

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 29 avril 2016
Par Elodie LEBREDONCHEL**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de**

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Diagnostic moléculaire du carcinome hépatocellulaire sur ADN circulant

Membres du jury :

Président :

M. le Professeur Thierry BROUSSEAU
Professeur à la faculté de pharmacie, Université de Lille 2
Praticien hospitalier, Institut de biochimie
Chef de pôle du Centre de Biologie-Pathologie
CHRU de Lille

Assesseurs :

Mme le Docteur Fabienne ESCANDE
Praticien hospitalier, institut de génétique moléculaire
Centre de Biologie Pathologie, CHRU de Lille

M. le Professeur Sébastien DHARANCY
Professeur à l'université de Lille 2
Praticien hospitalier, service de gastro-entérologie et hépatologie
CHRU de Lille

Directrice de thèse :

Mme Joséphine GALIPON
Docteur en Science
Responsable d'équipe en institut de recherche
Université de Keio, Tsuruoka, Japon



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE
CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice-présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Eric KERCKHOVE Professeur Eric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Damien CUNY Professeur Benoit DEPREZ Professeur Murielle GARCIN Monsieur Pierre RAVAUX Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Antoine HENRY
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie	Dr. Annie STANDAERT
Assesseur en charge de la recherche	Pr. Patricia MELNYK
Assesseur délégué à la scolarité	Dr. Christophe BOCHU
Assesseur délégué en charge des relations internationales	Pr. Philippe CHAVATTE
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante	M. Thomas MORGENROTH
Chef des services administratifs :	Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie Clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie Clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie Clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie Thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et économie Pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et économie Pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie Organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie Thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie Cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique

Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie Industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie Cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie Cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacologie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie Thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie Pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WILLEMAGNE	Baptiste	Chimie Organique
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques

M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie Pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	CUCCHI	Malgorzata	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et économie Pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEKYNDT	Bérengère	Pharmacie Galénique
M.	PEREZ	Maxime	Pharmacie Galénique

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises
dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

REMERCIEMENTS

Aux membres de mon jury, Dr Thierry Brousseau, Dr Fabienne Escande et Dr Sébastien Dharancy, merci de me faire l'honneur de votre présence et pour votre patience.

A ma directrice de thèse, Dr Joséphine Galipon, d'une professionnalité hors pair, capable de me corriger sur une variété de sujets en trois langues.

A ma famille, particulièrement mes parents et mes sœurs, qui me supportent et ne sont plus surpris de rien.

A Genta Nagae qui a accepté de me superviser pour la seconde fois sur ce sujet passionnant et pour son infinie patience, à Claire et toute l'équipe du laboratoire *Genome Science* RCAST du Professeur Aburatani, ainsi que les *gaijin* de l'université de Tokyo.

6年ぶりに、油谷研究室でもう一度、研究するチャンスを与えられて感謝しています。研究技術の発達を実感することが出来ました。そして、私も実験技術を少しでも向上できたと思います。日本の研究室で外国人が活動することが難しそうでしたが、歓迎してくれた皆様のおかげで、慣れるまでに毎日一生懸命頑張れました。8ヶ月で短い間でしたが、たくさんの実験ができて、たくさんの人に出会えて、とてもいい経験になりました。皆さん、どうもありがとうございました。

A ma famille japonaise pour ces dix années d'affection, notamment Mamie Sachiko Shimokurosawa.

Au CHRU de Lille qui m'a autorisé à vivre cette aventure et les différents services dans lesquels j'ai effectué un semestre, notamment celui d'oncogénétique pour sa compréhension lors de la rédaction de ma thèse.

Aux biologistes et internes de Guadeloupe : aux services du Dr Nicolas et du Dr Temar, à Sylvaine, Stéphanie, Amélie, Emma, Amandine, Sylvain, Mathieu, Xavier, David, Zaher qui ont ensoleillé mon internat.

Aux pharmaciens de Caen et celles avec qui j'ai passé l'internat : Stéphanie, Morgane et Carole, qui ont aujourd'hui une belle carrière de biologistes devant elles.

A mes amis d'enfance : Victorien, Fabien, Edouard, Jennifer, Anne-Lise et leurs familles...

Aux lillois : Cyprien, Thibaut, Honorine, Simon, Anaïs, Julien, Réna, Marie, Gauthier... et chacun de mes co-internes.

A mes relecteurs : Pierre, Halidou, Pauline, Solène et Yves-Marie.

A ceux qui seront venus assister à cette thèse et ceux que j'ai oubliés.

Et bien sûr, aux femmes de ma vie : Pauline, Célia, Marion, Gabrielle.

Und mein lieber Kaweh.

Adan an dot soley

TABLES DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	11
TABLE DES ILLUSTRATIONS	15
LISTE DES TABLEAUX	17
RESUME	18
INTRODUCTION	20
Chapitre 1 : Le carcinome hépatocellulaire	20
A. Epidémiologie	20
1) Généralités	20
2) Géographie	21
2. a) Zones de faible incidence	22
2. b) Zones de moyenne incidence	23
2. c) Zones d'incidence forte	23
2. d) France/Japon	24
3) Conclusion	25
B. Etiologies	27
1) Le virus de l'hépatite B	27
2) Le virus de l'hépatite C	29
3) Aflatoxine	30
4) L'alcool	30
5) Autres causes	31
C. Prévention	31
D. Aspects cliniques du CHC	33
1) Généralités	33
2) Sémiologie	33
3) Biologique générale	34
4) Marqueurs tumoraux	34
4. a) L'AFP	35
4. b) La DCP(déycarboxyprothrombine)	36
5) L'imagerie	37
5. a) L'échographie	37
5. b) Le scanner	37
5. c) Autres	38
6) Biopsie	38
7) Surveillance	39
7. a) Critères pronostics	39
8) Traitement	40
8. a) Transplantation hépatique (TH)	40
8. b) Résection hépatique	41
8. c) Traitements percutanés	42
8. d) La radioembolisation	43
8. e) Chimioembolisation	43
8. f) La chimiothérapie IV ou VO	44
8. g) L'immunothérapie	44
E. Altération génétique et cancer : application au CHC	46
1) Cancer : définition	46
2) Processus de carcinogénèse	46
3) Instabilité chromosomique dans le CHC	46
4) Anomalies génétiques	47

5)	Mutations fréquentes dans le CHC	48
5. a)	TERT	Erreur ! Signet non défini.
5. b)	CTNNB1 (β -caténine)	53
6)	Anomalies épigénétiques	55
6. a)	Les îlots CpG	55
6. b)	Modifications épigénétiques dans le CHC	57
Chapitre 2 : ADN tumoral circulant		59
1)	Dénominations	59
2)	Histoire	59
3)	Caractéristiques	59
4)	ADN circulant et cancer	61
5)	Origine	63
6)	ADN circulant au niveau hépatique	65
7)	Points importants à prendre en considération pour la récolte des échantillons	Erreur ! Signet non défini.
8)	Les cellules tumorales circulantes (CTC)	66
9)	Conclusion	67
MATERIEL ET METHODES		68
A.	Echantillons : origine et culture	68
1)	Echantillons cliniques	68
2)	Lignée cellulaire	68
3)	Culture cellulaire	68
B.	Extraction de l'ADN circulant	68
C.	Extraction de l'ADN génomique	69
D.	Purification des produits PCR	69
E.	Quantification de l'ADN	69
F.	Mesure de la longueur de l'ADN	70
1)	Agilent DNA 1000	70
2)	Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System	70
3)	Caliper HT DNA High Sensitivity LapChip®	71
G.	Préparation des contrôles négatifs	71
H.	PCR (Réaction de Polymérisation en chaîne)	72
1)	Design des amorces	72
2)	Amplification de l'ADN	73
2. a)	Mélange réactionnel New England Biolab NEB® Q5 High-Fidelity 2X Master	73
2. b)	Mélange réactionnel KAPA® HiFi Hot Start ReadyMix PCR	73
2. c)	Mélange réactionnel Next New England Biolab® High-Fidelity 2X GC Rich Mix 13A	74
I.	Vérification des produits de PCR	74
1)	Pré-vérification de la séquence à l'aide d'enzyme de restriction [New England Biolab®]	75
2)	Clonage	76
2. a)	Adénylation	76
2. b)	Insertion dans un plasmide (clonage)	76
2. c)	Transformation plasmidique	77
2. d)	Vérification de l'insert par PCR sur les colonies	78
J.	Séquençage Sanger	79
1)	Cycle de séquençage	79
2)	Purification des produits de PCR par précipitation à l'Ethanol/EDTA/NaOAc	79
K.	Traitement au bisulfite de sodium	80
1)	Conversion de l'ADN au bisulfite par désulfonation	81
2)	Amplification par la PCR au bisulfite	81
L.	Analyse des séquences	81
M.	Séquençage haut débit (NGS)	82
1)	Préparation de la librairie	83
2)	Amplification clonale	83
3)	Séquençage	84
4)	Analyse des données	85
RESULTATS		86
A.	Comparaison de méthodes de qualification	86

1) Quantification après extraction	86
2) Test qualitatif de l'ADN circulant des 14 échantillons de patients	87
B. Mise au point de la PCR du gène de la β -caténine et séquençage	89
1) Design des amorces	89
1. a) Séquence cible	89
1. b) Séquences des amorces et température de fusion	89
2) Résultats pour les mutations de <u>CTNNB1</u>	91
C. Mise au point de la PCR du promoteur TERT et séquençage	91
1) Sélection du tampon	91
2) Design et sélection des amorces	93
2. a) Séquence cible	93
2. b) Séquences des amorces et température de fusion	93
3) Mutations sur le promoteur TERT	96
D. Mise au point de la PCR au bisulfite	97
1) Sélection des amorces bisulfite	97
1. a) DUSP4	97
1. b) EPHA4	97
1. c) RNF135	98
1. d) CELF6	98
2) Essais de PCR multiplex	100
3) Résultats de méthylation	102

DISCUSSION **104**

A. Signification clinique des résultats	104
1) CTNNB1	Erreur ! Signet non défini.
2) TERT	Erreur ! Signet non défini.
3) Statut de méthylation	105
B. Limites et challenges techniques	107
1.a) CLONAGE	107
1.b) POLYMERASE	108
1.c) DMSO	108
1.d) NOMBRE DE CYCLES	108
1.e) NGS	109
1.a) FAIBLE POUVOIR STATISTIQUE ET METADONNEES	109
1.b) RATIO ADN TUMORAL / SAIN	110
C. PERSPECTIVES	111
1) A court terme	111
2) Accel-NGS™ Methyl-Seq DNA Library Kit	112
3) Nouvelles technologies et avancées	113
3.a) NANOPORE	114
3.b) ORIGINE DE L'ADN CIRCULANT	114
D. APPLICATION CLINIQUE	116

BIBLIOGRAPHIE **118**

LISTE DES ABREVIATIONS

5FU	5-FluoroUracile
AASLD	Association américaine pour l'étude des pathologies hépatiques (<i>American Association for the Study of Liver Diseases</i>)
ACPA	Analyse Chromosomique sur Puce à ADN
ACT	Transfert Cellulaire Adoptif (<i>Adoptive Cell Transfer</i>)
AFP	α -Foétoprotéine
ALAT	Alanine AminoTransférase
ALT	Alternative Lengthening of Telomerase
ANSM	Agence Nationale du Médicament (ancienne AFSSAPS)
APC	Adenomatous Polyposis Coli gene
ARF	Ablation par RadioFréquence
ARID	AT-Rich Interactive Domain
ASAT	Aspartate AminoTransférase
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
AVE	Tampon d'éluion
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BCT®	Blood Collection Tube
CA	Antigène Carbohydrate
CAT-scan	Computer Assisted Tomography scan
CEA	Antigène Carcino-embryonaire
CELF6	CUGBP, Elav-Like Family Member 6
cfDNA	cell-free DNA
cfDNAPS	Small amount of Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CK1	Caséine Kinase 1
CNA	Acides Nucléiques Circulants (<i>Circulating Nucleic Acids</i>)
CpG	Cytosine-phosphate-Guanosine
CT-scan	Computerised Tomography scan
CTC	Cellules tumorales circulantes
CTCF	CCCTC-binding factor
ctDNA	ADN tumoral circulant (<i>circulating tumor DNA</i>)
CTNNB1	Gène de la bêta-caténine (<i>Catenin Cadherin-Associated Protein Beta 1</i>)
CUGBP	CUG-Binding Protein
CYFRA-21-1	Fragment 21 de la Cytokeratine 19
DCP	DéyCarboxyProthrombine
ddNTP	Didésoxyribonucléotide triphosphate
DDW	Eau bidistillée (<i>double distilled water</i>)
DHS	Site d'hypersensibilité à la ADNase I (<i>DNase I Hypersensitivity Site</i>)
DMSO	DiméthylSulfoxide
DNase I	ADNase I
DNMT	DNA Méthyltransferase
DO	Densité Optique (Absorbance)
DUSP4	Dual Specificity Phosphatase 4
Dvl	Dishevelled

DW	Eau distillée (<i>Distilled Water</i>)
E-box	Enhancer Box
EASL	Association européenne pour l'étude du foie (<i>European Association for the Study of the Liver</i>)
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EPHA4	Ephrin Receptor A4
ETS-TCF	E-Twenty Six-Ternary Complex Factor
FBS	Sérum de veau fœtal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	Food and Drug Administration (équivalent de l'ANSM)
Fz	Fizzled
GPC (1 ou 3)	GlyPiCan
GS	Glutamine Synthase
GSK3	Glycogène Synthase Kinase 3
GST	Glutathione S-transferase
HAS	Haute Autorité de Santé
HBs	Antigène de surface du virus de l'hépatite B
HDAC	Histones DésACétylases
HDGN	Nodules Dysplasiques de Haut Grade
HepG2	Lignée humaine d'hépatoblastome
HS	High Sensitivity
HSP70	Heat Shock Protein 7
HTLV	Virus T lymphotrope humain (<i>Human T-Lymphotropic Virus</i>)
IARC	International Agency for Research on Cancer (CIRC)
ICG(R15)	IndoCyanine Green Retention rate at 15 minutes
ICMA	Immunochemiluminometric Assay
IHC	Insuffisance Hépatocellulaire
IL	Interleukine
INPES	Institut National de Prévention et d'Éducation pour la Santé
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
K ₃ EDTA	tri-potassium Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
kb	kilobases
KEAP1	Kelch like-ECH-associated protein 1
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LacZ	Un des 3 gènes de l'opéron lactose
LB(-Ampicillin)	Lysogeny broth / Luria-Bertani
LCA	Lens Culinaris Agglutinin A
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LEF	Lymphoid Enhancer-binding Factor
LOH	Perte d'hétérozygotie (<i>Loss Of Heterozygosity</i>)
LRP6	Low-density lipoprotein Receptor related Protein 6
MBP	Protéine liant l'ADN méthylé (<i>Methyl-Binding Protein</i>)
MELD	Model For End-Stage Liver Disease
MI	Instabilité Microsatellilaire (<i>Microsatellite Instability</i>)
miRNA	MicroARN
MPS	Massive Parallel Sequencing
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NANBH	Non-A Non-B Hepatitis
NaOH	Hydroxyde de Sodium (Soude)
NCP	Particule cœur de nucléosome (<i>Nucleosome Core Particule</i>)

ND	Non Disponible
NEB	New England Biolab
NFE2L2	Nuclear Factor Erythroid 2-like 2
NGS	Séquençage de Nouvelle Génération (<i>Next-Generation Sequencing</i>)
NIH	National Institutes of Health
NSE	Neuron Specific Enolase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pb	paires de bases
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PD-1/CTLA-4	Programmed Death 1/ anti-Cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4
PIVKA II	Vitamin K Absence II
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
PSA	Antigène Prostatique Spécifique (<i>Prostate-Specific Antigen</i>)
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RNF135	Ring Finger Protein 135
Rpm	Tours par minute (<i>Rounds per minute</i>)
RPMI	Milieu de l'institut Roswell Park Memorial
RPS6KA3	Ribosomal Protein S6 Kinase
SCC	Carcinome épidermoïde (<i>Squamous Cell Carcinoma</i>)
SHNA	Stéatoses Hépatiques Non Alcooliques (NASH)
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis
SLE	Lupus érythémateux disséminé (<i>Systemic Lupus Erythematosus</i>)
SMD	Syndrome MyéloDysplasique
SMRT	Single Molecule Real Time
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
TACE	Chimioembolisation transartérielle (<i>TransArterial ChemoEmbolization</i>)
TACO	Tomographie Axiale Calculée par Ordinateur
TBE	Tris Borate EDTA
TCF	Facteur de lymphocyte T (<i>T-Cell specific transcription Factor</i>)
TDM	TomoDensitoMétrie
TERC	Composante ARN de la télomérase (<i>Telomerase RNA component</i>)
TERT	Transcriptase inverse de la télomérase (<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>)
TGCA	The Cancer Genome Atlas
TGF- α/β 1	Facteur de croissance transformant (<i>Transforming Growth Factor</i>)
TGO	Oxaloacetate Transaminase
TGP	Glutamate Pyruvate Transaminase
TH	Transplantation Hépatique
TNCD	Thésaurus National de Cancérologie Digestive
TNF	Tumor Necrosis Factor
TP53	Protéine tumorale p53 (<i>Tumor Protein P53</i>)
UCSC	University of California, Santa Cruz
UV	UltraViolet
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'ImmunoDéficiency Humaine
W	Watt
WHO	World Health Organisation

Wnt
X-Gal
 γ GT

Contraction de *Wingless Integration*
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
Gamma glutamyl-transpeptidase ou transférase

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Résumé illustré du projet de recherche.....	19
Figure 2: Carte estimant l'incidence mondiale du cancer hépatique chez l'homme en 2012 [GLOBOCAN, 2012] (1).....	21
Figure 3 : Incidence et mortalité pour 100 000 hommes dans les pays développés et pays en développement (ou pays à hauts revenus et pays à revenus moyens à bas) [GLOBOCAN, 2002] (3).....	21
Figure 4 : Taux standardisé d'incidence sur l'âge du CHC pour 100 000 habitants à risques dans différentes régions du monde [GLOBOCAN, 2008] (4).....	22
Figure 5 : Courbe de tendance de l'incidence du cancer hépatique dans une sélection de pays d'Europe et d'Asie (taux standardisés sur l'âge pour 100 000 habitants) [GLOBOCAN, 2012] (1).....	23
Figure 6 : Taux standardisé d'incidence sur l'âge de l'HCC par ethnie basée sur le registre de 1975 à 2007 [Mittal et al., 2013] (16).....	25
Figure 7 : Mécanismes de la carcinogénèse hépatique.....	27
Figure 8 : Relation entre VHB et aflatoxine dans le CHC [IARC, 2003] (25).....	28
Figure 9 : Surveillance d'un nodule hépatique [inspiré de Stigliano et al., 2007] (71).....	39
Figure 10 : Traitement par radioembolisation.....	43
Figure 11 : Gènes impliqués dans la carcinogénèse hépatique [Nault et al., 2013] (91).....	48
Figure 12 : Activité enzymatique d'une télomérase [Kyell et al., 2011] (93).....	49
Figure 13 : Mutations somatiques du promoteur TERT [Nault et al., 2013] (91).....	51
Figure 14 : Voie de signalisation de la famille Wnt.....	53
Figure 15 : Méthylation des cytosines.....	56
Figure 16 : Représentation schématique des facteurs impliqués dans la condensation de la chromatine.....	57
Figure 17 : Dégradation de l'ADN circulant [inspiré de Lo et al., 2010] (122).....	60
Figure 18 : Composition du plasma après extraction d'ADN circulant [Brock et al., 2015] (137).....	63
Figure 19 : Mécanisme hypothétique du relargage actif et passif des acides nucléiques circulants [Schwarzenbach et al., 2011] (138).....	64
Figure 20 : Tube Cell-Free DNA BCT®.....	66
Figure 21 : Procédure d'extraction de l'ADN circulant par QIAamp [traduction de la notice explicative de Qiagen®].....	69
Figure 22 : Composition du PGEM-T easy™vector [Promega®].....	77
Figure 23 : Mécanisme moléculaire de la transformation par le bisulfite de sodium.....	80
Figure 24 : Séquenceur haut débit MiSeq Illumina ® utilisé au cours de ces expériences [Illumina®].....	82
Figure 25: Cellule d'amplification [Illumina®].....	83
Figure 26 : Principe de la technologie Illumina® [Metzker et al., 2010] (161).....	83
Figure 27: Déroulement d'un cycle séquençage [Metzker et al., 2010] (161).....	84
Figure 28 : Formule d'une thymine modifiée [Illumina/Solexa] [Barnes, 2002] (162).....	84
Figure 29 : Fluorescence observée après chaque cycle [Metzker et al., 2010] (161).....	85
Figure 30 : Electrophorèse des échantillons d'ADN circulant sur Caliper®.....	88
Figure 31 : Mise au point de la PCR de CTNNB1.....	90
Figure 32 : Pourcentage de mutations obtenus sur CTNNB1 pour les 14 échantillons.....	91
Figure 33 : Sélection du couple d'amorce pour l'amplification du promoteur TERT.....	94
Figure 34 : Résultats obtenus pour TERT : PCR, clonage, taux de mutations.....	95
Figure 35 : Mise au point de la PCR au bisulfite.....	99
Figure 36 : Essais de PCR multiplex.....	100
Figure 37 : Vérification de l'insert et pourcentage de méthylation.....	102

<i>Figure 38 : Diagramme à point (dot plot) comparant l'index de méthylation de l'îlot CpG GSTP1 chez des sujets sains comparativement à des patients atteints de cancer de la prostate sur tissu et sérum [Bastian et al., 2005] (170).</i>	106
<i>Figure 39 : Origine de l'ADN analysé [Inspirée de Vallée et Denis, 2013] (174).</i>	111
<i>Figure 40 : Principe de la méthode de "séquençage de la 5ème base" par Swift bioscience [Makarov et al. 2015] (175) .</i>	113
<i>Figure 41 : Séquençage d'ADN par nanopore [Oxford Nanopore Technologies©] (177) ..</i>	114
<i>Figure 42 : Résumé illustré de l'article paru dans l'édition 164 de Cell [Snyder et al., 2016] (123) .</i>	116
<i>Figure 43 : Courbe de décroissance du coût de séquençage d'une mégabase d'ADN [NIH, 2016] (178).</i>	117

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Paramètres de calcul simplifié du score AFP [Duvoux et al., 2012] (76)</i>	<i>41</i>
<i>Tableau 2 : Calcul du score de Child-Pugh</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 3 : Composition du mix compatible avec NEB® Q5 High-Fidelity 2X Master.....</i>	<i>73</i>
<i>Tableau 4 : Programme de PCR recommandé pour NEB® Q5 High-Fidelity 2X Master.....</i>	<i>73</i>
<i>Tableau 5 : Composition du mix compatible avec KAPA® HiFi Hot Start ReadyMix PCR.....</i>	<i>73</i>
<i>Tableau 6 : Programme de PCR recommandé pour KAPA® HiFi Hot Start ReadyMix PCR..</i>	<i>74</i>
<i>Tableau 7 : Composition du mix compatible avec Next NEB® High-Fidelity 2X GC Rich Mix 13A.....</i>	<i>74</i>
<i>Tableau 8 : Composition du mix d'adénylation.....</i>	<i>76</i>
<i>Tableau 9 : Composition du mix pour le clonage</i>	<i>77</i>
<i>Tableau 10 : Composition du mix de vérification de l'insert.....</i>	<i>78</i>
<i>Tableau 11 : Programme de PCR de vérification de l'insert</i>	<i>79</i>
<i>Tableau 12 : Composition du mélange de PCR pré-séquençage</i>	<i>79</i>
<i>Tableau 13 : Programme de PCR pré-séquençage.....</i>	<i>79</i>
<i>Tableau 14 : Composition du mix pour la PCR au bisulfite</i>	<i>81</i>
<i>Tableau 15 : Programme de PCR au bisulfite</i>	<i>81</i>
<i>Tableau 16 : Dosage des concentrations en ADN circulant des échantillons.....</i>	<i>86</i>
<i>Tableau 17 : Programme de PCR touchdown finale pour le promoteur TERT.....</i>	<i>92</i>

RESUME

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le sixième cancer en terme de fréquence et le second en terme de mortalité par cancer à l'échelle mondiale. Il représente à lui seul 90% des tumeurs primitives du foie et apparaît dans 90% des cas sur une pathologie hépatique préexistante : la cirrhose. Une très grande disparité géographique demeure en termes d'étiologies avec une forte incidence dans les pays pour lesquels le virus de l'hépatite B est endémique. Les seuls traitements curatifs sont la transplantation et la résection hépatique. Malheureusement, les techniques de diagnostic et de surveillance actuelles étant limitées, la majorité des patients ne sont diagnostiqués qu'à un stade avancé et ne peuvent être candidats à la chirurgie. Les options thérapeutiques sont donc le plus souvent palliatives. La mortalité est très forte, avec une médiane de survie ne dépassant pas les six mois. L'errance thérapeutique pourrait être compensée par un diagnostic plus précoce, c'est pourquoi le développement de nouvelles stratégies diagnostiques est un véritable enjeu de santé publique.

L'ADN circulant plasmatique a récemment été mis en lumière pour de nombreuses applications. Le développement de cette « *biopsie liquide* » est en pleine expansion dans le but d'une utilisation dans les examens de biologie médicale comme biomarqueur précoce de la tumorigénèse. Cette classe émergente de test moléculaire, qui a déjà fait ses preuves pour diverses applications, pourrait permettre d'obtenir un diagnostic plus précoce, un pronostic plus précis, des informations théranostiques utiles dans le CHC et l'amélioration du confort du patient restreignant la répétitivité des biopsies hépatiques.

Dans cette étude, quatre régions d'intérêt ont été ciblées et sujettes au séquençage de nouvelle génération (NGS) par la technique Mi-seq Illumina® à partir du plasma de 14 patients issus d'une cohorte de 155 patients porteurs d'un CHC hospitalisés dans le service de gastroentérologie du Nihon University Hospital. Les données obtenues portent sur deux loci porteurs de mutations : d'une part, le promoteur du gène codant pour la transcriptase inverse de la télomérase (*TERT*), muté dans 59% des CHC selon une étude de 2013, et d'autre part, le gène *CTNGB1* codant pour la β -caténine, qui est muté dans 26% des lignées cellulaires tumorales HepG2. De précédentes études révèlent en effet un rôle majeur de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement du CHC.

Plusieurs hotspots de méthylation se sont en outre avérés être de marqueurs candidats intéressants. Ce sont des gènes dont les îlots CpG, présents au niveau du promoteur, peuvent subir une méthylation au cours du processus de carcinogénèse. Pour la préparation de la librairie NGS, une PCR bisulfite a été nécessaire dans le but de différencier les cytosines

méthylées des cytosines déméthylées. Les deux promoteurs de gène candidats ont été sélectionnés : *CELF6* et *RNF135*, qui subiraient des modification épigénétiques au cours de la carcinogénèse hépatique.

Ces premières investigations sur 14 patients devront à l'avenir être comparées à un plus grand pool de volontaires sains, et permettront d'élargir l'étude aux ADN circulants déjà extraits des 155 patients de la cohorte. Enfin, de nouvelles technologies de type NGS sont en cours d'optimisation pour améliorer la sensibilité et étendre l'étude à d'autres gènes candidats.

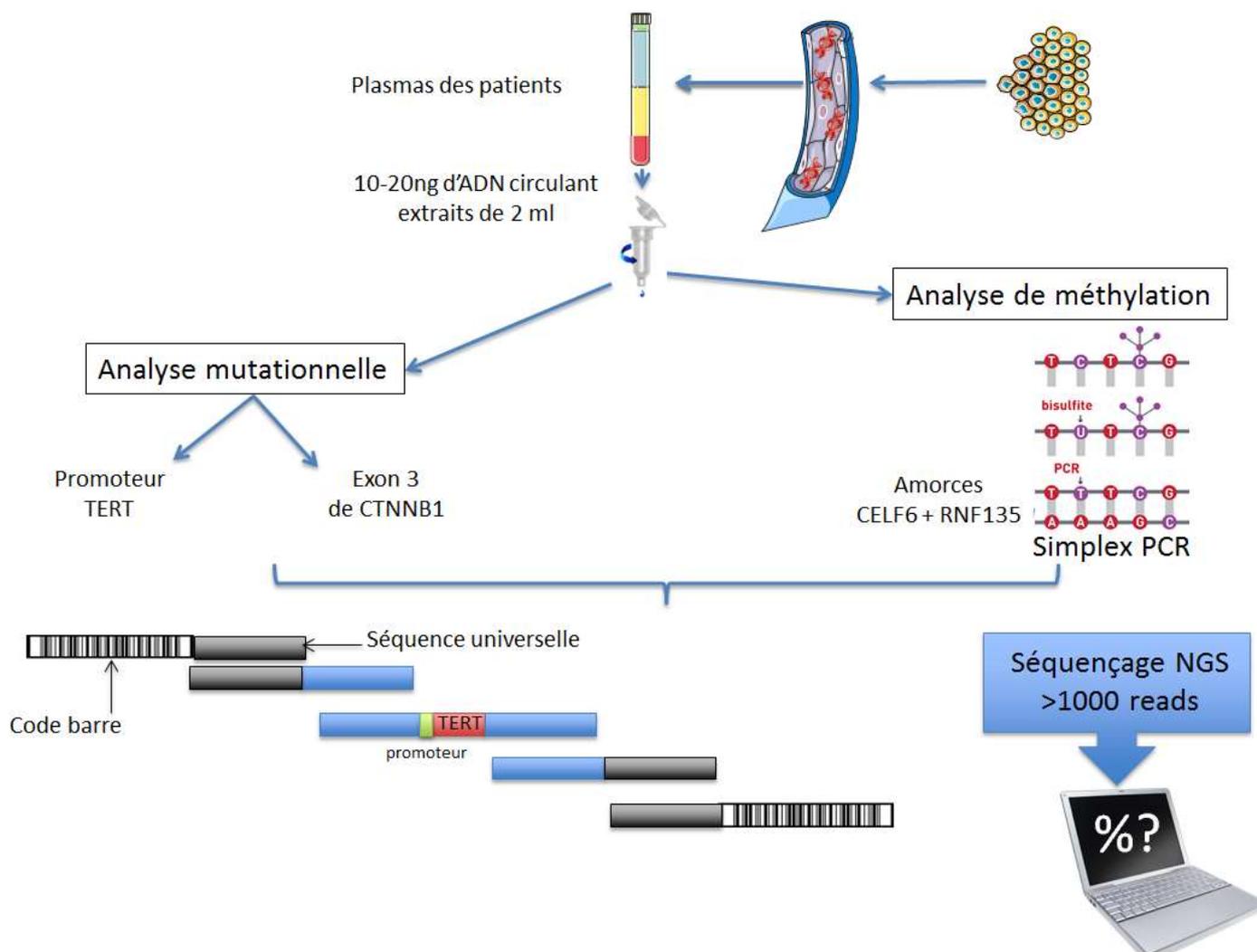


Figure 1 : Résumé illustré du projet de recherche

Mots-clés : carcinome hépatocellulaire, ADN circulant, séquençage haut débit, PCR bisulfite, promoteur TERT, β -caténine, méthylation

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Le carcinome hépatocellulaire

A. Epidémiologie

1) **Généralités**

D'après l'étude GLOBOCAN 2012, menée par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer hépatique est la seconde cause de mort par cancer sur le plan mondial après le cancer du poumon. En 2012, il fut à l'origine de 746 000 décès (9% du total des décès par cancer). Son pronostic est sombre avec un ratio global de mortalité de 0,95 soit un taux de survie à 5 ans de moins de 20%. Lorsque le diagnostic est posé tardivement, comme dans 80% des cas, la survie est alors inférieure à un an. Ainsi les profils de morbidité et de mortalité sont superposables [Cancer IArFo, 2012] (1). Le rapport GLOBOCAN précédent datant de 2008, une nouvelle mise à jour est attendue dans le courant de l'année 2016.

Parmi les tumeurs bénignes qui ne sont pas considérées comme des tumeurs hépatiques à part entière on recense : l'hémangiome, l'adénome hépatique, l'adénome focal hyperplasique, les kystes, lipomes, fibromes et leiomyomes.

Seuls deux types de tumeurs sont actuellement catégorisées comme cancers hépatiques : le carcinome hépatocellulaire ou hépatocarcinome (CHC), et le cholangiocarcinome intrahépatique. Le cholangiocarcinome est rare (5% des cancers hépatiques) et très localisé. Il sévit surtout au Nord-Est de la Thaïlande en raison de la présence d'un parasite : *Opisthorchis viverrini*, une douve colonisant les canaux biliaires du foie [Sripa et al., 2011] (2). L'hépatocarcinome, sujet unique de cette thèse, représente donc à lui seul 95% des cancers primaires hépatiques.

En terme d'incidence, le cancer hépatique est la 5^{ème} cause de cancer chez l'homme avec 554 000 cas, soit 7,5% des cancers. Chez les femmes, il s'agit de la 9^{ème} cause avec 228 000 cas, soit 3,4%. Au total 782 000 cas soit 6% des cancers. La carte ci-dessous (figure n° 2) présente la répartition mondiale de l'incidence du CHC en 2012 avec en bleu foncé les pays à forte endémie : essentiellement l'Asie du Sud-Est et l'Afrique Subtropicale. Malheureusement, étant donné le pronostic sombre du CHC, incidence et mortalité se confondent, c'est pourquoi une seule carte est décrite.

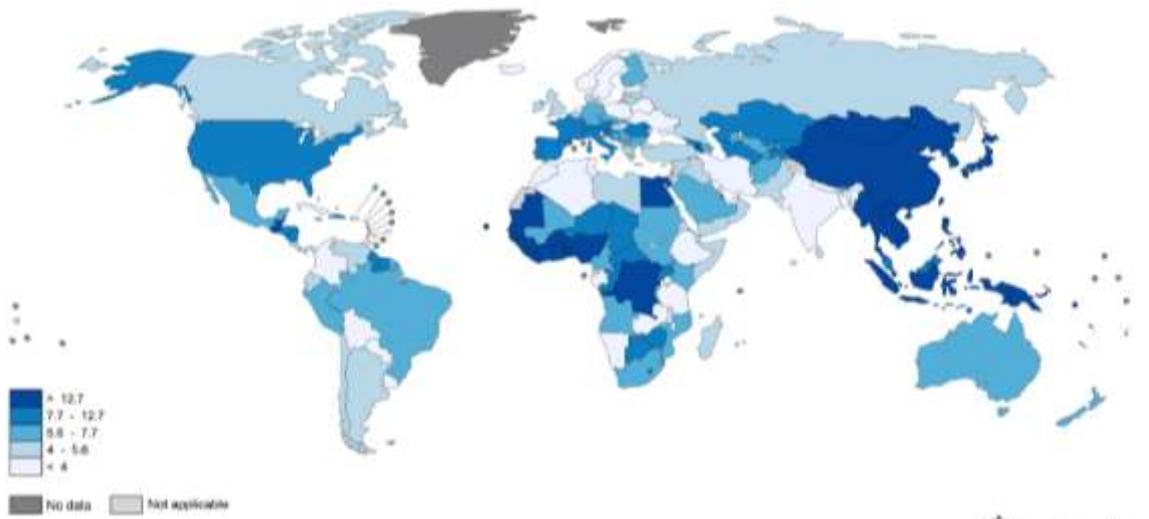


Figure 2: Carte estimant l'incidence mondiale du cancer hépatique chez l'homme en 2012 [GLOBOCAN, 2012] (1)

2) Géographie

L'épidémiologie de l'hépatocarcinome est très variable sur les 5 continents. La figure n°3 présente la prévalence des différents cancers dans les pays développés comparativement aux pays en développement.

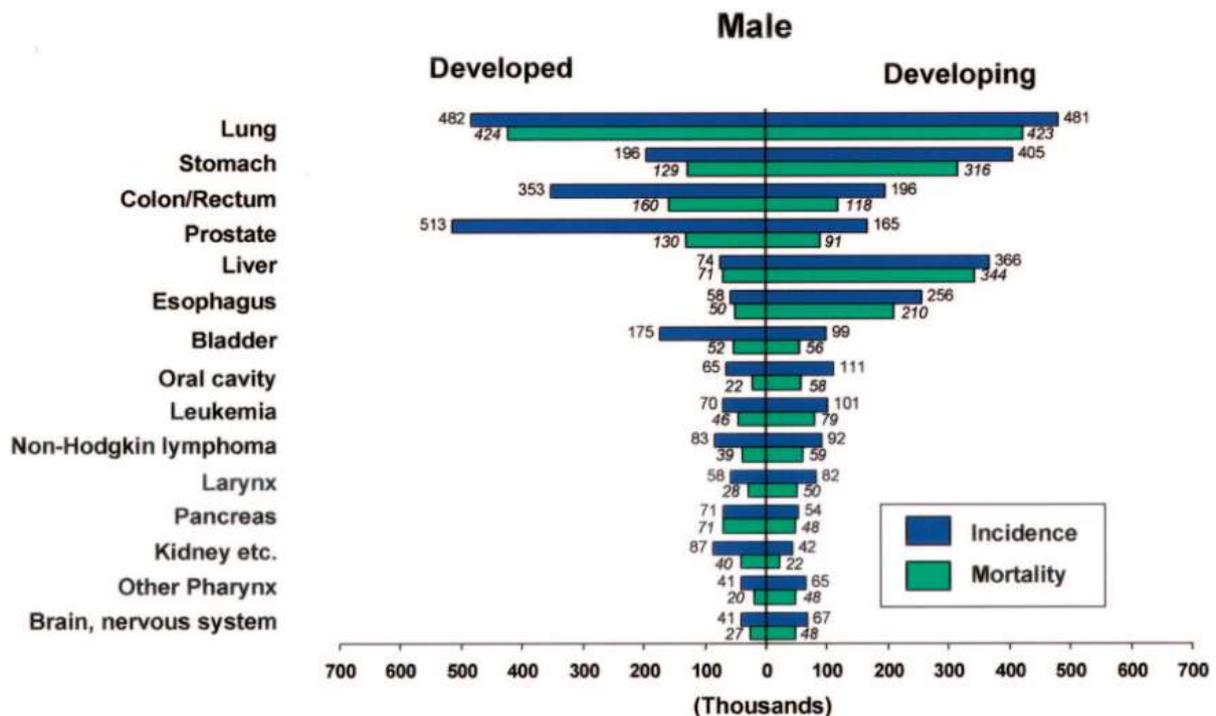


Figure 3 : Incidence et mortalité pour 100 000 hommes dans les pays développés et pays en développement (ou pays à hauts revenus et pays à revenus moyens à bas) [GLOBOCAN, 2002] (3)

On constate sur cette troisième figure que le statut économique du pays semble avoir une influence sur les organes touchés. Le mode de vie et les facteurs de risque qui lui sont associés sont à l'origine de ces disparités. En outre, un bon nombre de cancers de haute incidence dans les pays en développement sont associés à une survie relativement bonne : prostate, cancers colorectaux et cancer du sein chez les femmes (données non présentées), tandis que les cancers les plus courants dans les pays en développement sont associés à un mauvais pronostic : foie, estomac et œsophage [Ferlay *et al.*, 2010] (4).

Sur la figure n° 4 on observe une fracture Nord-Sud corrélée à la prévalence du facteur de risque principal qu'est l'infection par le virus de l'hépatite B dans les pays en voie de développement. Il est à l'origine de 80% des cas. Il en ressort également qu'indépendamment de la localisation géographique, l'incidence chez la femme est moindre. Une explication de ce phénomène sera proposée au chapitre 1 : B. Etiologies.

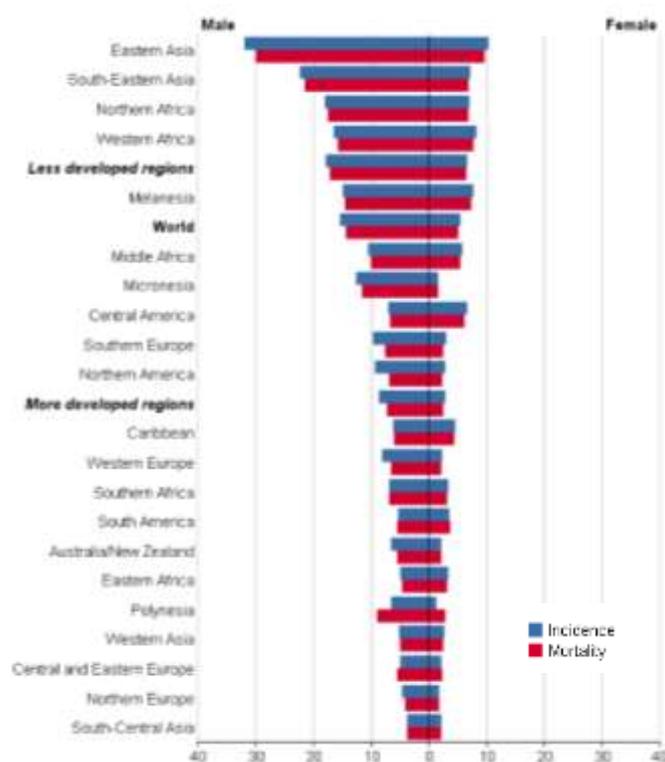


Figure 4 : Taux standardisé d'incidence sur l'âge du CHC pour 100 000 habitants à risques dans différentes régions du monde [GLOBOCAN, 2008] (4)

2. a) Zones de faible incidence

En Europe, en Amérique du Nord et en Australie l'incidence est de 1 à 3 pour 100 000 cas par an. La figure n°5 montre que la tendance de l'évolution du CHC au cours du temps au sein des pays européens représentés est similaire. Le pourcentage de la population atteint d'hépatite B chronique est de 0,1 à 1%. Les facteurs de risques pour cette zone seront l'infection par le VHC, l'éthylisme chronique et certaines maladies métaboliques associées au

surpoids. Dans cette zone, la contamination par l'aflatoxine B₁, une mycotoxine carcinogène, demeure faible en raison du climat et d'un contrôle strict.

L'âge moyen d'apparition d'un cancer hépatique est entre 45 et 55 ans, mais dans les pays développés il est plus tardif ; ceci est dû encore une fois aux différences dans les facteurs de risque.

2. b) Zones de moyenne incidence

En ce qui concerne l'Amérique du Sud, l'Afrique du Nord, le Japon, le Moyen Orient, et l'Inde, l'incidence est entre 3 et 10 pour 100 000 habitants. Là encore c'est l'infection chronique par le VHB qui est majoritairement responsable, à l'exception du Japon (figure n°5, droite), qui sera développé plus loin.

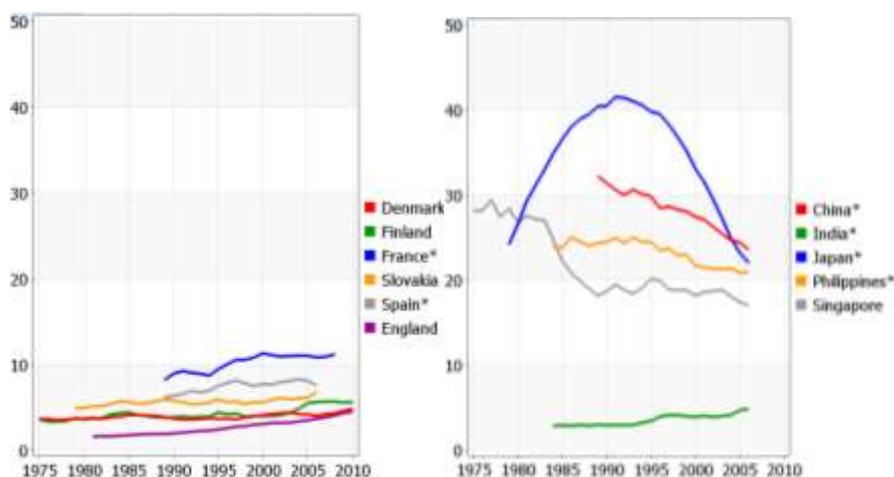


Figure 5 : Courbe de tendance de l'incidence du cancer hépatique dans une sélection de pays d'Europe et d'Asie (taux standardisés sur l'âge pour 100 000 habitants) [GLOBOCAN, 2012] (1)

2. c) Zones d'incidence forte

83% des nouveaux cancers apparaissent chaque année en Asie du Sud-Est et en Afrique subtropicale avec 90 à 150 cas pour 100 000 habitants. La Chine à elle seule en représente 50% avec une incidence de 80 cas pour 100 000 [El Serag et Rudolph, 2007] (5). Cette forte incidence sur le territoire asiatique est visible dans les figures n°4 et 5. L'explication de ces chiffres tient au facteur de risque principal qu'est l'infection par le virus de l'hépatite B, de très forte incidence dans ces pays [Zhang *et al.*, 2004] (6). L'Afrique subsaharienne et l'Asie orientale sont des zones endémiques avec une positivité élevée pour l'antigène Hbs décelée dans plus de 8% de la population. Dans ces mêmes pays, l'incidence du CHC est supérieure à 20 pour 100 000 habitants et 80 à 90% de ces cas résultent d'une cirrhose engendrée par l'un des deux virus [Fattovich *et al.*, 2004] (7).

La contamination des aliments par l'aflatoxine B₁ dans cette zone constitue un second facteur de risque. Il a été montré que l'infection par le VHB et l'exposition à l'aflatoxine B₁ agissent en synergie sur la carcinogénèse hépatique [Wild *et al.* 1992] (8)

Dans les pays développés les traitements proposés sont inefficaces pour les stades avancés, et pour les pays susceptibles de plus forte incidence, il est fréquent qu'aucun traitement ne soit disponible par manque de moyens financiers et de structures sanitaires.

2. d) France/Japon

La France est représentative de l'Europe de l'Ouest, tandis que le Japon est un cas particulier en Asie Orientale. Les résultats à suivre ayant été obtenus dans un laboratoire tokyôite, et la présente thèse étant rédigée en français, nous nous intéresserons plus particulièrement à ces deux régions du monde. Le cancer est la 4^{ème} cause de décès par cancer dans l'archipel japonais ; pour 100 000 habitants l'incidence était de 23651 nouveaux cas (5,7% des cancers) et 20929 décès (9,4%) en 2012. Avec 6500 nouveaux cas en moyenne chaque année (3,3%) et 5929 décès pour 100 000 (6,6%), le cancer hépatique se place aussi à la 4^{ème} place dans l'hexagone. Ces données incluent uniquement la France métropolitaine.

En France, l'incidence annuelle est de 11 chez les hommes et 1,5 chez les femmes pour 100 000 habitants pour les hommes et 1,5 cas pour 100000 pour les femmes soit environ 6000 nouveaux cas par an. Même si la cirrhose hépatique due à une infection sous-jacente par le VHC est en cause, la cirrhose alcoolique reste la cause majoritaire [Bouvier *et al.*, 2004] (9).

Plus de 60% des patients atteints de cancer hépatocellulaire sont infectés par le VHC au Japon [Chen *et al.*, 1997] (10). L'archipel japonais est le berceau du VHC, le génotype 1 y ayant été mis en évidence pour la première fois en 1882. L'une des explications pourrait être une variation d'incidence observée à partir des années 20, lors de la campagne de traitement de la bilharziose par de l'antimoine IV. Les seringues potentiellement contaminées seraient à l'origine de cette épidémie [Iida *et al.*, 1999] (11). Cette contamination est également visible en Egypte à partir de 1940 [Lambert *et al.*, 2009] (12). En 1996, le gouvernement japonais déclare l'éradication complète de *Schistosoma japonica*, l'agent responsable de la bilharziose. Aujourd'hui, au Japon, en ce qui concerne l'origine de la transmission du VHC, une étude montre que 40% de ces patients auraient été transfusés par le passé [Nishioka *et al.*, 1991][Tanaka *et al.*, 2002] (13) (14).

Depuis les années 90, dans les pays développés, on note une nette chute d'incidence due à la prise de conscience d'une nécessité de contrôle des conduites à risques [Chen *et al.*, 2006] (15), notamment les échanges d'aiguilles, et le dépistage systématique des donneurs de

sang et d'organe (1992 pour la France). Tous ces éléments pourraient expliquer la courbe en cloche visible en figure n°5 pour le Japon.

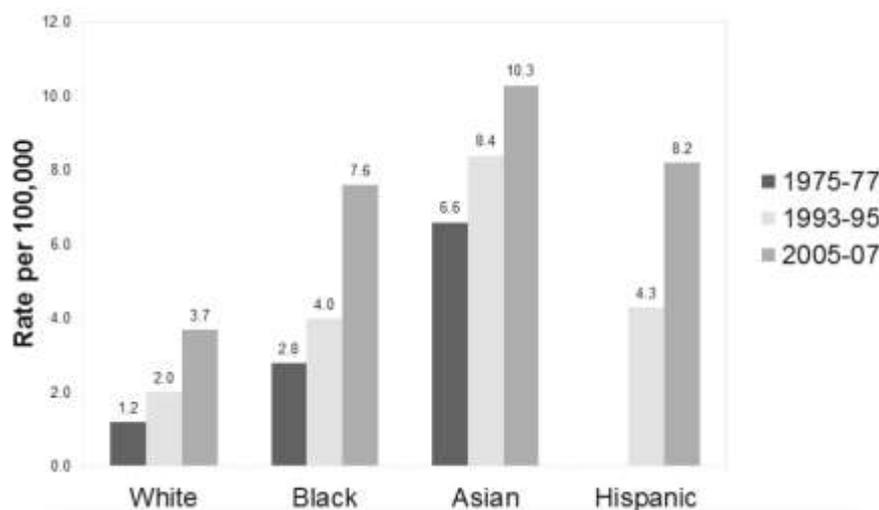


Figure 6 : Taux standardisé d'incidence sur l'âge de l'HCC par ethnie basé sur le registre de 1975 à 2007 [Mittal *et al.*, 2013] (16)

Même si les études ethniques sont aujourd'hui controversées, l'histogramme de la figure n°6, basé sur des données collectées jusqu'en 2007, laisse penser que des facteurs génétiques pourraient influencer sur l'incidence du cancer. Sur un continent aussi économiquement hétérogène que l'Asie, d'après la figure n°2, il semblerait qu'aujourd'hui les taux d'incidence soient proches malgré certaines différences au niveau des facteurs de risque et des modes de vie. On remarque que la susceptibilité accrue chez les hommes est particulièrement prononcée dans les populations asiatiques (figure 4), indépendamment du statut économique. Les facteurs génétiques possiblement impliqués sont encore inconnus. Certaines études se sont penchées sur le sujet mais aucun résultat ne s'est avéré significatif [Yu *et al.*, 1996](17).

3) Conclusion

Ces chiffres sont certainement largement sous-estimés en raison d'une errance diagnostique dans les pays en développement. En tout, il pourrait y avoir plus d'un million de cas par an dans le monde [El-Serag *et al.* 2003] (18).

Une baisse de l'incidence est observée dans les pays en voie de développement avec la démocratisation de la vaccination contre le virus de l'hépatite B et le contrôle strict de la contamination sanguine pour l'hépatite C. *A contrario*, on constate une hausse d'incidence dans les pays développés due à l'augmentation des infections par le virus de l'hépatite C et de l'obésité. En effet, parmi les facteurs de risques les plus récemment établis, on compte les

stéatoses hépatiques non alcooliques (SHNA), en anglais Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) inductrices de cirrhose. Ce phénomène, d'abord constaté aux Etats-Unis et au Canada dans les communautés afro-américaines et hispaniques pourrait, à l'avenir, s'appliquer à l'ensemble des pays industrialisés [Mittal *et al.*, 2013]. Cependant, cette augmentation dans les pays développés serait le fruit du progrès notamment de moyens de diagnostic plus précoces, et non une progression effective de l'incidence.

B. Etiologies

Les différences géographiques que nous venons de voir résultent en partie de l'association du carcinome hépatocellulaire avec des facteurs de risques dépendants des conditions sociodémographiques. Le CHC découle dans la grande majorité des cas d'une pathologie hépatique chronique préexistante. Le risque de développer un cancer hépatique est de 3 à 7 % par an pour un patient cirrhotique [Ikeda *et al.*, 2006] [Sangiovanni *et al.*, 2006] (19) (20) ou atteint d'une fibrose avancée. En effet, 80 à 90% des patients développant un CHC présentent déjà une cirrhose [Murali *et al.*, 2013] (21).

Les agents infectieux sont à l'origine de plus de 25% des cancers dans les pays en développement, comme le papillomavirus pour le cancer du col utérin, *Helicobacter pylori* pour le cancer de l'estomac, certains vers plats pour le cancer de la vessie ou le cholangiocarcinome, et enfin, les hépatites B et C pour l'hépatocarcinome [Fattovich *et al.*, 2004] (7). La distribution géographique des virus des deux hépatites est approximativement la même au sein des pays en voie de développement.

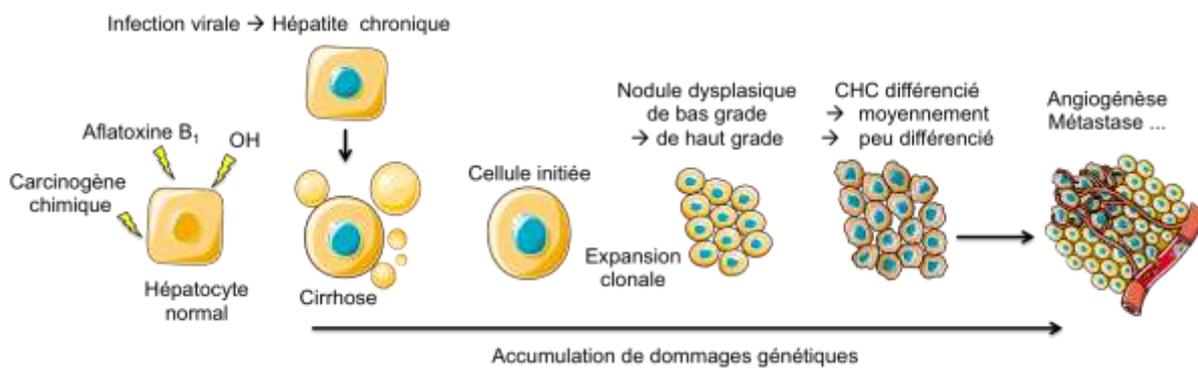


Figure 7 : Mécanismes de la carcinogénèse hépatique

1) **Le virus de l'hépatite B**

Découvert en 1967, le virus de l'hépatite B est un virus enveloppé à ADN circulaire partiellement double brin (3,2kb) de la famille des Hepadnaviridae du genre *Orthohepadnavirus*. Sa taille fait environ 40nm de diamètre.

Dans la population mondiale, 2 milliards de personnes ont déjà été exposées au virus de l'hépatite B et présentent une positivité de l'antigène HBs au niveau sérologique, dont 350 millions de porteurs chroniques. Le virus de l'hépatite B est environ 100 fois plus contagieux que le virus du SIDA [Kiene *et al.*, 1994] (22) .

Bien que dans 30% des cas on ignore le mode de contamination, la transmission peut se faire par le sang, les sécrétions génitales et la salive si présence de microlésions intrabuccales. Elle peut être verticale lors de la grossesse (périnatale lors de l'accouchement), ou horizontale, le mode de transmission majoritaire. Un partage de brosse à dent, une piqûre :

insectes, tatouage, piercing, aiguilles voire même par l'intermédiaire de petites plaies [INPES, 2012] [OMS, 2015] (23) (24).

Ce virus a un effet cancérigène sur les hépatocytes sur différents modèles d'après des expériences *in vivo* et *in vitro*. En effet, l'inflammation persistante engendrée peut évoluer vers une cirrhose puis l'hépatocarcinome. Environ 60% des cancers primitifs du foie au niveau mondial et 67% des cas au sein des pays en développement sont attribuables à une infection chronique par le VHB [IARC, 2003] (25). Un individu présentant une hépatite chronique a 20 fois plus de risque de développer un CHC [IARC, 1994] (26).

Chez les porteurs du VHB, le risque de CHC augmente avec différents types de facteurs : l'ethnie (présence d'ancêtres asiatiques ou africains), le sexe masculin (risque 4 fois plus élevé chez les hommes) [Chang *et al.*, 2000] (27), l'âge (>50 ans), la charge virale (étude REVEAL-HBV) [Chen *et al.*, 2006] (28), la présence d'une cirrhose, la durée de l'infection, et la co-infection avec d'autres virus tels que l'hépatite C, D et le virus de l'immunodéficience humaine [Fattovich *et al.*, 2004] [Mittal *et al.*, 2013] (7) (16).

Le ratio homme/femme s'explique par plusieurs constatations. L'utilisation d'une contraception orale est un facteur de risque d'apparition d'un adénome hépatique. Ceci s'explique par le fait que les adénomes possèdent des récepteurs aux œstrogènes. Cependant, l'utilisation de dérivés de la testostérone comme anabolisant est également un facteur de risque de pathologies hépatiques chroniques : CHC et du cholangiocarcinome. À ce jour, aucune étude n'a pu prouver la significativité du lien entre les concentrations d'hormones sexuelles et le développement du CHC [El Mahdy Korat T *et al.*, 2016] [Maio *et al.*, 2016] (29) (30). Cette différence entre les genres s'expliquerait par la plus forte consommation de tabac et d'alcool chez les hommes [Chen *et al.*, 1997] (10).

Des facteurs environnementaux sont également impliqués – l'exposition aux contaminants alimentaires tels que l'aflatoxine B1 [Cha *et al.*, 2005] (31), le tabac, ou encore l'alcool – et seront développés ci-après. Tous ces éléments sont autant de cofacteurs aggravants des hépatites.

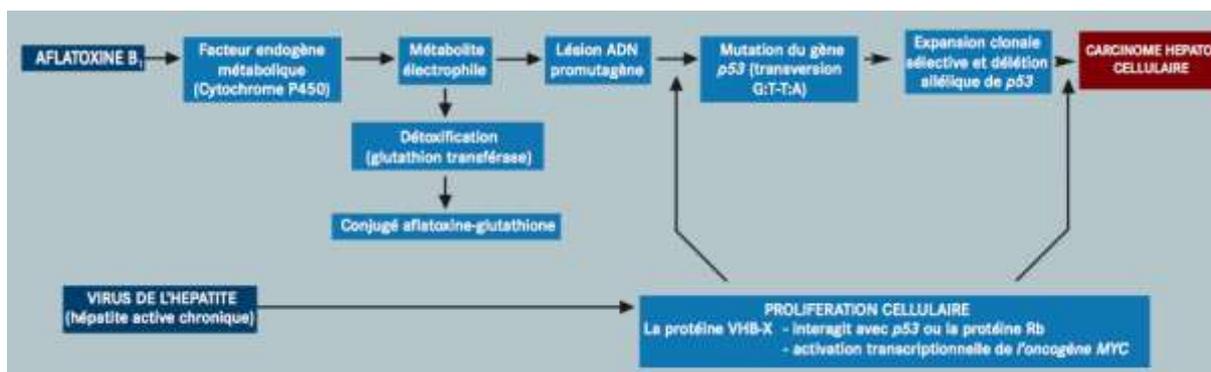


Figure 8 : Relation entre VHB et aflatoxine dans le CHC [IARC, 2003] (25)

Le virus de l'hépatite B provoque le processus de carcinogénèse des hépatocytes par la désorganisation de leur génome. Premièrement, l'ADN viral peut s'intégrer à celui des cellules, et pourrait influencer l'expression de certains gènes. Deuxièmement l'antigène Hbx, transactivateur et potentiellement oncogène, augmenterait la transcription du mitogène TGF- α , même si le mécanisme en jeu n'est pas encore totalement élucidé [Kim et Rho 2002] (32).

Aujourd'hui dix différents génotypes du virus de l'hépatite B ont été mis en évidence, allant de A à J. Leur distribution géographique spécifique sert de marqueur épidémiologique. Le génotype G a été reporté en France, en Allemagne et aux Etats-Unis tandis que le génotype J, découvert le plus récemment, est spécifique des îles Ryûkyû au Japon. Il existe un lien entre génotype et mode de transmission. En effet, les génotypes asiatiques B et C sont plus fréquents dans les zones de transmission périnatale (ou verticale) du virus [Wagner *et al.*, 2014] (33). De plus, le nombre de copies d'ADN viral dans le sérum détermine l'évolution de la pathologie hépatique. Le nombre de copies étant plus élevé chez les patients atteints du VHB de génotype C, ce typage peut permettre de présager de l'efficacité du traitement et de l'issue de l'hépatite [Lin *et al.*, 2013] (34).

2) Le virus de l'hépatite C

Découvert en 1989, le virus de l'hépatite C (VHC) est initialement désigné par le nom d'hépatite « *non-A non-B* » (NANBH). C'est un virus enveloppé à ARN de la famille des Flaviviridae du genre *Hepacivirus* d'une taille d'environ 60nm de diamètre. Contrairement au VHB, il ne s'intègre pas au génome de l'hôte.

La prévalence du VHC est différente de celle du VHB car elle reste relativement élevée dans les pays développés comme par exemple le Japon, l'Espagne, l'Italie, l'Egypte. Ce virus constitue notamment la cause principale de CHC aux Etats-Unis. Généralement, le CHC se développe entre une à deux décennies après l'infection par le VHC. Il est responsable de 15 à 20% des CHC au niveau mondial [Mittal *et al.*, 2013] (16).

Alors que dans les pays en voie de développement l'incidence du CHC est en train de diminuer, on constate un doublement d'incidence et de mortalité du CHC aux Etats-Unis et en Europe dans les années 2000 par rapport aux années 1980 [Deuffic *et al.*, 1998] [El-Serag *et al.*, 2002] (35) (36). Aux Etats-Unis entre 1975 et 2005, on constate même un triplement de l'incidence [Altekruse *et al.*, 2009]. Cette augmentation peut être expliquée par l'accroissement de l'incidence des infections par le VHC et de l'obésité, mais pourrait être biaisée par les améliorations de la prise en charge des patients qui augmenteraient le nombre

de diagnostics. La diminution d'incidence dans les autres pays au cours de cette même période est due en majorité à la mise en place d'une prévention vaccinale.

De la même façon que pour l'hépatite B, la transformation maligne serait due à l'inflammation des cellules infectées et à la formation de fibrose. Le génotype 1b du virus causerait deux fois plus de CHC que les autres génotypes [Raimondi *et al.*, 2009] (37). En France, chaque année, on compte au moins 4000 nouveaux cas de CHC, dont 30% sont liés à l'hépatite C, mais la cause majoritaire reste la cirrhose alcoolique [Boudjema *et al.*, 2006] (38).

3) Aflatoxine

L'aflatoxine est un carcinogène produit par les champignons *Aspergillus flavus* (aflatoxine B1 et B2) et *A. parasiticus* (B1, B2, G1 et G2) dans les céréales, le manioc, les arachides, ou encore le soja fermentés conservés en régions et/ou dans des conditions chaudes et humides. La contamination alimentaire est commune en Afrique Sub-saharienne, Amérique du Sud, et en Asie de l'Est. De plus, dans certaines zones au sein de ces territoires, jusqu'à 20% des individus sont porteurs de VHB. Le risque de développer une CHC chez les patients VHB est multiplié par 60 en cas d'exposition prolongée à l'aflatoxine B1 [Qian *et al.*, 1994] (39).

In vivo l'aflatoxine réagit avec les cytochromes pour former des adduits à l'ADN. L'intoxication est observable par dosage des adduits sur l'albumine sérique ou urinaire. Dans les régions concernées sus-citées, ces adduits sont détectables chez 95% de la population. L'aflatoxine B1 provoque des mutations du gène suppresseur de tumeur TP53. Cette mutation est une transversion de type G>T à la dernière base du codon 249 de l'exon 7 (AGG>AGT soit la substitution d'une arginine par une sérine). Elle provoque également des mutations sur d'autres codons ainsi que dans d'autres gènes impliqués dans la cancérogenèse hépatique [Bressac *et al.*, 1991] (40).

4) L'alcool

Un éthylysme chronique de plus de 10 ans peut engendrer un CHC par le biais du développement d'une cirrhose alcoolique. C'est la cause majeure en Amérique du Nord et en Europe, dont la France est représentative [Donato *et al.*, 2002] (41). Malgré cela, le potentiel carcinogène de l'alcool en lui-même consommé de façon modérée n'a pas été prouvé. Dans le CHC, il agit essentiellement en synergie avec les virus des hépatites en accélérant le processus de fibrose. Le risque de cirrhose est multiplié par plus de 2 chez les patients VHC ingérant plus de 40 à 160g d'éthanol par jour, correspondant à plus de 4 verres standardisés par jour (4 unités d'alcool dans la pratique clinique). Le risque est multiplié par 3 pour le

VHB [Hutchinson *et al.*, 2005] (43). La prévalence des CHC chez les patients atteints de cirrhose alcoolique varie de 7 à 13 % [Nalpas *et al.* 1992] (44).

5) Autres causes

Il existe un lien entre le CHC et les syndromes métaboliques, en particulier l'insulino-résistance ou diabète [El-Serag *et al.*, 2004] (45) et l'obésité [Caldwell *et al.*, 2004] (46) qui peuvent, à terme, provoquer des stéatoses. C'est la cause principale de maladie hépatique chronique aux Etats-Unis. Celles-ci porte le nom de stéatoses hépatiques non alcooliques (SHNA ou NASH en anglais), faisant partie des NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease). Le risque de développer un CHC est limité avec une incidence inférieure à 2,5%. Il est bien moindre qu'avec les autres cirrhoses, notamment celles dues au VHC [Arase *et al.*, 2012] [Kawamura *et al.*, 2012] (47) (48).

Au niveau des facteurs génétiques, il a été montré que certaines mutations dans les gènes de la GST (Glutathione S-transférase) (GSTM1 or GSTT1) et du TNF α (Tumor Necrosis Factor) augmenteraient le risque de CHC.

Certaines intoxications sont aussi impliquées : l'exposition au Bétel (Noix d'Arec machée en Asie), au chlorure de vinyle (utilisé dans la fabrication des plastiques) et à l'arsenic favorisent l'angiosarcome hépatique. L'hémochromatose (surcharge histologique en fer du foie), le déficit en α 1-antitrypsine, la tyrosinémie, les porphyries *cutanea tarda*, la maladie de Wilson [Kowdley *et al.*, 2004] sont d'autant de facteurs pouvant aggraver le risque de CHC.

Le rôle du tabac dans la carcinogénèse hépatique a été suspecté mais reste encore controversé [McGlynn *et al.*, 2005] (49), de même pour les contraceptifs oraux [Bosch *et al.*, 1988](50).

Le café quant à lui aurait un effet protecteur du CHC dans les consommations fortes à modérées en réduisant la fibrose hépatique. Ceci s'expliquerait par la capacité à faire diminuer le taux d'insuline réduisant ainsi le risque de diabète. D'autres études montrent que le café en lui-même aurait des propriétés anti-carcinogéniques [Modi *et al.*, 2010] [Huxley *et al.*, 2009] (51) (52).

C. Prévention

Mis au point en 1976, le vaccin contre l'hépatite B est aujourd'hui obligatoire en France pour le personnel soignant. Il est fortement recommandé chez les nourrissons, les enfants/adolescents non antérieurement vaccinés, et dans les populations à risque : entourage d'une personne porteuse chronique de l'hépatite B, personnes ayant plusieurs partenaires sexuels, toxicomanes, voyageurs en pays d'endémie.

De nombreux pays dans le monde ont adopté la vaccination et son efficacité a été prouvée par une réduction rapide de l'hépatocarcinome dans la population. Le meilleur exemple reste Taïwan où l'incidence du VHB a chuté à 1,2% et celle du CHC a été réduite de 70% en 20 ans chez les enfants vaccinés [Zanetti *et al.*, 2008] (53). L'interféron α , obtenu par génie génétique, est une molécule utilisée dans le traitement des hépatites B et C chroniques. En ce qui concerne l'hépatite B chronique, il n'a pas été prouvé que l'interféron α réduise significativement l'incidence du CHC [Bruix *et al.*, 2011] (54).

Malheureusement, il n'existe pas de vaccin contre l'hépatite C. Ce virus à ARN présente différents génomes qui varient au cours du temps, ce qui s'avère problématique pour la création d'un vaccin garantissant une immunité à long terme.

La prévention vis-à-vis de l'exposition à l'aflatoxine B₁ en Afrique et Asie du Sud se traduit par l'amélioration des conditions de stockage des aliments susceptibles d'être contaminés par les micro-organismes produisant la toxine.

L'éthylisme chronique étant également un fléau quasi-universel, encourager une consommation modérée semble être une bonne mesure prophylactique.

D. Aspects cliniques du CHC

1) **Généralités**

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain. De forme triangulaire, il est situé majoritairement dans la cavité droite abdominale au-dessus du duodénum et est divisé en quatre lobes chacun séparés par un septum.

Ses fonctions sont des plus importantes. Il permet notamment le maintien de la glycémie par la formation de glycogène, synthétise l'urée, l'albumine, les protéines de l'hémostase, des vitamines, des apoprotéines pour le transport lipidique, secrète de la bile dans le duodénum, détruit les hématies...

Il est irrigué par l'artère hépatique apportant du sang riche en oxygène et par la veine porte déversant le sang de l'intestin. Nous verrons qu'une chimiothérapie locale peut être injectée via ces vaisseaux.

En cas d'inflammation au niveau hépatique, au cours de la régénération des hépatocytes provoquée par une pathologie virale chronique ou une cirrhose, on observe l'apparition d'altérations génétiques et la formation de nodules d'hépatocytes dysplasiques. Il faut quelques décennies pour observer une évolution en CHC. Les carcinomes sont des tumeurs ayant une origine épithéliale, ils représentent 90% des cancers humains. Les métastases hépatiques peuvent avoir une origine : colique, gastrique, pancréatique et sont présents dans la majorité des cancers généralisés [IARC, 2005] (55) [Leroy et Cremoux, 2014] (57).

2) **Sémiologie**

Les symptômes du CHC sont ceux de la cirrhose, son aggravation est souvent révélée par une hypertension portale ou une insuffisance hépatocellulaire (IHC). Les symptômes de l'hypertension portale sont l'ascite (épanchement de liquide au niveau abdominal), la splénomégalie (augmentation du volume de la rate), les œdèmes des membres inférieurs, une circulation veineuse collatérale abdominale (veines apparentes) et les varices œsophagiennes. Ceux de l'insuffisance hépatocellulaire peuvent être un angiome stellaire (lésion vasculaire bénigne de la peau de forme étoilée), une érythrose palmaire, un hippocratisme digital (ongles bombés hypertrophiés), un ictère (coloration jaune de la peau), un prurit (démangeaison), un hypogonadisme, une leuconychie (ongles blancs). A terme, on peut voir apparaître une encéphalopathie.

Même si 28% des patients sont asymptomatiques à la découverte d'un CHC, des signes généraux de carcinogénèse peuvent également amener le patient à consulter un médecin : présence d'une masse palpable au niveau de l'hypochondre droit, nausées, anorexie, malaise

général ou plus rarement une fièvre. Une tumeur sera palpable à partir de 10^9 cellules et visible à l'échographie à partir de 10^8 cellules [Teicher, 2009] (58).

3) Biologique générale

Sur le bilan d'hémostase, l'insuffisance hépatocellulaire se traduit par une diminution du TP (taux de prothrombine), du facteur V de la coagulation. On note aussi une baisse de la bilirubine à prédominance conjuguée parfois mixte et dans les cas sévères, une hypoalbuminémie. L'hypersplénie se traduit par une neutropénie, anémie et surtout une thrombopénie.

Une augmentation de l'activité de la cirrhose, quant à elle, se reflète par une augmentation des transaminases sériques : ASAT (ASpartate AminoTransférase) appelée aussi TGO (Oxaloacetate Transaminase) et ALAT (ALanine AminoTransférase) ou TGP (Glutamate Pyruvate Transaminase) [Fattovich *et al.*, 2004] (7). Les γ GT et les PAL (Phosphatases ALcalines) peuvent être normales à augmentées. L'ALAT est relativement spécifique du foie, alors que l'ASAT est plus spécifique du cœur, bien qu'elle se retrouve également dans les hépatocytes. Les ASAT seront supérieures aux ALAT en cas de cirrhose alcoolique (rapport ASAT/ALAT>1).

Il est à noter qu'aucun facteur biologique n'est spécifique de la cirrhose et qu'un bilan normal n'exclut pas son diagnostic.

4) Marqueurs tumoraux

De nombreuses tumeurs secrètent des protéines dans la circulation générale qui peuvent être utilisées comme marqueurs tumoraux en pratique clinique. Les plus couramment utilisés pour le diagnostic et le suivi sont : le PSA (*Prostate Specific Antigen*) dans le cancer de la prostate, l'ACE (Antigène CarcinoEmbryonnaire) dans le cancer du côlon, le CA 15.3 (*Cancer Antigen*) dans le cancer du sein, le CA 125 dans le cancer de l'ovaire, le CA 19.9 dans les tumeurs pancréatiques, le NSE (*Neuron Specific Enolase*) dans le cancer du poumon à petites cellules, le CYFRA-21-1 (*Fragment 21 de la Cytokeratine 19*) dans le carcinome épidermoïde, le SCC (*Squamous Cell Carcinoma*) dans le cancer épidermoïde et les carcinomes des épithéliums pavimenteux du col de l'utérus.

Le CA 19.9 (*Carbohydrate antigen 19.9*) a une valeur élevée dans 70% des tumeurs pancréatiques mais aussi dans 50% des tumeurs hépatiques. Il est également élevé dans au moins 25% des tumeurs coliques, gastriques, œsophagiennes mais également dans 10% des tumeurs non digestives. Il n'est pas utilisé, car en raison d'un manque de spécificité et de

sensibilité, il pourrait s'avérer dangereux en cas de valeur interprétée comme faussement rassurante (faux négatif) [Steinberg *et al.*, 1990] (59).

Chaque année l'on découvre de nouveaux marqueurs tumoraux protéiques. Tout récemment, en août 2015, une équipe a mis en évidence un nouveau marqueur spécifique du cancer pancréatique : le glypican-1 (GPC1). Il s'agit d'une protéine de liaison membranaire qui est surexprimée spécifiquement dans les exosomes dérivant des cellules pancréatiques cancéreuses. Elle permet un diagnostic dès le stade le plus précoce de la maladie sur un simple prélèvement sanguin dans lequel on recherche les exosomes circulants de façon très sensible et très spécifique [Melo *et al.*, 2015] (60).

L'ADN circulant est en phase de devenir un marqueur tumoral universel de nouvelle génération. Pour lors, les marqueurs tumoraux actuels permettent une orientation du diagnostic seulement dans certains cas, en raison de leur manque de spécificité. Ils ne peuvent remplacer l'imagerie.

4. a) L'AFP

L'alpha-fœtoprotéine (AFP) est une glycoprotéine de transport tout comme l'albumine, sa masse est de 67kDa. Elle achemine des acides gras dont l'acide arachidonique dans les cellules. Elle est synthétisée au cours du développement embryonnaire et fœtal par le foie et le sac vitellin avec un pic entre la 12^{ème} et la 14^{ème} semaine de grossesse. En cas de prématurité on note un taux augmenté à la naissance. Dans le sang maternel, cette protéine provient du transfert placentaire et le taux augmente jusqu'à la 30^{ème} semaine puis diminue. Après l'accouchement, le taux chute : la demi-vie de l'AFP est de 5 à 7 jours. Un taux élevé pendant la grossesse est toujours pathologique. Cette molécule est donc utilisée en obstétrique pour la détection anténatale de la trisomie 21. Une concentration élevée hors grossesse a été identifiée dans de nombreuses études comme prédictive du développement futur d'un CHC [Ganne-Carié *et al.*, 1996] (61). Son dosage est généralement effectué dans les laboratoires d'hormonologie sur tube sec de sang ou de liquides divers (liquide de kyste, LCR et liquide amniotique), par technique d'immunoanalyse ICMA (Immunochemiluminometric Assay ; B63). Sa valeur est jugée physiologique si elle est inférieure à 10ng/ml. L'AFP reflète la destruction hépatocytaire avec les transaminases mais donne aussi une idée de la taille de la tumeur. Plus la tumeur est de petite taille, plus la sensibilité est faible. Avec une sensibilité faible (60%), ce n'est pas un bon moyen de surveillance.

L'AFP n'est pas spécifique du CHC, elle peut être élevée dans d'autres cas : grossesse, mucoviscidose, hépatites aigües ou chronique, hémochromatose, tyrosinémie, ataxie-

télangectasie et certaines pathologies familiales. De plus, elle est augmentée dans de nombreux autres cancers : cholangiocarcinome, hépatoblastomes, cancer du pancréas, des voies biliaires, du colon, de l'estomac, des testicules, voire même dans les leucémies et mélanomes.

Même si un seuil à partir de 200 à 400 ng/ml évoque un passage de la cirrhose au stade CHC, une AFP supérieure à 400ng/ml ne permet pas à elle seule de poser le diagnostic [EASL, 2012] (62).

Il existe une hétérogénéité moléculaire des différentes formes d'AFP en fonction de leur degré de fucosylation, de leur taille et de leur charge électrique. Ainsi une séparation des isoformes en électrophorèse d'affinité sur gel d'agarose traité par le LCA (*Lens Culinaris Agglutinin A*) permet d'isoler 3 formes : L1, L2 et L3. Les isoformes L1 et L3 caractérisent les patients atteints de CHC. Cette technique permettrait d'augmenter la sensibilité mais n'est pas réalisée en routine [Ikeda *et al.*, 1998] (43).

La pertinence de l'AFP laisse à désirer mais la combinaison du dosage de l'AFP avec l'imagerie augmente la qualité de la surveillance. Elle peut s'avérer utile également dans le suivi post-chirurgical.

4. b) La DCP (déγ-carboxyprothrombine)

Le foie permet la γ -carboxylation de la prothrombine au niveau d'un résidu acide glutamique. Cette réaction est dépendante de la vitamine K et est indispensable à la coagulation sanguine. Dans le CHC, ce système de carboxylation est déficitaire (< 5 %), même sans déficit en vitamine K (PIVKA II : vitamin K absence II). Les métabolismes du facteur IX de la coagulation et de la protéine C sont également altérés par ces mécanismes. La prothrombine devient une dé- γ -carboxyprothrombine : DCP. Selon les études publiées, sa sensibilité serait de 28 à 90% et sa spécificité de 44 à 100% pour le diagnostic du CHC. Une méta-analyse de 2014 montre que la DCP serait meilleure que l'AFP dans la différenciation des patients avec un CHC de ceux ayant une pathologie hépatique chronique sans malignité. La combinaison des deux n'aurait pas d'effet bénéfique pour les stades précoces [Li *et al.*, 2014] (63). Avec seulement 20 % de positivité pour des tumeurs inférieures à 3cm, le marqueur de choix pour le carcinome hépatocellulaire reste à établir [Weitz *et al.*, 1993] (64).

Une très récente étude japonaise de novembre 2015 a montré qu'une élévation des taux d'AFP et de DCP après 24 semaines de traitement par anti-VHB (Ribavirine et Interféron alpha) est fortement associée au développement d'un CHC indépendamment de la réponse virale. Ces résultats sont d'autant plus probants chez les patients ayant déjà été traités auparavant pour un CHC (synonyme de rechute). Ceci suggère que l'association de ces deux

paramètres aurait une bonne valeur prédictive dans des cas particuliers, tels que chez les patients cirrhotiques atteints de VHB [Shakado *et al.*, 2015] (65).

5) L'imagerie

5. a) L'échographie

Le moyen de dépistage de référence pour les patients à risque reste donc l'échographie abdominale associée au dosage de l'AFP. En effet, l'échographie est un moyen simple et accessible dans le monde entier car peu onéreux. Elle a une sensibilité de 65 à 80% et une spécificité supérieure à 95%.

Un contrôle tous les 6 mois est recommandé par l'AASLD [Trinchet, 2011] (66) pour les patients présentant une cirrhose ainsi que d'autres catégories de patients à risques comme les porteurs chroniques du VHB. Il permet le diagnostic précoce d'une masse hépatique suspecte de type lésion nodulaire focale. Selon un essai randomisé effectué en Chine, un contrôle régulier échographie + AFP permettrait de réduire de 37% la mortalité des CHC (9371 patients) comparativement à une absence de surveillance (9443 patients). Le groupe de témoins sans suivi se contentait d'un accès aux établissements de soin s'ils en ressentaient le besoin [Zhang *et al.*, 2004] (6).

Le dépistage du CHC chez les patients atteints de cirrhose est entré dans la pratique dans la plupart des pays occidentaux [Chalasanani *et al.*, 1999] (67) mais reste contesté chez les patients non cirrhotiques atteints d'hépatite chronique asymptomatique [Monge, 2016] (68). L'échographie met difficilement en évidence la présence de petits nodules et le diagnostic de CHC n'est posé que dans 1 cas sur 3 [Trinchet *et al.*, 2011] (66). D'autres inconvénients sont la difficulté de réalisation chez les patients présentant une obésité et son caractère opérateur dépendant.

Le scanner et l'IRM sont de meilleurs outils d'imagerie que l'échographie, mais leur utilisation est réservée à la classification de la tumeur plutôt que pour la surveillance en raison de leur coût [Singal *et al.*, 2014] (69).

5. b) Le scanner

La tomodensitométrie est communément appelée Scanner (CT-scan en anglais pour Computerised tomography). Un scanner thoraco-abdominal sera réalisé après une échographie montrant une masse suspecte ou un nodule sur le foie. La TDM avec injection de produit de contraste permet d'apprécier les caractéristiques de cinétique de rehaussement de la masse suspecte et de vérifier la présence ou l'absence d'autres nodules ou métastases ganglionnaires, osseuses, pulmonaires, surrénaliennes, péritonéales.

Radiologiquement, la cirrhose se définit par la visualisation du tissu fibreux et de nodules de régénération, d'une dysmorphie hépatique, d'une hypertension portale (anomalie morphologique).

Quant à un CHC, il se définit par « *la présence d'un nodule hypervascularisé au temps artériel précoce avec washout à la phase portale ou tardive par rapport au tissu sain au scanner hélicoïdal avec triple acquisition artérielle* ». En des termes simples, il s'agit d'une accumulation anormalement rapide et importante de produit de contraste suivie d'un lavage également anormalement précoce par rapport au reste du parenchyme hépatique sain après injection intraveineuse du produit de contraste lors du scanner.

Les nodules hypodenses sont typiquement des macronodules cirrhotiques à surveiller de près car susceptibles de se transformer en CHC. Contrairement à la biopsie, l'imagerie ne permet pas de différencier un CHC d'un cholangiocarcinome [EASL 2012] (62).

5. c) Autres

L'IRM est plus sensible pour de plus petites tumeurs et donne des images plus précises permettant de voir une éventuelle atteinte de la vascularisation hépatique. Une petite tumeur est définie comme étant inférieure à 5 cm ou plusieurs nodules inférieurs à 3 cm.

La fibroscopie œsogastroduodénale est utilisée pour repérer la présence de varices œsophagiennes ou stomacales résultant du CHC. Leur saignement peut provoquer à terme une anémie. Elles doivent être prises en charge.

6) **Biopsie**

La biopsie est un prélèvement de cellules du tissu sain et du tissu tumoral. Elle se fait par guidage échographique ou scannographique si le foie est supposé non cirrhotique. La biopsie comporte un risque d'essaimage sur un foie cirrhotique. Elle est effectuée si les examens précédents n'ont pas permis de mettre en évidence un CHC.

Le recours à des méthodes de diagnostic non invasives expose à un risque d'erreur. La preuve histologique fait foi et sert de référence au diagnostic. 70% des CHC sont confirmés lors de la biopsie. Malheureusement, elle est parfois difficilement réalisable. Elle doit être effectuée avec une aiguille de 14 à 18G, les aiguilles plus fines permettant une analyse cytologique mais pas une analyse histologique correcte. Du tissu sain et du tissu tumoral doivent être prélevés en même temps pour une comparaison. Ces tissus inclus en paraffine, après analyse anatomopathologique et cytologique, pourront être utilisés pour la biologie moléculaire dans les laboratoires de biologie médicale pour identifier d'éventuels marqueurs qui permettront d'orienter le traitement, de confirmer le diagnostic, voire d'établir une

classification. C'est pourquoi l'absence de biopsie est pénalisante. Malgré tout, une biopsie négative n'exclut pas le diagnostic. Elle permet toutefois de différencier le CHC des nodules bénins ou non hépatocytaires (cholangiocarcinome) ainsi qu'un sous-typage de bas et hauts grades en cas de nodules dysplasiques [Vullierme *et al.*, 2010] (70). Les nodules de régénération précèdent les nodules dysplasiques, qui précèdent les nodules d'hépatocarcinome.

Un des risques de la biopsie est l'essaimage de la tumeur ; c'est pourquoi l'aiguille utilisée est coaxiale et bénéficie d'une protection du trajet pariétal. Ce risque est de 2% et la décision doit être prise en réunion pluridisciplinaire (RCP).

On s'affranchit de la biopsie dans les cas suivant : [Bruix, 2011] (54) selon l'AASLD

- Certitude du diagnostic de cirrhose
- Imagerie dans les bonnes pratiques d'utilisation
- Discussion en RCP

Les nodules inférieurs à 1 cm sont surveillés par imagerie tous les 3 mois. En cas de disparition ou de stabilisation du diamètre pendant 2 ans, la surveillance se fera ensuite au rythme habituel.

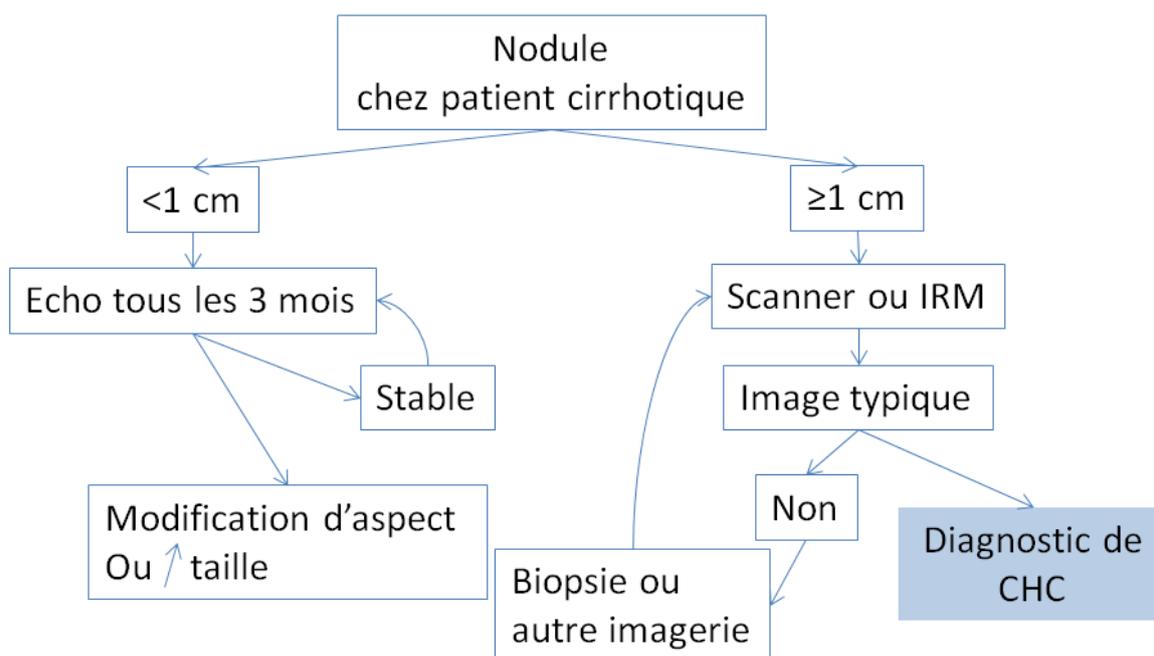


Figure 9 : Surveillance d'un nodule hépatique [inspiré de Stigliano *et al.*, 2007] (71)

7) Surveillance

7. a) Critères pronostics

Il n'y a pas de consensus sur la classification pronostique à utiliser. L'Association européenne pour l'étude du foie EASL (*European Association for the Study of the Liver*) ou l'organisation européenne pour la recherche et le traitement des cancers EORTC (*European Organisation for the Research and Treatment of Cancer*) recommandent une échographie

chaque semestre pour le dépistage chez les patients atteints de cirrhose sans dosage de l'alpha-foetoprotéine. Ces mesures permettent le diagnostic à un stade curable dans plus de 70% des cas [EASL 2012 ; TNCD 2011] (62) (72).

L'AASLD (*American Association for the Study of Liver Diseases*), l'association américaine pour l'étude des maladies du foie, quant à elle, rédige les critères de surveillance après diagnostic d'une cirrhose :

- Masse <1cm : échographie tous les 3-4 mois
- Masse entre 1 et 2 cm : scanner + IRM sinon biopsie
- Masse > 2cm : scanner ou IRM + AFP sinon biopsie

Les méthodes alternatives Fibrotest®, Fibromètre®, Hepascore®, Fibroscan® validées par l'HAS sont non-invasives, et diagnostiquent les cirrhoses induites par le VHC, mais ne sont pas encore validées pour le CHC [HAS, 2013] (73).

8) Traitement

Les patients diagnostiqués à un stade précoce peuvent avoir une survie à 5 ans supérieure à 70% après transplantation et résection. En revanche, les patients diagnostiqués tardivement sont éligibles uniquement pour des traitements palliatifs et l'espérance de vie est inférieure à 1 an [Bruix *et al.*, 2011] (54).

8. a) Transplantation hépatique (TH)

Il s'agit de l'ablation totale du foie suivie du remplacement par un greffon sain après décès d'un donneur ou, plus rarement, issu d'un donneur vivant cédant une partie de son foie. Elle permet de supprimer à la fois la tumeur mais aussi la cirrhose. C'est donc le seul traitement curatif du CHC car la greffe prévient les rechutes et procure une survie à long terme.

D'après le rapport d'activité de l'agence de biomédecine en 2014, le CHC représente 38% des indications de transplantation hépatique. Cette même année, le nombre de candidats à la greffe hépatique en France était de 2,4 pour un greffon disponible alors qu'elle n'était que de 1,8 en 2007. La progression du CHC aggrave cette pénurie. Les délais d'attente s'allongent à plus de 7 mois depuis 2012 ; 7 mois pendant lesquels la pathologie progresse. C'est pourquoi le recours aux traitements anti-tumoraux s'accroît [Clavien *et al.*, 2012] (74).

La promotion de la greffe partielle à partir de donneurs vivants pourrait pallier à ce manque mais les patients ont rarement des donneurs potentiels dans leur entourage probablement en raison du risque encouru lors du don : 0,5% de décès [Cherqui *et al.*, 2002] (75).

Les critères de Milan, déterminant si un patient peut prétendre à une greffe, prennent en compte la taille tumorale et le nombre de nodules et permettent de réduire le taux de récidives après transplantation hépatique à 20%. En raison du faible nombre de critères intégrés, le score obtenu est controversé. Depuis 2012, le « score AFP » qui combine des critères radiologiques et la concentration sanguine en alpha-fœtoprotéine (AFP) est également utilisé (Tableau 1). Le patient peut bénéficier d'un *downstaging* (reclassification) si une réévaluation est effectuée le semestre suivant. Un score supérieur à 2 présage d'un risque de rejet dans près d'un cas sur deux et écarte la transplantation.

Paramètre	Classe	Score
Taille	≤ 3cm	0
	3-6cm	1
	> 6cm	4
Nombre de nodules	≤ 3	0
	> 4	2
AFP (ng/ml)	≤ 100	0
	100-1000	2
	> 1000	3

Tableau 1 : Paramètres de calcul simplifié du score AFP [Duvoux *et al.*, 2012] (76)

8. b) Résection hépatique

Malgré sa simplicité et son faible coût, la résection hépatique doit être effectuée uniquement dans les centres spécialisés. Il s'agit de retirer la tumeur avec une marge de tissu non tumoral de plus d'1cm. La coelioscopie est préférable à la laparotomie [Gigot *et al.*, 2002] (77). Les patients pouvant bénéficier de cette chirurgie doivent avoir une fonction hépatique conservée (cf chapitre 1.D.3) et un CHC de petite taille et superficiel (Child-Pugh A, MELD<10). Le score de MELD permet d'évaluer la gravité de la pathologie hépatique chronique. Il est calculé selon une formule qui prend en compte les paramètres suivants : la bilirubinémie, l'INR, la créatininémie et l'étiologie. Le risque opératoire reste élevé : une mortalité inférieure à 10% et une morbidité jusqu'à 50%. Les complications post-opératoires sont courantes : hémopéritoine, IHC, hémorragie, infections. En effet, le foie cirrhotique, par définition, a perdu sa capacité de régénération [TNCD 2011] (72).

L'intervention consiste si possible en une segmentectomie et/ou sous-segmentectomie pour pallier à la dissémination portale et éviter les métastases. De nos jours, 65% des patients

ont une survie à 5 ans [Lim *et al.*, 2012] (78). Mais cette méthode ne prévient pas l'apparition d'une tumeur *de novo*.

Calcul du score de Child-Pugh			
	1 point	2 points	3 points
Encéphalopathie (grade)	Absente	Grade I et II	Grade III et IV
Ascite	Absente	Minime	Modérée
Bilirubine totale (mmol/l)	< 35	35 à 50	> 50
Albumine (g/l)	> 35	28 à 35	< 28
TP (%)	> 50	40 à 50	< 40

-entre 5-6 points : classe A

-entre 7-9 points : classe B

-entre 10-15 points : classe C

Tableau 2 : Calcul du score de Child-Pugh

8. c) Traitements percutanés

Les traitements percutanés visant à une destruction locale de la tumeur étaient autrefois chimiques : alcoolisation et acétisation [Bruix *et al.*, 1999] (79). L'alcoolisation consistait à injecter directement de l'éthanol à 90% au sein de la tumeur pour provoquer une nécrose. En contrepartie de ses bons résultats, il y a nécessité d'effectuer plusieurs séances [Ebara *et al.*, 2005] (80). Les traitements chimiques laissent place désormais à de nouvelles techniques physiques.

Pour la radiofréquence, l'hospitalisation est de courte durée (≤ 48 h) et se fait sous anesthésie générale. Cette ablation thermique consiste à introduire une électrode au sein de la tumeur et la porter à des températures entre 60 et 100°C grâce à un courant de 60 à 200W délivré *in situ* pendant quelques dizaines de minutes. Le guidage se fait sous imagerie. Contrairement aux méthodes chimiques, une seule séance peut suffire. De la même façon, on peut utiliser les micro-ondes. Ici encore, la nécrose thermique n'est applicable que pour des tumeurs de taille réduite (<4cm). Contrairement à la résection, cette technique est applicable à des tumeurs de localisation plus profonde. Son risque est la dissémination de la tumeur sur le trajet de ponction [Livraghi *et al.*, 2000] [Kalra *et al.*, 2015] (81) (82).

Les techniques chirurgicales sont potentiellement curatives. Pour des tumeurs uniques inférieures à deux centimètres il n'y aurait pas de différence entre les médianes de survie à 1 ou 2 ans entre la résection chirurgicale et l'ablation (radiofréquence) [Takayama *et al.*, 2010] (83). Aucune étude n'a encore clairement mis en évidence la supériorité de l'une sur l'autre.

8. d) La radioembolisation

Le flux sanguin qui alimente la lésion hépatique provient quasi-exclusivement de l'artère hépatique (80%). La radioembolisation procède de la pose d'un cathéter dans l'artère fémorale que l'on fait remonter jusqu'à l'artère hépatique. Puis l'on injecte des microsphères chargées d'un élément radioactif : l'Yttrium-90. Grâce à leur densité proche de celle des hématies, elles vont transiter jusqu'aux micro-vaisseaux proches de la tumeur. Une dosimétrie pré-implantation effectuée une semaine avant l'intervention permet au radiophysicien de calculer la dose à injecter. Les sphères peuvent être en résine ou en verre, et la préparation des solutions contenant ces sphères est du ressort du radiopharmacien. Une scintigraphie post-implantation contrôle, le jour même, la localisation de cette radioactivité de type rayonnement β . Les billes vont provoquer des radiations pendant plusieurs semaines et détruire la tumeur localement. Une embolisation permettant de fermer les autres artères autour de la tumeur permet d'éviter la dissémination des billes. Les modalités de recours à la radioembolisation ne sont pas encore clairement référencées [Salem *et al.*, 2011] (84).

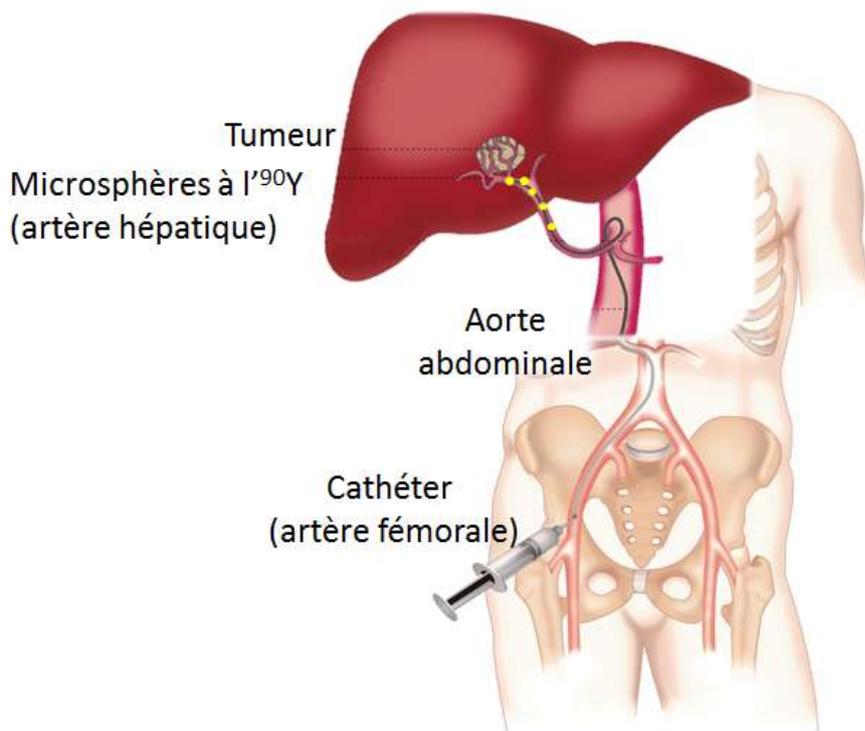


Figure 10 : Traitement par radioembolisation

8. e) Chimioembolisation

Le BCLC (*Barcelona Clinic Liver Cancer*) est un système de classement international des patients atteints de CHC composé de 5 classes : 0, A, B, C, D. Ces classes sont fonction du statut tumoral : nombre, taille, invasion vasculaire, N1 (ganglions), M1 (métastase); de la fonction hépatique (score de Child-Pugh) et de l'état général. La chimioembolisation

transcathéteur artérielle (TACE) est recommandée pour les patients de stades intermédiaires B. Ce traitement palliatif permet d'éviter l'échec postopératoire [Song, 2015] (85).

Comme pour la radioembolisation, il s'agit de poser un cathéter fémoral vers l'artère hépatique guidé par radiologie, par lequel un traitement chimiothérapique sera injecté (anthracyclines, 5FU, cisplatine...). Les molécules vont se fixer sur les cellules environnantes grâce à un adjuvant hydrophobe et radio-opaque : le lipiodol. Ce vecteur est composé d'esters éthyliques d'acides gras iodés d'huile d'œillette.

Le Lipocis® (laboratoire Cisbio international), lipiodol radioactif à l'Iode 131 [Lau *et al.*, 2008] (86), quant à lui, n'est plus utilisé en raison de sa toxicité pulmonaire. Les cytotoxiques seront à l'avenir chargés sur des microsphères pour une meilleure biodisponibilité.

Là encore, une embolisation de l'artère hépatique temporaire concomitante est effectuée, si possible, pour compartimenter la chimiothérapie. Ce traitement peut être répété, mais même s'il s'agit de la technique la plus utilisée en France, la chimioembolisation fait encourir un risque d'ischémie des organes digestifs voisins.

8. f) La chimiothérapie IV ou VO

Seuls 25% des patients peuvent bénéficier d'un traitement curatif. D'autres techniques sont développées à visée palliative mais leur efficacité reste très médiocre en raison de leur toxicité sur un foie déjà fragilisé. Le tamoxifène, les anti-androgènes, ou encore l'interféron n'ont pas prouvé leur efficacité [Bruix *et al.*, 2011] (54). Aucune chimiothérapie de référence n'existe pour le traitement des formes évoluées.

Le Sorafénib Nexavar® (laboratoire Bayer Schering) est un inhibiteur multi-tyrosine kinase ayant un effet antiangiogénique. C'est le seul médicament à bénéficier d'une AMM en 2007 sur le CHC comme traitement palliatif ; à l'international, son utilisation est approuvée par la FDA (*Food and Drug Administration*). Néanmoins, son coût et ses effets indésirables (diarrhées, hypertension artérielle, asthénie, syndrome main-pied) limitent son utilisation. Son association au brivanib, à l'erlotinib ou au bevacizumab s'est avérée vaine [Yau *et al.*, 2012] (87).

8. g) L'immunothérapie

Chez le fœtus, c'est le foie qui joue le rôle du thymus, encore immature. De ce fait, il conserve quelques propriétés d'organe lymphoïde dont un mécanisme qui lui permet d'échapper à l'immunosurveillance de l'hôte par activation du TGF- β 1 et de l'IL-10 (Interleukine 10). Ces facteurs et cytokines protègent les cellules cancéreuses hépatiques de l'apoptose et permettent leur différenciation et l'angiogénèse.

De nouvelles thérapies, appelées immunothérapies, utilisant les propriétés immunes du foie sont en cours d'expérimentation. Le premier vaccin anti-AFP contient 4 peptides de l'AFP et permet de générer une réponse des lymphocytes T à ces peptides. D'autres vaccins (anti-GPC3), des anticorps contre des inhibiteurs de point de contrôle (anticorps PD-1/CTLA-4) et la transfusion autologue de cellules immunitaires (ACT) en phase d'essais cliniques sont prometteurs, surtout de façon combinée [Hong *et al.*, 2015] (88).

L'unité Inserm UMR991 « *Foie, Métabolisme et Cancer* » en partenariat avec l'UMR 6226 CNRS, l'institut des sciences chimiques de l'université de Rennes 1 travaille aujourd'hui sur la possibilité d'utiliser les nanoparticules pour le traitement du CHC. Un groupe s'intéresse plus précisément à la captation de dérivés poly(acide-malique) par des cultures d'hépatomes. Les nanoparticules constituent une piste intéressante à explorer dans de nombreux domaines et particulièrement dans l'hépatocarcinome [Loyer *et al.*, 2016] (2).

E. Altération génétique et cancer : application au CHC

1) **Cancer : définition**

Une cellule cancéreuse se définit comme un clone cellulaire génétiquement instable ayant une prolifération anarchique échappant au contrôle des mécanismes de régulation habituels assurant l'homéostasie. Elle possède six caractéristiques principales : autonomie de prolifération incontrôlée indépendante des signaux de croissance endogènes et exogènes, résistance aux inhibiteurs de croissance, à l'apoptose et aux mécanismes de réparation de l'ADN, capacité d'angiogenèse, de métastase et d'immortalité. Cette immortalité peut être conférée par une anomalie au niveau des télomères et notamment des enzymes télomérases qui seront décrites ci-dessous. Les lignées cellulaires continues utilisées comme modèle en recherche ont pour la plupart une origine cancéreuse. A partir de ces premiers événements d'initiation, il faut attendre 30 divisions pour que la tumeur soit cliniquement détectable [Hanahan *et al.*, 2000] (89).

2) **Processus de carcinogénèse**

5% des cancers ont une origine héréditaire, c'est-à-dire la transmission d'une altération génétique constitutionnelle. C'est le cas notamment pour le syndrome sein-ovaire et le syndrome de Lynch prédisposant aux cancers colorectaux. Dans ces syndromes, on observe un excès de cas au sein d'une même famille par rapport à la fréquence moyenne observée dans la population générale, avec des formes précoces et des localisations multiples. Les autres cancers sont sporadiques.

Une seule altération de l'ADN ne suffit pas à provoquer le développement tumoral, il s'agit d'une accumulation d'évènements indépendants. Les anomalies extrinsèques peuvent être génétiques ou épigénétiques. Au total, plus de 300 gènes peuvent être impliqués dans la carcinogénèse. Ces anomalies apparaissent 90% du temps dans les cellules somatiques. Une instabilité génétique, souvent liée à des anomalies chromosomiques, caractérise également les cellules cancéreuses.

3) **Instabilité chromosomique dans le CHC**

Dans le CHC, les aberrations et instabilités chromosomiques sont plus couramment rencontrées lorsque la tumeur est liée à une hépatite virale B ou C. Les altérations génétiques structurales comme les amplifications ou les délétions de gènes voire d'une partie d'un chromosome se développent progressivement durant l'hépatite chronique et sont plus abondantes dans les nodules cirrhotiques et les tumeurs. Les techniques de CGH array (*Comparative Genomic Hybridization*) ou ACPA en français (Analyse Chromosomique sur

Puce à ADN), anciennement LOH (*Loss Of Heterozygosity*) de l'ADN du CHC ont montré la présence d'instabilité chromosomique dans 80% des tumeurs associées au VHB. Les plus courants sont des gains de chromosomes entiers ou partiels (brin court « *p* » ou brin long « *q* ») : 1q, 5, 6p, 7, 8q, 17q et 20 autant que des pertes : 1p, 4q, 6q, 8p, 13q, 16, 17p et 21. Le gain de copie du locus 8q24 conjointement à une surexpression du gène *c-myc* situé sur cette région a été significativement associé aux hépatites et à la cirrhose alcoolique, mais pas aux CHC sporadiques. Ceci suggère que les CHC pourraient être classés en différentes classes génétiques en fonction de leurs étiologies [Tornesello *et al.*, 2013] (90).

4) Anomalies génétiques

Les gènes fréquemment impliqués sont les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs qui contrôlent essentiellement le cycle cellulaire et les gènes de réparation de l'ADN. Les oncogènes peuvent être de type : facteurs de croissance et leurs récepteurs, agents de transduction des signaux de prolifération, facteurs de transcription... Un adduit à l'ADN peut être provoqué par des agents endogènes ou exogènes. Les facteurs de risques peuvent être de nature chimiques (agents alkylants, amines aromatiques, hydrocarbures, aflatoxine B1, chlorure de vinyl, nitrosamines), physiques (rayons X, UV), hormonaux, ou encore microbiologiques (infection virale, parasitaire ou bactérienne).

En effet, certains virus eux-mêmes peuvent avoir un pouvoir oncogène, il s'agit de virus à ARN ou ADN qui s'intègrent au génome humain lors du passage à la chronicité, comme par exemple : le virus HTLV (pouvoyeur de lymphomes et leucémies), le VIH (Sarcome de Kaposi), le Papillomavirus (cancer du col de l'utérus), le virus Epstein-Barr (lymphome de Burkitt), et les virus des hépatites. Il en va de même pour certaines bactéries : *Helicobacter pylori* (carcinome gastrique) et parasites : *Schistosoma haematobium* (tumeur vésicale).

Les changements dans l'ADN provoqués par ces agents à risque peuvent être des mutations (ponctuelles ou non), délétions chromosomiques, translocations, amplifications et réarrangements géniques.

Les mutations peuvent également être des substitutions : remplacement d'un nucléotide par un autre ; des délétions : suppression d'un ou plusieurs nucléotides ; des insertions : addition d'un ou plusieurs nucléotides. La délétion d'un nombre de nucléotides n'étant pas un multiple de trois va décaler le cadre de lecture (*frameshifting*), provoquant très souvent l'occurrence *in fine* d'un codon stop précoce et donc la production d'une protéine tronquée. Une délétion d'un multiple de trois nucléotides mène à une protéine dépourvue d'un ou plusieurs de ses acides aminés. Au-delà, de plus grandes délétions peuvent provoquer la suppression d'un exon entier, de plusieurs exons, voire d'un gène entier.

Certaines mutations peuvent être synonymes ou silencieuses : codant pour le même acide aminé dans le code génétique ; faux-sens : codant pour un acide aminé différent ; non-sens : menant à un codon stop. D'autres mutations, dans les introns par exemple, peuvent avoir un impact sur la traduction en compromettant l'épissage alternatif ou la fixation de régulateurs, surtout à proximité d'un des motifs consensus d'épissage en fin ou en début d'intron. A titre d'exemple le triplet ATG, codant pour une méthionine, est en général le premier codon à être traduit sur le premier exon, une modification touchant ce triplet ou son environnement est quasiment toujours délétère.

5) Mutations fréquentes dans le CHC

Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier deux *hotspots* de mutation dans le CHC : *TERT* et *CTNNB1*, dont la pertinence sera démontrée dans les paragraphes suivants.

Les autres gènes connus comme étant mutés de façon récurrente dans le CHC sont : *TP53* (*Tumor Protein p53*), *ARID1A* (*AT-rich interactive domain*), *ARID2*, *RPS6KA3* (*Ribosomal Protein S6 Kinase Polypeptide 3*), *NFE2L2* (*Nuclear Factor Erythroid 2-like 2*) et *KEAP1* (*Kelch like-ECH-Associated Protein 1*). Cependant, ces gènes ne sont pas mutés dans les CHC précoces, et ne sont donc pas des candidats idéaux pour le développement d'une méthode de diagnostic précoce.

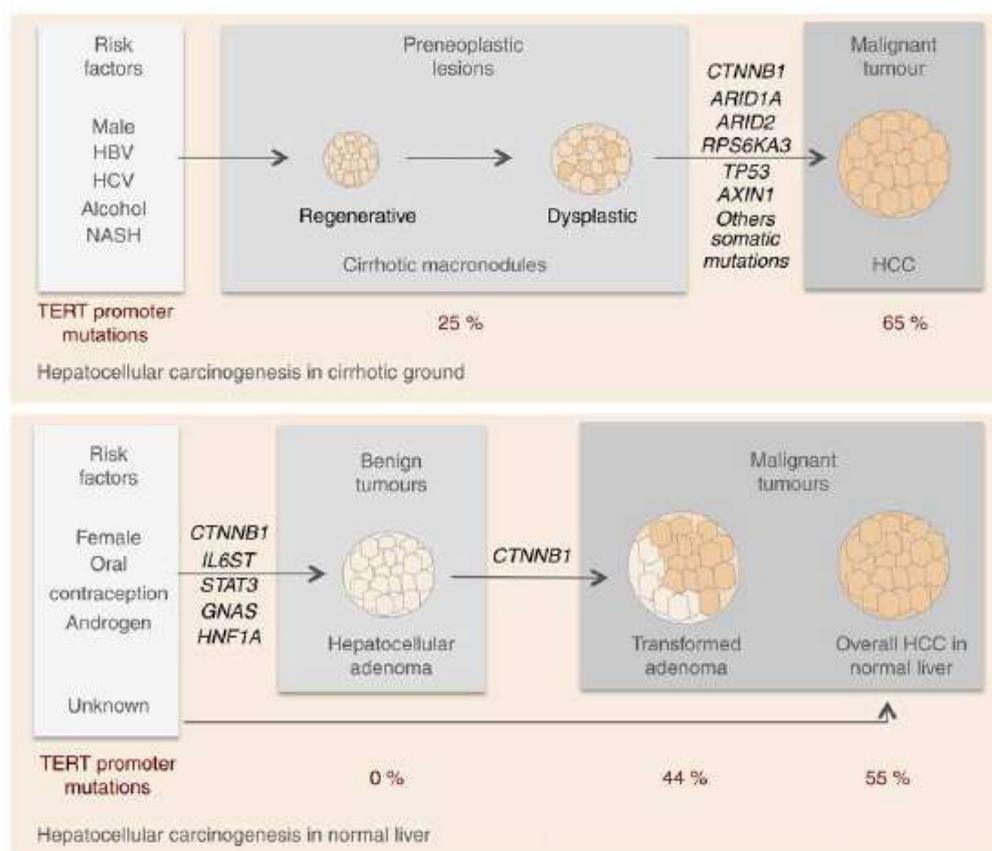


Figure 11 : Gènes impliqués dans la carcinogénèse hépatique [Nault *et al.*, 2013] (91)

5. a) TERT

TELOMERASE

Découverts en 1971 par un biologiste russe Alekseï Olovnikov, les télomères (*telos* : terminal ; *meros* : segment) se définissent comme des régions d'ADN non codant répétitives qui régissent l'intégrité chromosomique. Il s'agit de séquences riches en guanines, de 5 à 8 pb, répétées en tandem aux extrémités des chromosomes des eucaryotes. Chez les vertébrés, le motif de ces complexes nucléoprotidiques est : TTAGGG. Ils peuvent être répétés des centaines de fois allant de 3 à 20 kilobases et se terminent par une extrémité 3' simple brin. Les télomères coiffent et protègent l'extrémité des chromosomes de la dégradation au cours des cycles de réplication. Les télomères sont eux-mêmes protégés par un complexe Shelterin visant à inhiber les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN qui pourraient les confondre avec une cassure double brin.

Le maintien de la longueur des télomères est dépendant de l'expression d'une holoenzyme appelée télomérase. Celle-ci a pour rôle d'ajouter des unités répétitives à la fin de chaque cycle de réplication. Sans activité télomérasique, les télomères raccourcissent à chaque division cellulaire. En effet, l'ADN polymérase est incapable de répliquer les extrémités 3' des chromosomes. C'est l'un des signes majeurs du vieillissement cellulaire, découvert par Hayflick en 1965. Il démontre que le nombre de divisions possibles dans la vie d'une cellule avant d'entrer en sénescence est limité à 52 pour l'Homme. Lorsque que le raccourcissement des télomères devient critique, une cascade de signalisation cellulaire impliquant les protéines p53 et p21 est activé et engendre inéluctablement la mort cellulaire. C'est la limite de Hayflick [Hayflick *et al.*, 1965] (92). Il est cependant important de noter que la télomérase n'est inactive que dans les cellules en phase terminale de différenciation.

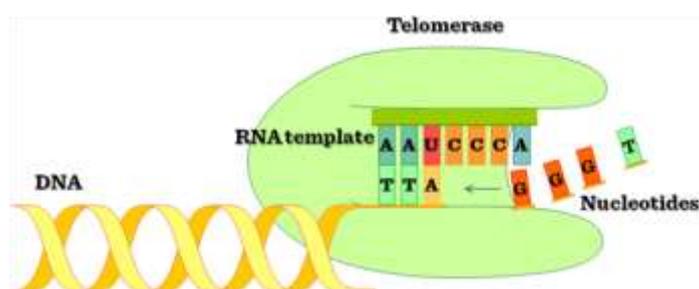


Figure 12 : Activité enzymatique d'une télomérase [Kyell *et al.*, 2011] (93)

Plus tard, la capacité des cellules issues des lignées cellulaires cancéreuses à se diviser indéfiniment viendra nuancer cette théorie. Elle est attribuée à l'hyperactivation de la télomérase, présente dans les cellules cancéreuses mais pas dans les cellules normales [Zhang *et al.*, 1999] (94). Ainsi, les cellules cancéreuses conservent leur capacité d'autorenouvellement. Un mécanisme moléculaire indépendant de la télomérase, l'ALT

(*Alternative Lengthening of Telomerase*) peut également être impliqué, si bien que plusieurs voies sont possibles pour l'immortalisation des cellules cancéreuses [Killela *et al.*, 2013] (95).

LE PROMOTEUR *TERT*

TERT est un gène localisé sur le chromosome 5 (5p15-33), qui code pour la transcriptase inverse de la télomérase (*Telomerase Reverse Transcriptase*). Au cours de la transformation maligne, de nombreuses altérations génétiques s'accumulent à ce niveau. Avec le composant ARN de la télomérase *TERC* (*Telomerase RNA Component*), ils promeuvent l'élongation des télomères et la prévention de l'érosion chromosomique *in vitro*.

La dérégulation des télomérases est ubiquitaire dans les tumeurs humaines avec plus de 90% des cancers présentant une hyperactivation de cette enzyme. Une augmentation d'activité ou une réactivation de *TERT* est connue comme étant une condition fondamentale pour la transformation cancéreuse mais les mécanismes sous-jacents restent mal compris. Il existe deux moyens de maintenir la longueur des télomères : une régulation épigénétique de l'activité télomérasique similaire à celles des cellules souches capables d'autorenouvellement et des mutations somatiques du promoteur de *TERT* [Heidenreich *et al.*, 2014] (96).

Ces mutations sont très fréquemment présentes dans les pathologies dermatologiques. C'est d'ailleurs dans les mélanomes qu'elles ont pour la première fois été recensées, puis dans le sarcome dermique pléiomorphe, le liposarcome et les carcinomes basocellulaires. Elles ont ensuite été mises en relief dans d'autres cancers tels que les tumeurs biliaires, urothéliales, thyroïdiennes, les gliomes, les mésothéliomes et plus récemment dans le cancer hépatique. Des mutations de *TERT* peuvent avoir lieu dans d'autres types de cancers mais avec une fréquence bien moindre [Vinagre *et al.*, 2013] (97). En effet, on considère qu'elles ont lieu principalement dans les tumeurs dérivant de tissus composés de cellules différenciées avec un faible potentiel d'autorenouvellement.

Au cours de la carcinogénèse hépatique, les mutations ponctuelles sont principalement retrouvées au niveau de deux centres de mutagénèse ou *hotspots*. Le premier est situé -124 pb et le second à -146 pb en amont du codon d'initiation ATG du gène *TERT*, et sont porteurs de substitutions G>A ou plus rarement G>T.

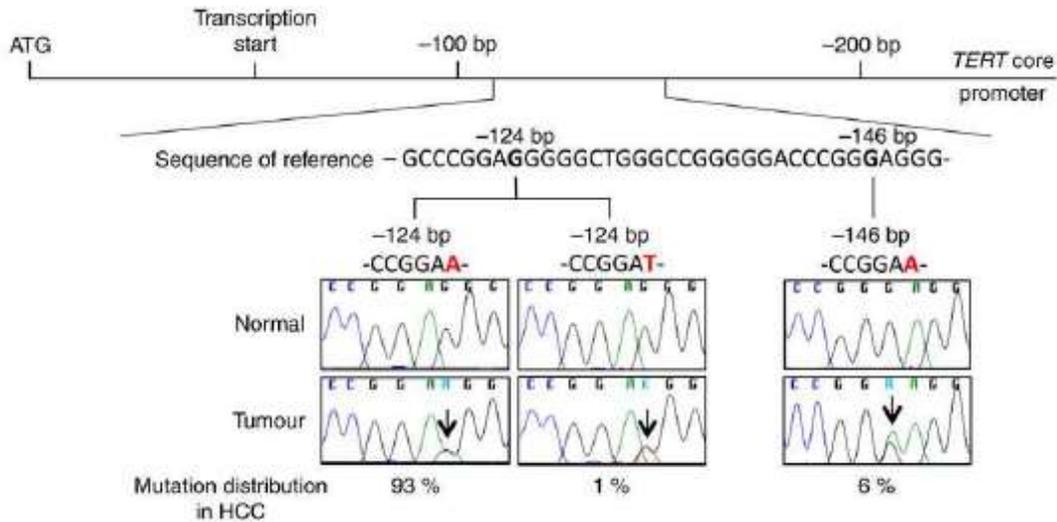


Figure 13 : Mutations somatiques du promoteur *TERT* [Nault *et al.*, 2013] (91)

Plus précisément, la plus fréquente des mutations est celle située en -124. Dans l'étude de Nault en 2013, 93% des CHC étaient mutés G>A (soit 166 cas) et 1% G>T (soit 2 cas) à cette position. Sur le second hotspot, 6% (soit 11 cas) étaient mutés G>A (Figure n° 13). Ces deux hotspots étant mutuellement exclusifs, aucune tumeur ne présentait les deux mutations de façon concomitante. En effet, ces mutations engendrent une séquence consensus de liaison ETS-TCF (*E-Twenty Six-Ternary Complex Factor*) de type CCGGAA qui suffit à l'expression de *TERT*. Contrairement aux mélanomes, nous ne retrouvons pas de mutation en tandem de type GG>AA qui sont typiques des mélanomes induits par les rayons ultra-violets.

Le promoteur de *TERT* est l'élément de régulation le plus important pour l'expression de la télomérase. Sa forte teneur en GC autour du site d'initiation de la transcription permet une régulation épigénétique *via* la méthylation des îlots CpG et des modifications de la chromatine.

Il contient un cœur de 260 pb qui peut être la cible de nombreux facteurs de régulation et est dépourvue d'une boîte TATA ou de séquence similaires. Parmi ces facteurs, on compte *c-myc* et d'autres oncogènes, hormones et cytokines qui peuvent se fixer sur les boîtes GC et E. La boîte GC possède une séquence GGGCGG située 50 nucléotides en amont du gène, quand à la boîte E ou E-box (*Enhancer Box*) sa séquence spécifique est un palindrome de type CANNTG (où N peut être n'importe quel nucléotide). La mutation sur le promoteur de *TERT* augmente la prolifération cellulaire, diminue l'apoptose, régule la réponse aux dommages de l'ADN, régule le statut chromatinien et allonge la durée de vie cellulaire.

Dans la majorité des cas, les mutations germinales sur *TERT* sont liées à la cirrhose. Une réactivation télomérasique est alors nécessaire à la progression tumorale.

L'équipe de Nault met en évidence une prévalence de 59% de mutations sur le promoteur *TERT* chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire. Elle est présente dans 6% des dysplasies de bas grade, 19% des dysplasies de haut grade, 61% des CHC précoces et 42% des CHC évolués.

La chronologie des lésions malignes passe d'abord par le nodule dysplasique de bas grade, puis de haut grade, s'ensuivent le CHC précoce et le CHC avancé. Sur le plan immunohistochimique les pathologistes ont développé trois marqueurs permettant de distinguer les CHC précoces des nodules dysplasiques de haut grade (HDGN) : GPC3 (*Glypican 3*), GS (*Glutamine Synthase*) et HSP70 (*Heat Shock Protein 70*).

La mutation du promoteur de *TERT* est donc la plus fréquente et la plus précoce des altérations génétiques récurrentes identifiées dans les cirrhoses pré-malignes. De plus, son implication dans le processus de transformation maligne de la cirrhose est avérée. Les mutations sur le promoteur du gène *TERT* sont donc de bons biomarqueurs d'identification précoce de CHC chez les patients à risque. Le promoteur de *TERT* est l'altération génétique la plus fréquente dans le CHC, le premier gène muté de façon récurrente dans les lésions cirrhotiques pré-neoplasiques et l'étape finale de la transformation maligne de l'adénome.

Les données épidémiologiques concernant les mutations sur le promoteur *TERT* montrent que dans le CHC, leur fréquence est supérieure chez les patients de sexe masculin présentant un taux faible d'AFP sérique, une petite tumeur (<5cm), une mutation du gène *CTNNB1*, et qui sont sans lien avec le virus de l'hépatite B. Une étude de 2014 montre que les mutations sur le promoteur *TERT* apparaissent plus fréquemment sur les CHC liés au virus de l'hépatite C. L'absence d'infection à l'hépatite B est d'une manière générale associée de façon significative à la présence de mutation sur le promoteur *TERT*. Ces données suggèrent que ces facteurs étiologiques seraient impliqués dans les différents mécanismes de maintien des télomères durant la carcinogénèse [Chen *et al.*, 2014] (98).

Le faible taux de mutation *TERT* chez les patients VHB peut s'expliquer par une différence dans le mécanisme de carcinogénèse, la transcription de la télomérase étant induite par l'insertion de l'ADN viral du VHB. Dans notre cohorte environ 40% des patients présentaient une sérologie positive pour l'hépatite C et 20% pour l'hépatite B. Ce qui est représentatif des CHC dans la population japonaise. Les tumeurs des 14 patients dont l'ADN circulant a été étudié mesurent de 14 à 130 mm (Tableau 16 §Résultats.A.1).

5. b) *CTNNB1* (β -caténine)

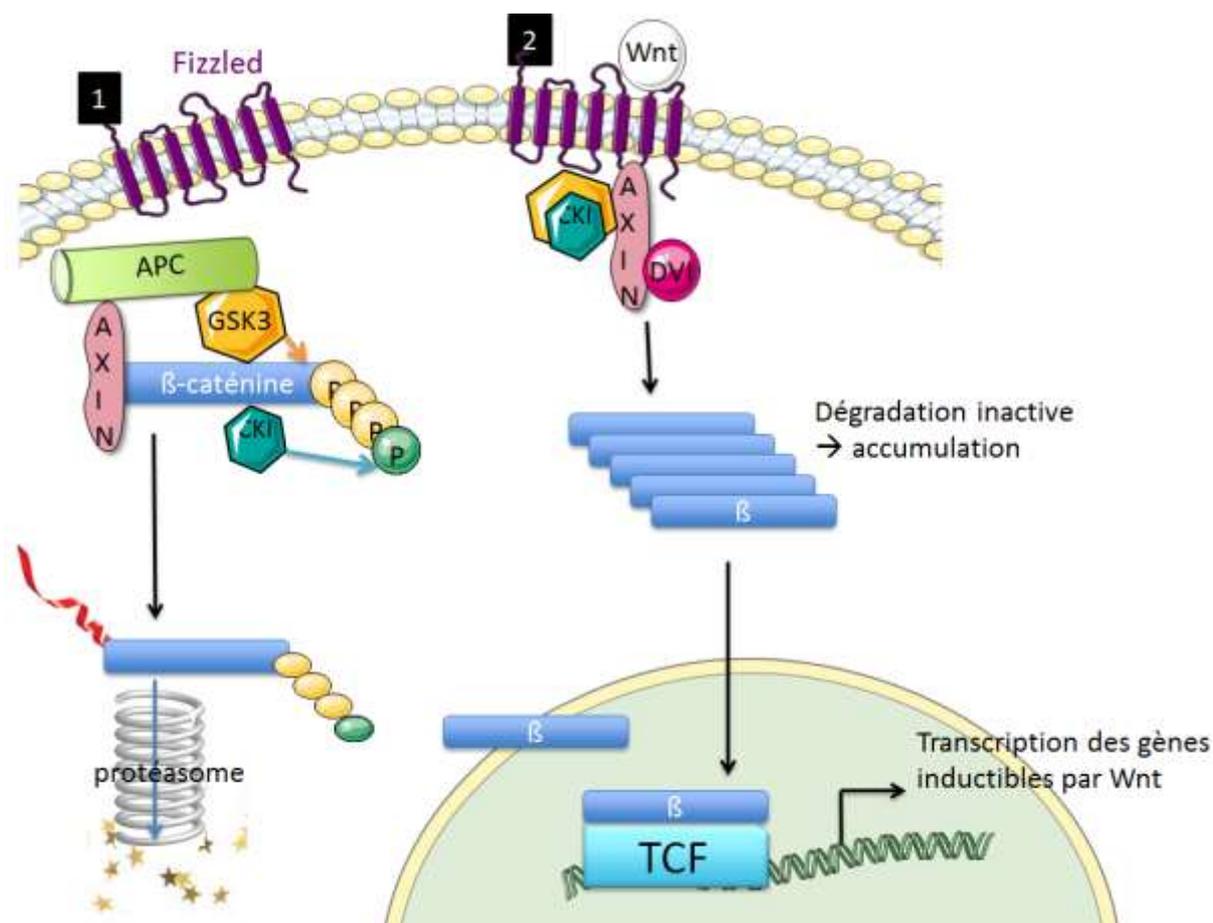


Figure 14 : Voie de signalisation de la famille Wnt

La famille Wnt, telle qu'on la nomme, est une somme de glycoprotéines sécrétées qui constituent l'un des mécanismes les plus fondamentaux qui régissent la polarité cellulaire, la prolifération cellulaire et le sort des cellules dans l'embryogénèse et l'homéostasie tissulaire. Toute mutation dans cette voie peut être la cause d'une anomalie congénitale ou d'un cancer. La voie canonique de la famille Wnt régule le coactivateur transcriptionnel de la β -caténine qui contrôle les programmes d'expression des gènes développementaux clés. Cela fait 20 ans que cette signalisation Wnt/ β -caténine est étudiée [De la Coste *et al.*, 1998] (99). Sans expression de Wnt, la protéine cytoplasmique β -caténine est dégradée par le complexe AXIN. Ce complexe est composé par la protéine axine, le produit du gène suppresseur de tumeur *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), de la caséine kinase 1 (CK1) et de la glycogène synthase kinase (GSK3). CK1 et GSK3 sont capables de phosphoryler la région terminale de la β -caténine (Figure n° 14). De cette manière, la β -caténine peut subir une ubiquitination et une dégradation par le protéasome. L'élimination constante de la β -caténine empêche celle-ci d'atteindre le noyau et par là, sa cible Wnt [Mac Donald *et al.*, 2009] (100).

Quand un ligand Wnt et Fizzled (Fz), un récepteur transmembranaire à 7 hélices, se lie avec le co-récepteur LRP6 (*Low-Density Lipoprotein Receptor related Protein 6*) : la

voie Wnt/ β -caténine est activée. Ce complexe recrute la protéine de matrice Dishevelled (Dvl) et la phosphorylation de LRP6 a lieu. Le complexe axine est ensuite recruté jusqu'au récepteur. Ce phénomène conduit à l'inhibition de la phosphorylation de β -caténine médiée par l'axine ce qui stabilise cette dernière. Dès lors, la β -caténine s'accumule au sein du cytoplasme et parvient jusqu'au noyau pour se fixer à TCF (*T-cell specific Transcription Factor*) et la famille LEF (*Lymphoid Enhancer-binding Factor*). Ainsi elle active l'expression des gènes cibles de Wnt.

La β -caténine contrôle le maintien de l'adhésion cellule-cellule, la quiescence des cellules stellaires hépatiques, le phénomène de zonation, la signalisation tyrosine kinase et l'expression des régulateurs du cycle cellulaire tels que la cycline-D1, primordiale pour la prolifération cellulaire, de même que l'oncogène *c-myc* [Nejak-Bowen *et al.*, 2010] (101). Ce phénomène est amplifié par le fait qu'en plus de phosphoryler la β -caténine, les deux phosphorylases GSK3 et CK1 phosphorylent l'axine et APC. Ceci conduit à une augmentation de la fixation de l'axine et APC à la β -caténine ce qui augmente la phosphorylation et la dégradation de cette dernière.

La voie de signalisation Wnt joue un rôle dans la pathobiologie du foie, en dépit du fait qu'il soit quiescent la plupart du temps chez l'adulte. Cette voie cruciale dans le développement de l'organe régule également le processus de prolifération cellulaire, de survie, de différenciation et de régénération hépatique normale ou anormale. Une activation aberrante peut mener à une tumeur : un hépatoblastome ou un CHC, étudié ici.

Récemment, il a été montré que parmi les tumeurs bénignes, les adénomes qui portent des mutations activatrices du gène *CTNNB1* sont plus à risque de transformation maligne et au développement d'un CHC sur un foie normal, même si une mutation sur *CTNNB1* ne suffit pas au développement de ce type de tumeur [Nault *et al.*, 2013] (91).

A titre d'exemple, chez les souris transgéniques de type *c-myc/TGF- β* et *c-myc/E2F1* servant de modèle pour le CHC, l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine provoque une carcinogénèse accélérée ou agressive. Cette activation apparaît dans les stades les plus précoces de la carcinogénèse [Calvisi *et al.*, 2001-2005] (102) (103). De plus, la moitié des souris transgéniques mutées sur *c-myc* ou *H-ras* présentaient soit une mutation ponctuelle, soit une délétion dans le gène de la β -caténine [De la Coste *et al.*, 1998] (99).

Dans les carcinomes hépatocellulaires, les mutations dans la télomérase transcriptase inverse et les mutations activatrices de la β -caténine (*CTNNB1*) sont associées de façon significative même si aucun mécanisme par lequel elles pourraient s'influencer directement n'est connu [Nault *et al.*, 2013] (91).

C'est pourquoi nous avons estimé que la qualification et la quantification des mutations au sein de ces deux cibles dans le plasma de patients atteints de CHC était pertinente.

6) Anomalies épigénétiques

En grec, *epi* signifie « sur, au-dessus ». Les cellules somatiques d'un même individu ont le même génome mais diffèrent de par leurs caractéristiques épigénétiques. Les modifications épigénétiques regroupent entre autres la méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG, les modifications post-traductionnelle des extrémités des histones, ainsi que les changements de variants d'histones, et peuvent être régulées par l'intervention d'ARN non-codants. C'est un processus biologique normal qui influe sur la régulation de l'expression des gènes et sur l'architecture de la chromatine au sein des cellules eucaryotes. La séquence d'ADN en elle-même n'est pas modifiée, mais l'épigénome qui lui est associé est héritable d'une division cellulaire à l'autre [Berger *et al.*, 2009] (104).

Dans le noyau, la chromatine existe sous deux conformations différentes : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine est une conformation ouverte et décondensée qui correspond généralement aux régions transcriptionnellement actives. A l'inverse, l'hétérochromatine est la forme condensée, resserrée ne permettant que peu ou pas de transcription. L'hétérochromatine constitutive est toujours sous forme compacte et correspond généralement à des régions riches en séquences répétitives, notamment les télomères. L'hétérochromatine facultative garde son potentiel de transcription de par la possibilité d'être décondensée en euchromatine en cas de besoin [Woodcock et Ghosh, 2010] (105).

Les modifications chromatinienne jouent donc un rôle crucial dans le développement des mammifères, et la présence d'aberrations dans ce système peut conduire à de nombreuses pathologies. En effet, lors de la tumorigénèse, le modèle épigénétique global est caractérisé par une vaste hypométhylation des régions riches en séquences répétitives et une hyperméthylation locale des régions géniques associées aux îlots CpG.

6. a) Les îlots CpG

Un site CpG (Cytosine-Phosphate-Guanine) est un dinucléotide CG. Ces dinucléotides se distinguent des autres de par leur répartition. Ils sont regroupés en fréquence constante en des amas dits « îlots CpG », séquences d'environ 1 kilobase où ils représentent plus de 60% de la séquence. En général, ils sont particulièrement sous-représentés dans le génome ; en effet, les méthyl-cytosines subissent fréquemment une mutation menant à une transition de CpG vers TpG [Gardiner-Garden *et al.*, 1987] (106). C'est pourquoi on ne retrouve que 1% de

ces motifs, alors que statistiquement, ils devraient constituer de 4 à 6% du génome [Takai *et al.*, 2002] (107). Une large fraction de ses îlots (37%) est localisée au sein de la région 5' régulatrice en amont des gènes, soit au sein des promoteurs, avec approximativement 60% des gènes constitutifs humains ayant un îlot CpG entre -2 kilobases (kb) et +1 kilobase de leur site d'initiation de la transcription.

Chez les vertébrés, les résidus cytosines peuvent être méthylés de façon post-répllicative sur le carbone C5 de leur cycle pyrimidique. Cette 5-méthylcytosine est obtenue par transfert d'un groupement méthyle issu du cofacteur SAM (S-Adénosyl-Méthionine ou AdoMet) par une ADN méthyltransférase (DNMTs). Il en résulte la formation d'un SAH (S-adénosylhomocystéine) résiduel. Dans la famille des méthyltransférases, quatre membres peuvent être impliqués : DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L [Fernandez *al.*, 2012] (108). Cette méthylation provoque une inhibition de l'expression du gène correspondant. Dans les cellules humaines normales, la majorité des groupements CpG sont méthylés (70%) [Bestor *et al.*, 2000] (109).

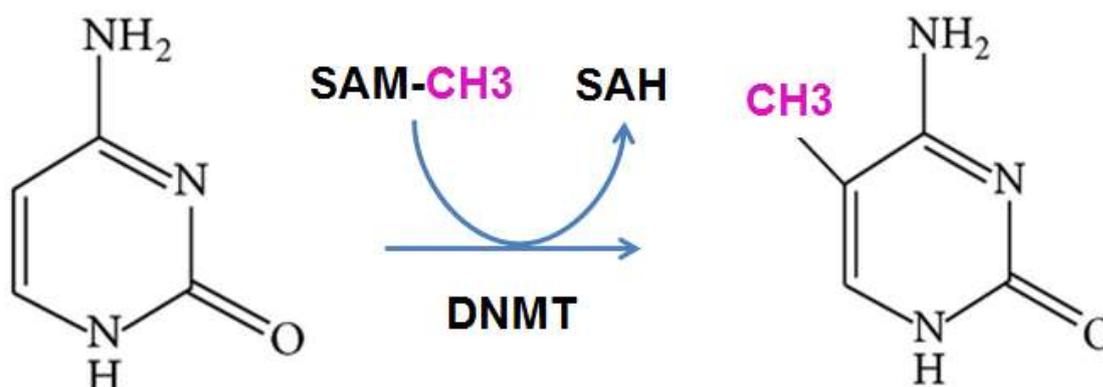


Figure 15 : Méthylation des cytosines

Les sites de méthylation créent des sites d'ancrage reconnus par des protéines MBP liant l'ADN méthylé (Methyl-Binding Protein). Elles vont recruter un complexe protéique contenant des enzymes de modification covalentes des histones comme les histones désacétylases (HDAC), qui ont la capacité de retirer les groupements acétyles de l'extrémité des histones pour rendre l'hétérochromatine inaccessible au complexe de transcription. Des complexes co-répresseurs peuvent maintenir cette conformation chromatiniennne fermée. Il en est ainsi des protéines HP1 (Protéine de l'Hétérochromatine 1), qui se lient avec une haute affinité aux histones H3 méthylés en K9 (Lysine 9) [Fuks, 2005] (110).

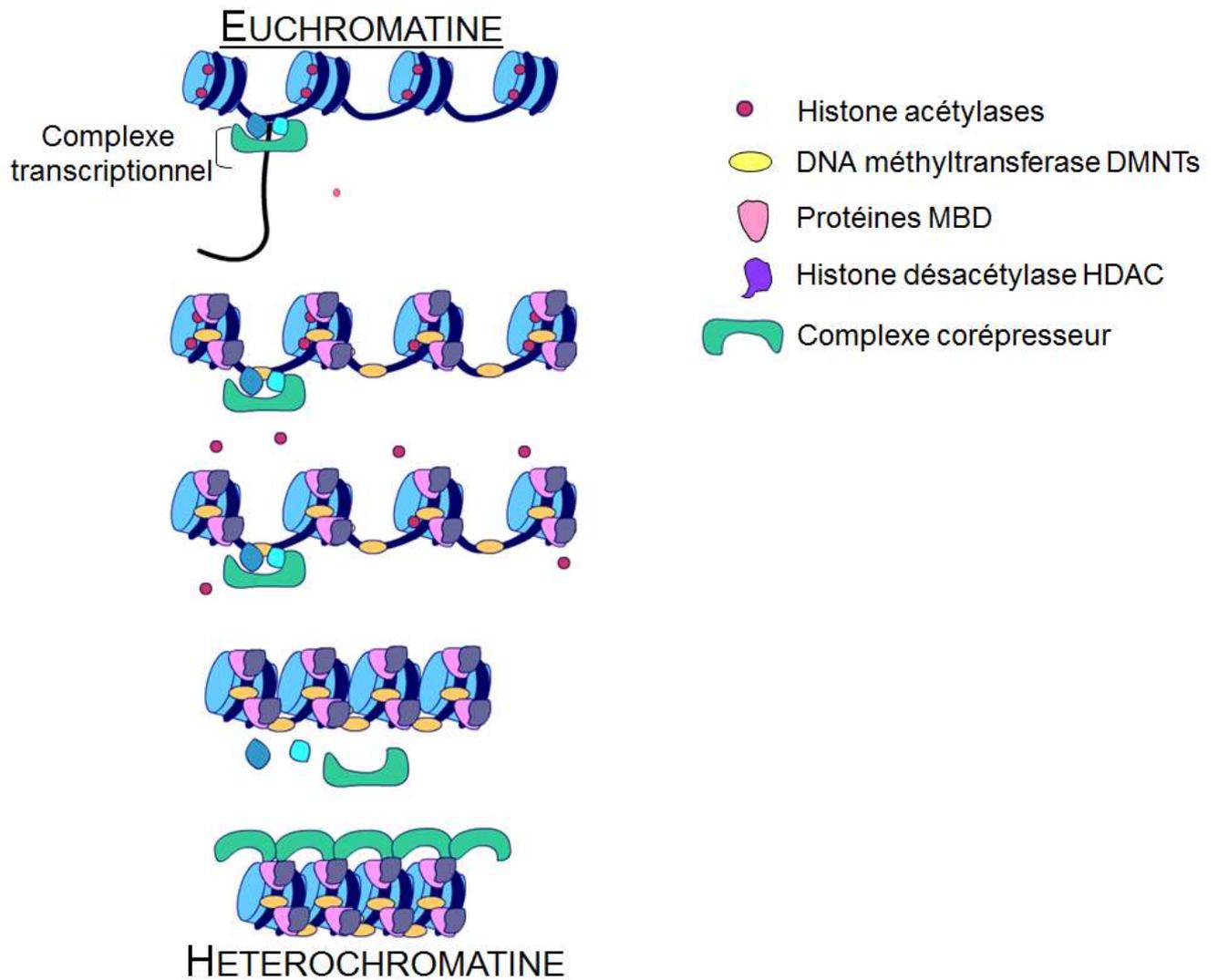


Figure 16 : Représentation schématique des facteurs impliqués dans la condensation de la chromatine

Les différentes modifications des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation, sumoylation, ubiquitinylation), loin d'être mutuellement exclusives, se combinent pour donner naissance à un « code histonique » au niveau duquel les ARN non-codants jouent un rôle majeur qui ne fera pas l'objet de la présente thèse. En effet, seule la méthylation a été prise en compte au cours des manipulations effectuées. Il en va de même pour les nombreuses enzymes qui interviennent dans la régulation de l'architecture chromatinienne.

6. b) Modifications épigénétiques dans le CHC

RNF135 (*Ring Finger Protein 135*), est une protéine également connue sous le nom de Riplet, Reul, MMFD ou encore RIG-I E3. Il s'agit d'un capteur cytoplasmique de la présence de virus à ARN au niveau intracellulaire par un mécanisme de détection des monobrans négatifs. L'ubiquitine ligase est importante pour son activation. Les protéases du virus de l'hépatite C clivent *RNF135*, ce qui a pour conséquence l'inhibition de la production de l'interféron IFN de type 1 [Oshiumi *et al.*, 2013] (111). Ce gène code pour une protéine qui

contient un domaine *ring finger* (annulaire) connu pour être impliqué dans les interactions protéine-protéine et acides nucléiques-protéine, et qui est fréquemment délétée dans la neurofibromatose [Douglas *et al.*, 2007] (112).

CELF6 (CUGBP, Elav-Like Family Member 6), aussi connue sous le nom de BRUNOL6, est une protéine liant l'ARN qui non seulement régule l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager, mais qui est aussi capable d'éditer la séquence ARN messagers au niveau post-transcriptionnel (C>U). Cette protéine régule également la traduction dans de nombreux tissus [Ladd *et al.*, 2004] (113). Une erreur dans ce gène peut conduire à la perturbation des neurones sérotoninergiques, et il a également été montré que *CELF6* aurait un lien avec l'autisme [Dougherty *et al.*, 2013] (114).

Les promoteurs de *RNF135* et *CELF6* sont riches en îlots CpG. A ce jour, rien n'a été publié sur leur implication dans le diagnostic du carcinome hépatocellulaire, mais de toutes nouvelles données montrent qu'ils pourraient être des cibles de premier choix. Ces marqueurs ont été brevetés en 2014 par l'équipe du laboratoire dans lequel mes expériences ont été menées [Nagae *et al.*, 2014] (115). C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier leur pourcentage de méthylation sur de l'ADN circulant de patients porteurs d'un CHC.

Chapitre 2 : ADN tumoral circulant

1) Dénominations

L'ADN circulant est connu sous différentes dénominations, telles qu'acides nucléiques circulants CNA (*Circulating Nucleic Acids*), ADN tumoral circulant ctDNA (*circulating tumor DNA*), ADN libre ou extracellulaire cfDNA (*cell-free DNA*) ou encore en anglais *small amounts of circulating nucleic acids in the plasma and serum* (cfDNAPS). Parmi ces dénominations alternatives nous garderons délibérément l'expression d'ADN circulant tout au long de cette thèse qui se réfère à l'intégralité des ADN non encapsulés de la circulation sanguine. Ils peuvent être de nature : fragments d'ADN, ADN mitochondrial, ADN ou ARN viraux, ARNm (ARN messenger) ou encore miRNA (microARN) circulant dans le plasma et le sérum [González-Masiá *et al*, 2013] (116). Ils sont présents chez l'Homme et semblent également conservés à travers les règnes animaux et végétaux [Fleischhacker *et al*, 2007] (117).

2) Histoire

Ce sont deux français, Mandel et Métais, qui mentionnèrent pour la première fois le terme dans un journal dans les années 40 [Mandel et Métais, 1948] (118). Ils mirent en lumière la présence d'acides nucléiques libres dans le plasma sanguin chez l'homme. Il a néanmoins fallu attendre presque 30 ans pour acquérir une meilleure compréhension de ces fragments d'ADN. Dans les années 70, l'ADN circulant est mis en évidence chez des patients atteints de maladies auto-immunes [Koffler *et al.*, 1973] (119). Par la suite, une équipe américaine reportera un taux plus élevé d'ADN circulant dans le plasma des sujets atteints de cancer pancréatique. Cette même équipe reporta également dans certaines tumeurs une diminution considérable des quantités d'ADN circulant après chimiothérapie ou radiothérapie [Leon *et al*, 1977] (120).

L'ADN circulant est retrouvé dans d'autres fluides biologiques tels que l'urine, le lait maternel, les lavages bronchiques dépourvus de cellules, l'ascite, la moelle osseuse, les sucs gastriques et biliaires, les selles, les fluides lymphatiques, péritonéaux, cérébrospinaux et prostatiques *etc*, éléments qui ne seront pas développés dans cette thèse [Fleischhacker *et al.*, 2007] (117).

3) Caractéristiques

L'ADN circulant est une molécule double brin de faible poids moléculaire qui est fragmentée en de courts brins avec une taille moyenne comprise entre 140 et 170 paires de base (pb). La taille des fragments a été observée dès 1998 grâce à la microscopie électronique

[Giacona *et al.*, 1998] (121). Elle peut parfois avoisiner les 70 pb, mais peut aller jusqu'à 30 kilobases.

Il est à noter que l'ADN génomique qui s'enroule autour des 8 histones d'un nucléosome est d'environ 146 pb (ce qui correspond à un tour trois quart) et la région internucléosomique est d'environ 60 pb,

La distribution de la longueur des fragments d'ADN circulant possède un pic dominant à environ 167 pb qui coïncide avec la longueur de l'ADN associé à un chromatosome. Un chromatosome est constitué du nucléosome associé à une histone de liaison. Sur les fragments d'une longueur comprise entre 100 et 160pb on note une périodicité de décroissance d'environ 10,4 paires de bases. C'est à dire qu'en moyenne, l'ADN circulant est clivé toutes les 10 paires de bases, correspondant au pas de l'hélice, soit la longueur d'un tour complet d'hélice d'ADN. Les protéines du cœur nucléosomique protègent l'ADN circulant du clivage par l'endonuclease DNase I : NCP (*Nucleosome Core Particule*), ainsi que l'histone de liaison (*histone linker*), qui protège 20 paires de bases supplémentaires ($147+20 = 167$) [Lo *et al.*, 2010] [Snyder *et al.*, 2016] (122) (123).

Le modèle de clivage par la DNase I a mis en évidence deux classes dominantes : de longs fragments associés à un clivage entre les nucléosomes et de courts fragments associés à un clivage adjacent aux sites de liaison des facteurs de transcription (TFBS : *Transcription Factor Binding Site*). Les espaces internucléosomiques nus peuvent être considérés comme des sites d'hypersensibilité à la DNase I (DHS : *DNase I Hypersensitivity Site*) car ils ne sont pas protégés [Schep *et al.*, 2015] (124).

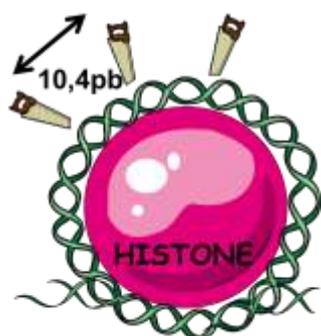


Figure 17 : Dégradation de l'ADN circulant [inspiré de Lo *et al.*, 2010] (122)

Cet ADN est présent en quantité infime, y compris chez les sujets sains ; seuls 10 à 100 ng/ml soit 10^3 à 10^4 copies peuvent être amplifiés par millilitre de sang, dont seule une fraction sera potentiellement utile au diagnostic [Wu *et al.*, 2002] (125). Ces fragments sont libérés sous forme de complexes nucléoprotéiques augmentant leur stabilité. Ces protéines spécifiques protègent l'ADN de la dégradation par les nucléases présentes dans la circulation sanguine [Stroun *et al.*, 2000] (126).

En étudiant la durée de présence d'ADN circulant fœtal dans le sang maternel en post-partum des femmes ayant donné naissance à un garçon (la présence d'ADN du chromosome Y facilitant le traçage de l'ADN circulant fœtal), il a été déterminé que la demi-vie de l'ADN circulant était de 30 minutes maximum, avec une moyenne de 16,3 minutes [Lo *et al.*, 1997] (127). C'est pourquoi il est primordial de centrifuger et de congeler les échantillons dans les plus brefs délais après le prélèvement sanguin.

Il a été montré que 3,3% de l'ADN total d'une tumeur maligne est introduit dans le sang quotidiennement. Pour une tumeur de 30g dans laquelle seulement 1,3% des 4000 fragments d'ADN circulant par millilitre de plasma sont porteurs d'une mutation, on estime que 0,15% d'ADN tumoral est relargué chaque jour dans la circulation [Diehl *et al.*, 2005] (128). Les répercussions physiologiques de la présence d'ADN circulants d'origine tumorale dans le sang restent méconnus, mais ils sont l'objet d'études pour évaluer de possibles applications en terme de diagnostic.

4) ADN circulant et cancer

Il fallut encore quelques années supplémentaires pour que l'importance de l'ADN circulant soit reconnue, avec la mise en évidence de la présence de matériel issu de tumeurs dans le sang : cellules, protéines, acides nucléiques. On ignore encore à partir de quel stade tumoral ou à partir de quelle taille de tumeur la détection d'ADN tumoral serait quantifiable avec certitude par les techniques actuelles. La présence, sur cet ADN circulant, de mutations sur les oncogènes a été reportée pour la première fois en 1994 avec le gène *K-ras* chez les patients atteints de cancer pancréatique ou colorectal [Sorenson *et al.*, 1994] (129), *N-ras* dans le syndrome myélodysplasique (MDS) et les leucémies myéloïdes [Vasioukhin *et al.*, 1994] (130). Par la suite, des mutations sur des gènes suppresseurs de tumeurs tel que *TP53* ont également été décelées sur de l'ADN circulant [Gonzalez *et al.*, 2000] (131). S'ensuivirent de nombreuses études sur les cancers touchants différents tissus : nasopharyngés, œsophagiques, gastriques, thyroïdiens, hépatiques, rénaux, pulmonaires, cutanés, mammaires, ovariens, utérins, prostatiques, cérébraux et hématologiques [Stroun *et al.*, 1989] (132).

Cependant, même si en moyenne les sujets sains ont une concentration en ADN circulant plus faible (13 ng/ml de sang ; de 0 à 100 ng/ml), que des sujets atteints de cancer (180 ng/ml ; de 0 à 5000 ng/ml), les taux ne sont pas constants dans le temps mais fluctuent.

Il a été montré que ces concentrations étaient plus élevées chez les patients présentant des métastases que chez ceux présentant une tumeur locale [Anker *et al.*, 1999] (133). De plus il existe une corrélation entre la concentration d'ADN circulant des patients et le pronostic dans les cancers pulmonaires. En effet, des concentrations élevées avant traitement sont

associées à une diminution de la survie. Ceci souligne le potentiel diagnostique de ces molécules [Sozzi *et al.*, 2001] (134).

Il est important toutefois de noter que ces concentrations peuvent refléter des processus physiologiques et pathologiques non-spécifiques des tumeurs. En effet, la concentration d'ADN provenant de tumeurs peut augmenter en cas de diabète, AVC, inflammation, infection, auto-immunité, exercice physique intense et chez les patients âgés atteints de pathologies chroniques [Swarup *et al.*, 2007] (135), ces paramètres sont donc à prendre en compte lors d'un éventuel diagnostic.

Enfin, comme décrit plus haut, des acides nucléiques fœtaux peuvent être retrouvés dans le sang maternel au cours de la grossesse, ce qui s'avère utile dans les stratégies de diagnostic génétique prénatal.

Les altérations de l'ADN circulant peuvent être de type : mutations ponctuelles, hyperméthylations de l'ADN, réarrangements chromosomiques, instabilités microsatellites (MI), perte d'hétérozygotie (LOH), intégrations de génome viral et mutations dans l'ADN mitochondrial.

Elles sont, pour la plupart, identiques à celles que porte la tumeur initiale, ce qui permet de retracer l'origine tumorale de l'ADN circulant [Esteller *et al.*, 1999] (136). Une hypo- ou hyperméthylation globale est fréquemment retrouvée au niveau des îlots CpGs des régions promotrices de certains gènes dans la tumeur. Dans ce travail, nous nous intéresserons à la méthylation de deux îlots CpGs sur des échantillons d'ADN circulant provenant de patients sains et atteints d'hépatocarcinome. De même, nous étudierons deux mutations ponctuelles sur des promoteurs d'intérêt.

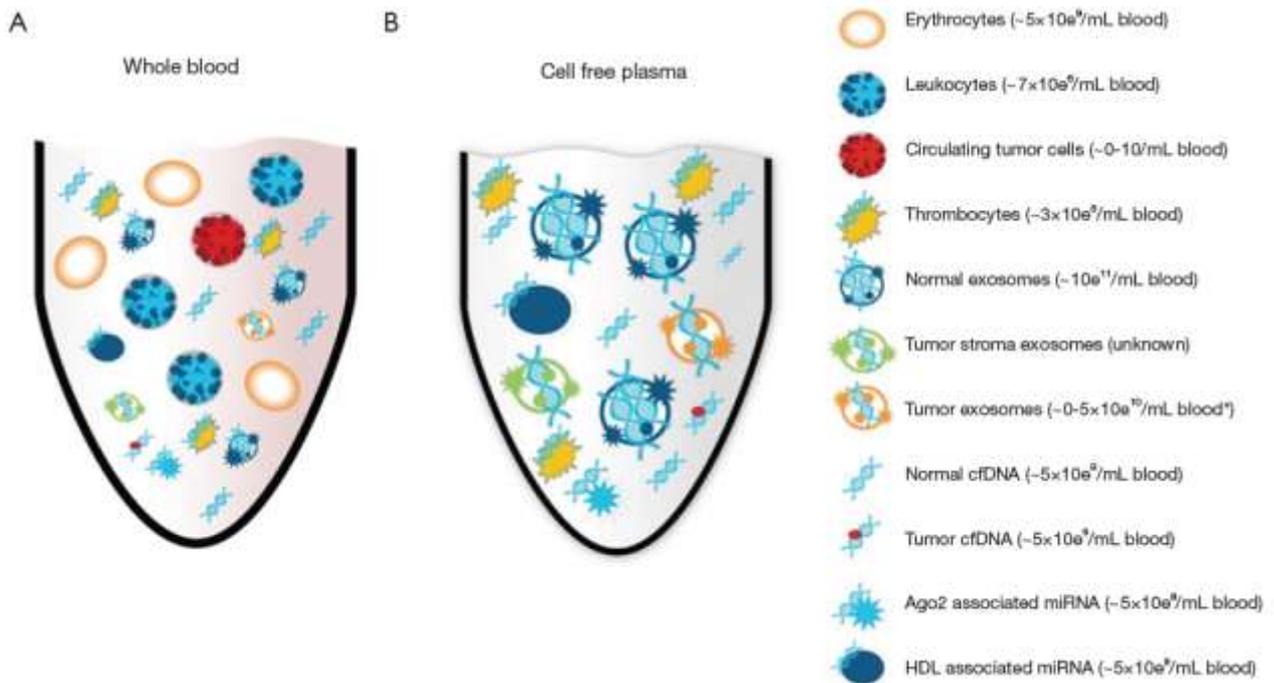


Figure 18 : Composition du plasma après extraction d'ADN circulant [Brock *et al.*, 2015] (137)

5) Origine

L'origine exacte de l'ADN et de l'ARN présents dans le plasma reste encore hypothétique. Chez les sujets sains, ils sont issus de la lyse des tissus avoisinants et des cellules nucléés circulant librement dans du sang. Chez les patients atteints de cancer, une partie de l'ADN circulant total possède les mêmes caractéristiques que l'ADN tumoral, avec des anomalies telles qu'un défaut de stabilité des brins, la présence d'oncogènes, d'instabilité microsatellitaire ou de modification du statut de méthylation [Stroun *et al.*, 2000] (126).

A partir de là, deux hypothèses sur l'origine de cet ADN sont plausibles : un phénomène actif et un passif. Premièrement, l'origine de l'ADN circulant pourrait être le fruit du relargage spontané de matériel génétique par les tissus ou tumeurs lors du renouvellement et/ou de la croissance cellulaire. Ainsi, une partie des cellules tumorales relarguées dans la circulation sanguine subira une mort cellulaire par le même mécanisme que les cellules sanguines et tissus sains. Le phénomène passif comprendrait de même la diffusion dans le système vasculaire de l'ADN issu de cellules tumorales subissant une nécrose ou une apoptose directement au sein de la tumeur en croissance [Schwarzenbach *et al.*, 2013] (138). En effet, le profil de migration de l'ADN circulant chez des individus sains sur électrophorèse ressemble à celui de l'ADN de cellules en apoptose [Giacona *et al.*, 1998] (121). La dégradation de micrométastases circulantes serait donc une source d'ADN circulant de même nature que la tumeur d'origine.

Par ailleurs, il a également été prouvé que l'ADN pouvait être transporté à travers les membranes par un processus actif [Anker *et al.*, 1976] (139). Les exosomes, ou vésicules d'exocytose lipidiques de 90 à 200nm contenant des acides nucléiques et des protéines, seraient également compris dans les processus actifs de production d'ADN circulant. Les exosomes permettent aux cellules d'éliminer du matériel en excès, ou servent de moyen de communication entre des entités biologiques distantes. Il a été montré que certaines tumeurs utilisent des vésicules dans le processus métastatique [Rodriguez *et al.*, 2015] (140).

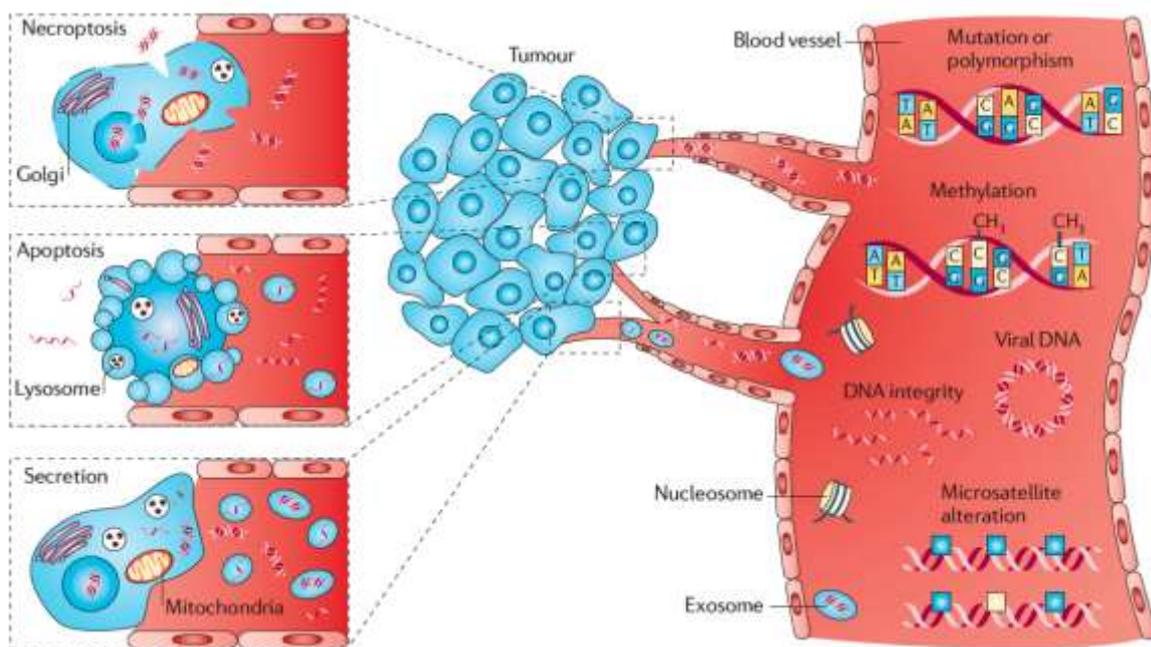


Figure 19 : Mécanisme hypothétique du relargage actif et passif des acides nucléiques circulants [Schwarzenbach *et al.*, 2011] (138)

L'hypothèse d'un relargage soit passif, soit actif reste soumise à controverse et divise les spécialistes. Sorenson remet notamment en cause l'idée de la lyse cellulaire, car le nombre de cellules tumorales circulantes serait trop faible pour maintenir la quantité d'ADN circulant observée chez les sujets cancéreux [Giacona *et al.*, 1998] (121). En effet, les ADN circulants dans le sang sont considérés comme relativement instables, au vu de la courte demi-vie de l'ADN circulant fœtal dans le sang maternel. Un relargage actif constant par la tumeur serait donc nécessaire au maintien d'une forte concentration d'ADN circulant chez les patients atteints de cancer. Cependant, une possibilité n'excluant pas l'autre, les deux phénomènes pourraient être concomitants.

6) ADN circulant au niveau hépatique

Les pourcentages d'ADN tumoral dans l'ADN circulant total varient en fonction de la tumeur [Gormally *et al.*, 2007]. Des études ont été menées jusqu'ici sur des tumeurs touchant de nombreux organes : œsophage [Hibi *et al.*, 2001] (141), colon [Kopreski *et al.*, 1997] (142), poumon [Usadel *et al.*, 2002] [Paci *et al.*, 2009] (143) (144).

Dans l'étude de l'équipe de Paci, il a été montré que la concentration en ADN circulant chez les sujets présentant un adénocarcinome pulmonaire était quatre fois supérieure (12,8 ng/ml en moyenne sur 151 patients) à celle des volontaires sains (2,9 ng/ml de moyenne sur 79 individus). De la même façon, une plus forte concentration est retrouvée chez les patients atteints de CHC ($47,1 \pm 43,7$ ng/ml sur 79 patients) et de cirrhose ($30,0 \pm 13,3$ ng/ml sur 20 patients) que chez les témoins ($17,6 \pm 9,5$ ng/ml) [Ren *et al.*, 2006] (145).

Le foie d'un individu moyen pèse environ 1 kilo et demi, et comprend quelques 100 milliards d'hépatocytes qui ont chacun une demi-vie de 400 jours. On estime que 2 à 7 mg d'ADN génomique seraient produits quotidiennement en raison du renouvellement rapide de plusieurs millions d'hépatocytes. Cet ADN génomique est majoritairement détruit de manière locale lors de la mort cellulaire, mais une partie est libérée dans la circulation sanguine.

L'ADN circulant possède les mêmes caractéristiques que l'ADN génomique, excepté en cas de cirrhose, où la destruction d'une quantité considérable de cellules non cancéreuses provoque un relargage massif de petits fragments d'ADN de nature apoptotiques [Gormally *et al.*, 2007] (146).

Des études sur l'hépatocarcinome ont déjà détecté une perte d'hétérozygotie ou d'instabilité microsatellitaire sur ADN circulant dans l'hépatocarcinome [Pang *et al.*, 2007 et 2006] (147) (148).

7) Conditions préanalytiques

L'instabilité des ADNs circulants requiert un procédé robuste pour la récolte, la conservation, et l'extraction des échantillons.

Il est possible d'analyser l'ADN circulant aussitôt après extraction du plasma. Le tube de prélèvement recommandé est le tube EDTA (2 tubes de 7 ml ou 3 tubes de 5 ml). L'héparinate de lithium inhibant les réactions d'amplification de l'ADN par PCR, les tubes héparinés (verts) seront donc proscrits [Sozzi *et al.*, 2001] (134). Etant donné la brièveté de la demi-vie de l'ADN circulant, le tube devra être acheminé au laboratoire pour centrifugation dans les deux heures suivant le prélèvement à température ambiante.

Pour une étude génétique différée sur l'ADN circulant, le prélèvement devra être centrifugé sur place à 2000 gauges pendant 10 minutes, puis décanté dans un tube à hémolyse et conservé à -20°C. Le transport devra être effectué à 4°C ou sur carboglace.

Pour un service d'analyse génétique d'ADN tumoral circulant dispensé par voie postale, un tube Cell-Free DNA BCT® (*Blood Collection Tube*) de 10ml est nécessaire. Ces tubes sont commercialisés par l'entreprise Streck® aux Etats-Unis. Ils permettent de maintenir la stabilité de l'ADN à température ambiante pendant une durée maximum de 14 jours. L'anticoagulant contenu dans ces tubes est le K₃EDTA [Norton *et al.*, 2013] (149).



Figure 20 : Tube Cell-Free DNA BCT®

Le plasma est préférable au sérum ; bien que plusieurs études suggèrent que ce dernier contienne une plus forte concentration en ADN circulant [Lee *et al.*, 2001] [Taback *et al.*, 2004] [Vallée *et al.*, 2013] (150) (151) (152). Celui-ci aura tendance à être pollué par de l'ADN génomique des leucocytes sanguins, ce qui peut en partie s'expliquer par une contamination extrinsèque d'ADN cellulaire durant le processus de coagulation. Au moment de la séparation entre le culot globulaire et le sérum dans le tube, une partie des leucocytes relargueraient leur ADN et contamineraient l'ADN circulant [Umetani *et al.*, 2006](153). Il a également été prouvé que la conservation des échantillons à 4°C permet de limiter l'augmentation de cette concentration par rapport à un stockage à température ambiante [Jung *et al.*, 2003] (154).

8) Les cellules tumorales circulantes (CTC)

Sous le terme de biopsie liquide, on regroupe trois classes de composants trouvés dans la circulation du sang : l'ADN circulant, les vésicules extracellulaires comme les exosomes, et les CTC ou cellules tumorales circulantes. Ces dernières furent observées pour la première fois en 1869 dans le sang d'un patient présentant des métastases qui pourraient en être la source. [Ashworth, 1869] (155). Il a été montré que ces cellules renferment des composants de pathogénèse et de malignité. Comme l'ADN circulant, leur taux augmente en cas de cancer progressif et leur étude peut fournir une aide à la décision thérapeutique [Mavroudis *et al.*, 2010] [Pantel *et al.*, 2010] (156) (157).

Les CTC peuvent être dénombrées ou triées par leurs antigènes de surface (clusters de différenciation) ou leurs caractéristiques morphologiques. Le système CellSearch® est commercialisé depuis les années 2000 comme moyen de détection et de quantification des

CTC. Mais ces cellules restent rares, environ une pour 100 000 voire un million de leucocytes.

En raison de difficultés techniques dues à leur rareté, les études sur l'ADN circulant, actuellement en plein essor, sont plus nombreuses que celles sur les CTC.

9) Conclusion

Plusieurs tumeurs sécrètent des protéines dans la circulation sanguine et celles-ci sont utilisées comme marqueurs tumoraux en pratique clinique. L'ADN circulant est en passe de devenir un biomarqueur tumoral universel de nouvelle génération, pour les raisons suivantes.

L'évaluation de la réponse à une chimiothérapie nécessite parfois des biopsies répétées. Obtenir une biopsie comporte des risques pour le patient, sans compter certaines difficultés techniques en fonction de la localisation du prélèvement. L'ADN circulant, désormais appelé « *biopsie liquide* » [Kenneth *et al.*, 2015] (158), est une méthode à haut potentiel diagnostique et pronostique, qui est de plus rapide, sensible, précise et non invasive.

Les enjeux sont élevés car la biopsie liquide pourrait à terme fournir, en dehors de données épidémiologiques, un diagnostic plus précoce et une amélioration considérable du confort des patients. En effet, cette précocité s'explique par le fait que la tumeur et même ses caractéristiques seraient potentiellement définies même avant apparition de la tumeur sur l'imagerie ou encore avant les premiers symptômes de la pathologie. La demi-vie très courte de l'ADN circulant, qui constitue un challenge au niveau de la collecte et de la conservation des échantillons, pourrait cependant permettre un suivi précis et en temps réel des variations de concentration au cours d'un traitement.

Au fil des années, l'étendue des possibilités et des limites de l'ADN circulant en tant qu'outil diagnostique sera de mieux en mieux définie. La mise au point de techniques pour l'amplification et le séquençage de l'ADN circulant de façon simple, rapide, fiable, bon marché, et utilisable à grande échelle en routine et normalisable reste un challenge. La partie expérimentale de cette thèse apporte un début de réponse à la question du potentiel diagnostique de l'ADN circulant dans le contexte de l'hépatocarcinome.

On note malgré tout un bémol concernant l'origine de l'ADN circulant. En effet, dans le prélèvement plasmatique, cohabitent à la fois des ADN circulants dit « normaux » et « tumoraux ». A l'heure actuelle, il nous est impossible de différencier les deux. Ce traçage de l'ADN circulant pourrait être résolu dans les années voire les mois qui viennent, car une nouvelle publication clé propose un début de solution au problème [Snyder *et al.*, 2016] (123). Ce thème sera développé dans la partie discussion.

MATERIEL ET METHODES

A. Echantillons : origine et culture

1) Echantillons cliniques

Le sang périphérique d'une cohorte de plus de 200 patients de l'hôpital de la Nihon University a été collecté. Ces patients présentaient tous un carcinome hépatocellulaire au moment du prélèvement lors de leur hospitalisation dans le service de chirurgie gastro-intestinale du Dr Yutaka Midorikawa. Aussi, dix témoins négatifs ont été prélevés au laboratoire.

Après centrifugation, les échantillons d'un volume d'un ou deux millilitres de plasma sont conservés dans des tubes en plastique Nunc™. Nous y avons ajouté une seconde étape de centrifugation de 10 minutes, 1900 gauges (g) correspondant à 300 tours par minutes (rpm : rotation per minute) à une température de 4°C afin de prévenir la contamination des plasmas par de l'ADN de leucocytes.

Le plasma sanguin constitue 55% du volume total de sang. Il contient des facteurs de coagulation et du fibrinogène tandis que le sérum en est dépourvu.

2) Lignée cellulaire

La lignée tumorale humaine HepG2 a été préparée pour être utilisée comme contrôle positif. Elle dérive du tissu hépatique d'un patient caucasien de 15 ans atteint d'un carcinome hépatocellulaire bien différencié. Cette lignée cellulaire transformée et immortelle est couramment utilisée dans les études biochimiques et de biologie cellulaire hépatique.

Elle est connue pour avoir des modifications au sein du promoteur *TERT*. Les cellules HepG2, de morphologie épithéliale, sont adhérentes, monocouches, forment de larges agrégats, ont 55 paires de chromosomes et ne sont pas tumorigènes chez la souris immunodéprimée [[Altogen Biosystems](#)] (159).

3) Culture cellulaire

La lignée humaine d'hépatoblastome HepG2 a été obtenue à partir de l'American Type Culture Collection. Elles ont été incubées sur milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*) additionnées de 10% de sérum de veau foetal (FBS) à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂.

B. Extraction de l'ADN circulant

Le kit QIAamp® Circulating Nucleic acid (ref 55114, Qiagen®) a été utilisé pour extraire les courts fragments d'ADN circulant dans le sérum ou le plasma des patients. Ceci a

été effectué à l'aide d'un dispositif de vide QIAvac 24 Plus® en suivant les recommandations du fabricant. La seule modification a lieu lors de la dernière étape de centrifugation, où nous avons utilisé deux fois 25µl de tampon AVE comme volume final pour la collection de l'ADN circulant. La concentration en ADN varie entre 1–100 ng/ml en fonction du patient.

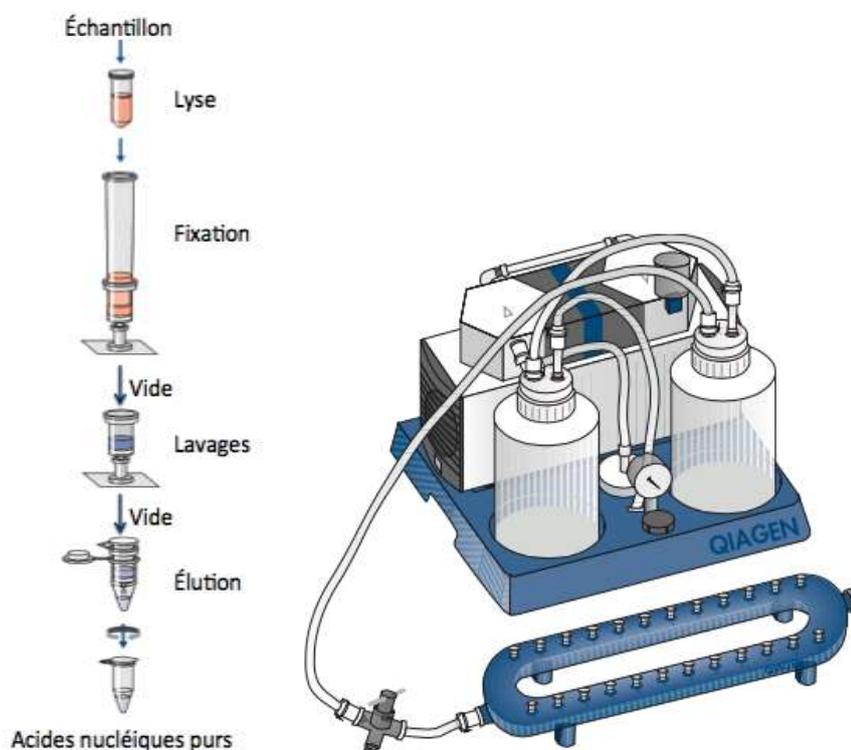


Figure 21 : Procédure d'extraction de l'ADN circulant par QIAamp [traduction de la notice explicative de Qiagen®]

C. Extraction de l'ADN génomique

Le kit QiaQuick® PCR Purification (ref: 28106, Qiagen®) a été utilisé pour extraire l'ADN génomique de la lignée HepG2 en suivant les recommandations du fabricant.

D. Purification des produits PCR

Le kit MinElute® Reaction Cleanup (Ref: 28206, Qiagen®) a été utilisé après chaque réaction de PCR pour purifier les produits de PCR.

E. Quantification de l'ADN

La concentration en ADN a été vérifiée après chaque étape d'extraction ou d'amplification en utilisant 1µl d'échantillon avec Nanodrop3000® ou le kit Qubit® dsDNA HS Assay (ref: Q32854, Life Technologies®) associé au Qubit® 1.0 Fluorometer ainsi que leurs logiciels respectifs.

Il est à noter que 1000 cellules donnent 2000 copies d'ADN, soit seulement 3,6 ng d'ADN. Le principe du Nanodrop® est une mesure de l'absorbance à 260nm d'une solution

d'ADN plus ou moins diluée pour le quantifier. Une unité de d'absorbance ou DO (densité optique) à 260nm correspond à 50µg/ml d'ADN (double brin). Un autre paramètre est calculé, il s'agit de la pureté : le rapport DO 260nm/DO 280nm doit être entre 1,8 et 2. Un rapport inférieur à 1,8 peut indiquer une contamination par les protéines. Le rapport DO 260nm/DO 230nm doit être supérieur à 1,3. S'il est inférieur, il existe une contamination par des sels qui sont susceptibles d'inhiber la PCR.

Sur le même principe de détection de l'absorbance, le système Qubit® utilise des sondes qui ne fluorescent qu'une fois liées aux ADN, ARN et protéines. Cette quantification est plus spécifique des acides nucléiques et s'affranchit de l'absorbance des contaminants. Elle est utilisable à partir de 10 pg/µl d'ADN.

F. Mesure de la longueur de l'ADN

1) **Agilent DNA 1000**

Le Bioanalyzer Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies®) est un système basé sur l'électrophorèse capillaire qui permet d'analyser l'ADN, l'ARN et les protéines. Il a une capacité de traitement de 12 échantillons par puce et les résultats sont générés en 30 minutes environ. L'électrophorèse capillaire est utilisée pour séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille et de leur charge. Les produits de PCR sont mesurés précisément, quantifiés et alignés par rapport aux fragments du marqueur de taille moléculaire. Les produits ont été analysés sur le support DNA 1000 LabChips en fonction des recommandations du fabricant. Le colorant de gel a été préparé avec 20µl de colorant concentré additionné à 400µl de matrice de gel ; le mélange a été passé à travers un filtre à centrifuger puis déposé sur le support.

5µl de marqueur ont été ajoutés à chaque puits, auxquels ont été ajoutés soit 1µl de marqueur de taille moléculaire, soit 1µl d'échantillon. Le support a été vortexé puis passé dans le Bioanalyzer Agilent 2100 en utilisant le logiciel Expert 2100.

2) **Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System**

L'appareil TapeStation® (ref: G2964AA, Agilent Technologies®) est un système d'électrophorèse sur gel automatisé pour l'ADN, l'ARN et les protéines. Les cassettes sont des dispositifs dotés de 16 canaux individuels pré-remplis de réactifs permettant donc de traiter 16 échantillons par série. D'autres cassettes peuvent permettre d'analyser jusqu'à 96 échantillons simultanément. Les produits de PCR sont analysés en utilisant le kit High Sensitivity D1000 (200600-1) sur la TapeStation® en suivant les recommandations du fabricant. Les échantillons ont été déposés dans les 8 tubes pour une PCR d'un volume de

0,2ml ; 2µl de marqueur de taille moléculaire sont ajoutés au premier tube puis 2µl de tampon de charge ainsi que 2µl d'échantillons dans les tubes suivants. Les tubes sont bouchés par des capuchons avant d'être vortexés durant une minute. En utilisant une microcentrifugeuse de paillasse, nous rassemblons l'intégralité du liquide au fond du tube, un procédé que nous appellerons ici *spin down*. Les tubes, cônes fournis et cassettes sont placés dans le Lab901 TapeStation® et passés en utilisant le logiciel TapeStation® Controller GeneTools.

3) Caliper HT DNA High Sensitivity LapChip®

Le kit HT DNA High Sensitivity Labchip® GX/GXII (ref: 522-2447, Caliper LifeSciences®) a été utilisé en suivant les recommandations fournies par le fabricant. Le marqueur de taille moléculaire a été préparé en ajoutant 12µl de solution de marqueur initiale à 1X de tampon. Ensuite pour chaque analyse cette préparation a été additionnée de 96µl d'eau distillée. 8µl d'eau de qualité biologie moléculaire dépourvue de RNase a été déposée dans chaque puits d'une plaque 96 puits. Après fermeture, la plaque est centrifugée à 1000g pendant deux minutes. La solution Gel-Dye et le marqueur d'ADN sont chargés dans le support DNA LapChip® GX instrument. Le logiciel The GX software contrôle le passage des échantillons.

G. Préparation des contrôles négatifs

Les contrôles négatifs ont été préparés par prélèvement de sang total de volontaires sains. Les tubes EDTA BD Vactutainer™ de sang total ont été centrifugés pendant 10 minutes à 1900g (3000 rpm) à une température +4°C. Le surnageant a été méticuleusement aspiré sans troubler la couche leucoplaquettaire. Environ 4 à 5 millilitres de plasma peuvent être obtenus à partir de 10 millilitres de sang total. La seconde centrifugation a été effectuée à 16 000 g à une température de 4°C. Pour l'extraction des acides nucléiques, le plasma peut être conservé entre 2 et 8°C s'il doit être utilisé immédiatement dans la journée, ou bien à -80°C dans le cas contraire.

Un contrôle positif a été créé en troublant volontairement la couche leucoplaquettaire. Par ce test, nous pourrions évaluer l'importance de la contamination de l'échantillon final d'ADN circulant par de longs fragments d'ADN d'origine leucocytaire. Cette appréciation a été effectuée par les trois méthodes qualitatives citées ci-dessus.

H. PCR (Réaction de Polymérisation en chaîne)

1) **Design des amorces**

La séquence cible du promoteur *TERT* a d'abord été vérifiée sur le site Internet de référence UCSC *genome browser* de l'institut de génomique de l'Université de Californie Santa Cruz. La spécificité des amorces a été vérifiée avec l'outil en ligne Bisearch et UCSC *in-silico* PCR.

La séquence à amplifier sur de l'ADN circulant doit être comprise idéalement entre 170 et 200 paires de bases, et correspondre à la taille moyenne des fragments d'ADN circulants. Pour la PCR au bisulfite, la séquence à amplifier doit comporter un maximum de dinucléotides CG d'intérêt. La température optimale de fusion des amorces doit être proche de 55°C, être proche du site d'initiation de la transcription, avoir une longueur entre 21 et 26 paires de bases et avoir une stabilité supérieure à 10kcal/mol. La température d'hybridation doit être comprise idéalement entre 52°C et 65°C, et des essais doivent être réalisés au préalable pour déterminer la température optimale. Cette température est calculée selon la formule ci-dessous, avec T_m (*melting temperature*) la température d'hybridation des amorces, M la concentration en ions monovalents et L la longueur en base.

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log M + 0,41(\%GC) - [500/L] - 0,6(\%formamide) - 1,5(\%mésappariements)$$

La formule simplifiée couramment utilisée pour les oligonucléotides entre 14 et 24 paires de bases est : $T_m = 4(G+C) + 2(A=T)$. Si la température est supérieure au T_m , les amorces sont stables de façon libre dans le mélange et ne se fixent pas. Si on diminue la température d'hybridation, on perd en spécificité et inversement.

Les amorces se fixent à l'extrémité 3' des brins par un clamp GC stable.

Les séquences des amorces sens et anti-sens ont été obtenues par l'outil All-in-One. Le logiciel Primer3 (v.0.4.0) permet de vérifier l'incapacité des amorces à former des dimères et des mésappariements.

Les motifs à éviter sont : les épingles à cheveux, les palindromes, la formation d'homodimères et d'hétérodimères, les paires CG, les longues séquences T répétitives, une différence de température de fusion avec un écart supérieure à 25°C par rapport à l'amplicon.

Les outils de référence suivants ont été utilisés dans le design des amorces :

<http://www-personal.umich.edu/~ino/blast.html>

<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

<http://bisearch.enzim.hu>

L'un des seuls bémols de ces outils est qu'ils ne peuvent pas tenir compte de tous les polymorphismes.

2) Amplification de l'ADN

L'amplification des fragments de séquences d'ADN génomique humain contenant le promoteur *TERT* et du promoteur du gène de la β -caténine *CTNNB1* a été réalisée en utilisant les conditions de PCR décrites ci-dessous sur le thermocycleur CFX 96™ Real-Time System C1000 Touch™, Biorad®. Nous avons déterminé au préalable la quantité optimale d'ADN pour cette PCR, aux alentours de 5ng pour l'ADN circulant, et de 25ng pour l'ADN génomique (correspondant à environ 5 μ l dans nos échantillons).

2. a) Mélange réactionnel New England Biolab NEB® Q5 High-Fidelity 2X Master

Mélange	Volume (μ l)
Q5 High-Fidelity 2X Master	10
Amorce sens 50 μ M	0,2
Amorce anti-sens 50 μ M	0,2
ADN	5
Eau stérile exempte de nucléases	qsp 20 μ l

Tableau 3 : Composition du mix compatible avec *NEB® Q5 High-Fidelity 2X Master*

En suivant les recommandations du fabricant :

Etape	Température	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	98°C	30 secondes	1
Dénaturation	98°C	5-10 secondes	35
Hybridation	55-65°C	10-30 secondes	
Extension	72°C	20-30 secondes	
Extension terminale	72°C	2 minutes	1
Conservation	4-10°C	∞	1

Tableau 4 : Programme de PCR recommandé pour *NEB® Q5 High-Fidelity 2X Master*

2. b) Mélange réactionnel KAPA® HiFi Hot Start ReadyMix PCR

En suivant les recommandations du fabricant :

Mélange	Volume (μ l)
2X Kapa Hifi Hotstart Mix	10
Amorce sens 50 μ M	0,12
Amorce anti-sens 50 μ M	0,12
ADN	5
Eau stérile exempte de nucléases	qsp 2 μ l

Tableau 5 : Composition du mix compatible avec *KAPA® HiFi Hot Start ReadyMix PCR*

Etape	Température	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	95°C	3 minutes	1
Dénaturation	98°C	20 secondes	35
Hybridation	66-75°C	15secondes	
Extension	72°C	15 secondes	
Extension terminale	72°C	1 minute	1
Conservation	4-10°C	∞	1

Tableau 6 : Programme de PCR recommandé pour KAPA® HiFi Hot Start ReadyMix PCR

2. c) Mélange réactionnel Next New England Biolab® High-Fidelity 2X GC Rich Mix 13A

Mélange	Volume (µl)
NEB GC Rich Mix 13A	5
Amorce sens 10µM	0,5
Amorce anti-sens 10µM	0,5
ADN	2,5
Eau stérile exempte de nucléases	qsp 10µl

Tableau 7 : Composition du mix compatible avec Next NEB® High-Fidelity 2X GC Rich Mix 13A

Le programme utilisé est le même que pour le mélange réactionnel New England Biolabs NEB® Q5 High-Fidelity 2X Master vu au paragraphe H2a).

Pour chaque cible, la concentration en MgCl₂ et en DMSO du mix a été ajustée. Le MgCl₂ permet d'augmenter la stringence des amorces. Le DMSO permet de faire diminuer le T_m si la région est trop riche en paire de bases GC, mais cela a pour conséquence de diminuer le rendement. Les produits à amplifier étant très courts (Entre 80 et 200pb), les phases d'hybridation et d'élongation doivent être eux aussi très courtes.

I. Vérification des produits de PCR

La taille des produits de PCR a été vérifiée sur gel d'électrophorèse à 2% d'agarose préparé par nos soins à partir du gel Invitrogen® Ultrapure. La migration se fait dans du tampon TBE 0,5X pendant 20 minutes à 100 volts. Le tampon TBE 0.5X est dilué dans de

l'eau désionisée à partir d'un stock TBE 10X (1M Tris base ; 1M acide borique ; 20mM EDTA).

Les bandes d'ADN sont révélées grâce au bromure d'éthidium sous lampe UV, et comparées à celles du marqueur de taille moléculaire qui est gradué toutes les 100 pb.

1) Pré-vérification de la séquence à l'aide d'enzyme de restriction [New England Biolab®]

Produits de PCR purifiés 10µl	}	25°C, 60min
Enzyme <i>SmaI</i> 1µl		
Tampon n°4 (idéal pour <i>SmaI</i>) 2µl		

L'enzyme *SmaI* est connue pour scinder les régions CCC[□]GGG que l'on retrouve au sein du promoteur *TERT*.

Produits de PCR purifiés 10µl	}	37°C, 30min
Enzyme <i>AluI</i> 1µl		
Tampon n°4 2µl		

L'enzyme *AluI* est connue pour scinder les régions AG[^]TC que l'on retrouve au sein du promoteur *TERT*, ainsi que dans le promoteur du gène de la β-caténine *CTNNB1*.

2) Clonage

2. a) Adénylation

Mélange d'adénylation	µl
Produit de PCR	9
Tampon de PCR (10X)	2
dATP (10X) 2nM	2
ADN polymérase (T4)	1
Eau stérile exempte de nucléases	6

Tableau 8 : Composition du mix d'adénylation

La réaction d'adénylation consiste en l'ajout d'une adénosine aux extrémités 3' d'un fragment d'ADN dans le but de l'insérer dans un plasmide (procédure couramment appelée clonage de l'ADN). La réaction dure entre 30 minutes et une heure à 72°C. La polymérase T4 provient de la compagnie Takara®. Les produits sont ensuite purifiés par le kit MinElute® Reaction Cleanup (Ref: 28206, Qiagen®). Au final, 90% of de l'ADN préalablement mesuré est conservé lors de cette réaction.

2. b) Insertion dans un plasmide (clonage)

Le plasmide utilisé est le pGEM®-T Easy Vector Systems (ref: A3600, Promega®).

Lors du clonage, il est important de mélanger le fragment d'ADN à cloner et le plasmide linéarisé dans des proportions soit équimolaires, soit avec un excès du fragment le plus petit. Pour un plasmide de 2686 pb, une quantité de 0,03pmol correspond à 50ng. À titre d'exemple, le produit d'amplification du promoteur *TERT* par les amorces F3R2 étant de 168 pb, la quantité d'ADN requise pour la ligation doit être comprise entre 3,15~31,5ng (0,03~0,3pmol).

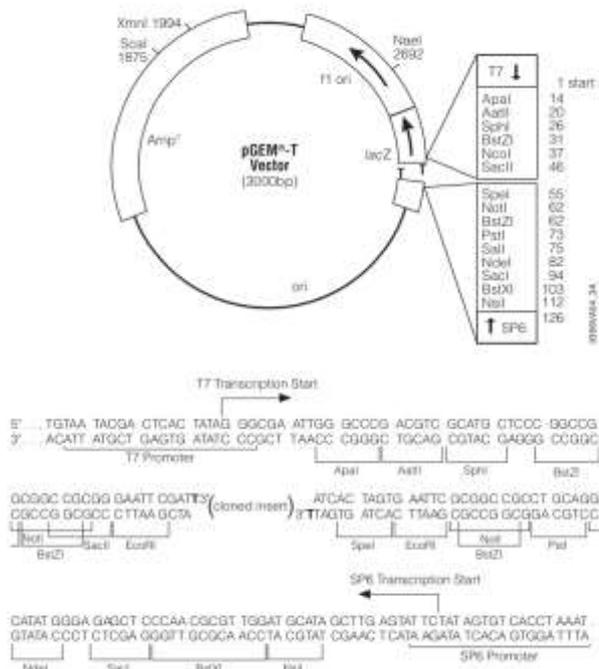


Figure 22 : Composition du PGEM-T easy™vector [Promega®]

T7 : GTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGG 28nt -25 +3

SP6 : GCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAG 26nt 141 167

La taille initiale de l'insert est de : 141bp + 25 + 25 = 191bp

Mélange pour clonage TA	Volume
Vecteur plasmidique	1µl (50ng)
ADN inséré	2µl (0,03~0,3pmol)
Solution I (Solution d'enzyme)	7µl
Eau stérile exempte de nucléases	Qsp 14µl

Tableau 9 : Composition du mix pour le clonage

2. c) Transformation plasmidique

Environ 100µl de bactéries *Escherichia coli* DH5α de haute compétence sont additionnées à 7µl du mélange précédent contenant les plasmides nouvellement formés. Ce mélange a subi un choc thermique en étant plongé exactement 45 secondes dans un bain-marie à précisément 42°C puis plongé immédiatement dans la glace pendant 2 minutes. 950µl du milieu SOC* sont ajoutés au réactif de ligation et incubé à 37°C pendant 20 minutes avant d'être centrifugés pendant 3 minutes à 3000 tours par minutes pour laisser les bactéries récupérer avant la sélection par les antibiotiques.

Les cellules bactériennes sont ensuite cultivées sur des milieux gélosés LB-Ampicilline (lysogeny broth) préalablement complétés par le composant X-Gal et incubées toute la nuit à 37°C. 18h à 24h plus tard, les colonies blanches sans colonies satellites sont

sélectionnées. En effet, si le fragment de PCR est bel et bien inséré dans le plasmide, le gène lacZ de l'espèce *E.coli*, responsable de la production d'un pigment bleu au contact du composé X-Gal, se trouvera scindé puis éliminé.

*Le milieu SOC est un bouillon SOB, utilisé pour la culture des bactéries *Escherishia coli*, additionné de glucose (Super Optimal Broth with Catabolite repression) [Hanahan &al., 1983]. Sa composition est la suivante : 2% de tryptone, 0.5% d'extrait de levure, 10mM de NaCl, 2.5mM de KCl, 10mM de MgCl₂, 10mM de MgSO₄ et 20mM de glucose.

2. d) Vérification de l'insert par PCR sur les colonies

Les colonies sélectionnées sont transférées dans des microtubes et subissent une nouvelle amplification par PCR. Les amorces des promoteurs SP6 et T7 du kit sont conçues pour le séquençage des inserts clonés dans le vecteur pGEM®.

La vérification de la taille des inserts à l'intérieur du plasmide est effectuée sur gel d'électrophorèse à 2% d'agarose. Les produits d'intérêt sont purifiés par le kit GenElute® miniprep en suivant les recommandations du fabricant. La concentration d'ADN de chaque échantillon est vérifiée avec le logiciel Nanodrop3000, et ceux-ci sont traités par le kit Dye Terminator 3.1 qui permet de séquencer chaque fragment.

Séquence des amorces par Promega® :

SP6 : 5'-d(TATTTAGGTGACACTATAG)-3'

T7 : 5'-d(TAATACGACTCACTATAGGG)-3'

Mélange pour PCR sur colonie	25µl
Tampon de PCR 10X	2.5
Mélange de dNTP 1,25mM	4
Amorce plasmidique (T7)	0,25
Amorce plasmidique (SP6)	0,25
Polymérase Taq (GA)	0,3
Eau stérile exempte de nucléases	17,7

Tableau 10 : Composition du mix de vérification de l'insert

Etape	Température	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	96°C	3 minutes	1
Dénaturation	95°C	40 secondes	35
Hybridation	52°C	40 secondes	
Extension	72°C	40 secondes	
Extension terminale	72°C	5 minutes	1
Conservation	20°C	∞	1

Tableau 11 : Programme de PCR de vérification de l'insert

J. Séquençage Sanger

Mélange pour le séquençage	Volume (µl)
BD 3.1 ready reaction premix	1
Tampon Big Dye sequencing	3,5
Amorce plasmidique T7 2µM	1,6
Echantillon d'ADN plasmidique	1
Eau stérile exempte de nucléases	qsp 20µl

Tableau 12 : Composition du mélange de PCR pré-séquencage

1) Cycle de séquençage

Etape	Température	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	98°C	10 minutes	1
Dénaturation	95°C	10 secondes	25
Hybridation	50°C	5 secondes	
Extension	60°C	4 minutes	
Conservation	4°C	∞	1

Tableau 13 : Programme de PCR pré-séquencage

2) Purification des produits de PCR par précipitation à l'Ethanol/EDTA/NaOAc

2µl d'EDTA, 2µl d'acétate de sodium et 50µl d'éthanol 100% sont ajoutés à l'échantillon. La précipitation se fait à température ambiante pendant 15 minutes. S'ensuit une centrifugation de 20 minutes à 4°C. Un seul lavage à l'aide de 250µl d'éthanol à 70% est requis avant séchage.

K. Traitement au bisulfite de sodium

La désamination de la cytosine par le bisulfite de sodium et la PCR qui en résulte sont constituées de 5 étapes critiques : (1) la dénaturation en simple brin d'ADN, (2) la réaction du bisulfite avec la double liaison 5-6 de la cytosine pour donner un dérivé sulfoné, (3) la désamination hydrolytique de celui-ci pour donner un dérivé uracile sulfoné, (4) un traitement alcalin permettant la désulfonation, et enfin, (5) l'obtention de l'uracile. L'ADN subira ensuite une amplification par PCR.

Il arrive que la conversion cytosine-uracile aboutisse à la création de paires qui ne sont pas de type Watson-Crick, c'est-à-dire non complémentaires (uracile-guanine), c'est pourquoi l'ADN doit être amplifié avec des paires d'amorces séparées qui sont spécifiques respectivement de la partie supérieure et inférieure du brin d'ADN, pour garder l'information spécifique à chaque brin. Au cours de l'amplification par PCR, l'uracile (U) sera amplifié comme une thymine (T) alors que les résidus cytosines 5-méthylées (5-MeC) sont amplifiés en tant que cytosine (C). Afin de déterminer la méthylation avec une résolution au nucléotide près, l'amplicon de PCR peut être séquencé aussi bien directement qu'après clonage. La méthylation de l'ADN dans la zone cible de la PCR est ensuite lue en évaluant le taux de cytosine demeurant dans la séquence [Clark & al., 2006](160).

La taille des fragments de PCR sur ADN circulant ne dépassant pas les 200pb, il n'est nécessaire ni de pré-traiter les échantillons en les fragmentant par sonication ou par digestion avec des enzymes de restriction, ni de les dénaturer par la soude NaOH 6N.

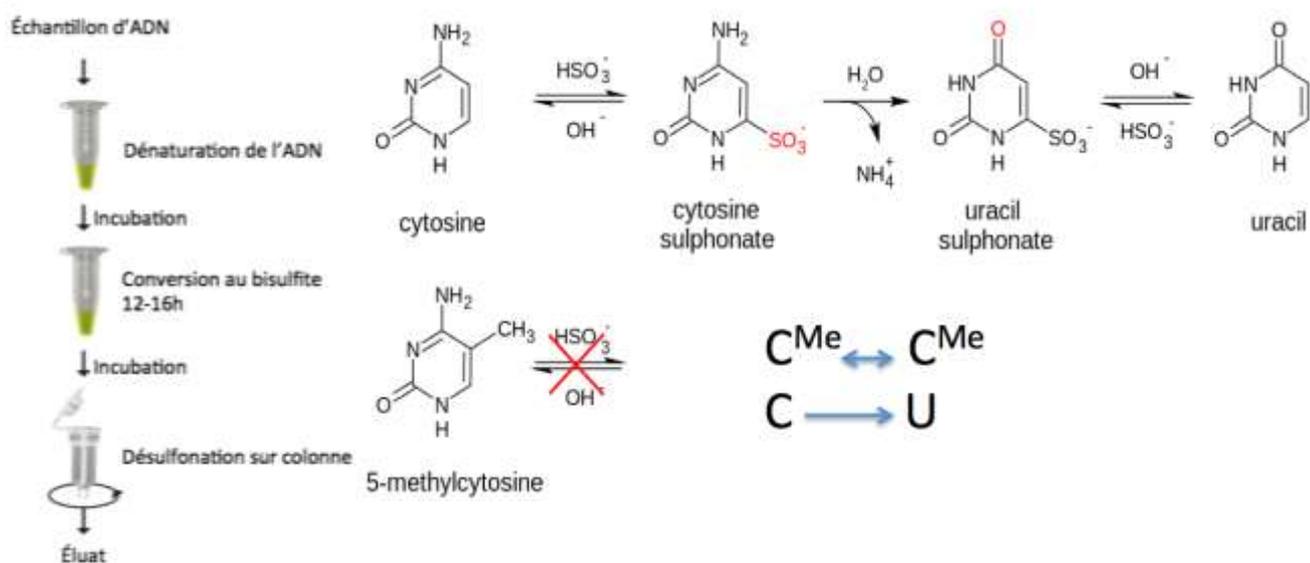


Figure 23 : Mécanisme moléculaire de la transformation par le bisulfite de sodium

1) Conversion de l'ADN au bisulfite par désulfonation

Le kit EZ DNA Methylation™ de Zymo Research® (ref: D5001) a été utilisé pour chaque série de 10 échantillons de 500 pg à 2µg, avec une efficacité optimale entre 200 et 500 ng. La solution de conversion CT, permettant de convertir les cytosines méthylées en uracile, a été préparée de façon extemporanée et protégée de la lumière. Le kit a été utilisé en respectant les recommandations du fabricant.

2) Amplification par la PCR au bisulfite

1µl d'ADN de chaque échantillon est amplifié par PCR en utilisant la polymérase Taq Hotstar (QIAGEN®). Il est coutume de fixer le nombre de cycles à 30 pour de l'ADN génomique et aux alentours de 40 pour de l'ADN tumoral, ce qui donnera environ un million de copies avant épuisement des réactifs. Les produits de PCR sont de nature plutôt résistante et peuvent être maintenus quelques heures à 20°C avant d'être stockés à +4°C.

La taille des produits de PCR est déterminée sur gel d'électrophorèse fait d'agarose à 2% et révélée par le bromure d'éthidium sous lumière UV.

Mélange pour PCR au bisulfite	Volume (µl)
KAPA® Uracil+ Master mix	5
Amorce sens 2µM	0,6
Amorce anti-sens 2µM	0,6
Echantillon d'ADN	1µl (10ng)
Eau stérile exempte de nucléases	Qsp 10µl

Tableau 14 : Composition du mix pour la PCR au bisulfite

Etape	Température	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	95°C	3 minutes	1
D naturation	98°C	20 secondes	35
Hybridation	52°C	15 secondes	
Extension	72°C	1 minute	
Conservation	4°C	∞	1

Tableau 15 : Programme de PCR au bisulfite

L. Analyse des séquences

Les échantillons sont dissous dans le formaldéhyde pendant dix minutes, puis 10µl de cette solution sont transférés sur une plaque adaptée à l'analyseur : 3130xl Genetic® de chez ABI PRISM. Un minimum de 16 puits est requis pour être analysés, les puits vides sont alors complétés avec 20µl d'eau distillée.

Le principe de cette méthode est basé sur celui de Sanger qui implique essentiellement l'amplification multiple d'un même fragment d'ADN simple brin. En théorie, lorsque l'ADN est amplifié, de nouveaux désoxynucléotides (dNTPs) sont ajoutés et l'ADN s'allonge au fur et à mesure. La méthode de Sanger utilise des bases particulières : les didéoxynucléotides ou ddNTPs (ddC, ddG, ddT, ddA). Ces bases sont identiques aux dNTPs à deux différences près: elles présentent une activité de fluorescence, et il leur manque un atome crucial pour la fixation de nouvelles bases à leur suite. De ce fait, une fois le ddNTP inséré, l'élongation du brin est impossible et la synthèse d'ADN est stoppée.

Ici, le séquenceur ABI Prism® renferme un capillaire d'électrophorèse de haut voltage dans le but de séparer chaque base d'une séquence. Chaque ddNTP émet un signal fluorescent qui lui est propre. Les longueurs d'onde des quatre fluorochromes sont diffractées par un prisme, permettant l'identification du signal correspondant à chaque base.

Enfin, un logiciel informatique relié au séquenceur permet de rassembler toutes ces données et de fournir un chromatogramme de la séquence. Un logiciel de traitement de séquence (Vector NT suite 9®) permet de visualiser, corriger, aligner et comparer la séquence obtenue.

M. Séquençage haut débit (NGS)

Cinq microlitres de chaque PCR et PCR au bisulfite ont été réunis et purifiés, qualifiés, quantifiés et séquencés simultanément sur Illumina® MiSeq. Le séquençage haut débit, aussi connu sous l'appellation *next-generation sequencing* (NGS) permet l'identification simultanée de la séquence de chaque fragment d'ADN contenue dans un échantillon.



Figure 24 : Séquenceur haut débit MiSeq Illumina® utilisé au cours de ces expériences [Illumina®]

1) Préparation de la librairie

Cette première étape a pour but d'obtenir des fragments d'ADN de tailles compatibles avec la technologie de séquençage utilisée. Les régions d'intérêt sont généralement amplifiées préalablement par une PCR classique ou multiplex. S'ajoutent ensuite à ces amplicons : des adaptateurs par ligation, qui vont permettre l'amplification et le séquençage haut débit, et des codes-barres en cas de séquençage multiplex.

2) Amplification clonale

L'amplification a lieu sur un support solide de verre nommé *flowcell*, c'est également sur ce support qu'aura lieu le séquençage.

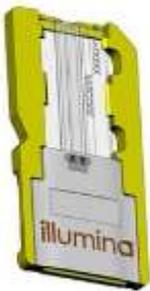


Figure 25: Cellule d'amplification [Illumina®].

La technologie Illumina® utilise le principe de « *Bridge amplification* » (amplification par pont). Le fragment fixé au support solide va d'abord former un pont avec une amorce à proximité. Il est possible d'obtenir *in fine* 1000 copies d'ADN par cluster de 1µm.

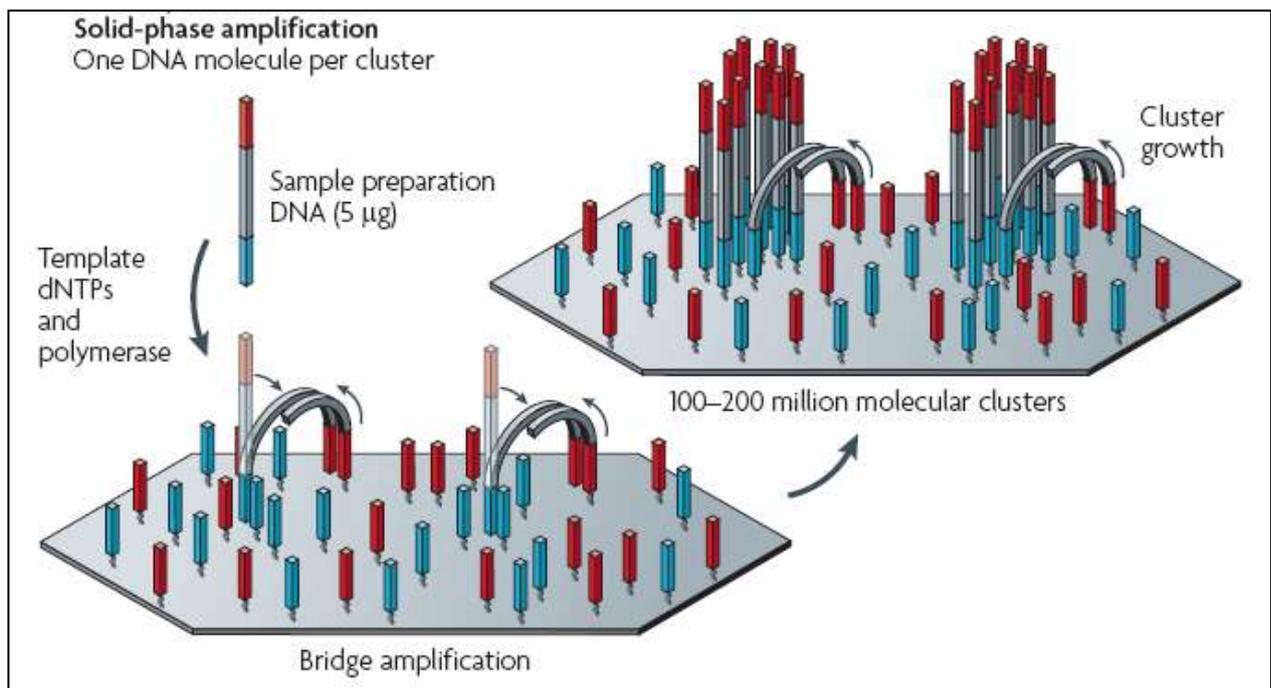


Figure 26 : Principe de la technologie Illumina® [Metzker et al., 2010] (161)

3) Séquençage

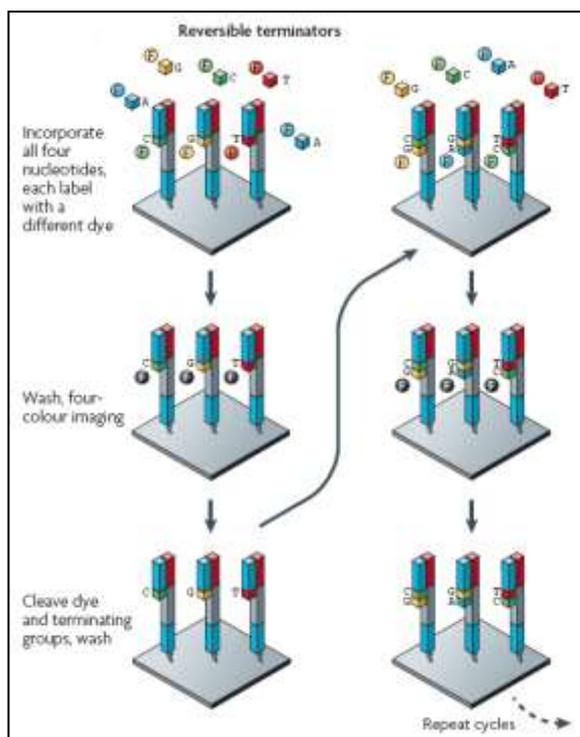


Figure 27: Déroulement d'un cycle séquençage [Metzker *et al.*, 2010] (161)

A chaque cycle de séquençage, seule une base peut être ajoutée à la précédente. Ceci est dû à la présence de terminateurs réversibles présents sur chaque base. Il s'agit d'un groupement clivable en 3' du désoxyribose lié à un oxygène : le 3'-O-azidométhyl.

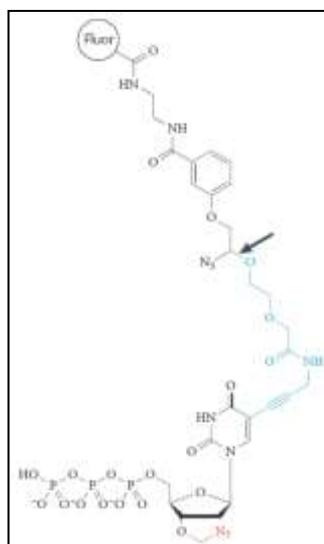


Figure 28 : Formule d'une thymine modifiée [Illumina/Solexa] [Barnes, 2002] (162)

Les bases sont différenciables par 4 fluorochromes. Certaines technologies n'en utilisent que 2. A chaque ajout de base on obtient une image, puis a lieu un clivage chimique du groupement.

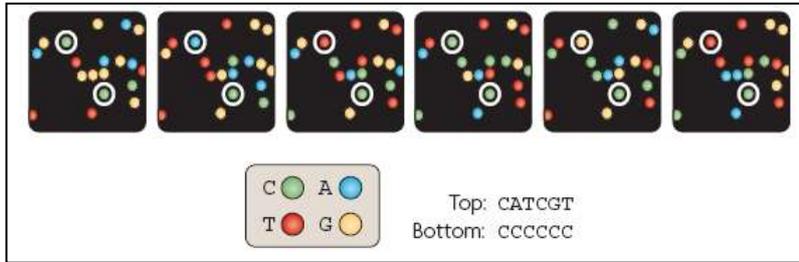


Figure 29 : Fluorescence observée après chaque cycle [Metzker *et al.*, 2010] (161)

4) Analyse des données

Après le séquençage, les données sont triées par un bioinformaticien ou un biologiste qui va d'abord récupérer les données brutes. Dès lors une étape de *trimming*, ou rognage, à lieu : il s'agit d'éliminer les séquences ou *reads* inutiles dont celles des amorces et indexes ainsi que les extrémités de *reads* de mauvaise qualité. Ensuite, les séquences restantes seront alignées sur la séquence de référence ce qui permettra de repositionner au besoin les *reads* contenant d'éventuelles insertions ou délétions. A chaque étape, un score de couverture est calculé par le logiciel pour chaque gène. Ici, le logiciel utilisé était IGV® mais d'autres sont disponible sur le marché tel : DVD® ou Alamut®. Ils permettent également une annotation des variants en nomenclature officielle dite HGVS et de localiser les variants obtenus dans les exons, introns, UTR... De même, les variations obtenues peuvent être identifiées par comparaison aux bases de données (*single nucleotide polymorphism* ou SNP, fréquence allélique, altération de l'épissage, acide aminé synonyme...). On obtient ainsi une prédiction de la signification *in vivo* de la mutation par rapport aux données *in silico*.

RESULTATS

A. Comparaison de méthodes de qualification

1) **Quantification après extraction**

Numéro d'échantillon	Concentration en ADN circulant (pg/μl)	Quantité totale ADN circulant (ng)	Taille de la tumeur (mm)	[AFP] ng/ml	[PIVKA II] ng/ml
476	360	18	115	3	71246
509	316	15,8	19	7	70
527	153	7,65	15	40	6
590	118	5,9	16	1412	16
607	344	17,2	20	3	3718
643	166	8,3	40	6	15
662	157	7,85	45	99	15
673	194	9,7	14	7	28
674	299	14,95	14	71	122
677	504	25,2	40	1	63
681	560	28	115	2	708
688	442	22,1	23	4	321
706	222	11,1	75	2	170
710	845	42,25	130	35	913

Tableau 16 : Dosage des concentrations en ADN circulant des échantillons

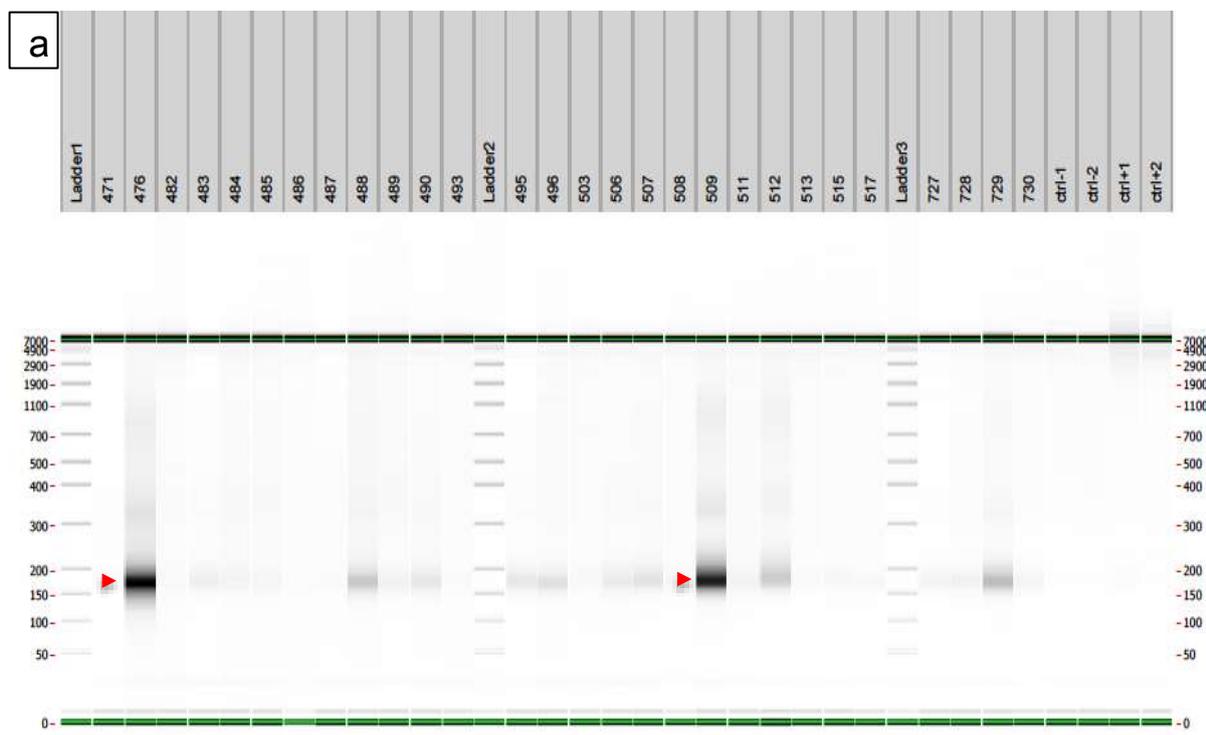
Parmi les 155 échantillons de plasma de patient du Nihon University Hospital dont j'ai extrait l'ADN circulant issus de la cohorte de 267 patients, seul un panel de 14 échantillons a été sélectionné. En effet, étant donné la grande valeur de ses échantillons, les tests préliminaires ont été effectués sur un petit échantillonnage. Ceux-ci ont été choisis car ils présentaient une plus forte quantité d'ADN circulant extraite comparativement aux autres, fournissant ainsi des quantités suffisantes pour la mise au point des techniques. Ils ont été utilisés tout au long de cette étude. Les 141 autres échantillons ont été conservés pour pouvoir être étudiés par la suite. L'ADN circulant de nos 14 échantillons tests a été dosé avec le système Qubit® après une dilution au 1/200. Le volume total d'extraction est de 50 μ l. La quantité totale pour chaque échantillon figure dans la troisième colonne du tableau 16 ci-dessus. Après avoir ainsi confirmé l'applicabilité du système Qubit®, nous avons procédé à l'analyse du reste des échantillons. Parmi les 155 échantillons extraits, la concentration moyenne était de 62pg/ μ l et la médiane de 22,8 pg/ μ l. De nombreuses données cliniques sont disponibles pour cette cohorte, telles que la taille de la tumeur, la concentration en AFP et en

PIVKA II. Ces paramètres pourront permettre de nombreux tests statistiques lorsque l'ensemble des échantillons aura été testé.

2) Test qualitatif de l'ADN circulant des 14 échantillons de patients

Au laboratoire, trois méthodes étaient disponibles pour tester la qualité de l'ADN circulant extrait : Agilent 2100 Bioanalyzer®, Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System® et Caliper HT DNA High Sensitivity LapChip® (Cf : §Matériel et Méthodes.F.1-3). Pour des raisons de sensibilité, de capacité d'analyse et de coût, l'automate Caliper HT DNA High Sensitivity LapChip® a été utilisé.

Sur les figures suivantes, les images d'électrophorèse indiquent la longueur moyenne des brins d'ADN circulants extraits. Pour sélectionner les 14 premiers échantillons dans le but de mettre au point la technique, nous avons choisi ceux présentant une bande correctement marquée et délimitée et une quantité d'ADN suffisante dosée par Qubit®. Ces bandes sont indiquées par une flèche rouge (figure 30.a).



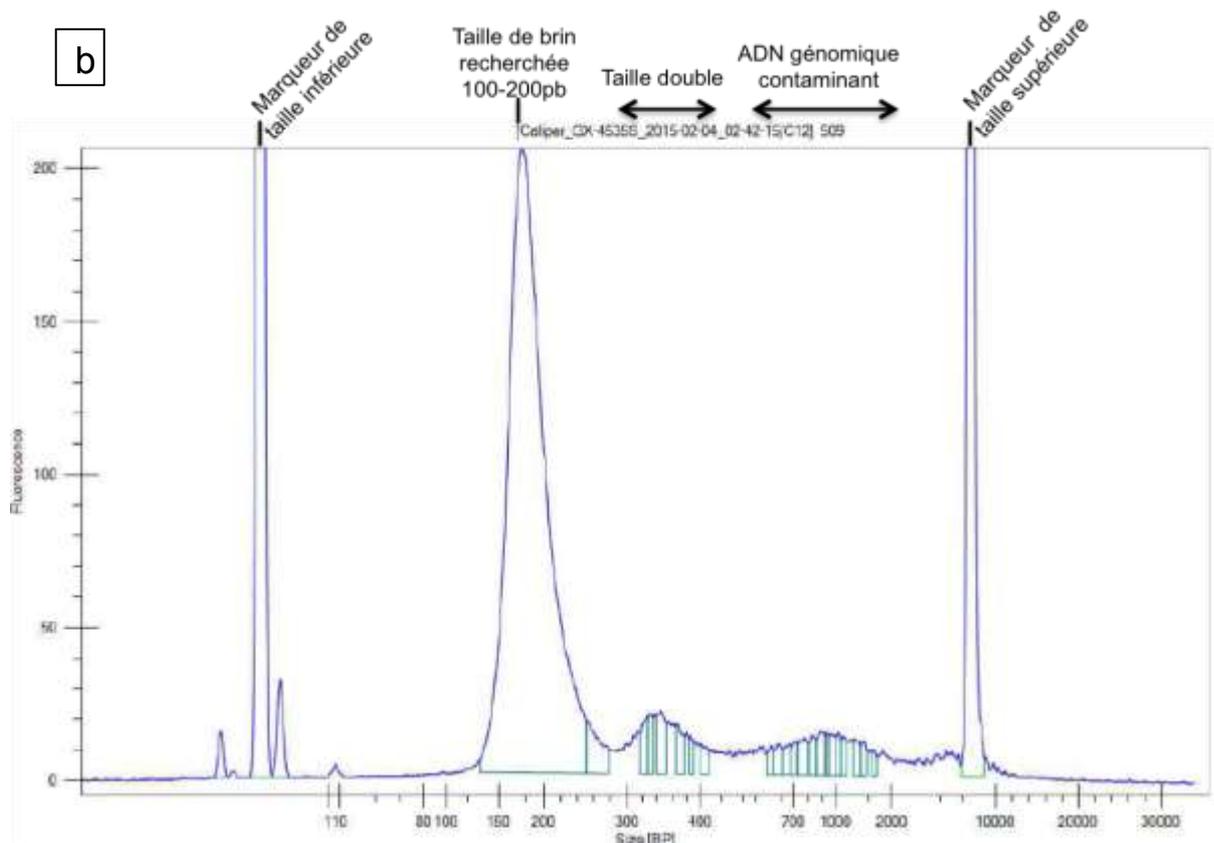


Figure 30 : Electrophorèse des échantillons d'ADN circulant sur Caliper®

Dans un second temps, les graphiques (figure b) donnent une idée de la répartition de la taille de ces brins d'ADN circulant. Ici, un des 14 échantillons du panel a été utilisé à titre d'exemple. La première bande constitue le marqueur de taille moléculaire inférieure (~ 0pb), la dernière bande le marqueur de taille supérieure (~10kb).

L'ADN circulant correspondant environ à un tour de nucléosome coupé par les macrophages lors de la phagocytose, il arrive parfois qu'une faible quantité d'ADN circulant mal scindés fassent une taille de 300 à 400pb correspondant à 2 tours de nucléosome, comme ci-dessus.

De même, lorsque l'extraction n'est pas totale, ou que de l'ADN génomique de leucocyte contamine l'échantillon de base, il se peut que quelques longs brins d'ADN génomiques soient extraits simultanément.

L'intégralité des électrophorèses et graphiques de qualification de nos 14 échantillons sont visibles en annexe (Cf : §Annexe/A.Qualification post-extraction).

B. Mise au point de la PCR du gène de la β -caténine et séquençage

La voie de signalisation du gène *CTNNB1* de la β -caténine est particulièrement affectée dans le processus de carcinogénèse hépatique. Ce gène porte une mutation somatique dans 19% des CHC d'origine virale [Tornesello *et al.*, 2013] (163) (*Cf: chapitre 1.E.5. Mutations fréquentes dans le CHC*). De plus parmi les 59% de CHC portant une mutation sur le promoteur du gène *TERT*, 42% en porte également une sur le gène *CTNNB1*. Ces deux gènes sont liés et les anomalies au niveau du gène *TERT* sont généralement antérieures à celles touchant la voie de signalisation de la β -caténine.

1) **Design des amorces**

1. a) Séquence cible

La région d'intérêt choisie ici : exon 3 du gène *CTNNB1* de la β -caténine est située en 1295163-1295462 sur le chromosome 5 :

```
ATGGCCATGGAACCAGACAGAAAAGCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCT
TACCTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGG
TAAAGGCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCCAAGTCCTGTATGAGTG
GGAACAGGGATTTCTCAGTCCTTCACTCAAGAACA
```

1. b) Séquences des amorces et température de fusion

Amorce sens (F) : GAATCCATTCTGGTGCCACT

Amorce anti-sens (R) : CAGGACTTGGGAGGTATCCA

La température de fusion calculée par le fournisseur Eurofins® : $T_m = 59,93^\circ\text{C}$ pour les deux amorces. La taille du produit d'amplification est de 89pb pour les brins d'ADN circulant les plus courts. Cette taille est proche de la taille minimale pour une amplification par PCR. La PCR ayant fonctionné immédiatement, il n'a donc pas été utile de redessiner des amorces.

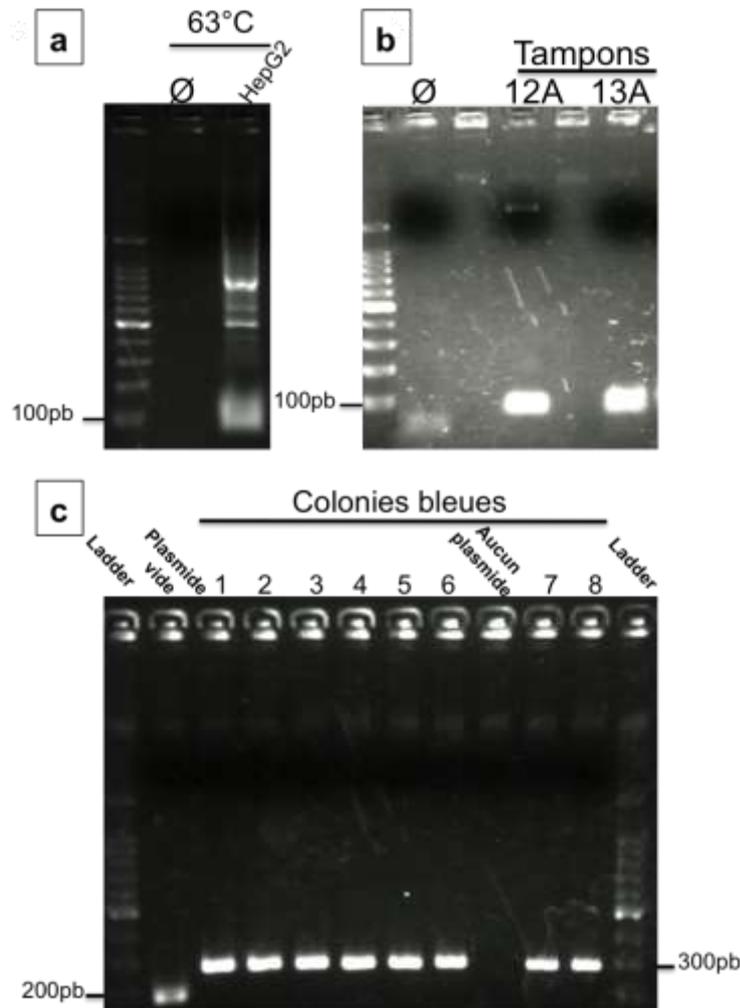


Figure 31 : Mise au point de la PCR de *CTNNB1*

a) Détermination de la température optimale sur ADN génomique **b)** Sélection du tampon de PCR **c)** Vérification de la taille de l'insert dans les clones bactériens.

Le premier test (figure a) sur ADN génomiques ont permis de fixer le nombre optimal de cycles à 35, la température d'hybridation à 63°C et la quantité de MgCl₂ à 2,5mM (sans ajout).

La figure b compare l'amplification du gène *CTNNB1* en présence de l'un ou l'autre des deux tampons suivants : NEB® GC Rich Mix 13A, ou NEB Phusion® 12A. Leur efficacité paraissant similaire, nous avons adopté le tampon 12A pour des raisons économiques. De plus, la région à amplifier étant moins riche en GC que le promoteur *TERT*, le tampon 13A semble inutile dans le cas de l'exon 3 de la β-caténine.

La PCR de vérification des clones après transfection du plasmide donne l'électrophorèse figure c. Contrairement au promoteur *TERT*, notre région d'intérêt fut insérée dans le plasmide, transfectée au sein des bactéries, et aisément amplifiée par PCR. Le séquençage Sanger donne une similarité de séquence à 97,8 % entre cette dernière et celle de l'exon 3 de *CTNNB1* sur le site UCSC.

2) Résultats pour la mutation de CTNNB1

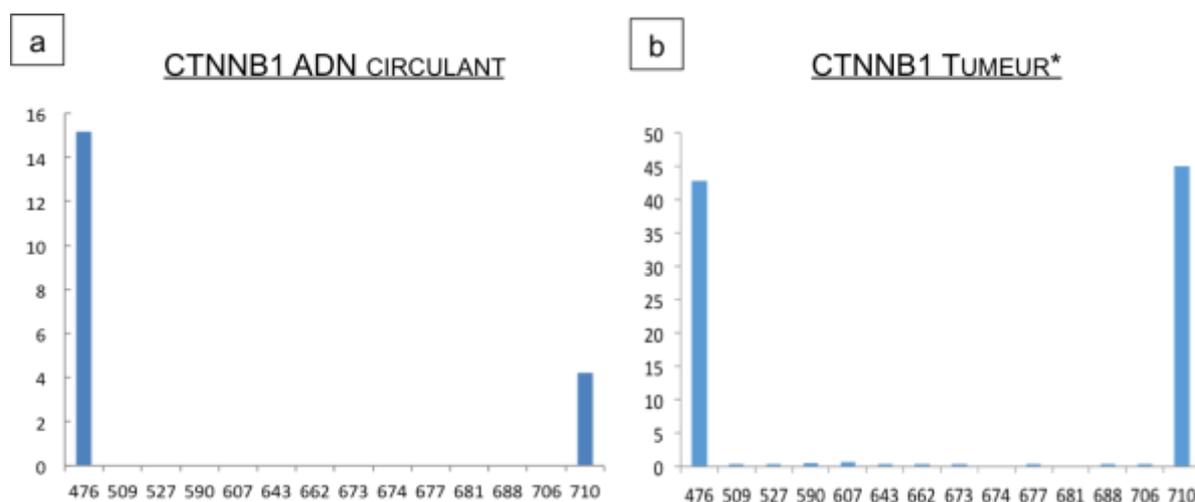


Figure 32 : Pourcentage de mutations obtenus sur CTNNB1 pour les 14 échantillons

a) Taux de mutation sur le gène de la β -caténine sur ADN circulant b) Taux de mutation sur le gène de la β -caténine sur la tumeur solide (* Les résultats de l'histogramme b ont été obtenus dans un second temps par le Dr Yoshikawa-sensei)

Les résultats obtenus ci-dessus (Figure 32.a) montrent que deux des 14 échantillons testés (N°476 et 710) présentent un pourcentage de mutation positif (15% et 5%) sur ADN circulant. Cette distribution est concordante avec la littérature qui indique que 19% des CHC présentent une mutation sur le gène de la β -caténine [Tornesello *et al.*, 2013] (163). Aussi, ces résultats s'accordent avec les données résultats obtenus sur tumeurs solides (42 et 45% pour les échantillons n°476 et 710, Figure 32.b).

C. Mise au point de la PCR du promoteur *TERT* et séquençage

Comme vu précédemment, la fréquence des mutations dans le promoteur de *TERT* s'élève à 59% dans le CHC, c'est pourquoi l'étude de ce gène est essentielle dans toute mise en place d'un diagnostic de cette pathologie. Les deux sites de mutations ponctuelles sont à considérer comme de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la transformation des lésions pré-malignes dans le CHC [Nault *et al.*, 2014] [Pinyol *et al.*, 2014] (164) (165)

(Cf: chapitre 1.E.5. Mutations fréquentes dans le CHC).

1) Sélection du tampon

Parmi les trois tampons précédemment présentés dans la partie Matériel et Méthode, NEB® GC Rich Mix 13A a prouvé être le plus approprié pour cette région. En effet la région d'intérêt ici pour le promoteur *TERT* est une région extrêmement riche en GC ce qui fait la spécificité de ce mélange. Pour chaque cible, la concentration en $MgCl_2$ et en DMSO du mix doit être ajustée. Le $MgCl_2$ permet d'augmenter la stringence des amorces. Le DMSO permet

de faire diminuer le T_m si la région est trop riche en paire de bases GC, mais cela a pour conséquence de diminuer le rendement. Les produits à amplifier étant très courts (Entre 80 et 200 pb), les phases d'hybridation et d'élongation doivent être eux aussi très courtes, afin de réduire la formation de produits contaminants de masse moléculaire élevée (Cf : § Matériel et méthode/H.2.c).

Après une série de tests préliminaires, nous avons conclu qu'aucun ajout de DMSO ni de $MgCl_2$ n'était nécessaire. La concentration initiale en $MgCl_2$ contenue dans ces deux tampons s'est avérée optimale sans ajout à 2mM. En revanche, le mélange 12A du même fournisseur n'a donné aucune bande de taille désirée.

Afin de pouvoir apprécier avec précision la longueur des produits de PCR, dont la longueur attendue est de 169pb, nous avons utilisé un marqueur de taille avec une échelle de 100pb. Pour la même raison, la largeur des puits de dépôt du gel d'électrophorèse a été augmentée pour améliorer la précision de l'appréciation de taille du fragment amplifié obtenu. Après maintes investigations, il a finalement été démontré que seule la PCR de type *touchdown* permettait d'obtenir un signal d'investigation suffisant et spécifique pour le promoteur de *TERT*.

La *touchdown* PCR est une technique qui permet d'amplifier de l'ADN présent en faible quantité au départ et/ou pour augmenter la spécificité des amorces lorsque d'autres sites à fortes homologies entrent en compétition. Elle se déroule en deux étapes. Durant les premiers cycles, la température d'hybridation est très élevée, ce qui ne permet pas une amplification efficace mais permet d'augmenter la spécificité de la PCR. Ensuite, la température est diminuée dans une seconde phase dans le but d'augmenter l'efficacité. Il s'agit d'amplifier fortement la faible quantité de brins spécifiques initiaux.

Le programme du thermocycler optimisé pour *TERT* est le suivant :

Etape	Température	Durée	Cycle
Dénaturation initiale	98°C	30 secondes	1
Dénaturation	98°C	10 secondes	20
Hybridation	65°C	15 secondes	
Extension	72°C	15 secondes	
Dénaturation	98°C	10 secondes	25
Hybridation	58°C	15 secondes	
Extension	72°C	15 secondes	
Extension terminale	72°C	2 minutes	1
Conservation	20°C	∞	1

Tableau 17 : Programme de PCR *touchdown* finale pour le promoteur *TERT*

2) Design et sélection des amorces

2. a) Séquence cible

La région cible pour sur le promoteur *TERT* est située sur le chromosome 5 (1295163-1295462), les sites de mutation étudiées sont colorés en rouge ci-dessous.

```
AAACTCGCGCCGCGAGGAGAGGGCGGGGCCGCGGAAAGGAAGGGGAGGGGCT  
GGGAGGGCCCGGAGGGGGCTGGGCGGGGACCCGGGAGGGGTCTGGGACGGGG  
CGGGGTCCGCGCGGAGGAGGCGGAGCTGGAAGGTGAAGGGGCAGGACGGGTG  
CCCGGGTCCCCAGTCCCTCCGCCACGTGGGAAGCGCGGTCCTGG
```

2. b) Séquences des amorces et températures de fusion

Avec « F » : amorce Sens (*Forward*) et « R » : amorce anti-sens (*Reverse*).

F1: GAAAGGAAGGGGAGGGGCTG	64,6°C
F2: AGGGCGGGGCCGCGGAAA	64°C
F3: CAGCGCTGCCTGAAACTC	57°C
R1: TGCCCCTTCACCTTCCAGCT	62.5 °C
R2: CACCCGTCCTGCCCTTCA	62 °C
R3: CTTCCAGCTCCGCCTCCT	59°C

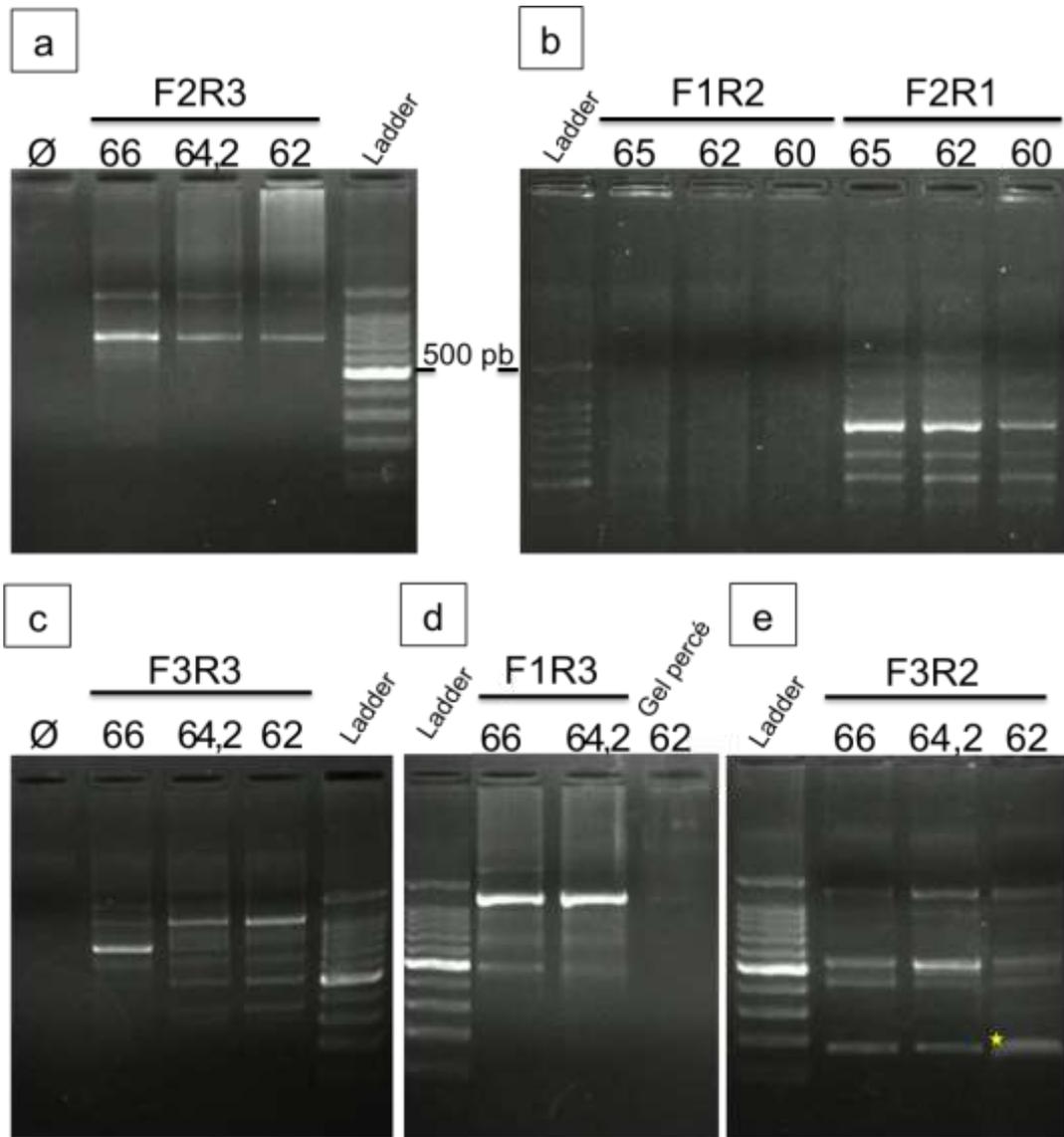


Figure 33 : Sélection du couple d'amorce pour l'amplification du promoteur *TERT*
 Résultats des électrophorèses après amplification par PCR des produits de différents couples d'amorces sur ADN génomique à différentes températures **(a)** Combinaison F3R2 : cible d'une longueur de 169 pb **(b)** F1R2, 123 pb **(c)** F3R3: 148pb ; F2R1 : 128pb **(d)** F1R3 : 103pb **(e)** F2R3: 119pb.

Le couple d'amorce F3R2 (figure e) s'est avéré être la seule combinaison à présenter une bande de la longueur attendue (169pb). La température retenue sera 62°C (croix jaune), les autres combinaisons étant soit trop courtes soit trop longues pour de l'ADN circulant ou ayant échoué précédemment (F1R1: 114 pb F2R2: 137 pb, F3R1: 159 pb).

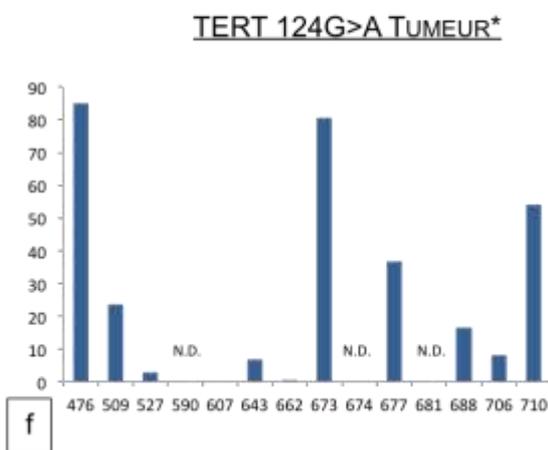
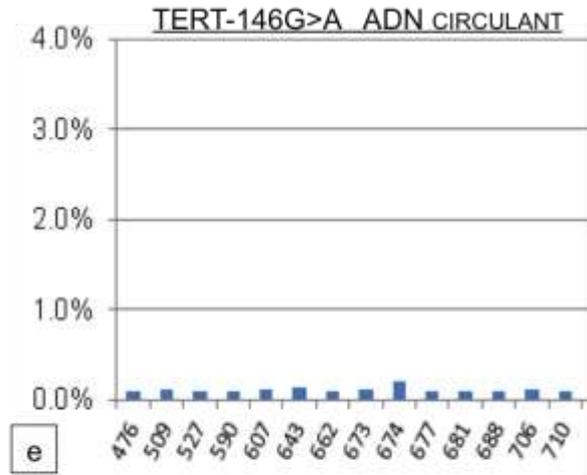
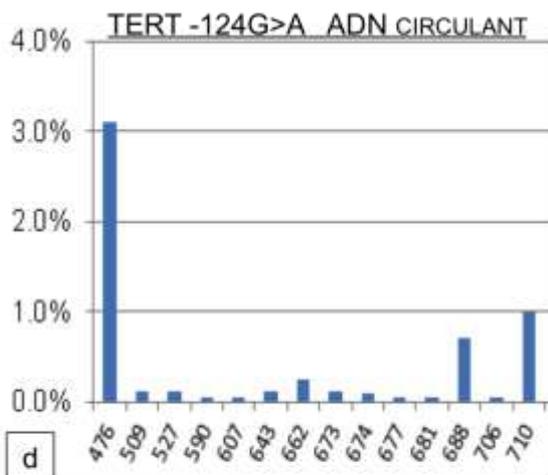
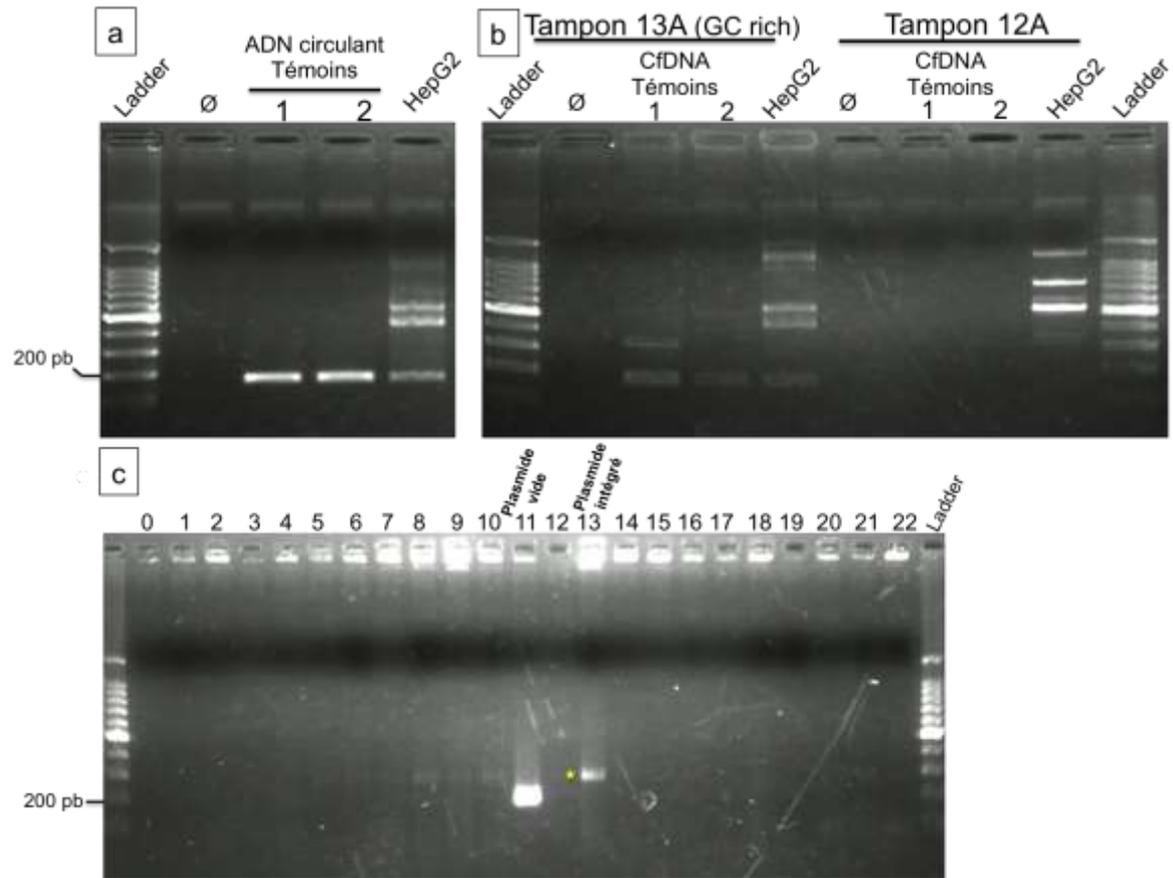


Figure 34 : Résultats obtenus pour *TERT* : PCR, clonage, taux de mutations

a) Electrophorèse après PCR *Touchdown* suivant le protocole du Tableau 17 b) Comparaison de deux tampons NEB Phusion®, l'un étant adapté aux amplifications des régions riches en GC d) vérification de l'insert dans le clone bactérien d) Pourcentage moyen de méthylation sur le site -124G>A de *TERT* sur les 14 patients sur ADN circulant e) Pourcentage moyen de méthylation sur le site -146G>A de *TERT* sur les 14 patients sur ADN circulant f) Pourcentage moyen de méthylation sur le site -124G>A de *TERT* sur les 14 patients sur tumeur solide (* Les résultats de l'histogramme f ont été obtenus dans un second temps par le Dr Yoshikawa-sensei ; ND : données Non Disponibles)

3) Mutations sur le promoteur *TERT*

La première figure (34.a) ci-avant, montre que grâce au programme de PCR, dit *Touchdown* PCR, mis au point dans le paragraphe *Résultats.C.1*, nous obtenons les meilleurs résultats pour l'amplification de *TERT*.

Sur la figure b, nous avons testé nos amorces sur de l'ADN circulant (*cfDNA*) de volontaires sains (Témoins 1 et 2) ainsi que sur de l'ADN génomique entier issu de la lignée cellulaire tumorale HepG2. La PCR de contrôle est validée en raison de l'absence de bande en l'absence d'échantillon initial (puits zéro). La taille de la bande recherchée est de 169 pb et seul le tampon 13A montre une bande entre 100 et 200 pb par rapport au marqueur de taille moléculaire. Nous pouvons donc éliminer le second tampon (12A). La séquence du produit de PCR sera vérifiée par séquençage.

Sur la figure 34.c, nous avons vérifié que la séquence intégrée dans le clone bactérien était bien de la longueur du produit de PCR du couple d'amorce F3R2. Pas moins de 22 colonies ont été sélectionnées et ont servi de matériel de départ pour une PCR dans le but de vérifier l'intégrité du plasmide. La séquence du promoteur de *TERT* étant très riche en GC, il est plus compliqué de faire amplifier celle-ci par des bactéries, qui peinent à copier cette séquence. En effet, seul l'un des puits (croix jaune) indique un signal suffisant (puits n°13) à 141 pb (plasmide vide) + 169 pb (produit de PCR) = 310 pb pour être la séquence cible. La bande du puits n° 11 correspond à la transfection d'un plasmide vecteur ne contenant aucun insert. Etant donné le faible taux d'amplification sur ces colonies, le séquençage a été effectué directement après la PCR post-insertion visible (puits n°13). Le produit avait 99.1% d'identité avec la région du chromosome 5 (1295203–1295318) qui correspond au promoteur *TERT* humain dans la base de données UCSC. Ce chiffre n'est pas surprenant car les régions très riches en GC accumulent facilement les erreurs lors de la PCR et du séquençage.

Nous avons pu amplifier avec succès la séquence cible à partir d'ADN circulant de 14 patients et étudié le taux de mutations sur les positions reportées précédemment [Nault *et al.*, 2013] (91). Malheureusement, aussi loin que nous ayons pu le détecter, l'ADN circulant de

ces patients n'a présenté qu'un maximum de 3% de mutations dans ces deux bases (figures 34.d et e). L'étape suivante sera de comparer ce taux à un pool de volontaires sains pour établir la pertinence de la détection des mutations du promoteur de *TERT* dans l'ADN circulant dans le diagnostic du cancer hépatocellulaire. De plus un test sur un plus grand panel de patient ainsi que différents réglages des paramètres d'amplification, de détection et de traitement des données est nécessaire.

D. Mise au point de la PCR au bisulfite

1) **Sélection des amorces bisulfite**

Le mélange contenant la polymérase KAPA® Hifi Hotstart Uracil + ReadyMix® a été utilisé. Les amorces ont été dessinées en ciblant les cibles de méthylation les plus pertinentes connues sur l'ADN génomique de cellule d'hépatocarcinome. Ces cibles ont été mises en lumière lors de précédentes études par l'équipe du Dr Nagae au sein du laboratoire du Dr Aburatani dans lequel les expériences décrites au cours de cette thèse ont été effectuées. Ces cibles ont été définies par une méthode d'analyse par puce HumanMethylation Illumina® sur 450 000 sites CpG pour une identification pangénomique des profils de méthylation aberrants dans le CHC. Au total, les données ont été récoltées à partir de 700 CHC, 96 individus sains et 6200 cas issus de la base de données TCGA (The Cancer Genome Atlas) de l'institut national de santé (NIH) des Etats-Unis. Ces données sont brevetées mais pas encore publiées [Nagae *et al.*, 2014] (166).

1. a) DUSP4

Localisation dans le génome : chromosome 8 : 29349840-29350036, taille: 196 pb

F : TTTATTTTTGAGTAGGTAGATGT

R : AAACCTAAAACAAATCCTACC

1. b) EPHA4

Localisation dans le génome: chromosome 2 : 221572170-221572316, taille: 142 pb

F : GTATATTTTGGAAATTTGTGATAG

R : CTCTCCTAACTTAAACATTTATT

Deux autres sites, *CELF6* et RNF 135, particulièrement riches en site CG ont été investigués.

1. c) RNF135

Localisation dans le génome: chromosome 17 : 29298141-29298394, taille 177 pb

Les amorces apparaissent surlignées.

ATGATTTTGGTTGTATTATTTGTTAGGGGTTGTTGGATTGGTTTGTTATGTTGTTTT
GTGGTTATAGTTTTTGTGTTATTGTTTGGAGGTTTTGTGGGGTGGTTGTGATGTTT
GTTGTTGGGTTTGTTTTATTTGTTGTTAGGGTGTGTTGTGTAGTAGTTGTATTTGTGGA
AGAATATGTTATTGTAGGATTTGGTTGATAAGTATTGTTGTGTTGTATGTGAGATA
TAGGTGGGTTTTGATTTTGTATTGT

F : AGGGGTTGTTGGATTGGT

R : TTTTRATTAAATTTTATAATAA

1. d) CELF6

Localisation dans le génome: chromosome 15 : 72612572-72612909

ATGATTTGTATAATGAGGAAGTAGTTGTTAATTAGAGTGGGAGTTGATTGGGTTT
GTTGGGGGTGGGGGGGGTGGTTGGGTTTATGTGTTTTTGTGTTATGGTAATTGG
ATTTTTGAATGTTTTGTGTGTGTTGAGTGTGTGTTGGGTTGTGGATTGTGTG
TGTGTGTTTTGGGTTGTGTGAGGGGAAGTAGTTTTGTTATGTGTGATGGTGTGTTGT
TGGAGTTGGGGTTAATTTTTATTGTATATATAGGTATATATAGGTAATGTAGGTA
TATGTAGGTATATATATTTTTAAATGTTGGTGTGTTTTTTGTGGGGGTGGATGGGG
ATT

F1 : ATGTTTTGTGTGTGTTGAGTGT

F2 : ATTTGTATAATGAGGAAGTAGT

F3 : AGTGGGAGTTGATTGGGT

R1 : ACRAAACTACTTCCCCTCA

R2 : CACTCRACACACACAAAACAT

Longueur des combinaisons d'amorces :

F2R1 202 pb, F2R2 138 pb, F3R1 169 pb, F3R2 105 and 573 pb

Cibles rejetées pour l'étude de la méthylation de l'ADN circulant :

ACTG1 bi1F GGGTTTAGTTATAGGTTTGTGTT

ACTG1 bi1R ACCCTAACTCRCTATTATCACT → 312 pb

TSC22D1-bi1-F GAGGTTTAGGTTTTGTGGAG

TSC22D1-bi1-R TACCCAACACAATACACCAA → 272 pb

Les fragments d'ADN circulants dépassant rarement les 200 pb, les produits de PCR se seraient avérés trop longs, menant à un échec d'amplification et un risque non négligeable d'amplification d'ADN génomique contaminant.

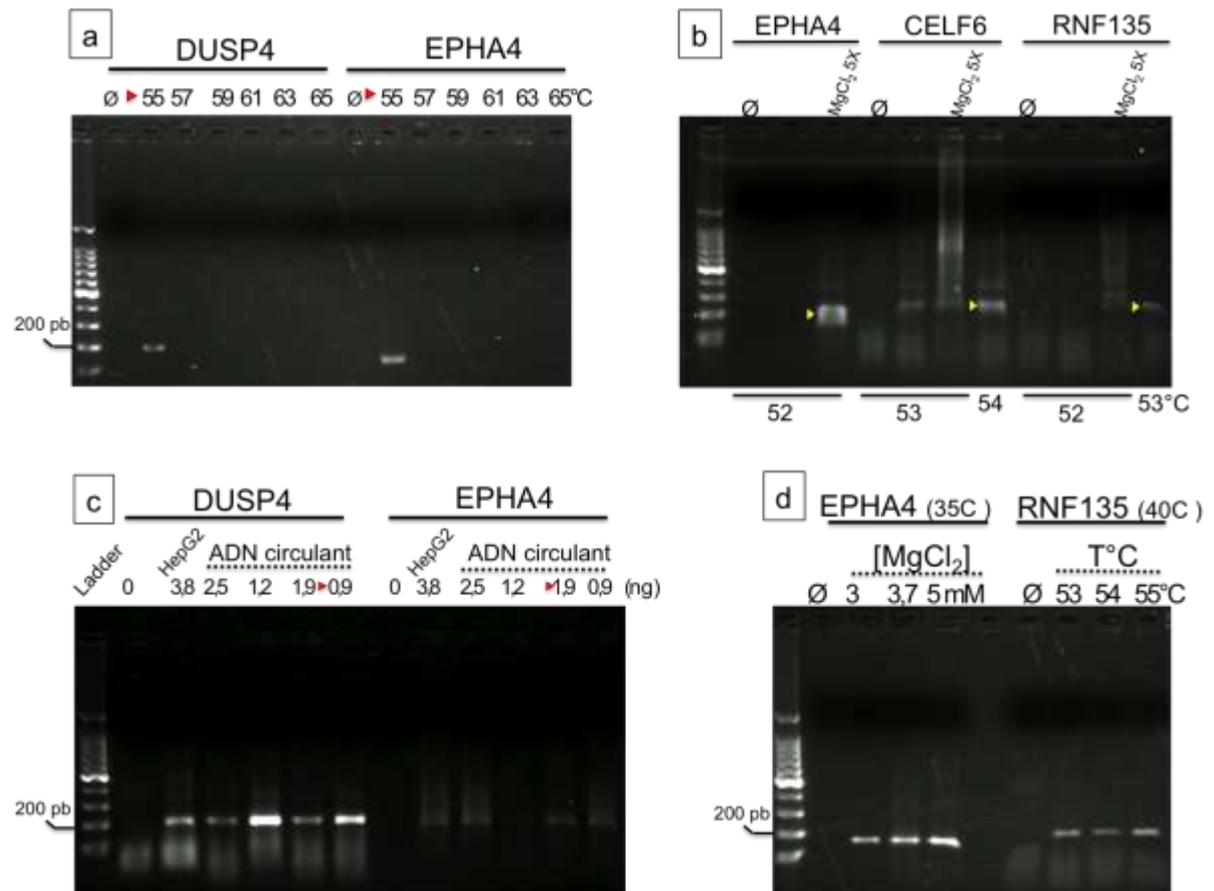


Figure 35 : Mise au point de la PCR au bisulfite

a) Electrophorèse après PCR suivant gradient de température b) Mix de PCR a différentes concentration en magnésium c) Détermination de la quantité minimale d'ADN pour une PCR efficace d) Affinage de la détermination de la concentration en magnésium et de la température optimale

Seule une température de 55°C présente une bande distincte entre 100 et 200 pb (figure 35.a, flèche rouge). D'autres PCR tests ont donc été effectuées à températures inférieures (figures non montrées). Nous avons fixé la température d'hybridation à 52°C pour *DUSP4* et *EPHA4* en raison de meilleurs résultats.

Figure c, nous avons tenté de déterminer la quantité minimale d'ADN circulant nécessaire à une amplification des cibles visible sur électrophorèse. Afin d'obtenir une bande distincte, ainsi qu'un nombre de copies suffisant pour les 2 amorces, la quantité initiale d'ADN circulant (cfDNA) doit être de 2,5ng dans le mélange minimum (retenus 5ng par sécurité). Pour l'ADN génomique il faut au minimum 10ng. En effet, avec des quantités inférieures le nombre de copies d'ADN circulant initial n'est pas suffisant pour obtenir une bande distincte en électrophorèse (c). Nous garderons ces valeurs pour les travaux à venir.

Sur les figures b et d, nous voyons que l'ajout de magnésium est bénéfique uniquement pour la cible *EPHA4*. Cet ajout devient délétère pour les autres gènes. Les

résultats de PCR sont optimaux pour des températures allant de 53 à 55°C pour l'amplification de *RNF135*.

L'extraction d'ADN circulant ne donnant que de faibles quantités d'ADN, nous avons pour but de préserver ce matériel. C'est pourquoi l'idée d'amplifier plusieurs cibles dans un seul tube a été émise, c'est la PCR multiplex.

2) Essais de PCR multiplex

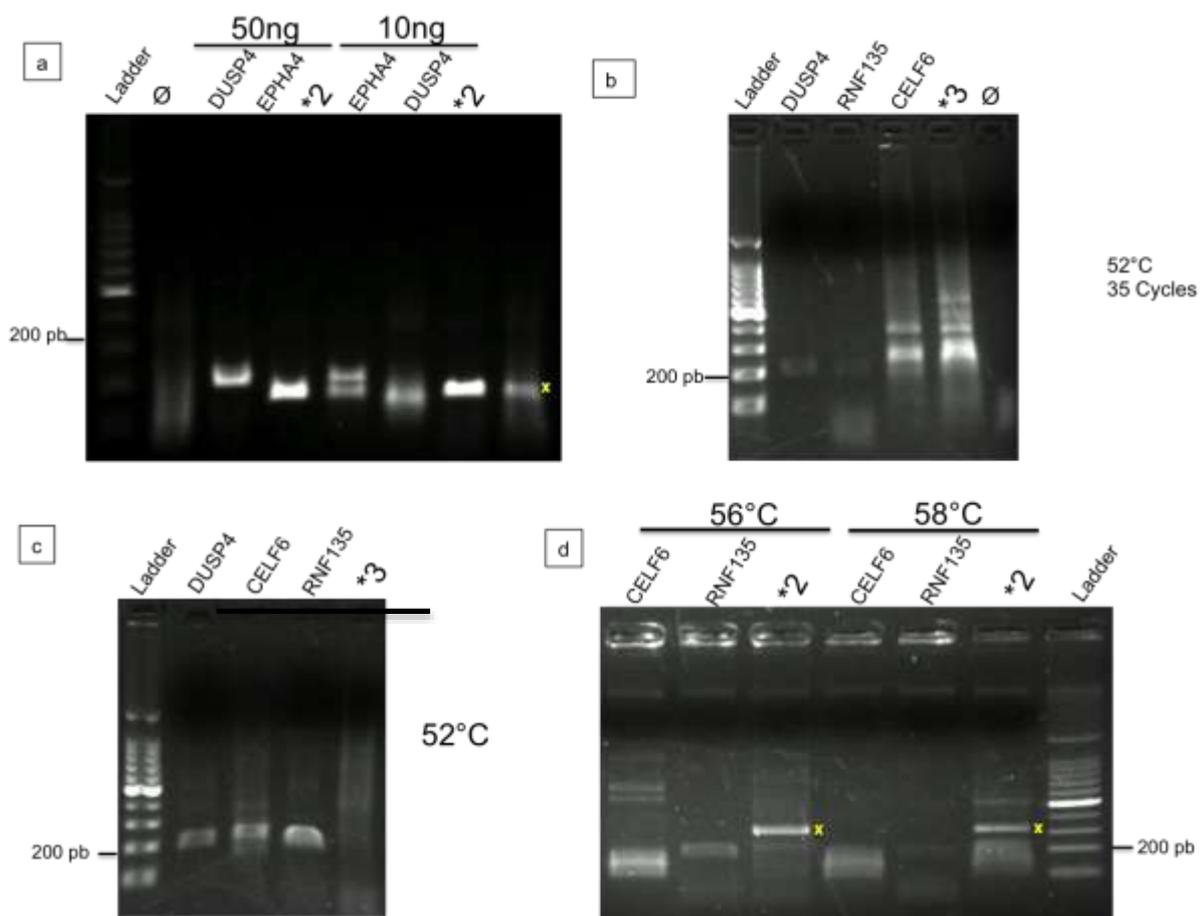


Figure 36 : Essais de PCR multiplex

a) Essai quantitatif **b)** PCR standard et avec 3 couples d'amorces (*3), 35 cycles, 52°C **c) d)** PCR avec 3 couples d'amorces suivant un gradient de température.

Les premiers tests (figure 36.a) ont été effectués sur ADN génomique. A une concentration de 50ng, deux bandes se distinguent, alors qu'à 10ng on ne remarque qu'un *smear*. Dans le puits zéro on remarque la formation de dimères d'amorces.

Il a donc fallu faire l'essai sur ADN circulant, à une concentration de 15ng initialement. Ici (figure b), on remarque que l'addition de plus de deux paires d'amorces au sein du même puits produit un *smear* (bavure) au lieu d'une succession de bandes bien distinctes. Plusieurs tentatives d'améliorer ce problème se sont avérées vaines. C'est pourquoi nous avons par la suite décidé d'effectuer une PCR standard pour nos deux cibles *RNF135*

and *CELF6* (monoplex). Les autres paires d'amorces auraient fonctionné également en PCR standard mais les régions explorées présageaient de résultats plus probants au vu des travaux effectués précédemment [Nagae *et al.*, 2014] (166).

Malheureusement nous ne pouvons donc pas envisager une PCR multiplex avec ces 3 cibles qui requièrent des conditions exactement similaires. Figures **c** et **d**, nous pouvons observer les artéfacts et produits de PCR non spécifiques qui apparaissent sur les électrophorèses. La PCR simplex a été conservée, avec des conditions optimales de :

-EPHA4 : 52°C + 3,7mM de MgCl₂, 35 cycles

-DUSP4 : 52°C sans MgCl₂, 35 cycles

3) Résultats de méthylation

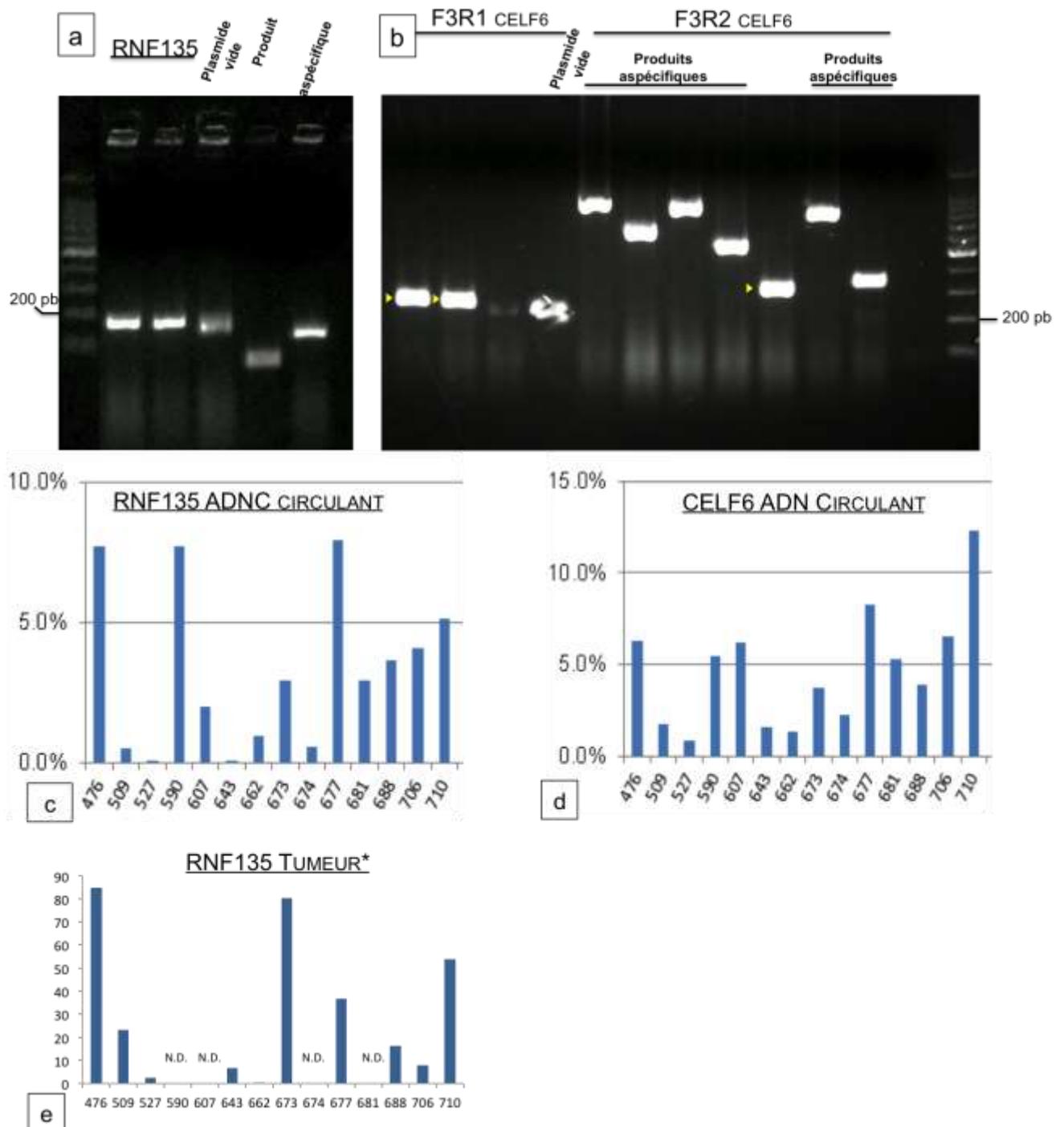


Figure 37 : Vérification de l'insert et pourcentage de méthylation

a) Vérification de la taille de l'insert dans les clones bactérien pour *RNF135* et pour b) *CELF6* avec deux couples d'amorces. c) Pourcentage moyens de méthylation sur les sites CpG du promoteur de *CELF6* sur les 14 échantillons après séquençage, et d) pour le promoteur de *RNF135*. e) Pourcentage moyen de méthylation sur le promoteur de *RNF135* sur les tumeurs solides des mêmes échantillons. (*Les résultats de l'histogramme e ont été obtenus dans un second temps par le Dr Yoshikawa-sensei, N.D = données Non Disponibles)

Les séquences des produits de PCR pour *RNF135* et *CELF6* (amorce F3R2) ont été vérifiées par deux fois avec succès par séquençage Sanger et alignement de séquence (figures **a** et **b**). Le taux de méthylation moyen pour nos 14 échantillons avoisine 4,5% pour le promoteur de *CELF6* et 3% pour *RNF135* (Figure 37 **c-d**).

Par manque de données disponibles sur le statut mutationnel des tumeurs solides des 14 patients, nous ne pouvons effectuer de tests statistiques pour comparer les résultats de l'ADN circulant à la tumeur. Les conditions de PCR pour nos deux cibles ci-dessus devront être améliorées avant le séquençage du reste de la cohorte.

DISCUSSION

A. Signification clinique des résultats

1) *CTNNB1*

Nous sommes parvenus à mettre au point une technique de détection de mutation sur l'exon 3 du gène *CTNNB1* sur ADN circulant par technique de séquençage haut débit. Les résultats obtenus sur ce premier échantillonnage test sont concordants avec les données mutationnelles retrouvées dans la tumeur solide et le pourcentage global de patient muté.

D'autres études avaient déjà exploré cette piste mais sans succès ou dans des domaines différents. Dans le cancer du sein, en 2014 par technique de séquençage massif d'ADN (MPS : *Massive Parallel Sequencing*), des prélèvements d'ADN plasmatique ont été effectués au cours du temps chez une patiente afin de comparer les mutations trouvées avec celles présentes au sein de la tumeur solide. Le gène *CTNNB1* faisait partie du panel et a pu être détecté avec succès [De Mattos-Arruda *et al.*, 2014] (167).

En 2008, une équipe de chercheur avait tenté de détecter les mutations de *CTNNB1* par technique RFLP (Polymorphisme de Longueur de Fragments de Restriction) après PCR sur une cohorte de 255 patients égyptiens atteints de CHC comparativement à des patients atteints uniquement d'hépatite chronique B ou C. Malheureusement ils ne purent détecter que les mutations dans le gène *TP53* mais aucune dans *CTNNB1* [Hosny *et al.*, 2008] (168).

Nos résultats préliminaires pour *CTNNB1* semblent prometteurs pour la suite de l'étude.

2) *TERT*

Nous avons pu amplifier avec succès le promoteur du gène *TERT* sur ADN circulant. Il a été nécessaire de designer manuellement pas moins de 6 nouvelles amorces pour y parvenir (*Cf: Résultats A.2.b*). Seul un seul couple de ses amorces nous a permis d'amplifier la région d'intérêt sur le promoteur *TERT* de façon spécifique avec une bande de taille attendue (169 pb) sur l'électrophorèse (Figure 33). Pas moins de trois tampons de réaction de PCR ont été nécessaires (Figures 34 a-b). De même, il fallut de longues semaines avant de pouvoir établir un protocole de PCR atypique *Touchdown PCR* (Tableau 17) pour finalement obtenir les meilleurs résultats. Ce type de PCR en deux phases, réduit les liaisons non spécifiques et la formation de produits non souhaités. La mise au point de la PCR du promoteur de *TERT* sur ADN circulant n'avait jusqu'alors pas été effectuée à en croire l'absence de publication dans la littérature.

La séquence du produit a ensuite été vérifiée par séquençage Sanger après amplification par clonage bactérien.

Pour le hotspot -124G>A de *TERT*, seul un échantillon a montré un taux de mutation supérieur à 3% et deux aux alentours de 1%. Les 11 autres présentaient un pourcentage de mutation quasi nul (Figure 34 d-f). Si l'on part du principe que les témoins négatifs, non encore testés sont supposés avoir un taux de méthylation du même ordre, ces résultats sont en deçà de ce que nous attendions. Qu'elles peuvent en être les raisons et comment les améliorer ?

3) Statut de méthylation

Les pourcentages de méthylation obtenus pour le promoteur de de *RNF135* et *CELF6* sur ADN circulant sur les 14 échantillons ne dépassent que rarement les 10%, (37.c-d) ceci laisse penser que les conditions de PCR pour nos deux cibles ci-dessus devront être améliorées avant le séquençage du reste de la cohorte. Dans l'étude précédemment menée dans notre laboratoire sur l'ADN génomique, on récence notamment un pourcentage de CHC portant une hyperméthylation sur le promoteur de *RNF135* de 84 à 89 % et de 68 à 77% sur celui de *CELF6* (37.f). Le faible échantillonnage ainsi qu'un manque de données pour les mutations au sein de la tumeur ne nous permet aucune conclusion statistique pour l'instant (Test de Fisher, tableau de contingence...).

Une fois les conditions de PCR améliorées, l'étape suivante sera de comparer ces résultats avec les volontaires sains qui sont censés être totalement déméthylés. Il est à noter que l'hyperméthylation est portée sur un seul des deux allèles. Autrement dit, une méthylation de 50% dans l'ADN tumoral correspond à un taux de 100% de méthylation sur l'allèle modifié. Nous avons choisi la lignée HepG2 comme témoin positif pour cette étude, connue pour être totalement méthylée sur son îlot CpG. Cette analyse sera effectuée dans les expériences à venir, la méthylation attendue est de 50%.

La méthylation sur ADN génomique est pratique courante dans les laboratoires d'oncogénétiques français. Dans les glioblastomes par exemple, l'hyperméthylation du promoteur du gène *MGMT* qui est un facteur prédictif de la réponse au traitement par le témozolomide, est recherchée [Quilien *et al.*, 2012] (169). La technique utilisée est le pyroséquençage et l'on admet la présence d'une hyperméthylation dans ce promoteur si la moyenne du taux de méthylation pour chaque site GC est strictement supérieure à 8%. Les témoins négatifs sont validés uniquement si cette moyenne est inférieure à 3%. On en conclu qu'on retrouve une très faible méthylation sur des portions de gène supposée être totalement déméthylés. Qu'en est-il pour l'ADN circulant ?

Lorsqu'on séquence une cible donnée sur ADN circulant, les limites de la technique sont à prendre en compte. En effet, une mutation vue sur seulement 1 ou 2% des reads peut être considérée comme artéfactuelle. Là encore qu'en est-il pour la méthylation ?

Une grande partie de l'ADN circulant extrait des échantillons plasmatiques des patients atteints de carcinome hépatique ou tout autre cancer sera d'origine génomique. Cet ADN génomique est dans la plupart des cas sain et ne portera pas la mutation.

Depuis une dizaine d'années la communauté scientifique s'intéresse à l'évaluation du statut de méthylation sur ADN circulant. En 2005 une équipe américaine se penche sur la question de l'hyperméthylation de l'îlot CpG du gène *GSTP1* dans le cancer de la prostate détectable dans l'ADN circulant. Les tests ont été effectués par rapport à 35 témoins négatifs. Certains des 85 échantillons de patients atteints d'un cancer de la prostate pouvaient atteindre des taux de méthylation autour de 30% mais la plupart présentaient un taux proche de zéro [Bastian *et al.*, 2005] (170), comparables à nos résultats pour le CHC.

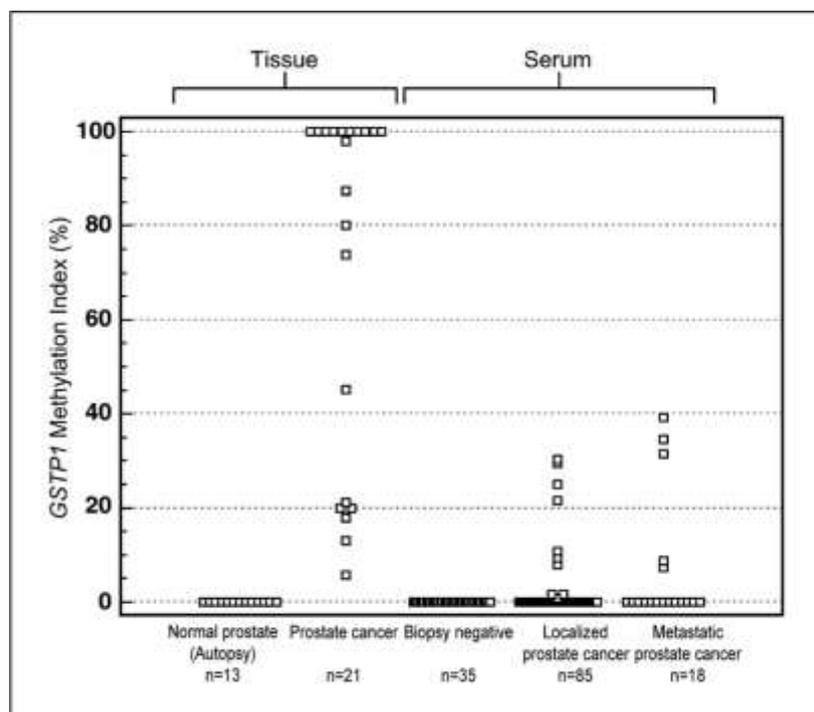


Figure 38 : Diagramme à point (*dot plot*) comparant l'index de méthylation de l'îlot CpG *GSTP1* chez des sujets sains comparativement à des patients atteints de cancer de la prostate sur tissu et sérum [Bastian *et al.*, 2005] (170).

Si nous parvenons à améliorer la sensibilité de ce test il est possible que le séquençage post-PCR au bisulfite soit un outil diagnostique prometteur pour le cancer hépatocellulaire.

Pour les deux autres sites d'intérêt potentiels sur les gènes *EPHA4* et *DUSP4*, la séquence des amplicons n'ayant pas encore été vérifiée, ils n'ont pas été utilisés pour la suite de l'étude et le séquençage NGS.

Les arguments moléculaires qui nous ont poussés à utiliser les promoteurs de ces gènes comme cibles résident en une précédente étude de screening large sur ADN génomique dans le CHC. Ce screening a été effectué à partir de données de méthylation au niveau pangénomique chez 700 patients CHC, une centaine d'individus sains ainsi que celles déjà présentes dans les bases de données à disposition (TGCA). Néanmoins, les résultats de ce screening étant encore sous brevet, aucune publication attestant cette hypothèse n'a été publiée jusqu'à présent [Nagae *et al.*, 2014](166).

En 2012, une étude avec des motivations similaires aux nôtres avait été effectuée sur une cohorte de patients taïwanais, utilisant également la technique de séquençage Illumina®. De la même façon, il s'agissait d'étudier les profils de méthylation du CHC au niveau pangénomique [Shen *et al.*, 2012 et 2013] (171) (172). Cette publication ne mentionne pas nos 4 cibles : *RNF135*, *CELF6*, *DUSPA* et *EPHA4* dans ses conclusions. Cette équipe considère un site digne d'intérêt si son pourcentage de méthylation est strictement supérieur à 5%. Cette limite donnée nous permettrait de tirer des conclusions sur certains de nos échantillons.

B. Limites et challenges techniques

La plupart des difficultés rencontrées pour l'étude du promoteur *TERT* s'expliquent par la richesse en dinucléotides GC dans la séquence cible.

1.a) CLONAGE

Comme l'atteste la figure 34c, seule une des 22 colonies bactériennes avait intégré le plasmide avec la séquence d'intérêt. Une colonie a pu intégrer un plasmide vide (puits 11) mais la plupart ne contenaient même pas de plasmide. Ceci s'explique encore une fois par le GC% du promoteur *TERT*. En effet, les deux brins sont plus difficilement séparables en raison des liaisons GC, ce qui augmente la température de fusion. Ainsi, la séquence est difficilement amplifiable par culture bactérienne. L'étape de ligation préalable à l'insertion dans un plasmide est également moins efficace en raison de cette richesse en GC. Les 99,1% d'identité sont donc satisfaisants pour notre étude mais ne le serait pas pour des séquences plus classiques. En effet, ceci constitue déjà 1% d'erreur dans chacun de nos amplicons de 169pb, soit presque deux bases erronées, avant même d'avoir commencé le séquençage haut débit des échantillons de patients.

1.b) POLYMERASE

En outre, la polymérase utilisée en PCR peut commettre des erreurs en recopiant les brins d'ADN circulant initiaux. Il en est de même sur ADN génomique. Ces erreurs apparaissent de préférences dans les régions riches en séquences répétitives et les polynucléotides. Nous savons que les queues polyA sont très fragiles. La région du promoteur *TERT* est riche en séquences GC qui confèrent une certaine monotonie de séquence augmentant le risque d'erreur de la polymérase. Les polymérases de type *Taq* utilisées couramment dans les mix de PCR commerciaux n'ayant pas d'activité de relecture intrinsèque (*proofreading*) commettent une erreur toutes les 1000 à 2000 bases (1 à 2kb), on parle de fidélité de la PCR. Par ailleurs, pour l'ARN les *Taq* polymérase introduisent davantage d'erreurs. La fidélité des polymérases des mix utilisés ici est de type « *High fidelity* », pour la marque NEB Phusion® elle est 50 fois supérieure à la *Taq* polymérase classique à savoir une erreur toutes les 50 à 100 kilobases [Pezza *et al.*, 2016] (173).

1.c) DMSO

Le DMSO est un additif organique se liant à l'ADN sur les résidus cytosines. En le rendant plus labile, il en change la conformation et facilite l'hybridation des amorces à l'ADN. Ainsi pour des régions riches en GC la température de fusion est revue à la baisse. Le DMSO est contenu dans la plupart des mix de PCR commerciaux et en concentration plus élevée dans les mix spécifiques aux régions « *GC rich* » comme celui que nous avons utilisé dans cette étude pour le promoteur *TERT* (*Next New England Biolab® High-Fidelity 2X GC Rich Mix 13A*). Or, l'ajout de DMSO augmente le taux d'erreur de la polymérase qui était, jusqu'à maintenant, déjà élevé.

1.d) NOMBRE DE CYCLES

Au cours de la PCR, une erreur apparue précocement sera multipliée de manière exponentielle pendant toute la durée des cycles restants, ce qui amplifie fortement le phénomène. Le nombre de cycle de notre programme *Touchdown PCR* est de 20 avec une température d'hybridation à 65°C et de 25 à 58°C. Au total 45 cycles, ce qui est nettement au-dessus de la moyenne habituelle (en moyenne un maximum de 35 cycles). Au-delà d'un certain nombre de cycles, la quantité d'amorce est en concentration minimale comparativement aux produits formés. Il arrive que ces produits commencent à se fixer les uns aux autres et s'autoamplifient, surtout pour des séquences riches en GC monotones. De cette façon, nous voyons bien que la PCR n'est plus spécifique. Ceci provoque parfois un phénomène *ladder like* : apparition de produits de taille graduées en PCR, totalement inexploitable.

1.e) NGS

Une deuxième polymérase est utilisée dans cette étude. Il s'agit de celle de l'étape NGS du fournisseur Illumina® du séquenceur MiSeq. Ici, comme la plupart du temps c'est encore une polymérase de type Phusion de haute fidélité qui est utilisée pour la préparation de la librairie. Ainsi, des erreurs supplémentaires seront additionnées à la librairie (une erreur toutes les 50 à 100 kilobases).

Il est également possible qu'un polymorphisme existe au sein de la séquence à amplifier. Comme les amorces dessinées n'amplifieraient qu'une seule des versions du gène *TERT* par exemple, là encore subsisterait un biais.

De plus, tous les produits obtenus lors de la première PCR ont été rassemblés dans les mêmes tubes pour le séquençage NGS. Au final, il s'agit donc d'une PCR multiplex lors de la préparation de la librairie. Certains produits ont également pu former des dimères ou multimères entre eux. Il est également fort possible que certains amplicons aient été favorisés par rapport à d'autres en raison de leur plus grande facilité à être amplifiés. Une séquence moins riche en GC telle que l'exon 3 du gène *CTNNB1* présente, par exemple, une profondeur de lecture supérieure à *TERT*.

Le nombre de *read* obtenus est aux alentours d'un millier pour le promoteur *TERT* ce qui est inférieur à la profondeur attendue et exploitable. En effet, on compte en moyenne 1% d'erreurs dans les *reads*. C'est-à-dire qu'une mutation détectée aux alentours d'1 pourcent est bien souvent artéfactuelle. Ceci allonge encore la liste des erreurs systématiques.

1.a) FAIBLE POUVOIR STATISTIQUE ET METADONNEES

Les premiers résultats portant sur trop peu d'échantillons aucune donnée statistique n'est exploitable. En effet même si pour l'exon 3 du gène *CTNNB1* les résultats semblent représentatifs de la population de patients atteints de CHC, il nous reste à les comparer à un échantillonnage de témoin. L'ADN circulant du plasma de 10 volontaires sains a été extrait, mais les quantités sont très faibles comparativement à celles issues du plasma des malades. La technique sera encore plus difficile à appliquer à ces échantillons. L'ADN génomique de la lignée cellulaire tumorale de référence pour le CHC est HepG2, elle a donc été choisie comme témoin positif et reste à être étudiée. Comme nous l'avons vu dans la cohorte de 267 patients, 155 autres ont déjà été extraits, ceux-ci une fois analysés permettront de plus amples études statistiques.

Le docteur Midorikawa-sensei a recueillis de nombreuses métadonnées concernant cette cohorte : l'âge des patients, le sexe, le statut sérologique VHB, VHC, la présence d'un diabète, d'une obésité, d'un éthylisme chronique conservation d'une excrétion biliaire, l'indice ICGR15 (le taux de rétention du vert d'indocyanine à 15 minutes) évaluant les fonction de réserve du foie ; Sur le plan anatomopathologique il renseigne sur la taille de la tumeur, le segment touché, le type histologique, son degré de différenciation et d'envahissement vasculaire.

Nos premiers résultats ne permettent pas d'établir une corrélation significative entre tous ces éléments. Ces données restent disponibles et permettront à l'avenir d'établir des liens entre les facteurs de risque et le type de modifications génétiques analysées.

Il nous serait possiblement donné de vérifier l'hypothèse de l'impact du VHC sur la mutation *CTNNB1* émise par l'équipe de Nault [Nault *et al.*, 2013] (91). Des liens entre l'étiologie et l'évènement génétique déclencheur du mécanisme de carcinogénèse pourraient être étudiés.

Il m'a été posé la question d'un potentiel biais ethnique, nous pourrions l'écarter en comparant les données à venir aux études en cours faites sur des patients majoritairement caucasiens.

1.b) RATIO ADN TUMORAL / SAIN

L'une des explications du faible taux de mutation obtenu pour le promoteur *TERT* peut être que le ratio ADN circulant normal/ADN circulant tumoral est faible. Ce phénomène est d'autant plus important que la quantité initiale de matériel était fixée à 5ng, quantité minimale amplifiable dans notre étude. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, dans la mesure où il nous est pour lors impossible de définir ce ratio, nous ne pouvons pondérer la véracité des pourcentages de mutations obtenus. Le nombre de fragment tumoral initialement présent dans le prélèvement serait trop faible.

Nous avons vu que la phase pré-analytique des prélèvements était primordiale. Après 2 heures à température ambiante les laboratoires français sont réticents à faire étudier le statut moléculaire sur prélèvements sanguins. En effet, la dégradation de l'ADN circulant contenu dans les échantillons à cette température est très rapide. Les prélèvements ont ici été utilisés déjà congelés à -20°C après avoir été prélevés par le Dr Midorikawa au Nihon University Hospital. A ce jour, il est difficile d'évaluer l'impact de la décongélation sur la quantité d'ADN circulant. De plus, les patients présentant une tumeur de volume faible ont généralement des concentrations en ADN circulant plus faibles que ceux présentant des tumeurs volumineuses.

Les techniques d'amplification actuelles permettent d'obtenir des millions de copies d'une molécule d'ADN circulant à partir d'un très faible nombre de copies initiales, qui comprennent des séquences « normales » et des séquences « mutées », définies comme telles par rapport à un génome de référence. Cependant, dans un cadre clinique, il est quasiment toujours impossible de déterminer l'origine cellulaire de l'ADN circulant prélevé, ni le ratio ADN tumoral/ADN physiologique, car il faudrait pouvoir séquencer le génome de toutes les cellules du patient en question pour le comparer à celui de l'ADN circulant prélevé. De plus, les éventuelles altérations observées ne sont pas forcément spécifiques d'un organe et peuvent avoir plusieurs origines. De même, différents cancers ou différentes tumeurs ne relarguent pas la même quantité d'ADN dans la circulation.

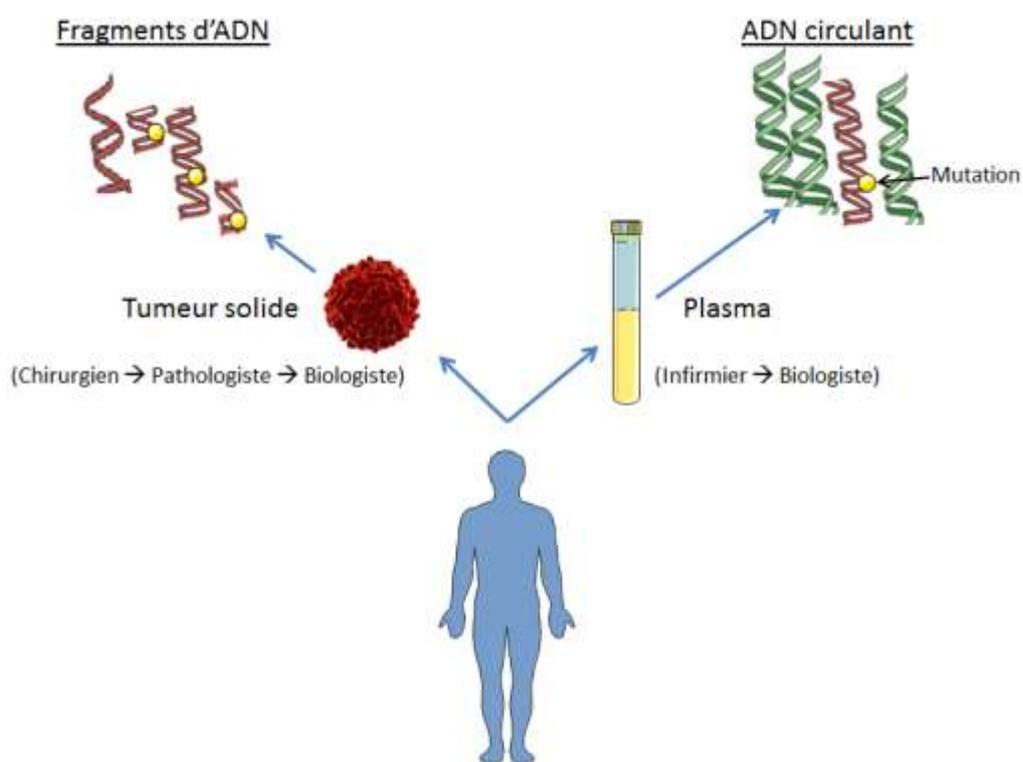


Figure 39 : Origine de l'ADN analysé [Inspirée de Vallée et Denis, 2013] (174)

C. PERSPECTIVES

1) **A court terme**

Excepté pour l'exon 3 du gène *CTNNB1*, une optimisation des conditions de PCR s'imposent. Ceci permettra de savoir si les faibles taux obtenus sont dus au faible nombre de copies mutées initialement présentes dans l'ADN circulant ou si l'imperfection de la technique est en cause. Ensuite il faudrait désormais analyser l'ensemble des 155 échantillons d'ADN circulant extraits des patients atteints de CHC de notre cohorte, ainsi que la centaine d'échantillons encore non extraits. De plus, 10 volontaires sains ont été prélevés au laboratoire. Les quantités d'ADN extraites étant trop faibles, nous ne disposons pas encore de

résultats exploitables pour les témoins négatifs mais des améliorations sont en cours. Le témoin positif à partir d'ADN génomique de la souche HepG2 permettra également de soumettre ses données à la statistique.

Nous avons également mis au point la PCR au bisulfite pour deux autres hotspots : EPHA4 et DUSP4, il ne reste qu'à vérifier la séquence des produits de PCR par une technique de Sanger après clonage bactérien pour valider leurs programmes et mix de PCR.

2) **Accel-NGS™ Methyl-Seq DNA Library Kit**

Le 22 mars 2015, le 11ème séminaire international de génomique avancée « *My Genome, Your Genome* » se tenait à Tokyo. Au cours de conférence, la compagnie Swift Bioscience© présenta sa nouvelle technologie pour le séquençage NGS des échantillons traités au bisulfite : le kit Accel-NGS™ Methyl-Seq DNA Library. Ce nouvel outil se vante de pouvoir être utilisé à partir d'une quantité initiale d'ADN circulant de 100pg jusqu'à 500ng avec un programme de PCR réduisant le nombre de cycle d'amplification à 14 et un temps de préparation de librairie de deux heures. Qu'elle est l'avancée de cette technologie par rapport à celles en vigueur ?

Dans cette étude nous avons utilisé une technologie où le traitement de l'ADN circulant par le bisulfite est antérieur à la préparation de la librairie par le kit TruSeq™ Nano DNA Sample Prep à savoir l'amplification par des amorces randomisées et la ligation des étiquettes avant séquençage (Figure 40.c). Cette méthode, comparativement à la méthode traditionnelle (b), permet d'éviter la perte d'une partie de la librairie après conversion des brins d'ADN dont l'une des extrémités se trouvera rognée. *A contrario*, l'approche par amorces complémentaires aléatoires conduit à l'incapacité de ces amorces à se fixer à un sous-ensemble de fragments altérés par la conversion au bisulfite. Une partie de l'ADN initial, dont les fragments de taille inférieure à 80 pb, est donc perdue. Swift Bioscience© propose l'utilisation d'adaptateurs après la conversion pour conserver la couverture de la totalité des fragments indépendamment de leur taille.

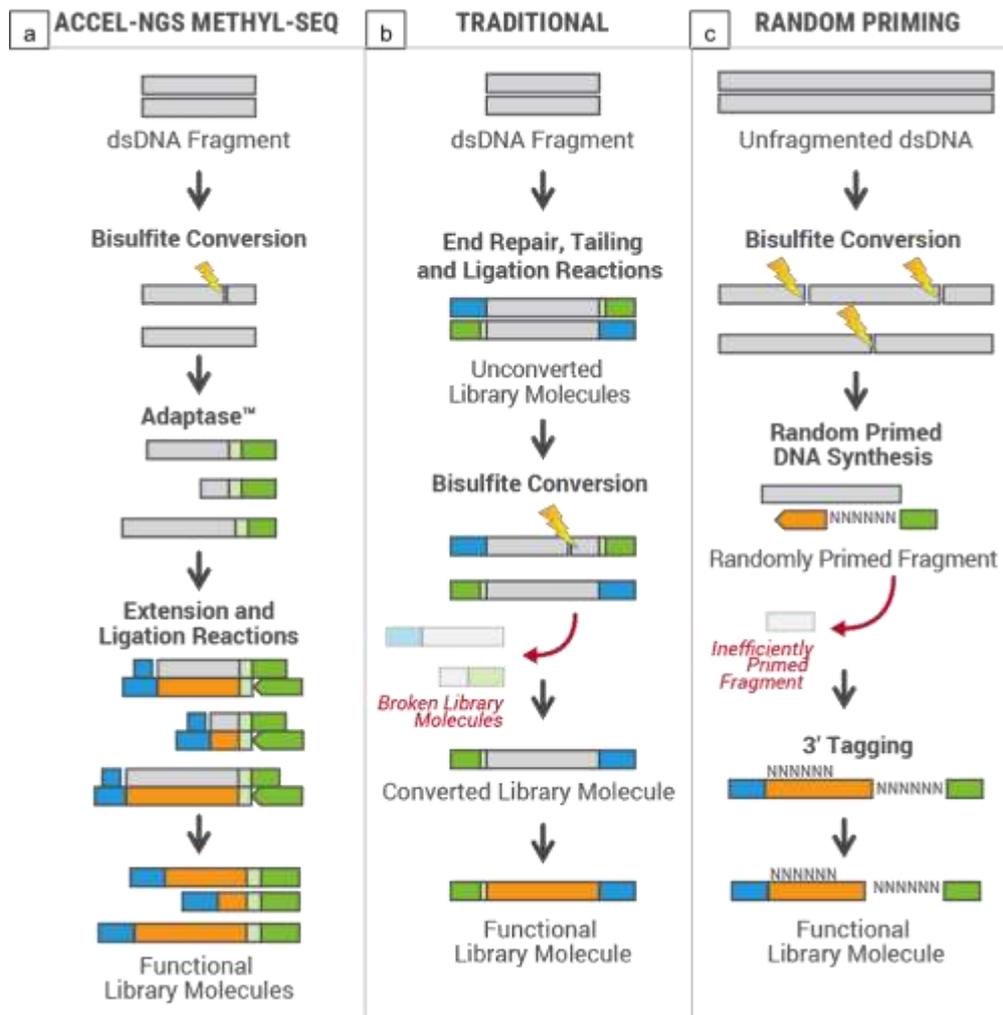


Figure 40 : Principe de la méthode de “séquençage de la 5ème base” par *Swift bioscience* [Makarov *et al.* 2015] (175)

Il a été décidé de mettre cette technique en place dans le laboratoire pour les expériences en relai des résultats qui viennent d’être présentés au cours de cette thèse. Les quelques 200 patients de la cohorte extraits ou non seront testés avec ce kit pour créer la librairie finale par le Dr Yoshikawa, gastroentérologue au cours d’une thèse de science. En effet, ce système permettra d’obtenir un rendement nettement supérieur. A nous désormais de vérifier son efficacité. Pour lors, ce projet est toujours au stade de considérations d’ordre financier.

3) Nouvelles technologies et avancées

Afin d’augmenter le nombre de *reads*, il pourrait s’avérer intéressant d’expérimenter d’autres techniques de séquençage au débit de routine tel que le Ion Torrent/Proton™ (émulsion sur billes) de la compagnie Life Technologies©, le 454 de Roche© (pyroséquençage) ou encore le SOLiD® system (colorimétrie) de Thermo Fischer Scientific©. Elles présentent des caractéristiques et des performances différentes du MiSeq®

d'Illumina© (amplification par *bridge*) comme la profondeur, la longueur du *run*, la durée du séquençage...

Apparaissent également sur le marché les techniques de séquençage dites de troisième génération avec le séquençage en temps réel : SMRT (*Single Molecule Real Time*) de Pacific Bioscience© ou les nanopores aux aspects prometteurs.

3.a) NANOPORE

Les techniques de nanopore repose sur des procédés physico-chimiques à l'étude depuis 1995. Aujourd'hui de nombreuses compagnies en développent à partir de divers matériaux. Oxford Nanopore Technologies© par exemple, établit un nanopore possédant un diamètre intérieur de l'ordre du nanomètre, composé de protéines. Il est inséré dans une membrane électriquement résistante constitué de polymères d'origine synthétiques. Un potentiel électrique est appliqué à travers cette membrane créant un flux passant uniquement par l'ouverture du nanopore. Chaque molécule qui y entre cause des perturbations électriques caractéristiques de leur composition. En mesurant ces différences de potentiel, la molécule peut être identifiée. Un monobrin d'ADN ou d'ARN s'y engouffrant pourra être séquencé base par base indépendamment de sa longueur via la partie la plus étroite du pore qui émet un signal. Par ce séquençage direct à l'échelle de la molécule même, on s'affranchit de toutes les erreurs de PCR puis et de celles de l'amplification lors de la préparation de la librairie. Leur but est la miniaturisation de la technologie offrant une médecine personnalisée tout terrains [Schaffer *et al.*, 2012] (176). Néanmoins, en raison d'un taux d'erreur encore non contrôlé les différentes technologies à base de nanopore n'est pas encore disponible mais constitue une alternative à considérer.

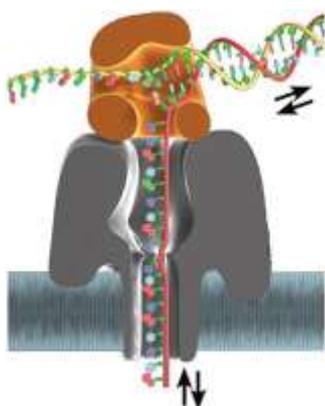


Figure 41 : Séquençage d'ADN par nanopore [Oxford Nanopore Technologies©] (177)

3.b) ORIGINE DE L'ADN CIRCULANT

Tout récemment, une équipe de Seattle publie un article dans la revue Cell de janvier 2016 intitulé : « *Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its*

Tissues-Of-Origin » que l'on peut traduire par : L'ADN circulant renferme une empreinte nucléosomique renseignant sur son origine tissulaire [Snyder *et al.*, 2015] (123).

La démonstration faite par Snyder, Kircher et leurs collaborateurs remet en cause certaines théories sur les origines de l'ADN circulant. Mais surtout elle ouvre les portes sur les potentiels moyens de pallier au manque d'interprétabilité auquel les laboratoires sont parfois confrontés avec les analyses en vigueur. En effet, nous avons vu que le ratio ADN tumoral / ADN normal dans le sang circulant est inconnu lors des études et cette dilution peut créer des résultats faussement négatifs.

Par une technique de séquençage en profondeur pangénomique de l'ADN circulant, cette équipe est parvenue à dessiner la carte de localisation des nucléosomes *in vivo* sur ces courts fragments d'ADN. Il a été montré que l'ADN circulant porte les marques des facteurs de transcriptions qui l'accompagnent, notamment le répresseur transcriptionnel CTCF. D'après cette étude, la disposition des nucléosomes est corrélée à l'architecture nucléaire, la structure des gènes et leur expression observées dans les différentes cellules. Ceci laisse à penser que ces marques constituent un véritable indice sur l'organe dont sont issus ces fragments. Ici, l'espace internucléosomique de l'ADN circulant des individus sains présumés est en accord avec les caractéristiques épigénétiques des cellules myéloïdes et lymphoïdes. La source de l'ADN circulant normal serait bien subséquente à l'apoptose des cellules hématopoïétiques de la circulation sanguine. D'un autre côté, définir de quel organe est issu l'ADN pathologique est une avancée conséquente et permettra l'étendue des applications cliniques en oncogénétiques et de nombreuses autres disciplines.

Genome-wide, *in vivo* nucleosome map from cell-free DNA in plasma

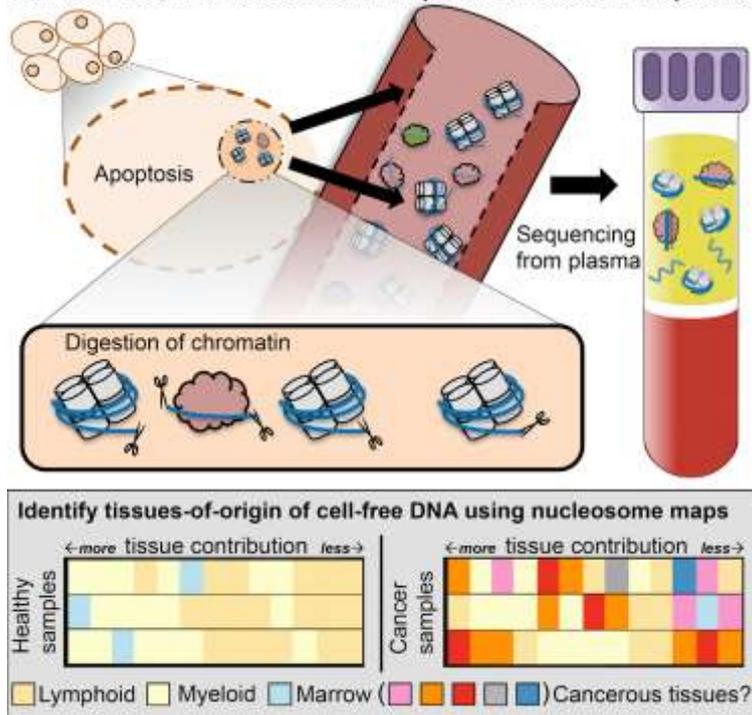


Figure 42 : Résumé illustré de l'article paru dans l'édition 164 de Cell [Snyder *et al.*, 2016] (123)

D. APPLICATION CLINIQUE

La recherche de mutations sur ADN circulant est effectuée en routine dans les laboratoires d'analyses à l'échelle planétaire pour servir la cancérologie. Par exemple, le gène *EGFR* est une cible particulièrement étudiée dans l'adénocarcinome pulmonaire. La possibilité de déterminer l'origine de cet ADN permettra de différencier l'ADN tumoral de l'ADN normal, l'ADN maternel de l'ADN fœtal ou encore l'ADN donneur versus receveur dans les rejets d'allogreffe.

Pour le dépistage précoce du CHC, la recherche de mutation sur le gène de la β -caténine et autres gènes cibles ne sera pas applicable avant d'avoir évalué les critères requis pour les tests cliniques. La mise en place en routine de nouvelles applications est la plupart du temps limité par le coût technique.

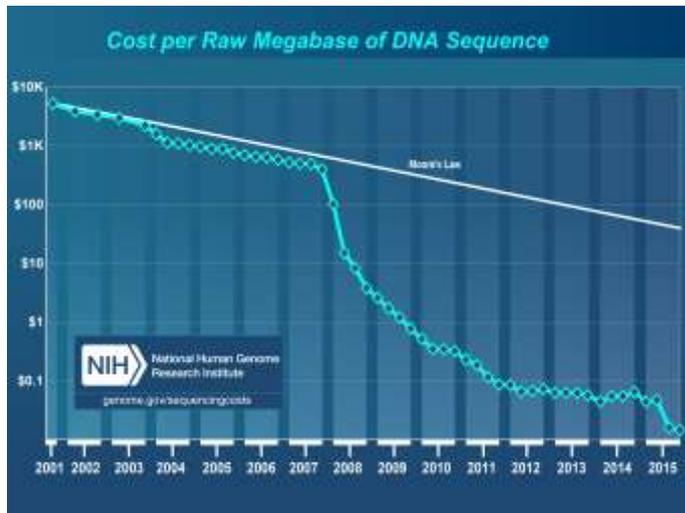


Figure 43 : Courbe de décroissance du coût de séquençage d'une mégabase d'ADN [NIH, 2016] (178)

Le prix du séquençage d'une base est divisé par deux chaque année. Sur la figure 43, nous voyons que début 2004 le cout du séquençage d'1 mégabase d'ADN était à 1000 dollars américains, il est désormais bien inférieur à 10 centimes. Ce phénomène va bien au-delà de la loi de Moore qui stipule que les performances informatiques doublent chaque année à coût constant. Il est même désormais possible de faire du séquençage de novo pour créer un génome artificiel de toute pièce. De la même manière, la quantité disponible d'informations que renferment l'ADN circulant va augmenter de façon exponentielle : la question des capacités de traitement de ces données se pose.

Dans le paysage génomique actuel, il est rationnel de penser que les applications cliniques à partir d'ADN circulant ne peuvent qu'exploser.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cancer IAfRo. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. 2012;
2. Sripa B, Bethony JM, Sithithaworn P, Kaewkes S, Mairiang E, Loukas A, et al. Opisthorchiasis and Opisthorchis-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. *Acta Trop*. 2011 Sep;120 Suppl 1:S158–68.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005 Apr;55(2):74–108.
4. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893–917.
5. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007 Jun 1;132(7):2557–76.
6. Zhang B-H, Yang B-H, Tang Z-Y. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004 Jul;130(7):417–22.
7. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S35–50.
8. Wild CP, Hasegawa R, Barraud L, Chutimataewin S, Chapot B, Ito N, et al. Aflatoxin-albumin adducts: a basis for comparative carcinogenesis between animals and humans. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 1996 Mar;5(3):179–89.
9. Bouvier A-M, Remontet L, Jouglu E, Launoy G, Grosclaude P, Buémi A, et al. Incidence of gastrointestinal cancers in France. *Gastroentérologie Clin Biol*. 2004 Oct;28(10 Pt 1):877–81.
10. Chen CJ, Yu MW, Liaw YF. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997 Oct;12(9-10):S294–308.
11. Iida F, Iida R, Kamijo H, Takaso K, Miyazaki Y, Funabashi W, et al. Chronic Japanese schistosomiasis and hepatocellular carcinoma: ten years of follow-up in Yamanashi Prefecture, Japan. *Bull World Health Organ*. 1999;77(7):573–81.
12. Lambert R. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the world [Internet]. 2009. Available from: <http://hdl.handle.net/2042/28030>
13. Nishioka K, Watanabe J, Furuta S, Tanaka E, Iino S, Suzuki H, et al. A high prevalence of antibody to the hepatitis C virus in patients with hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer*. 1991 Jan 15;67(2):429–33.
14. Tanaka Y, Hanada K, Mizokami M, Yeo AET, Shih JW-K, Gojobori T, et al. A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Nov 26;99(24):15584–9.
15. Chen SL, Morgan TR. The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Int J Med Sci*. 2006 Apr 1;3(2):47–52.
16. Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of HCC: Consider the Population. *J Clin Gastroenterol*. 2013 Jul;47(0):S2–6.
17. Yu MW, Lien JP, Liaw YF, Chen CJ. Effects of multiple risk factors for hepatocellular carcinoma on formation of aflatoxin B1-DNA adducts. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 1996 Aug;5(8):613–9.
18. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012 May;142(6):1264–73.e1.
19. Ikeda K, Arase Y, Saitoh S, Kobayashi M, Someya T, Hosaka T, et al. Prediction model of hepatocarcinogenesis for patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. Validation with internal and external cohorts. *J Hepatol*. 2006 Jun;44(6):1089–97.
20. Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, Ronchi G, Romeo R, Manini M, et al. The natural

- history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology* Baltim Md. 2006 Jun;43(6):1303–10.
21. Murali AR, Romero-Marrero C, Aucejo F, Menon KVN. Hepatocellular carcinoma: options for diagnosing and managing a deadly disease. *Cleve Clin J Med*. 2013 Oct;80(10):645–53.
 22. Kiene K, Hsu B, Rowe D, Carruthers A. Hepatitis, HIV, and the dermatologist: a risk review. *J Am Acad Dermatol*. 1994 Jan;30(1):108–15.
 23. INPES. L'hépatite B. 2012.
 24. OMS. Hépatite B, aide mémoire N°204. 2015.
 25. IARC, Kleihues P, Stewart BW. *Le Cancer dans le Monde*. Lyon; 2003.
 26. IARC. IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS : Hepatitis viruses. 1994.
 27. Chang MH, Shau WY, Chen CJ, Wu TC, Kong MS, Liang DC, et al. Hepatitis B vaccination and hepatocellular carcinoma rates in boys and girls. *JAMA*. 2000 Dec 20;284(23):3040–2.
 28. Chen C, Yang HI, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis b virus dna level. *JAMA*. 2006 Jan 4;295(1):65–73.
 29. El Mahdy Korah T, Abd Elfatah Badr E, Mohamed Emara M, Ahmed Samy Kohla M, Gamal Saad Michael G. Relation between sex hormones and hepatocellular carcinoma. *Andrologia*. 2016 Jan;n/a – n/a.
 30. Di Maio M, De Maio E, Morabito A, D'Aniello R, De Feo G, Gallo C, et al. Hormonal treatment of human hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Nov;1089:252–61.
 31. Cha C, Dematteo RP. Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005 Feb;19(1):25–37.
 32. Kim JH, Rho HM. Activation of the human transforming growth factor alpha (TGF-alpha) gene by the hepatitis B viral X protein (HBx) through AP-2 sites. *Mol Cell Biochem*. 2002 Feb;231(1-2):155–61.
 33. Wagner A, Denis F, Ranger-Rogez S, Loustaud-Ratti V, Alain S. Génotypes du virus de l'hépatite B. *Immuno-Anal Biol Spéc*. 2004 Dec;19(6):330–42.
 34. Lin S, Liu C, Shang H, Chen H, Yang B, Chen J, et al. HBV serum markers of 49164 patients and their relationships to HBV genotype in Fujian Province of China. *J Clin Lab Anal*. 2013 Mar;27(2):130–6.
 35. Deuffic S, Poynard T, Buffat L, Valleron AJ. Trends in primary liver cancer. *Lancet Lond Engl*. 1998 Jan 17;351(9097):214–5.
 36. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology* Baltim Md. 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S74–83.
 37. Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol*. 2009 Jun;50(6):1142–54.
 38. Paris C français de chirurgie 108. Carcinome hépatocellulaire : rapport présenté au 108e Congrès français de chirurgie, Paris, 2-4 octobre 2006. Arnette; 2006.
 39. Qian GS, Ross RK, Yu MC, Yuan JM, Gao YT, Henderson BE, et al. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 1994 Feb;3(1):3–10.
 40. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*. 1991 Apr 4;350(6317):429–31.
 41. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*. 2002 Feb 15;155(4):323–31.
 42. Hutchinson SJ, Bird SM, Goldberg DJ. Influence of alcohol on the progression of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2005 Nov;3(11):1150–9.

43. Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Koida I, et al. Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis: a prospective observation of 2215 patients. *J Hepatol.* 1998 Jun;28(6):930–8.
44. Nalpas B, Thiers V, Pol S, Driss F, Thepot V, Berthelot P, et al. Hepatitis C viremia and anti-HCV antibodies in alcoholics. *J Hepatol.* 1992 Mar 1;14(2):381–4.
45. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology.* 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S27–34.
46. Caldwell SH, Crespo DM, Kang HS, Al-Osaimi AMS. Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S97–103.
47. Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Kawamura Y, Akuta N, et al. Difference in malignancies of chronic liver disease due to non-alcoholic fatty liver disease or hepatitis C in Japanese elderly patients. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol.* 2012 Mar;42(3):264–72.
48. Kawamura Y, Arase Y, Ikeda K, Seko Y, Imai N, Hosaka T, et al. Large-scale long-term follow-up study of Japanese patients with non-alcoholic Fatty liver disease for the onset of hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2012 Feb;107(2):253–61.
49. McGlynn KA, London WT. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005 Feb;19(1):3–23.
50. Bosch FX, Muñoz N. Prospects for epidemiological studies on hepatocellular cancer as a model for assessing viral and chemical interactions. *IARC Sci Publ.* 1988;(89):427–38.
51. Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE, Liang TJ, et al. Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatol Baltim Md.* 2010 Jan;51(1):201–9.
52. Huxley R, Lee CMY, Barzi F, Timmermeister L, Czernichow S, Perkovic V, et al. Coffee, decaffeinated coffee, and tea consumption in relation to incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2009 Dec 14;169(22):2053–63.
53. Zanetti AR, Van Damme P, Shouval D. The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview. *Vaccine.* 2008 Nov 18;26(49):6266–73.
54. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatol Baltim Md.* 2011 Mar;53(3):1020–2.
55. Stewart BW, Kleihues P, Centre international de recherche sur le cancer. *Le cancer dans le monde.* Lyon: IARC Press; 2005.
56. Développement de la cellule cancéreuse - Société canadienne du cancer [Internet]. www.cancer.ca. [cited 2016 Feb 25]. Available from: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/what-is-cancer/cancer-cell-development/?region=on>
57. Leroy K, de Cremoux P. Anomalies moléculaires des cancers: Cible thérapeutique [Internet]. John Libbey Eurotext; 2014. (L'innovation thérapeutique en cancérologie). Available from: <https://books.google.fr/books?id=cBXPBQAAQBAJ>
58. Teicher BA. Tumor Stem Cells and Malignant Cells, One and the Same. In: Teicher BA, Bagley RG, editors. *Stem Cells and Cancer* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [cited 2016 Feb 25]. p. 15–26. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-933-8_2
59. Steinberg W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol.* 1990 Apr;85(4):350–5.
60. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature.* 2015 Jul 9;523(7559):177–82.
61. Ganne-Carrié N, Chastang C, Chapel F, Munz C, Pateron D, Sibony M, et al. Predictive score for the development of hepatocellular carcinoma and additional value of liver large cell dysplasia in Western patients with cirrhosis. *Hepatol Baltim Md.* 1996 May;23(5):1112–8.
62. Liver EA for the S of the, Cancer EO for R and T of. EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012 Apr;56(4):908–43.

63. Li C, Zhang Z, Zhang P, Liu J. Diagnostic accuracy of des-gamma-carboxy prothrombin versus α -fetoprotein for hepatocellular carcinoma: A systematic review. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol*. 2014 Oct;44(10):E11–25.
64. Weitz IC, Liebman HA. Des- γ -carboxy (abnormal) prothrombin and hepatocellular carcinoma: A critical review. *Hepatology*. 1993 Oct 1;18(4):990–7.
65. Shakado S, Sakisaka S, Chayama K, Okanoue T, Toyoda J, Izumi N, et al. Alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy-prothrombin at twenty-four weeks after interferon-based therapy predict hepatocellular carcinoma development. *World J Hepatol*. 2015 Nov 28;7(27):2757–64.
66. Trinchet J-C, Chaffaut C, Bourcier V, Degos F, Henrion J, Fontaine H, et al. Ultrasonographic surveillance of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: A randomized trial comparing 3- and 6-month periodicities. *Hepatology*. 2011 Dec 1;54(6):1987–97.
67. Chalasani N, Said A, Ness R, Hoen H, Lumeng L. Screening for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis in the United States: results of a national survey. *Am J Gastroenterol*. 1999 Aug;94(8):2224–9.
68. Monge M. *Cancérologie et biologie: marqueurs tumoraux organe par organe*. Issy-les-Moulineaux: Elsevier; 2006.
69. Singal AG, Pillai A, Tiro J. Early detection, curative treatment, and survival rates for hepatocellular carcinoma surveillance in patients with cirrhosis: a meta-analysis. *PLoS Med*. 2014 Apr;11(4):e1001624.
70. Vullierme M-P, Paradis V, Chirica M, Castaing D, Belghiti J, Soubrane O, et al. Hepatocellular carcinoma--what's new? *J Visc Surg*. 2010 Feb;147(1):e1–12.
71. Stigliano R, Marelli L, Yu D, Davies N, Patch D, Burroughs AK. Seeding following percutaneous diagnostic and therapeutic approaches for hepatocellular carcinoma. What is the risk and the outcome? Seeding risk for percutaneous approach of HCC. *Cancer Treat Rev*. 2007 Aug;33(5):437–47.
72. FFCD-FNCLCC-GERCOR-SFCD-SFRO-SNFGE. *Thésaurus national de cancérologie digestive*. Chapitre 7 – Carcinome hépatocellulaire (cancer primitif du foie). 2011.
73. Petitprez K. HAS. *Le diagnostic non invasif de la cirrhose non compliquée*. 2013.
74. Clavien P-A, Lesurtel M, Bossuyt PMM, Gores GJ, Langer B, Perrier A, et al. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncol*. 2012 Jan;13(1):e11–22.
75. Cherqui D, Trinchet JC. *Diagnostic et traitement du carcinome hépatocellulaire chez les malades atteints de cirrhose*. Deuxième partie : Traitement. 2002.
76. Duvoux C, Roudot-Thoraval F, Decaens T, Pessione F, Badran H, Piardi T, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a model including α -fetoprotein improves the performance of Milan criteria. *Gastroenterology*. 2012 Oct;143(4):986–94.e3; quiz e14–5.
77. Gigot J-F, Glineur D, Santiago Azagra J, Goergen M, Ceuterick M, Morino M, et al. Laparoscopic liver resection for malignant liver tumors: preliminary results of a multicenter European study. *Ann Surg*. 2002 Jul;236(1):90–7.
78. Lim K-C, Chow PK-H, Allen JC, Siddiqui FJ, Chan ES-Y, Tan S-B. Systematic review of outcomes of liver resection for early hepatocellular carcinoma within the Milan criteria. *Br J Surg*. 2012 Dec;99(12):1622–9.
79. Bruix J, Llovet JM. Locoregional treatments for hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 1999 Dec 1;13(4):611–22.
80. Ebara M, Okabe S, Kita K, Sugiura N, Fukuda H, Yoshikawa M, et al. Percutaneous ethanol injection for small hepatocellular carcinoma: therapeutic efficacy based on 20-year observation. *J Hepatol*. 2005 Sep;43(3):458–64.
81. Livraghi T, Goldberg SN, Lazzaroni S, Meloni F, Ierace T, Solbiati L, et al. Hepatocellular Carcinoma: Radio-frequency Ablation of Medium and Large Lesions. *Radiology*. 2000 Mar 1;214(3):761–8.
82. Kalra N, Gupta P, Chawla Y, Khandelwal N. Locoregional treatment for

- hepatocellular carcinoma: The best is yet to come. *World J Radiol.* 2015 Oct 28;7(10):306–18.
83. Takayama T, Makuuchi M, Hasegawa K. Single HCC smaller than 2 cm: surgery or ablation? *J Hepato-Biliary-Pancreat Sci.* 2010 Jul 1;17(4):422–4.
84. Salem R, Lewandowski RJ, Kulik L, Wang E, Riaz A, Ryu RK, et al. Radioembolization results in longer time-to-progression and reduced toxicity compared with chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2011 Feb;140(2):497–507.e2.
85. Song T. Recent advances in surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *Drug Discov Ther.* 2015 Oct;9(5):319–30.
86. Lau WY, Lai ECH, Leung TWT, Yu SCH. Adjuvant intra-arterial iodine-131-labeled lipiodol for resectable hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial-update on 5-year and 10-year survival. *Ann Surg.* 2008 Jan;247(1):43–8.
87. Yau T, Wong H, Chan P, Yao TJ, Pang R, Cheung TT, et al. Phase II study of bevacizumab and erlotinib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma patients with sorafenib-refractory disease. *Invest New Drugs.* 2012 Dec;30(6):2384–90.
88. Hong Y-P, Li Z-D, Prasoon P, Zhang Q. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma: From basic research to clinical use. *World J Hepatol.* 2015 May 8;7(7):980–92.
89. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57–70.
90. Tornesello ML, Buonaguro L, Tatangelo F, Botti G, Izzo F, Buonaguro FM. Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Genomics.* 2013 Aug;102(2):74–83.
91. Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun.* 2013;4:2218.
92. Hayflick L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res.* 1965 Mar;37:614–36.
93. Molecular and Clinical Basics of Gerontology|Digital Textbook Library [Internet]. [cited 2016 Feb 22]. Available from: http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_Gerontologia_en_book/ch01.htm
94. Zhang X, Mar V, Zhou W, Harrington L, Robinson MO. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev.* 1999 Sep 15;13(18):2388–99.
95. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, 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.* 2013 Apr 9;110(15):6021–6.
96. Heidenreich B, Nagore E, Rachakonda PS, Garcia-Casado Z, Requena C, Traves V, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in primary cutaneous melanoma. *Nat Commun.* 2014;5:3401.
97. Vinagre J, Almeida A, Pópulo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun.* 2013;4:2185.
98. Chen Y-L, Jeng Y-M, Chang C-N, Lee H-J, Hsu H-C, Lai P-L, et al. TERT promoter mutation in resectable hepatocellular carcinomas: a strong association with hepatitis C infection and absence of hepatitis B infection. *Int J Surg Lond Engl.* 2014;12(7):659–65.
99. De La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8847–51.
100. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009 Jul;17(1):9–26.
101. Nejak-Bowen KN, Monga SPS. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *Semin Cancer Biol.* 2011 Feb;21(1):44–58.

102. Calvisi DF, Ladu S, Factor VM, Thorgeirsson SS. Activation of beta-catenin provides proliferative and invasive advantages in c-myc/TGF-alpha hepatocarcinogenesis promoted by phenobarbital. *Carcinogenesis*. 2004 Jun;25(6):901–8.
103. Calvisi DF, Conner EA, Ladu S, Lemmer ER, Factor VM, Thorgeirsson SS. Activation of the canonical Wnt/beta-catenin pathway confers growth advantages in c-Myc/E2F1 transgenic mouse model of liver cancer. *J Hepatol*. 2005 Jun;42(6):842–9.
104. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhata R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. 2009 Apr 1;23(7):781–3.
105. Woodcock CL, Ghosh RP. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 May;2(5):a000596.
106. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987 Jul 20;196(2):261–82.
107. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19;99(6):3740–5.
108. Fernandez AF, Huidobro C, Fraga MF. De novo DNA methyltransferases: oncogenes, tumor suppressors, or both? *Trends Genet*. 2012 Oct;28(10):474–9.
109. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 2000 Oct;9(16):2395–402.
110. Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res*. 2003 May 1;31(9):2305–12.
111. Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seya T. A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003533.
112. Rahman N with Douglas J, Cilliers D, Coleman K, Tatton-Brown K, Barker K, Bernhard B, et al., Childhood Overgrowth Collaboration. Mutations in RNF135, a gene within the NF1 microdeletion region, cause phenotypic abnormalities including overgrowth. *Nat Genet*. 2007 Aug;39(8):963–5.
113. Ladd AN, Nguyen NH, Malhotra K, Cooper TA. CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing. *J Biol Chem*. 2004 Apr 23;279(17):17756–64.
114. Dougherty JD, Maloney SE, Wozniak DF, Rieger MA, Sonnenblick L, Coppola G, et al. The disruption of Celf6, a gene identified by translational profiling of serotonergic neurons, results in autism-related behaviors. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2013 Feb 13;33(7):2732–53.
115. Brevet US20140358448 - Computer readable medium for enabling a computer to carry out provision of ... - Google Brevets [Internet]. [cited 2016 Feb 22]. Available from: <http://www.google.com/patents/US20140358448>
116. González-Masiá JA, García-Olmo D, García-Olmo DC. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. *OncoTargets Ther*. 2013;6:819–32.
117. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—A survey. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2007 Jan;1775(1):181–232.
118. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *Comptes Rendus Séances Société Biol Ses Fil*. 1948 Feb;142(3-4):241–3.
119. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The Occurrence of Single-Stranded DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Other Diseases. *J Clin Invest*. 1973 Jan;52(1):198–204.
120. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977 Mar;37(3):646–50.
121. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*. 1998 Jul;17(1):89–97.
122. Lo YMD, Chan KCA, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FMF, et al. Maternal plasma

- DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med.* 2010 Dec 8;2(61):61ra91.
123. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell.* 2016 Jan 14;164(1-2):57–68.
124. Schep A, Buenrostro JD, Denny SK, Schwartz K, Sherlock G, Greenleaf WJ. Structured nucleosome fingerprints enable high-resolution mapping of chromatin architecture within regulatory regions. *bioRxiv.* 2015 Mar 17;016642.
125. Wu T-L, Zhang D, Chia J-H, Tsao K, Sun C-F, Wu JT. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2002 Jul;321(1-2):77–87.
126. Anker P, Stroun M. Circulating DNA in plasma or serum. *Medicina (Mex).* 2000;60(5 Pt 2):699–702.
127. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999 Jan;64(1):218–24.
128. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 8;102(45):16368–73.
129. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 1994 Feb;3(1):67–71.
130. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1994 Apr;86(4):774–9.
131. Gonzalez R, Silva JM, Sanchez A, Dominguez G, Garcia JM, Chen XQ, et al. Microsatellite alterations and TP53 mutations in plasma DNA of small-cell lung cancer patients: follow-up study and prognostic significance. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2000 Sep;11(9):1097–104.
132. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology.* 1989;46(5):318–22.
133. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(1):65–73.
134. Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res.* 2001 Jun 15;61(12):4675–8.
135. Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids – A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett.* 2007 Mar 6;581(5):795–9.
136. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* 1999 Jan 1;59(1):67–70.
137. Brock G, Castellanos-Rizaldos E, Hu L, Coticchia C, Skog J. Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring. *Transl Cancer Res.* 2015 Jun 18;4(3):280–90.
138. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 2011 Jun;11(6):426–37.
139. Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous extracellular synthesis of DNA released by human blood lymphocytes. *Cancer Res.* 1976 Aug;36(8):2832–9.
140. Rodríguez M, Silva J, Herrera A, Herrera M, Peña C, Martín P, et al. Exosomes enriched in stemness/metastatic-related mRNAs promote oncogenic potential in breast cancer. *Oncotarget.* 2015 Oct 26;
141. Hibi K, Taguchi M, Nakayama H, Takase T, Kasai Y, Ito K, et al. Molecular detection

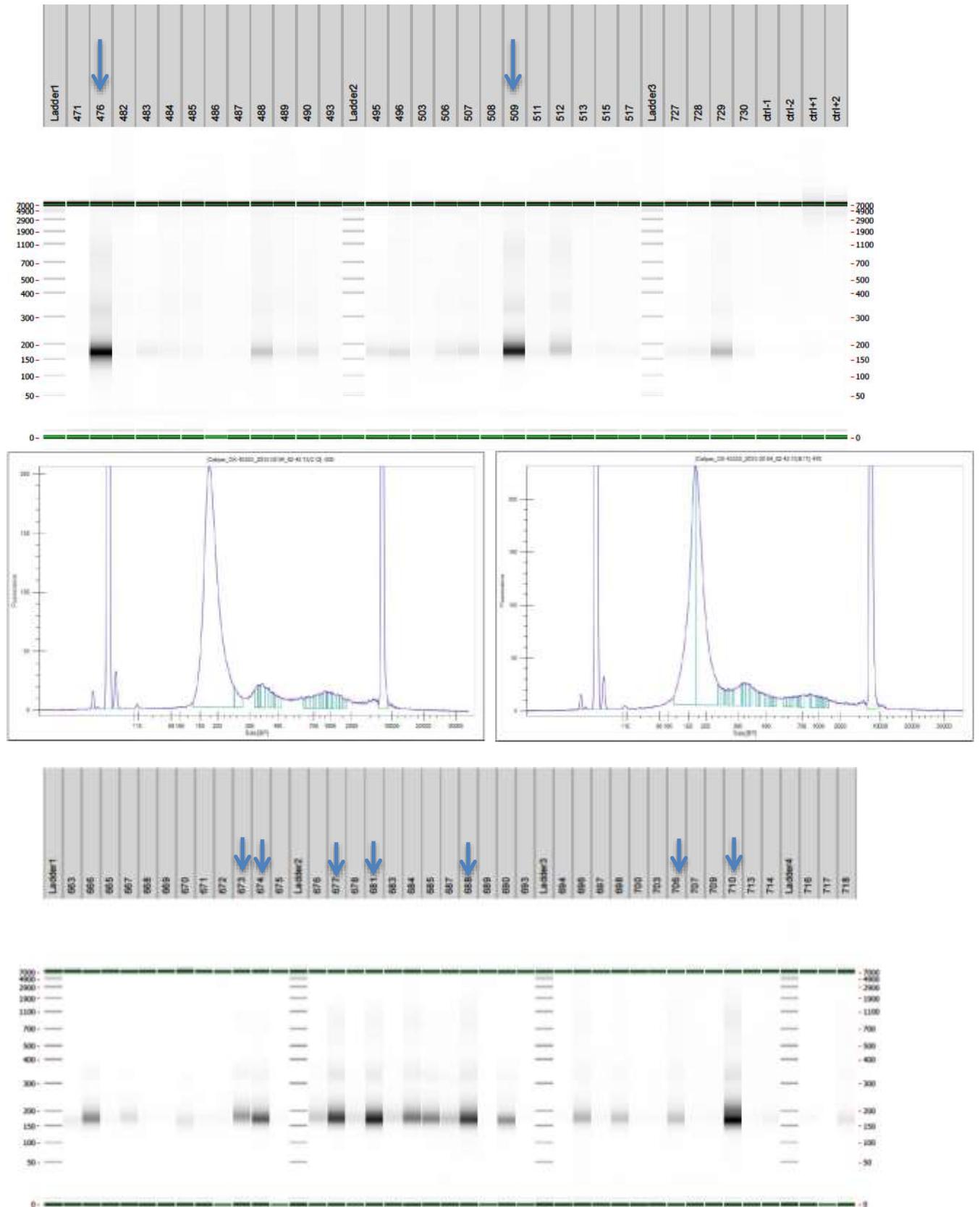
- of p16 promoter methylation in the serum of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2001 Oct;7(10):3135–8.
142. Koproški MS, Benko FA, Kwee C, Leitzel KE, Eskander E, Lipton A, et al. Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1997;76(10):1293–9.
143. Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, Jerónimo C, Harden S, Engles J, et al. Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer. *Cancer Res.* 2002 Jan 15;62(2):371–5.
144. Paci M, Maramotti S, Bellesia E, Formisano D, Albertazzi L, Ricchetti T, et al. Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth.* 2009 Apr;64(1):92–7.
145. Ren N, Ye Q-H, Qin L-X, Zhang B-H, Liu Y-K, Tang Z-Y. Circulating DNA level is negatively associated with the long-term survival of hepatocellular carcinoma patients. *World J Gastroenterol.* 2006 Jun 28;12(24):3911–4.
146. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res.* 2007 Jun;635(2-3):105–17.
147. Pang J-Z, Qin L-X, Ren N, Hei Z-Y, Ye Q-H, Jia W-D, et al. Loss of heterozygosity at D8S298 is a predictor for long-term survival of patients with tumor-node-metastasis stage I of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2007 Dec 15;13(24):7363–9.
148. Pang J, Qin L, Ren N, Ye Q, Ying W, Liu Y, et al. [Microsatellite alterations of circulating DNA in the plasma of patients with hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2006 Jun 27;86(24):1662–5.
149. Norton SE, Luna KK, Lechner JM, Qin J, Fernando MR. A New Blood Collection Device Minimizes Cellular DNA Release During Sample Storage and Shipping When Compared to a Standard Device. *J Clin Lab Anal.* 2013 Jul;27(4):305–11.
150. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion (Paris).* 2001 Feb;41(2):276–82.
151. Taback B, O’Day SJ, Hoon DSB. Quantification of circulating DNA in the plasma and serum of cancer patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Jun;1022:17–24.
152. Vallée A, Marcq M, Bizieux A, Kouri CE, Lacroix H, Bennouna J, et al. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer.* 2013 Nov 1;82(2):373–4.
153. Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DSB. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Sep;1075:299–307.
154. Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem.* 2003 Jun;49(6 Pt 1):1028–9.
155. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. 1869; *Aus Med J.* 1869;14:146–9.
156. Mavroudis D. Circulating cancer cells. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2010 Oct;21 Suppl 7:vii95–100.
157. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer.* 2014 Sep;14(9):623–31.
158. Kenneth R. Liquid Biopsy: An Emerging Market for Radically Improved Cancer Management. *Insight Pharma Reports;* 2015 May.
159. HepG2 (liver hepatocellular carcinoma): cell culture and transfection protocol [Internet]. [cited 2015 May 31]. Available from: <http://www.hepg2.com/>
160. Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. *Nat Protoc.* 2006 décembre;1(5):2353–64.

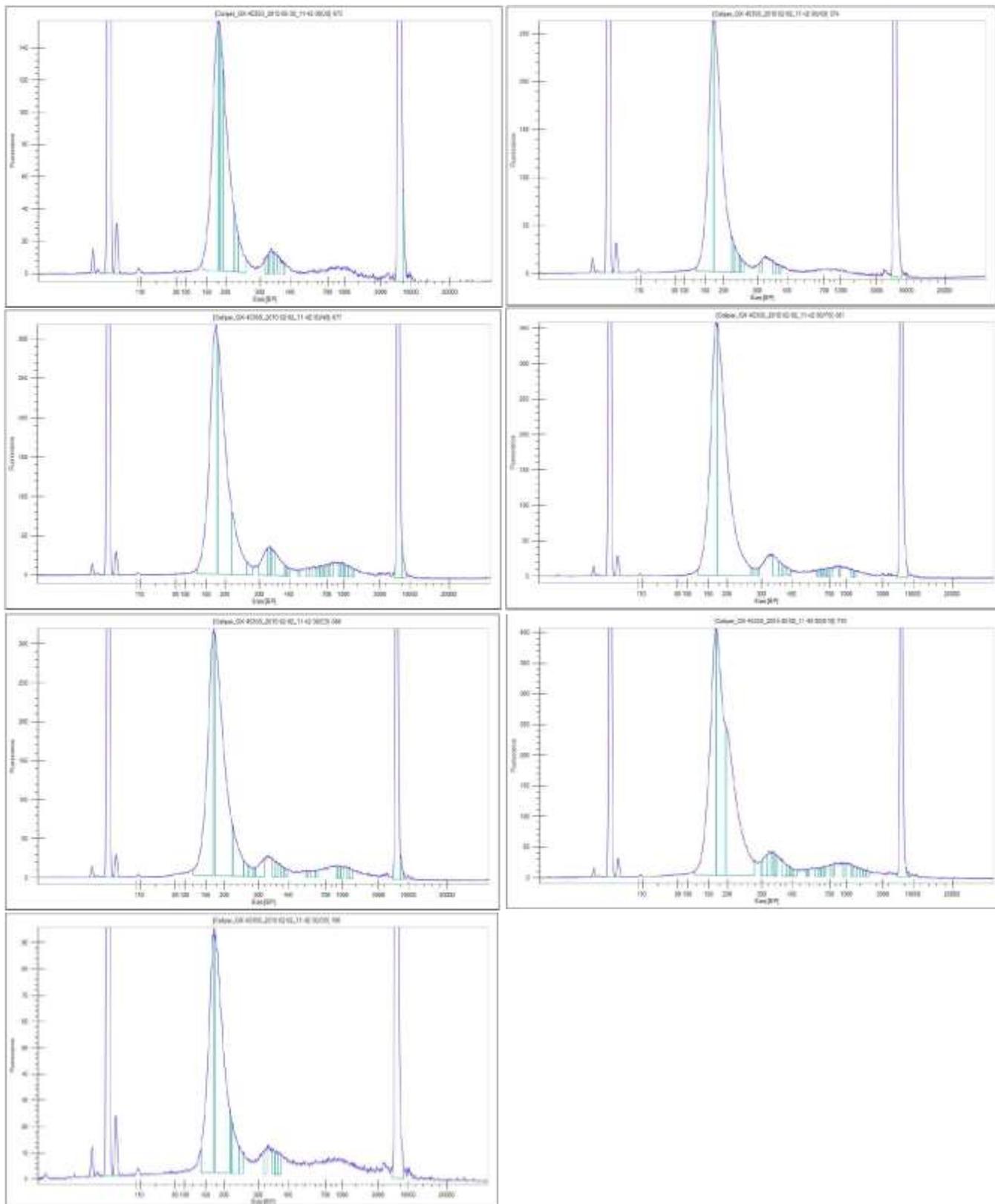
161. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31–46.
162. Balasubramanian S, Barnes C, Liu X, Swerdlow H. Labelled nucleotides. US7427673 B2, 2008.
163. Tornesello ML, Buonaguro L, Tatangelo F, Botti G, Izzo F, Buonaguro FM. Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Genomics.* 2013 Aug;102(2):74–83.
164. Nault JC, Calderaro J, Di Tommaso L, Balabaud C, Zafrani ES, Bioulac-Sage P, 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* Baltim Md. 2014 Dec;60(6):1983–92.
165. Pinyol R, Tovar V, Llovet JM. TERT promoter mutations: Gatekeeper and driver of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2014 Sep;61(3):685–7.
166. Nagae G. Computer readable medium for enabling a computer to carry out provision of information on hepatocellular carcinoma and marker and kit for obtaining information on hepatocellular carcinoma. US20140358448 A1, 2014.
167. De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, Won HH, Ng CKY, Nuciforo P, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2014 Sep;25(9):1729–35.
168. Hosny G, Farahat N, Tayel H, Hainaut P. Ser-249 TP53 and CTNNB1 mutations in circulating free DNA of Egyptian patients with hepatocellular carcinoma versus chronic liver diseases. *Cancer Lett.* 2008 Jun 18;264(2):201–8.
169. Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L, Carpentier C, Labussière M, Lesimple T, et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer.* 2012 Sep 1;118(17):4201–11.
170. Bastian PJ, Palapattu GS, Lin X, Yegnasubramanian S, Mangold LA, Trock B, et al. Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and the risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2005 Jun 1;11(11):4037–43.
171. Shen J, Wang S, Zhang Y-J, Wu H-C, Kibriya MG, Jasmine F, et al. Exploring genome-wide DNA methylation profiles altered in hepatocellular carcinoma using Infinium HumanMethylation 450 BeadChips. *Epigenetics.* 2013 Jan;8(1):34–43.
172. Shen J, Wang S, Zhang Y-J, Kappil M, Wu H-C, Kibriya MG, et al. Genome-wide DNA methylation profiles in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2012 Jun 1;55(6):1799–808.
173. Pezza JA, Kucera R, Sun L. Polymerase Fidelity: What is it, and what does it mean for your PCR?
174. Vallée A, Denis MG. Apports potentiels de l'ADN circulant pour la prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules. *Corresp En Onco-Théranostic.* 2013 décembre;(4).
175. Makarov V. Sequencing the 5th base of DNA, 5-methylcytosine. Swift Biosciences; 2015.
176. Schaffer A. Nanopore Sequencing. MIT Technology Review.
177. DNA: nanopore sequencing - Applications - Oxford Nanopore Technologies.
178. Wetterstrand K. DNA Sequencing Costs : Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP. National Human Genome Research Institute, NIH; 2016 Jan.

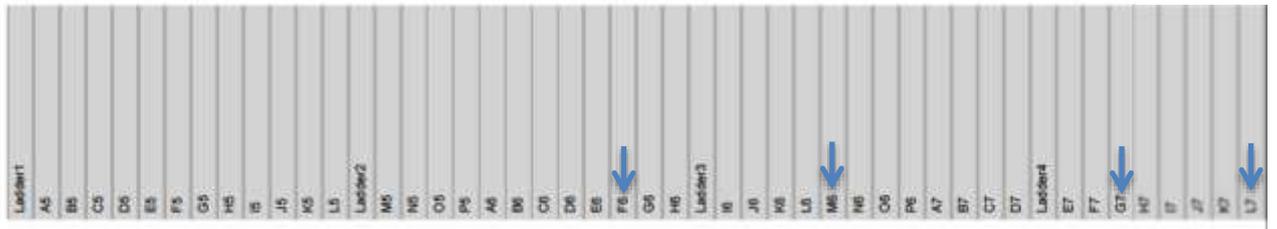
ANNEXE

A. Qualification post-extraction d'ADN circulant des 14 échantillons de patients

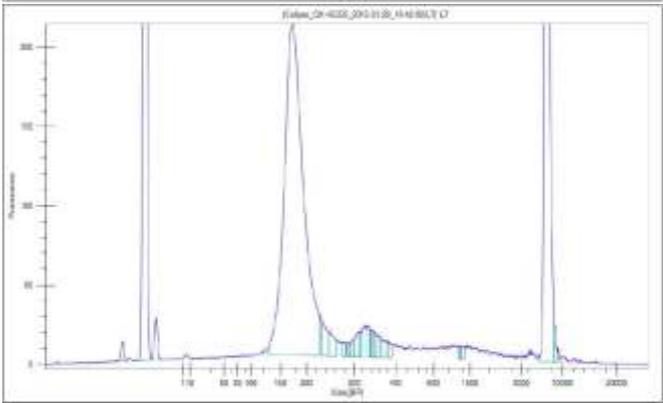
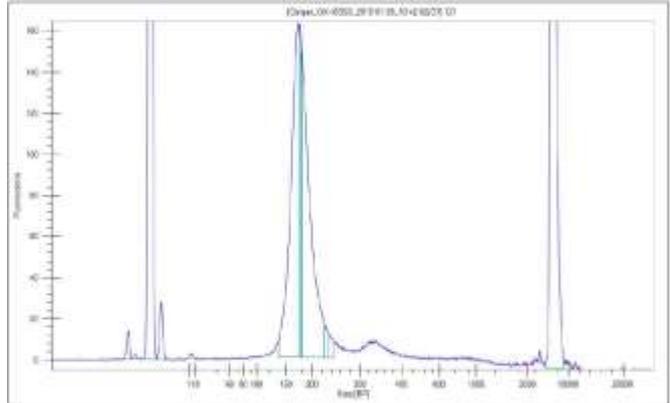
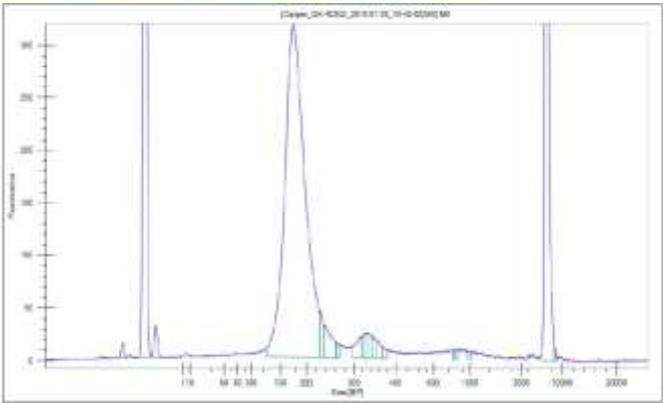
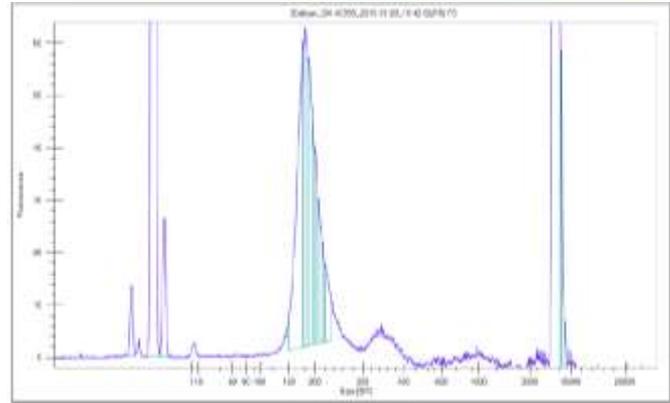
Résultats obtenus avec Caliper HT DNA High Sensitivity LapChip®.







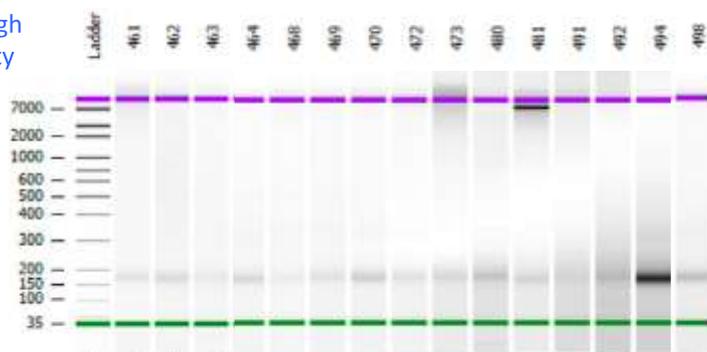
590 607 643 662



B. Choix de la méthode de quantification des échantillons

Les autres candidats étaient : Agilent 2100 Bioanalyzer® et Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System®.

Bioanalyzer
Agilent® 2100
expert High
Sensitivity
DNA



Agilent High
Sensitivity
D1000
ScreenTape
System

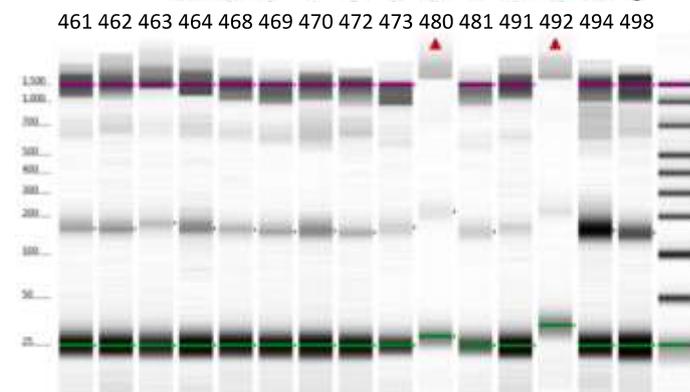
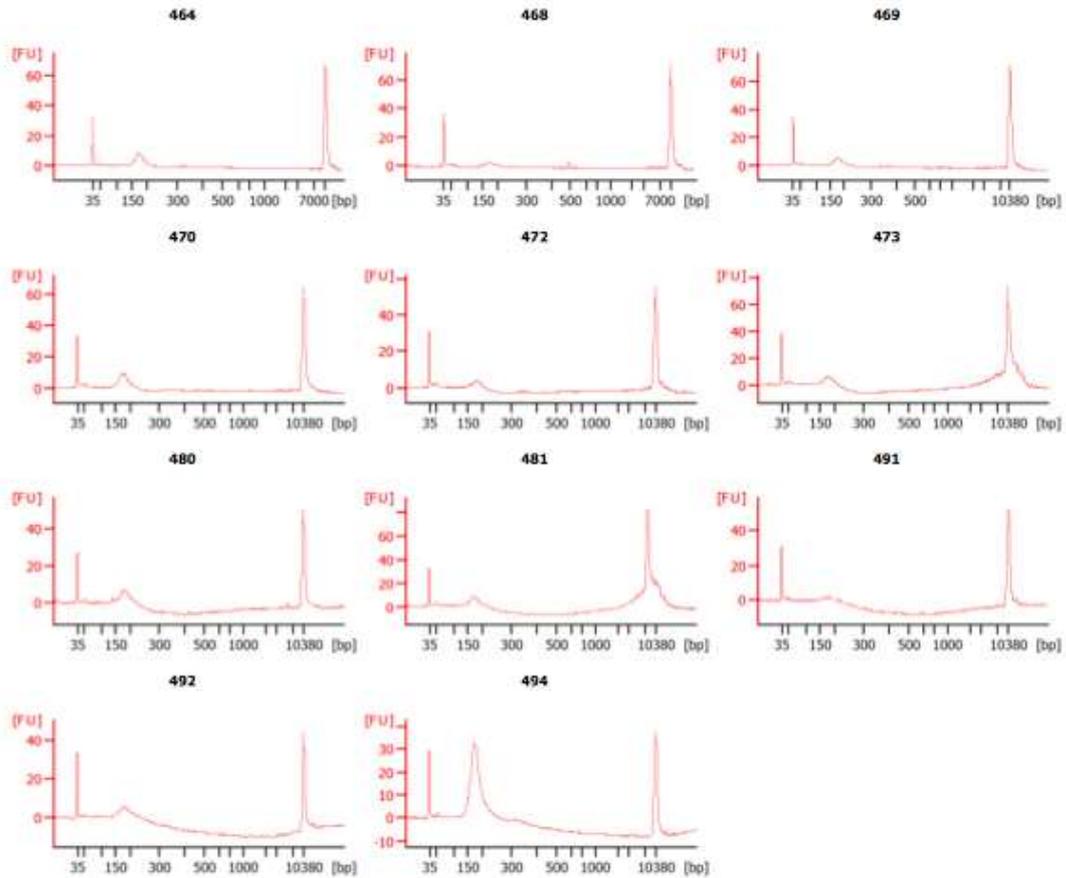


Figure n°? Exemple d'électrophorèse obtenue avec les deux méthodes non sélectionnés.

Bioanalyzer Agilent® 2100 expert High
Sensitivity DNA



HighSensitivityD1000ScreenTape®

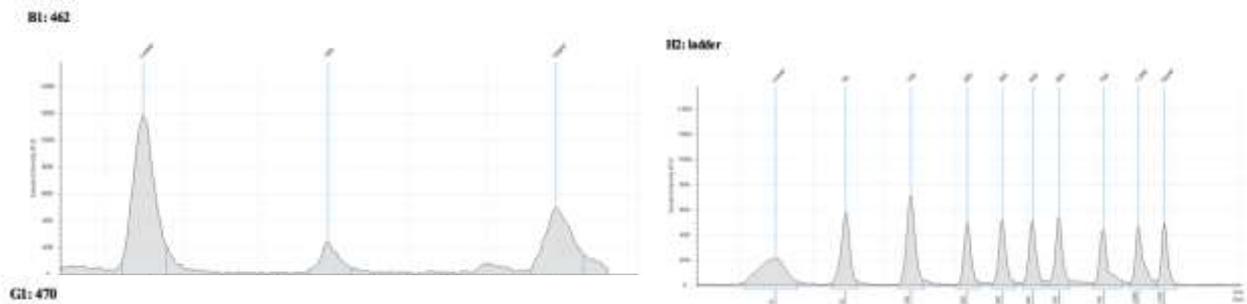
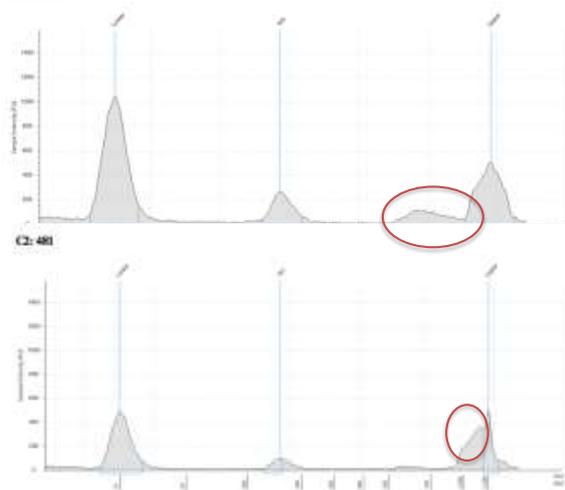


Figure n° ? Exemple de graphiques résultants de la mesure de la taille des fragments d'ADN circulant extraits par les deux méthodes non sélectionnées.



Traces d'ADN génomique

Figure n° ? Exemple d'extraction non optimale

Ces artéfacts sont en réalité de l'ADN génomique issue de leucocytes contaminant l'ADN circulant de nos échantillons.