20 (2014).
103. DeNicola, G.M. *et al.* Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106-9 (2011).
104. Fruman, D.A. & Rommel, C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 140-56 (2014).
105. Villanueva, A. *et al.* Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **135**, 1972-83, 1983 e1-11 (2008).
106. Lavoie, H. & Therrien, M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 281-98 (2015).
107. Trepo, C., Chan, H.L. & Lok, A. Hepatitis B virus infection. *Lancet* **384**, 2053-63 (2014).

108. Locarnini, S. & Zoulim, F. Molecular genetics of HBV infection. *Antivir Ther* **15 Suppl 3**, 3-14 (2010).
109. Neuveut, C., Wei, Y. & Buendia, M.A. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* **52**, 594-604 (2010).
110. Guerrieri, F., Belloni, L., Pediconi, N. & Levrero, M. Molecular mechanisms of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *Semin Liver Dis* **33**, 147-56 (2013).
111. Tang, H., Oishi, N., Kaneko, S. & Murakami, S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci* **97**, 977-83 (2006).
112. Seifer, M., Hohne, M., Schaefer, S. & Gerlich, W.H. In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBx protein. *J Hepatol* **13 Suppl 4**, S61-5 (1991).
113. Kim, S. *et al.* HBV X protein targets hBubR1, which induces dysregulation of the mitotic checkpoint. *Oncogene* **27**, 3457-64 (2008).
114. Gottlob, K., Pagano, S., Levrero, M. & Graessmann, A. Hepatitis B virus X protein transcription activation domains are neither required nor sufficient for cell transformation. *Cancer Res* **58**, 3566-70 (1998).
115. Schuster, R., Gerlich, W.H. & Schaefer, S. 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**, 1173-80 (2000).
116. Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T. & Jay, G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* **351**, 317-20 (1991).
117. Reifenberg, K. *et al.* Long-term expression of the hepatitis B virus core-e- and X-proteins does not cause pathologic changes in transgenic mice. *J Hepatol* **26**, 119-30 (1997).
118. Amaddeo G, C.Q., Ladeiro Y, Imbeaud S, Nault JC, Jaoui D, Mathe YG, Laurent C, Laurent A, Bioulac-Sage P, Calderaro J, Zucman-Rossi J. Integration of tumour and viral genomic characterisations in HBV-related hepatocellular carcinomas. *Gut* **Published Online First: 9 June 2014 doi:10.1136/gutjnl-2013-306228**(2014).
119. Brechot, C., Pourcel, C., Louise, A., Rain, B. & Tiollais, P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* **286**, 533-5 (1980).
120. Li, X. *et al.* The function of targeted host genes determines the oncogenicity of HBV integration in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **60**, 975-84 (2014).
121. Jiang, Z. *et al.* The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients. *Genome Res* **22**, 593-601 (2012).
122. Wang, J., Chenivesse, X., Henglein, B. & Brechot, C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* **343**, 555-7 (1990).
123. Paterlini-Brechot, P. *et al.* Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* **22**, 3911-6 (2003).
124. Martinez, P. & Blasco, M.A. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer* **11**, 161-76 (2011).
125. Shampay, J., Szostak, J.W. & Blackburn, E.H. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**, 154-7 (1984).
126. Gunes, C. & Rudolph, K.L. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell* **152**, 390-3 (2013).
127. Deng, Y., Chan, S.S. & Chang, S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* **8**, 450-8 (2008).

128. Armanios, M. & Blackburn, E.H. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet* **13**, 693-704 (2012).
129. Nandakumar, J. & Cech, T.R. Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 69-82 (2013).
130. Calado, R.T. & Young, N.S. Telomere diseases. *N Engl J Med* **361**, 2353-65 (2009).
131. Urabe, Y. *et al.* Telomere length in human liver diseases. *Liver* **16**, 293-7 (1996).
132. Scoazec, J.Y. *et al.* Focal nodular hyperplasia of the liver: composition of the extracellular matrix and expression of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules. *Hum Pathol* **26**, 1114-25 (1995).
133. Wiemann, S.U. *et al.* Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J* **16**, 935-42 (2002).
134. Hartmann, D. *et al.* Telomerase gene mutations are associated with cirrhosis formation. *Hepatology* **53**, 1608-17 (2011).
135. Calado, R.T. *et al.* Constitutional telomerase mutations are genetic risk factors for cirrhosis. *Hepatology* **53**, 1600-7 (2011).
136. Rudolph, K.L., Chang, S., Millard, M., Schreiber-Agus, N. & DePinho, R.A. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* **287**, 1253-8 (2000).
137. Farazi, P.A. *et al.* Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **63**, 5021-7 (2003).
138. Meyerson, M. *et al.* hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**, 785-95 (1997).
139. Ferlicot, S., Paradis, V., Dargere, D., Monges, G. & Bedossa, P. Detection of telomerase in hepatocellular carcinomas using a PCR ELISA assay: comparison with hTR expression. *J Clin Pathol* **52**, 725-9 (1999).
140. Farazi, P.A. & DePinho, R.A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* **6**, 674-87 (2006).
141. Nault, J.C. *et al.* High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun* **In Press**(2013).
142. Golub, T.R. *et al.* Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**, 531-7 (1999).
143. Lee, J.S. *et al.* Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* **40**, 667-76 (2004).
144. Lee, J.S. *et al.* A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med* **12**, 410-6 (2006).
145. Chiang, D.Y. *et al.* Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **68**, 6779-88 (2008).
146. Hoshida, Y. *et al.* Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **69**, 7385-92 (2009).
147. Coulouarn, C., Factor, V.M. & Thorgeirsson, S.S. Transforming growth factor-beta gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. *Hepatology* **47**, 2059-67 (2008).
148. Kaposi-Novak, P. *et al.* Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest* **116**, 1582-95 (2006).

149. Shaked, O., Siegelman, E.S., Olthoff, K. & Reddy, K.R. Biologic and clinical features of benign solid and cystic lesions of the liver. *Clin Gastroenterol Hepatol* **9**, 547-62 e1-4 (2011).
150. Belghiti, J., Cauchy, F., Paradis, V. & Vilgrain, V. Diagnosis and management of solid benign liver lesions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**, 737-49 (2014).
151. Nault, J.C., Bioulac-Sage, P. & Zucman-Rossi, J. Hepatocellular benign tumors-from molecular classification to personalized clinical care. *Gastroenterology* **144**, 888-902 (2013).
152. Edmondson, H.A., Henderson, B. & Benton, B. Liver-cell adenomas associated with use of oral contraceptives. *N Engl J Med* **294**, 470-2 (1976).
153. Rooks, J.B. *et al.* Epidemiology of hepatocellular adenoma. The role of oral contraceptive use. *JAMA* **242**, 644-8 (1979).
154. Rooks, J.B. *et al.* The association between oral contraception and hepatocellular adenoma--a preliminary report. *Int J Gynaecol Obstet* **15**, 143-4 (1977).
155. Christopherson, W.M., Mays, E.T. & Barrows, G. A clinicopathologic study of steroid-related liver tumors. *Am J Surg Pathol* **1**, 31-41 (1977).
156. Buhler, H. *et al.* Regression of liver cell adenoma. A follow-up study of three consecutive patients after discontinuation of oral contraceptive use. *Gastroenterology* **82**, 775-82 (1982).
157. Henderson, J.T., Richmond, J. & Sumerling, M.D. Androgenic-anabolic steroid therapy and hepatocellular carcinoma. *Lancet* **1**, 934 (1973).
158. Rebouissou, S., Bioulac-Sage, P. & Zucman-Rossi, J. Molecular pathogenesis of focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma. *J Hepatol* **48**, 163-70 (2008).
159. Svrcek, M. *et al.* Regressive liver adenomatosis following androgenic progestin therapy withdrawal: a case report with a 10-year follow-up and a molecular analysis. *Eur J Endocrinol* **156**, 617-21 (2007).
160. Paradis, V. *et al.* Telangiectatic adenoma: an entity associated with increased body mass index and inflammation. *Hepatology* **46**, 140-6 (2007).
161. Zucman-Rossi, J. *et al.* Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. *Hepatology* **43**, 515-24 (2006).
162. Sempoux, C. *et al.* Hepatocellular nodules expressing markers of hepatocellular adenomas in Budd- Chiari syndrome and other rare hepatic vascular disorders. *J Hepatol* (2015).
163. Labrune, P., Trioche, P., Duvaltier, I., Chevalier, P. & Odievre, M. Hepatocellular adenomas in glycogen storage disease type I and III: a series of 43 patients and review of the literature. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **24**, 276-9 (1997).
164. Calderaro, J. *et al.* Molecular characterization of hepatocellular adenomas developed in patients with glycogen storage disease type I. *J Hepatol* **58**, 350-7 (2013).
165. Bacq, Y. *et al.* Familial liver adenomatosis associated with hepatocyte nuclear factor 1alpha inactivation. *Gastroenterology* **125**, 1470-5 (2003).
166. Chanson, P., Salenave, S. & Orcel, P. McCune-Albright syndrome in adulthood. *Pediatr Endocrinol Rev* **4 Suppl 4**, 453-62 (2007).
167. Bioulac-Sage, P., Cubel, G., Balabaud, C. & Zucman-Rossi, J. Revisiting the pathology of resected benign hepatocellular nodules using new immunohistochemical markers. *Semin Liver Dis* **31**, 91-103 (2011).

168. Flejou, J.F. *et al.* Liver adenomatosis. An entity distinct from liver adenoma? *Gastroenterology* **89**, 1132-8 (1985).
169. Lepreux, S. *et al.* The identification of small nodules in liver adenomatosis. *J Hepatol* **39**, 77-85 (2003).
170. Gyorffy, E.J., Bredfeldt, J.E. & Black, W.C. Transformation of hepatic cell adenoma to hepatocellular carcinoma due to oral contraceptive use. *Ann Intern Med* **110**, 489-90 (1989).
171. van Aalten, S.M., de Man, R.A., JN, I.J. & Terkivatan, T. Systematic review of haemorrhage and rupture of hepatocellular adenomas. *Br J Surg* **99**, 911-6 (2012).
172. Baranes, L. *et al.* Imaging benign hepatocellular tumors: atypical forms and diagnostic traps. *Diagn Interv Imaging* **94**, 677-95 (2013).
173. van Aalten, S.M., Witjes, C.D., de Man, R.A., Ijzermans, J.N. & Terkivatan, T. Can a decision-making model be justified in the management of hepatocellular adenoma? *Liver Int* **32**, 28-37 (2012).
174. Dokmak, S. *et al.* A single-center surgical experience of 122 patients with single and multiple hepatocellular adenomas. *Gastroenterology* **137**, 1698-705 (2009).
175. van Vledder, M.G. *et al.* Safety and efficacy of radiofrequency ablation for hepatocellular adenoma. *J Vasc Interv Radiol* **22**, 787-93 (2011).
176. Bioulac-Sage, P. *et al.* Hepatocellular adenoma management and phenotypic classification: the Bordeaux experience. *Hepatology* **50**, 481-9 (2009).
177. van Aalten, S.M. *et al.* Validation of a liver adenoma classification system in a tertiary referral centre: implications for clinical practice. *J Hepatol* **55**, 120-5 (2011).
178. Pan, J. *et al.* Retrospective study of hepatocellular adenomas based on the phenotypic classification system: A report from China. *Histol Histopathol* **29**, 243-9 (2014).
179. Bellamy, C.O. *et al.* The value of immunophenotyping hepatocellular adenomas: consecutive resections at one UK centre. *Histopathology* **62**, 431-45 (2013).
180. Sasaki, M., Yoneda, N., Kitamura, S., Sato, Y. & Nakanuma, Y. Characterization of hepatocellular adenoma based on the phenotypic classification: The Kanazawa experience. *Hepatol Res* **41**, 982-8 (2011).
181. Bluteau, O. *et al.* Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat Genet* **32**, 312-5 (2002).
182. Jeannot, E. *et al.* Spectrum of HNF1A somatic mutations in hepatocellular adenoma differs from that in patients with MODY3 and suggests genotoxic damage. *Diabetes* **59**, 1836-44 (2010).
183. Yamagata, K. *et al.* Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* **384**, 455-8 (1996).
184. Pelletier, L. *et al.* Loss of hepatocyte nuclear factor 1alpha function in human hepatocellular adenomas leads to aberrant activation of signaling pathways involved in tumorigenesis. *Hepatology* **51**, 557-66 (2010).
185. Pontoglio, M. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* **84**, 575-85 (1996).
186. Lee, Y.H., Sauer, B. & Gonzalez, F.J. Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1alpha knockout mouse. *Mol Cell Biol* **18**, 3059-68 (1998).

187. Akiyama, T.E., Ward, J.M. & Gonzalez, F.J. Regulation of the liver fatty acid-binding protein gene by hepatocyte nuclear factor 1alpha (HNF1alpha). Alterations in fatty acid homeostasis in HNF1alpha-deficient mice. *J Biol Chem* **275**, 27117-22 (2000).
188. Bioulac-Sage, P. *et al.* Hepatocellular adenoma subtype classification using molecular markers and immunohistochemistry. *Hepatology* **46**, 740-8 (2007).
189. Laumonier, H. *et al.* Hepatocellular adenomas: magnetic resonance imaging features as a function of molecular pathological classification. *Hepatology* **48**, 808-18 (2008).
190. Paradis, V. *et al.* Telangiectatic focal nodular hyperplasia: a variant of hepatocellular adenoma. *Gastroenterology* **126**, 1323-9 (2004).
191. Bioulac-Sage, P. *et al.* Clinical, morphologic, and molecular features defining so-called telangiectatic focal nodular hyperplasias of the liver. *Gastroenterology* **128**, 1211-8 (2005).
192. Rebouissou, S. *et al.* Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature* **457**, 200-4 (2009).
193. Sa Cunha, A. *et al.* Inflammatory syndrome with liver adenomatosis: the beneficial effects of surgical management. *Gut* **56**, 307-9 (2007).
194. Schaper, F. & Rose-John, S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev* (2015).
195. Pilati, C. *et al.* Genomic Profiling of Hepatocellular Adenomas Reveals Recurrent FRK-Activating Mutations and the Mechanisms of Malignant Transformation. *Cancer Cell* **25**, 428-41 (2014).
196. Pilati, C. *et al.* Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas. *J Exp Med* **208**, 1359-66 (2011).
197. Nault, J.C. *et al.* GNAS-activating mutations define a rare subgroup of inflammatory liver tumors characterized by STAT3 activation. *J Hepatol* **56**, 184-91 (2012).
198. Chen, Y.W., Jeng, Y.M., Yeh, S.H. & Chen, P.J. P53 gene and Wnt signaling in benign neoplasms: beta-catenin mutations in hepatic adenoma but not in focal nodular hyperplasia. *Hepatology* **36**, 927-35 (2002).
199. Van der Borght, S. *et al.* Nuclear beta-catenin staining and absence of steatosis are indicators of hepatocellular adenomas with an increased risk of malignancy. *Histopathology* **51**, 855-6 (2007).
200. Farges, O. *et al.* Changing trends in malignant transformation of hepatocellular adenoma. *Gut* **60**, 85-9 (2011).
201. Fonseca, S. *et al.* Histological and immunohistochemical revision of hepatocellular adenomas: a learning experience. *Int J Hepatol* **2013**, 398308 (2013).
202. Huang, F.W. *et al.* Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* **339**, 957-9 (2013).
203. Horn, S. *et al.* TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* **339**, 959-61 (2013).
204. Weinstein, L.S., Liu, J., Sakamoto, A., Xie, T. & Chen, M. Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. *Endocrinology* **145**, 5459-64 (2004).
205. Mantovani, G. *et al.* Biallelic expression of the Gsalpha gene in human bone and adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 6316-9 (2004).
206. Williamson, C.M. *et al.* A cis-acting control region is required exclusively for the tissue-specific imprinting of Gnas. *Nat Genet* **36**, 894-9 (2004).

207. Dorsam, R.T. & Gutkind, J.S. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 79-94 (2007).
208. Wettschureck, N. & Offermanns, S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* **85**, 1159-204 (2005).
209. Dhanasekaran, N., Heasley, L.E. & Johnson, G.L. G protein-coupled receptor systems involved in cell growth and oncogenesis. *Endocr Rev* **16**, 259-70 (1995).
210. Landis, C.A. *et al.* GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature* **340**, 692-6 (1989).
211. Vallar, L., Spada, A. & Giannattasio, G. Altered Gs and adenylate cyclase activity in human GH-secreting pituitary adenomas. *Nature* **330**, 566-8 (1987).
212. Weinstein, L.S. *et al.* Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med* **325**, 1688-95 (1991).
213. Muca, C. & Vallar, L. Expression of mutationally activated G alpha s stimulates growth and differentiation of thyroid FRTL5 cells. *Oncogene* **9**, 3647-53 (1994).
214. Weinstein, L.S., Chen, M., Xie, T. & Liu, J. Genetic diseases associated with heterotrimeric G proteins. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 260-6 (2006).
215. Idziaszczyk, S., Wilson, C.H., Smith, C.G., Adams, D.J. & Cheadle, J.P. Analysis of the frequency of GNAS codon 201 mutations in advanced colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **202**, 67-9 (2010).
216. Lumbroso, S., Paris, F., Sultan, C. & European Collaborative, S. Activating Gsalpha mutations: analysis of 113 patients with signs of McCune-Albright syndrome--a European Collaborative Study. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2107-13 (2004).
217. Parvanescu, A. *et al.* Lessons from McCune-Albright syndrome-associated intraductal papillary mucinous neoplasms: : GNAS-activating mutations in pancreatic carcinogenesis. *JAMA Surg* **149**, 858-62 (2014).
218. Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-99 (2010).
219. Yuen, J.W. *et al.* Activation of STAT3 by specific Galpha subunits and multiple Gbetagamma dimers. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 1052-9 (2010).
220. Liu, A.M. *et al.* Activation of STAT3 by G alpha(s) distinctively requires protein kinase A, JNK, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **281**, 35812-25 (2006).
221. Levis, M.J. & Bourne, H.R. Activation of the alpha subunit of Gs in intact cells alters its abundance, rate of degradation, and membrane avidity. *J Cell Biol* **119**, 1297-307 (1992).
222. Talpaz, M. *et al.* Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* **354**, 2531-41 (2006).
223. Imamura, H. *et al.* Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol* **38**, 200-7 (2003).
224. Riley, R.D. *et al.* Prognosis Research Strategy (PROGRESS) 2: prognostic factor research. *PLoS Med* **10**, e1001380 (2013).
225. McShane, L.M. *et al.* Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* **97**, 1180-4 (2005).
226. Villanueva, A. *et al.* Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **140**, 1501-12 e2 (2011).

227. Ji, J. *et al.* MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med* **361**, 1437-47 (2009).
228. Nault, J.C. *et al.* A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection. *Gastroenterology* **145**, 176-87 (2013).
229. Yamashita, T. *et al.* EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **68**, 1451-61 (2008).
230. Hoshida, Y. *et al.* Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **359**, 1995-2004 (2008).
231. Villa, E. *et al.* Neoangiogenesis-related genes are hallmarks of fast-growing hepatocellular carcinomas and worst survival. Results from a prospective study. *Gut* (2015).
232. Kim, S.M. *et al.* Sixty-five gene-based risk score classifier predicts overall survival in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **55**, 1443-52 (2012).
233. Kim, J.H. *et al.* Genomic predictors for recurrence patterns of hepatocellular carcinoma: model derivation and validation. *PLoS Med* **11**, e1001770 (2014).
234. Budhu, A. *et al.* Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell* **10**, 99-111 (2006).
235. Roessler, S. *et al.* A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor relapse in early-stage hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res* **70**, 10202-12 (2010).
236. Woo, H.G. *et al.* Identification of a cholangiocarcinoma-like gene expression trait in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **70**, 3034-41 (2010).
237. Marquardt, J.U. *et al.* Human hepatic cancer stem cells are characterized by common stemness traits and diverse oncogenic pathways. *Hepatology* **54**, 1031-42 (2011).
238. Budhu, A. *et al.* Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **47**, 897-907 (2008).
239. Coulouarn, C., Factor, V.M., Andersen, J.B., Durkin, M.E. & Thorgeirsson, S.S. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* **28**, 3526-36 (2009).
240. Wei, R. *et al.* Clinical significance and prognostic value of microRNA expression signatures in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **19**, 4780-91 (2013).
241. Augello, C. *et al.* MicroRNA profiling of hepatocarcinogenesis identifies C19MC cluster as a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* **32**, 772-82 (2012).
242. Viswanathan, S.R. *et al.* Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet* **41**, 843-8 (2009).
243. Li, W. *et al.* Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **123**, 1616-22 (2008).
244. Jiang, J. *et al.* Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res* **14**, 419-27 (2008).
245. Gramantieri, L. *et al.* MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality. *Clin Cancer Res* **15**, 5073-81 (2009).
246. Villanueva, A. *et al.* DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **61**, 1945-56 (2015).

247. Hernandez-Vargas, H. *et al.* Hepatocellular carcinoma displays distinct DNA methylation signatures with potential as clinical predictors. *PLoS One* **5**, e9749 (2010).
248. Calvisi, D.F. *et al.* Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* **130**, 1117-28 (2006).
249. Lee, S. *et al.* Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* **163**, 1371-8 (2003).
250. Kwon, G.Y. *et al.* Promoter methylation of E-cadherin in hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *J Korean Med Sci* **20**, 242-7 (2005).
251. Lou, C. *et al.* Aberrant DNA methylation profile of hepatocellular carcinoma and surgically resected margin. *Cancer Sci* **100**, 996-1004 (2009).
252. Heidenreich, B., Rachakonda, P.S., Hemminki, K. & Kumar, R. TERT promoter mutations in cancer development. *Curr Opin Genet Dev* **24**, 30-7 (2014).
253. Bell, R.J. *et al.* Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science* **348**, 1036-9 (2015).
254. Borah, S. *et al.* Cancer. TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. *Science* **347**, 1006-10 (2015).
255. Huang, D.S. *et al.* Recurrent TERT promoter mutations identified in a large-scale study of multiple tumour types are associated with increased TERT expression and telomerase activation. *Eur J Cancer* **51**, 969-76 (2015).
256. Killela, P.J. *et al.* TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 6021-6 (2013).
257. Griewank, K.G. *et al.* TERT promoter mutations are frequent in atypical fibroxanthomas and pleomorphic dermal sarcomas. *Mod Pathol* **27**, 502-8 (2014).
258. Vinagre, J. *et al.* Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun* **4**, 2185 (2013).
259. Tallet, A. *et al.* Overexpression and promoter mutation of the TERT gene in malignant pleural mesothelioma. *Oncogene* (2013).
260. Griewank, K.G. *et al.* TERT promoter mutations are frequent in cutaneous basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *PLoS One* **8**, e80354 (2013).
261. Quaas, A. *et al.* Frequency of TERT promoter mutations in primary tumors of the liver. *Virchows Arch* **465**, 673-7 (2014).
262. Cevik, D., Yildiz, G. & Ozturk, M. Common telomerase reverse transcriptase promoter mutations in hepatocellular carcinomas from different geographical locations. *World J Gastroenterol* **21**, 311-7 (2015).
263. Dejean, A., Bougueleret, L., Grzeschik, K.H. & Tiollais, P. Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. *Nature* **322**, 70-2 (1986).
264. Totoki, Y. *et al.* High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet* **43**, 464-9 (2011).
265. Wood, L.D. *et al.* Chromophobe hepatocellular carcinoma with abrupt anaplasia: a proposal for a new subtype of hepatocellular carcinoma with unique morphological and molecular features. *Mod Pathol* **26**, 1586-93 (2013).
266. Nault, J.C. *et al.* Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Hepatology* **60**, 1983-92 (2014).

267. Goutagny, S. *et al.* High Incidence of Activating TERT Promoter Mutations in Meningiomas Undergoing Malignant Progression. *Brain Pathol* (2013).
268. Satyanarayana, A., Manns, M.P. & Rudolph, K.L. Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **40**, 276-83 (2004).
269. Harley, C.B. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* **8**, 167-79 (2008).
270. Greten, T.F. *et al.* A phase II open label trial evaluating safety and efficacy of a telomerase peptide vaccination in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **10**, 209 (2010).
271. Atchison, R.W., Casto, B.C. & Hammon, W.M. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* **149**, 754-6 (1965).
272. Goncalves, M.A. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol J* **2**, 43 (2005).
273. Smith, R.H. Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther* **15**, 817-22 (2008).
274. Flotte, T.R. & Berns, K.I. Adeno-associated virus: a ubiquitous commensal of mammals. *Hum Gene Ther* **16**, 401-7 (2005).
275. Halbert, C.L. *et al.* Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther* **17**, 440-7 (2006).
276. Kotterman, M.A. & Schaffer, D.V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet* **15**, 445-51 (2014).
277. Chiorini, J.A. *et al.* The roles of AAV Rep proteins in gene expression and targeted integration. *Curr Top Microbiol Immunol* **218**, 25-33 (1996).
278. Kotin, R.M. *et al.* Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2211-5 (1990).
279. McAlister, V.J. & Owens, R.A. Preferential integration of adeno-associated virus type 2 into a polypyrimidine/polypurine-rich region within AAVS1. *J Virol* **81**, 9718-26 (2007).
280. Samulski, R.J. *et al.* Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* **10**, 3941-50 (1991).
281. Huser, D. *et al.* Integration preferences of wildtype AAV-2 for consensus rep-binding sites at numerous loci in the human genome. *PLoS Pathog* **6**, e1000985 (2010).
282. Schnepp, B.C., Jensen, R.L., Chen, C.L., Johnson, P.R. & Clark, K.R. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol* **79**, 14793-803 (2005).
283. McCarty, D.M., Young, S.M., Jr. & Samulski, R.J. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet* **38**, 819-45 (2004).
284. Tratschin, J.D., Miller, I.L., Smith, M.G. & Carter, B.J. Adeno-associated virus vector for high-frequency integration, expression, and rescue of genes in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **5**, 3251-60 (1985).
285. Vasileva, A. & Jessberger, R. Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting. *Nat Rev Microbiol* **3**, 837-47 (2005).
286. Miao, C.H. *et al.* The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nat Genet* **19**, 13-5 (1998).
287. Kaeppel, C. *et al.* A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med* **19**, 889-91 (2013).

288. Miller, D.G., Petek, L.M. & Russell, D.W. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat Genet* **36**, 767-73 (2004).
289. Nakai, H. *et al.* AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* **34**, 297-302 (2003).
290. Miller, D.G., Rutledge, E.A. & Russell, D.W. Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat Genet* **30**, 147-8 (2002).
291. Lamartina, S., Sporeno, E., Fattori, E. & Toniatti, C. Characteristics of the adeno-associated virus preintegration site in human chromosome 19: open chromatin conformation and transcription-competent environment. *J Virol* **74**, 7671-7 (2000).
292. Nathwani, A.C. *et al.* Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* **365**, 2357-65 (2011).
293. LeWitt, P.A. *et al.* AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol* **10**, 309-19 (2011).
294. Bainbridge, J.W. *et al.* Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **372**, 1887-97 (2015).
295. Moore, P.S. & Chang, Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer* **10**, 878-89 (2010).
296. Martin, D. & Gutkind, J.S. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* **27 Suppl 2**, S31-42 (2008).
297. Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. & Howley, P.M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-36 (1990).
298. Munger, K. *et al.* Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* **8**, 4099-105 (1989).
299. Shah, K.M. & Young, L.S. Epstein-Barr virus and carcinogenesis: beyond Burkitt's lymphoma. *Clin Microbiol Infect* **15**, 982-8 (2009).
300. Hu, Z. *et al.* Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat Genet* **47**, 158-63 (2015).
301. Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. & Moore, P.S. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* **319**, 1096-100 (2008).
302. Epstein, M.A., Achong, B.G. & Barr, Y.M. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **1**, 702-3 (1964).
303. Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. & zur Hausen, H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3812-5 (1983).
304. Poiesz, B.J. *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7415-9 (1980).
305. Chang, Y. *et al.* Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266**, 1865-9 (1994).
306. Blumberg, B.S., Alter, H.J. & Visnich, S. A "New" Antigen in Leukemia Sera. *JAMA* **191**, 541-6 (1965).
307. Choo, Q.L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-62 (1989).

308. Ding, D. *et al.* Recurrent targeted genes of hepatitis B virus in the liver cancer genomes identified by a next-generation sequencing-based approach. *PLoS Genet* **8**, e1003065 (2012).
309. Deshpande, A., Sicinski, P. & Hinds, P.W. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* **24**, 2909-15 (2005).
310. Johnstone, R.W., Frew, A.J. & Smyth, M.J. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* **8**, 782-98 (2008).
311. Baudard, M. *et al.* Expression of the human multidrug resistance and glucocerebrosidase cDNAs from adeno-associated vectors: efficient promoter activity of AAV sequences and in vivo delivery via liposomes. *Hum Gene Ther* **7**, 1309-22 (1996).
312. Haberman, R.P., McCown, T.J. & Samulski, R.J. Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. *J Virol* **74**, 8732-9 (2000).
313. Donsante, A. *et al.* Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther* **8**, 1343-6 (2001).
314. Li, H. *et al.* Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood* **117**, 3311-9 (2011).
315. Donsante, A. *et al.* AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* **317**, 477 (2007).
316. Chandler, R.J. *et al.* Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J Clin Invest* **125**, 870-80 (2015).
317. Rosas, L.E. *et al.* Patterns of scAAV vector insertion associated with oncogenic events in a mouse model for genotoxicity. *Mol Ther* **20**, 2098-110 (2012).

Titre : Identification of new mechanisms of carcinogenesis and new prognostic biomarkers in hepatocellular tumors

Hepatocellular adenomas (HCA) are rare benign liver tumors occuring in young women taking oral contraception and complications as haemorrhage or malignant transformation in hepatocellular carcinomes (HCC) could occur. A genotype/phenotype classification has defined different subgroups of tumors : HCA with inactivating mutations of *HNF1A*, HCA with activating mutations of β-catenin and inflammatory HCA with activation of the JAK/STAT pathway. We have identified activation mutations of *GNAS*, that codes for the alpha subunit of the Gs protein in a subgroup of inflammatory HCA and in patients with HCA and McCune Albright syndrom, a rare disease that combined endocrine tumor, bone fibrous dysplasia and « cafe au lait » skin macula. These findings highlight the crosstalk between the cyclic AMP pathway induced by *GNAS* mutation with the JAK/STAT pathway.

HCC are the most frequent primary liver tumors worldwide and mainly occur on cirrhosis due to various risk factor as hepatitis B and C virus, alcohol consumption and metabolic syndrome. HCC is due to the accumulation of genetic and epigenetic alterations in the malignant hepatocytes. We have identified *TERT* (telomerase reverse transcriptase) promoter mutations as the most frequent somatic genetic alterations in HCC. These mutations were also found in cirrhotic premalignant nodules underlying their role in tumor initiation and malignant transformation. In contrast, the study of the different steps of malignant transformation of HCA into HCC using next generation sequencing and *TERT* promoter screening have shown that activatiing mutation of β-catenin is an early genetic alteration whereas *TERT* promoter mutation is required in a second step to promote a full malignant transformation.

We have also identified a prognostic molecular signature, the 5-gene score, in patients with HCC treated by liver resection. The 5-gene score predicts tumor recurrence and disease specific survival and has been validated in different cohorts of patients worldwide.
Finally, we have shown that adeno-associated virus type 2 is involved in liver carcinogenesis on normal liver through insertional mutagenesis in key cancer genes as *TERT*, *CCNA2*, *MLL4* and *TNFSF10*.

These results have underlined a new oncogenic virus involved in HCC development, identified new genetic alterations involved in malignant transformation on cirrhosis and normal liver and a new prognostic molecular signature that will help to guide treatment of patients with HCC in the future.

Keywords

Hepatocellular adenoma, JAK/STAT, *GNAS*, *TERT*, malignant transformation, hepatocellular carcinoma, 5-gene score, molecular signature, AAV2, insertional mutagenesis

Adress of the laboratory

Inserm UMR 1162 – Génomique fonctionnelle des tumeurs solides 27, rue Juliette Dodu 75010 Paris

Titre : Identification de nouveaux mécanismes de carcinogenèse et facteurs pronostiques des tumeurs hépatocellulaires

Résumé : Les adénomes hépatocellulaires (AHC) sont des tumeurs hépatiques bénignes rares se développant chez la femme jeune suite à la prise de contraceptifs oraux et pouvant se compliquer d'hémorragie et de transformation maligne en carcinome hépatocellulaire (CHC). Une classification génotype/phénotype a mise en évidence trois groupes d'AHC : les AHC inactivés pour le facteur de transcription *HNF1A*, les AHC mutés pour la β-caténine et les AHC dit « inflammatoires » ayant une activation de la voie JAK/STAT.
Nous avons identifiés des mutations activatrices du gènes *GNAS,* codant pour la sous unité alpha de la protéine Gs, dans un sous-groupe d'AHC inflammatoires ainsi que chez des patients avec des AHC et atteints d'un syndrome de McCune Albright, une maladie rare combinant des tumeurs endocriniennes, une dysplasie fibreuse osseuse et des taches cutanés café au lait. Cette découverte confirme les interactions entre la voie de l'AMP cyclique induite par les mutations *GNAS* et la voie JAK/STAT.

Les CHC sont les tumeurs primitives du foie les plus fréquentes, survenant souvent sur un foie cirrhotique exposé à différents facteurs de risque comme l'hépatite B chronique, l'hépatite C chronique, l'alcool ou le syndrome métabolique. Le CHC est le résultat de l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques.
Premièrement, nous avons identifiés les mutations du promoteur de *TERT* (Telomerase reverse transcriptase) comme les altérations génétiques somatiques les plus fréquentes des CHC. Ces mutations ont été aussi retrouvées dans des lésions prénéoplasiques développées sur cirrhose suggérant leurs rôles précoces dans l'initiation tumorale et la transformation maligne.
A l'inverse l'étude des mutations du promoteur de *TERT* et la réalisation de séquençage haut-débit dans les AHC et les transformation d'adénome en CHC nous a permis de disséquer les mécanismes de transformation maligne sur foie sain avec la présence de manière précoce d'une mutation de la β-caténine et dans un second temps l'apparition d'une mutation dans le promoteur de *TERT*.
Par la suite, nous avons mis en évidence une signature moléculaire pronostique transcriptomique chez les patients avec CHC traités par résection hépatique. Cette signature moléculaire prédisant à la fois la récidive tumorale et le décès a été validée dans des cohortes de patients à l'étranger.
Enfin, nous avons mise en évidence le rôle oncogénique de l'adeno-associated virus de type 2 dans la survenue de CHC sur foie sain via un mécanisme de mutagénèse insertionnelle dans des gènes clés de la carcinogénèse comme *TERT*, *CCNA2*, *MLL4* ou *TNFSF10*.

Ces résultats ont permit de mettre en évidence de nouveaux facteurs de risque viraux de survenue du CHC, d'identifier de nouvelles altérations génétiques impliquées dans la transformation maligne sur cirrhose et sur foie sain et permit de développer une signature moléculaire pronostique qui pourrait être utiliser dans le futur comme une aide à la stratification thérapeutique chez les patients atteint de CHC.

Mots clés

Adénome hépatocellulaire, JAK/STAT, *GNAS*, *TERT*, transformation maligne, carcinome hépatocellulaire, score 5-gène, pronostic moléculaire, AAV2, mutagénèse insertionnelle

Intitulé et adresse du laboratoire

Inserm UMR 1162 – Génomique fonctionnelle des tumeurs solides 27, rue Juliette Dodu 75010 Paris