

UNIVERSITE PARIS VII – DENIS DIDEROT

MAGISTERE DE GENETIQUE
MASTER 2 DE SCIENCES, SANTE ET APPLICATIONS
MENTION GENETIQUE

Année Universitaire 2005-2006

**Caractérisation transcriptomique des hyperplasies nodulaires
focales télangiectasiques et adénomes hépatocellulaires
inflammatoires**

Mémoire présenté par
Cristel THOMAS

Inserm U674 "Génétique Fonctionnelle des Tumeurs Solides"
27, rue Juliette Dodu
75010 Paris
Directeur : Marco GIOVANNINI

Responsable scientifique :
Dr. Jessica ZUCMAN-ROSSI
zucman@cephb.fr

RESUME

Récemment une classification des adénomes hépatocellulaires a été proposée par le laboratoire, basée sur l'étude des corrélations génotype-phénotype de ces lésions. Quatre types d'adénomes hépatocellulaires ont ainsi été définis : les lésions pour lesquelles le gène codant le facteur de transcription HNF1 α est inactivé de manière bi-allélique, celles pour lesquelles une activation de la voie WNT/ β -caténine est observée, et enfin les deux derniers groupes étant différenciés selon la présence ou non d'infiltrats inflammatoires. Les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques, un autre type de tumeurs bénignes hépatiques, sont actuellement classées avec les hyperplasies nodulaires focales typiques. Cependant, des études récentes ont montré que les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques partageaient des caractéristiques des adénomes inflammatoires, notamment sur les plans pathologique et moléculaire. La place des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques dans la classification des tumeurs hépatiques bénignes est d'un intérêt majeur pour la prise en charge thérapeutique des patients, car celle-ci diffère radicalement entre les adénomes inflammatoires et les hyperplasies nodulaires focales typiques.

Les objectifs de cette étude ont été (1) de définir plus clairement la relation entre hyperplasie nodulaire focale télangiectasique et adénomes hépatocellulaires inflammatoires et (2) de chercher à identifier les voies de carcinogenèse altérées dans ces deux types de tumeurs. La comparaison des profils d'expression entre hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et foies non tumoraux a permis d'identifier une dérégulation de gènes impliqués dans l'inflammation. Les niveaux d'expression d'une partie de ces gènes ont été validés dans un groupe d'hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et testés dans un groupe d'adénomes inflammatoires par RT-PCR quantitative. Ces résultats de validation ont confirmé les données du transcriptome. Ils ont également permis de mettre en évidence un profil de dérégulation similaire entre hyperplasie nodulaire focale télangiectasique et adénomes inflammatoires et ont suggéré l'existence d'altérations des voies interférons/NF- κ B dans certaines des tumeurs. Parmi ces gènes, une sur-expression spécifique de gènes de la réponse inflammatoire aiguë est retrouvée de manière constante au sein de ces deux types de tumeurs. De plus, l'analyse immunohistochimique d'une protéine de la phase aiguë (SAA) suggère que l'altération des voies inflammatoires est constitutive et spécifique des hépatocytes tumoraux. Dans le but de mieux caractériser les voies de carcinogenèse impliquées dans le développement tumoral des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et des adénomes inflammatoires, nous avons également vérifié l'expression protéique de certains interacteurs de la voie de transduction du signal JAK/STAT, voie de signalisation majeure dans les processus inflammatoires. Cette étude a révélé une activation de cette voie dans la majorité des tumeurs de la série testée, mais aucune altération génétique n'a pu encore être associée à ces dérégulations.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus confirme que les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et les adénomes inflammatoires appartiennent à la même entité tumorale, et indique d'une part une sur-expression spécifique des gènes de la phase inflammatoire aiguë dans toutes ces lésions, et d'autre part l'activation dans certaines d'entre elles des voies interférons/NF- κ B. Enfin, une activation de la voie JAK/STAT a été identifiée dans la plupart des tumeurs testées.

ABSTRACT

Recently, our lab proposed a classification of hepatocellular adenomas, based on genotype-phenotype correlations, that defines four groups of hepatocellular adenomas. Bi-allelic mutations of the gene encoding the transcription factor HNF1 α determine a first homogeneous subgroup of tumors. Activation of the WNT/ β -catenin pathway is found in all the tumors of the second subgroup. The last two subgroups are differentiated by the presence or absence of inflammatory infiltrates at the tumor site. Telangiectatic focal nodular hyperplasias have been until now classified amongst typical focal nodular hyperplasias. However, recent studies have shown that telangiectatic focal nodular hyperplasia shared homologies with inflammatory hepatocellular adenomas, especially from a pathological and a molecular point of view. The accuracy of the classification of benign liver tumors is of the utter importance, because of the fundamental difference between focal nodular hyperplasias and hepatocellular adenomas follow-ups.

To identify the carcinogenetic pathway involved in the development of telangiectatic focal nodular hyperplasias and inflammatory adenomas, we carried out a transcriptomic analysis of these tumors. Gene expression profiles revealed a dysregulation of genes involved in the acute phase response, specific of these tumors, that was confirmed using immunohistochemistry, and quantitative RT-PCR on a large set of different benign liver tumors. The validation of gene expression on a subset of genes involved in various inflammatory pathways supported the similarity of the dysregulation profiles of telangiectatic focal nodular hyperplasias and inflammatory hepatocellular adenomas, and suggested an alteration of the interferon/ $\text{NF-}\kappa\text{B}$ pathways in a subset of tumors. To further characterize the carcinogenetic processes involved in the development of these tumors, we also assessed the expression at the protein level of some of the mediators of the JAK/STAT signaling pathway, involved in the inflammatory signal transduction. This study showed that this pathway is activated in most telangiectatic focal nodular hyperplasias and inflammatory adenomas, even though no genetic alterations have been correlated to these dysregulations yet.

Altogether, these results confirm that telangiectatic focal nodular hyperplasias and inflammatory hepatocellular adenomas belong to the same tumoral entity, characterized by a specific overexpression of the acute phase response genes. Moreover, they prove that the JAK/STAT pathway is often activated, as well as the interferon/ $\text{NF-}\kappa\text{B}$ pathways in a subset of tumors.

SOMMAIRE

RESUME	2
ABSTRACT	3
INTRODUCTION	5
1. CARACTERISTIQUES DES ADENOMES HEPATOCELLULAIRES	5
2. DEFINITION DES HYPERPLASIES NODULAIRES FOCALES TYPIQUES	7
3. CAS PARTICULIER DES HYPERPLASIES NODULAIRES FOCALES TELANGIECTASIQUES	8
MATERIEL ET METHODES	10
I. PATIENTS ET TUMEURS	10
II. METHODES	10
1. EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE	10
2. EXTRACTION DES ARN TOTAUX	10
3. EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES	11
4. EXTRACTION DES PROTEINES NUCLEAIRES	11
5. CRIBLAGE DES MUTATIONS	11
6. ANALYSE DU TRANSCRIPTOME / METHODES STATISTIQUES	12
7. VALIDATION DES RESULTATS PAR RT-PCR QUANTITATIVE	12
8. WESTERN BLOT	14
RESULTATS	15
I. HYPERPLASIES NODULAIRES FOCALES TELANGIECTASIQUES ET ADENOMES INFLAMMATOIRES	15
1. ANALYSE DU TRANSCRIPTOME	15
2. ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE	15
3. VALIDATION DE L'EXPRESSION DES GENES	16
4. ANALYSE DES PROMOTEURS	21
II. VOIE JAK/STAT	23
1. ANALYSE PROTEIQUE	23
2. RECHERCHE D'ALTERATION GENETIQUES	26
DISCUSSION	28
REMERCIEMENTS	33
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	34

INTRODUCTION

Les tumeurs bénignes hépatiques peuvent être divisées en deux groupes principaux : les adénomes hépatocellulaires (AHC) et les hyperplasies nodulaires focales typiques (HNF).

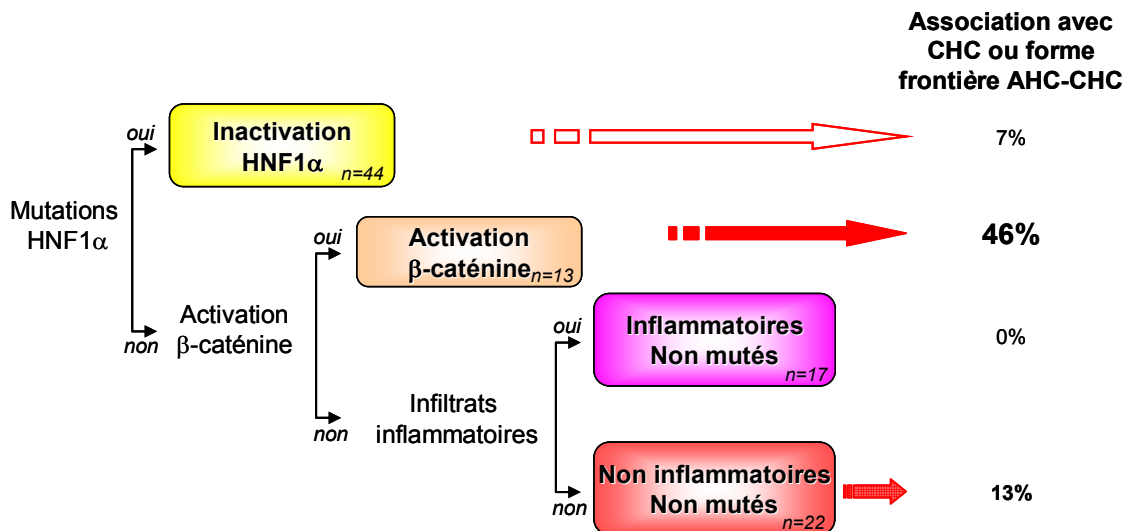
Les voies de carcinogenèse altérées dans les tumeurs hépatiques bénignes sont encore mal connues. Jusqu'à présent, seul un gène suppresseur de tumeur, *TCF1* codant le facteur de transcription HNF1 α (Hepatocyte Nuclear Factor 1 α), et un oncogène, *CTNNB1* codant la β -caténine, ont été identifiés comme altérés dans les adénomes hépatocellulaires. Récemment, nous avons montré dans le laboratoire que les altérations génétiques étaient étroitement liées au phénotype des adénomes. Cependant, il existe plusieurs sous-groupes de tumeurs bénignes hépatiques pour lesquelles aucune altération génétique n'est connue et dont les voies de carcinogenèse restent à identifier.

1. Caractéristiques des adénomes hépatocellulaires

Les adénomes hépatocellulaires sont des tumeurs rares, dont l'incidence est estimée dans la population générale à 1 cas pour 100 000 habitants^{1, 2}. Dans 90% des cas, ces tumeurs sont observées chez la femme adulte, et leur émergence est fortement corrélée à la prise de contraceptifs oraux^{1, 3, 4}. Les adénomes hépatocellulaires sont le plus fréquemment constitués d'un nodule isolé. Cependant, dans 20 à 30% des cas, ces tumeurs se présentent sous une forme multiple où deux à six nodules sont observés. Plus rarement, la présence de plus d'une dizaine de nodules définit une adénomatoze hépatique, entité anatomo-clinique qui semble survenir avec une fréquence équivalente dans les deux sexes, sans association avec la prise de contraceptifs⁵. Macroscopiquement, les adénomes hépatocellulaires forment le plus souvent une masse arrondie, richement vascularisée, de 3 à 15 cm de diamètre. Ces lésions se présentent sous la forme d'une prolifération bénigne d'hépatocytes, avec parfois une surcharge en glycogène ou en lipides (stéatose), habituellement dans un foie par ailleurs normal, en particulier indemne de lésion cirrhotique ou d'hépatite chronique active⁶. Des zones de nécrose et/ou d'hémorragie sont fréquemment observées dans les adénomes, et peuvent être à l'origine de complications graves, dont la principale est une rupture hémorragique de la tumeur⁶. Par ailleurs, la transformation maligne de l'adénome en carcinome hépatocellulaire est rarement observée^{7, 8}.

Plusieurs altérations génétiques ont été identifiées dans les adénomes hépatocellulaires. Le caractère monoclonal de la prolifération hépatocytaire est retrouvé de manière constante par l'étude de l'inactivation préférentielle du chromosome X^{9 10}. D'autre part, nous avons identifié dans le laboratoire des mutations inactivatrices d'HNF1 α , dans environ 50% des cas d'adénomes, et proposé le gène codant ce facteur de transcription comme gène suppresseur de tumeur. Enfin, la voie de la β -caténine est activée dans environ 15% des cas d'adénomes hépatocellulaires par des mutations activatrices de la protéine qui sont soit des substitutions soit des petites délétions de l'exon 3¹¹⁻¹³.

Récemment une classification des adénomes hépatocellulaires, basée sur l'étude de 96 tumeurs du foie a été proposée par le laboratoire¹². Cette classification a été établie à partir de l'étude des corrélations génotype-phénotype, et divise les adénomes hépatocellulaires en quatre catégories, présentées dans la figure 1.



D'après Zucman-Rossi et al., 2006

Figure 1 – Représentation schématique de la classification des adénomes hépatocellulaires. La fréquence des adénomes associés avec un hépatocarcinome (CHC), ou des lésions dont le diagnostic est considéré comme ambigu entre adénome et carcinome hépatocellulaire (AHC-CHC) est indiquée sur la droite de chaque groupe de tumeurs.

Les lésions avec des mutations bi-alléliques du gène codant le facteur de transcription HNF1 α sont stéatosiques, et présentent exceptionnellement des anomalies cytologiques ou des infiltrats inflammatoires. Ce type de lésion est essentiellement retrouvé chez les femmes, et la transformation maligne de ces adénomes est un évènement exceptionnel.

Parmi les autres tumeurs de la série étudiée, celles présentant une activation de la voie β -caténine sont également associées à un phénotype spécifique. Ces lésions sont

exceptionnellement stéatosiques, mais présentent fréquemment des anomalies cytologiques et des formations pseudo-glandulaires. De plus, la proportion d'hommes présentant ces tumeurs est plus importante que pour les autres types d'adénomes. Enfin, ces lésions sont associées dans 46% des cas à un diagnostic de carcinome hépatocellulaire, suggérant une capacité de transformation maligne élevée de ce sous-groupe d'adénomes.

Les tumeurs sans mutation d'HNF1 α ni de la β -caténine ont été séparées en deux sous-groupes selon la présence ou non d'infiltrats inflammatoires. Les adénomes de phénotype inflammatoire présentent de manière générale une réaction ductulaire importante. Les vaisseaux sont fréquemment dystrophiques et plus nombreux. De plus, certaines de ces lésions sont comparables morphologiquement aux hyperplasies nodulaires focales dites télangiectasiques (Cf paragraphe 3.). Aucune altération génétique n'a encore été identifiée dans ce type de lésion, appelé "adénomes inflammatoires". Parmi ces adénomes inflammatoires, aucun cas d'association à un carcinome hépatocellulaire n'a été observé.

Les tumeurs ne répondant à aucun des critères précédemment cités ont été regroupées dans la dernière catégorie d'adénomes hépatocellulaires.

2. Définition des hyperplasies nodulaires focales typiques

Les hyperplasies nodulaires focales typiques du foie sont généralement considérées comme une prolifération hépatocytaire réactionnelle à une lésion hépatique de type malformation vasculaire. Elles sont le plus souvent découvertes de manière fortuite et ne demandent pas de traitement particulier¹⁴. Ce type de tumeur est observé principalement chez la femme adulte. Il ne semble pas y avoir de lien clairement établi entre la taille ou le nombre de nodule et la prise d'œstro-progestatifs¹⁵, bien que l'émergence de la tumeur semble corrélée avec la prise de contraceptifs oraux¹⁰. Cependant, aucune étude épidémiologique n'a confirmé cette observation.

Ce type de tumeur est typiquement constitué d'un nodule ferme, caractérisé par une cicatrice fibreuse en position centrale d'où irradiant des travées fibreuses séparant des nodules hépatocytaires, conférant à la tumeur un aspect pseudo-cirrhotique⁶. Ces lésions sont rarement associées à une hémorragie ou à un phénomène de nécrose, et il semble qu'elles ne donnent jamais lieu à une transformation maligne⁹. Elles sont solitaires dans deux tiers des cas, et les cas de récurrence semblent extrêmement rares^{16, 17}. Différentes études ont montré que les

hyperplasies nodulaires focales étaient généralement polyclonales^{9, 10, 18, 19}, et aucune altération génétique spécifique n'a, à ce jour, été associée à ce type de tumeur.

3. Cas particulier des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques

Les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques (HNFT) ont historiquement été classées comme hyperplasies nodulaires focales du fait de leur caractère multifocal^{16, 20, 21}. Ce syndrome est en général associé à une ou plusieurs autres lésions, par exemple des dysplasies artérielles, un défaut du système nerveux central, des malformations vasculaires, des méningiomes ou des astrocytomes²⁰. Cependant, les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques ne forment pas une entité clairement définie. Morphologiquement, ces lésions sont formées d'un nodule relativement fragile, ne présentant pas l'étoile fibreuse caractéristique des hyperplasies nodulaires focales. De plus, comme les hyperplasies nodulaires focales typiques, elles sont caractérisées par des malformations vasculaires importantes^{14, 20, 22, 23}. Cependant, comme les adénomes hépatocellulaires, et contrairement aux hyperplasies nodulaires focales typiques, elles sont fréquemment sujettes aux hémorragies¹⁰. Elles présentent également une dilatation sinusoïdale, caractéristique typique des adénomes hépatocellulaires¹⁰. Ces lésions sont majoritairement retrouvées chez la femme adulte, et leur développement pourrait être associé à la prise de contraceptifs oraux¹⁰, bien qu'à ce jour aucune étude épidémiologique n'ait confirmé cette observation.

Récemment, une étude proposée par le laboratoire a défini les caractéristiques cliniques, morphologiques et moléculaires connues des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques¹⁰. L'analyse de la clonalité par l'étude de l'inactivation préférentielle du chromosome X ainsi qu'un allélotypage réalisé sur l'ensemble du génome a confirmé le caractère monoclonal de la prolifération tumorale dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques, caractère commun avec les adénomes hépatocellulaire. Par ailleurs, aucune inactivation d'HNF1 α n'a été identifiée parmi les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques étudiées. Enfin, le rapport des transcrits des gènes *ANGPT1* et *ANGPT2* qui est spécifiquement élevé dans les hyperplasies nodulaires focales typiques²⁴, s'est révélé normal dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques comme dans les adénomes hépatocellulaires.

Globalement, l'ensemble des données sur les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques suggère fortement que ce type de lésion serait plus proche sur les plans clinique, histologique

et moléculaire des adénomes hépatocellulaires, et plus particulièrement des adénomes avec infiltrats inflammatoires¹². La définition correcte de la place de cette entité "hyperplasie nodulaire focale télangiectasique" dans la classification des tumeurs bénignes hépatiques est indispensable, car la prise en charge thérapeutique des patients dépend du type de tumeurs observées.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail a été d'étudier les altérations moléculaires des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et des adénomes inflammatoires avec deux objectifs principaux : (1) définir plus clairement la relation entre hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et adénomes hépatocellulaires inflammatoires et (2) chercher à identifier les voies de carcinogenèse altérées dans les adénomes hépatocellulaires inflammatoires et les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques. Pour cela, j'ai utilisé une méthode d'analyse globale des altérations du transcriptome de ces tumeurs comparées à des tissus hépatiques non tumoraux dans un petit nombre d'échantillons. La dérégulation de l'expression de gènes sélectionnés a ensuite été validée par RT-PCR quantitative et au niveau protéique dans une série plus large de tissus. Enfin, j'ai cherché dans les tumeurs des mutations des gènes codant les protéines de la voie JAK/STAT, pouvant éventuellement expliquer les phénotypes tumoraux.

MATERIEL ET METHODES

I. Patients et tumeurs

Les différentes analyses ont été effectuées à partir d'une série de 62 prélèvements tumoraux et non tumoraux, prélevés chez 51 patients. Au total, cette série comporte 6 adénomes hépatocellulaires mutés pour le gène *TCF1*, codant HNF1 α ; 6 adénomes hépatocellulaires mutés pour le gène *CTNBI*, codant la β -caténine; 7 hyperplasies nodulaires focales typiques; 10 hyperplasies nodulaires focales t \acute{e} langiectasiques et 9 adénomes hépatocellulaires inflammatoires.

Pour chaque individu, un fragment de tumeur et de foie non tumoral ont été immédiatement congelés et stockés à -80°C après hépatectomie. Le consentement des patients a été obtenu dans le cadre de cette étude.

II. Méthodes

1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait à partir des tissus hépatiques congelés tumoraux et non tumoraux. Pour chaque échantillon, un fragment d'environ 3 mm³ a été prélevé en vapeur d'azote. La lyse des cellules et noyaux a été réalisée sur la nuit à 55°C, sous agitation lente, avec 710 μ l d'une solution de lyse (Tris 10 mM pH 7,6 ; NaCl 51 mM ; EDTA 10 mM pH 8 ; SDS 0,2%) et 50 μ g de protéinase K (Merck). Les ARN ont ensuite été lysés à température ambiante par ajout de 100 μ g de RNase A et les protéines ont été précipitées à froid en ajoutant 430 μ l de NaCl 5 M. Après une étape de centrifugation à 13 000 rpm (centrifugeuse Jouan) à 4°C, l'ADN contenu dans le surnageant a été précipité par 900 μ l d'isopropanol, puis culotté par centrifugation 15 min à 13 000 rpm. Le culot d'ADN a ensuite été lavé deux fois par de l'éthanol 70% avant d'être re-suspendu sur roue pendant au moins 24 h dans un volume final de 400 μ l de tampon TE 10.1 (Tris 10 mM ; EDTA 1 mM). Après re-suspension complète, 4 μ l d'ADN pour chaque échantillon ont été quantifiés grâce à un fluoroskan (Labsystems) en plaque de 96 puits en utilisant comme intercalant de l'ADN le Hoechst 33258, à une concentration finale de 2,5 mg/ml et par rapport à une gamme de dilution d'ADN de référence.

2. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à partir des tissus hépatiques congelés tumoraux et non tumoraux en utilisant le Rneasy[®] Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), conformément au protocole fourni par le fabricant, et dans des conditions nécessaires à la prévention de la dégradation accidentelle des ARN par les RNases contaminantes. Brièvement, pour chaque échantillon, un fragment d'environ 3 mm³ a été prélevé en vapeur d'azote. La lyse et l'homogénéisation complète du tissu ont été réalisées au moyen d'un Mixer Mill MM 300[®] (Qiagen) par deux cycles d'agitation de deux minutes à 20 Hz en présence d'une bille d'acier et d'un tampon de lyse contenant du β -2 mercaptoéthanol et de l'isothiocyanate de guanidine, agent dénaturant des protéines et inhibiteur de RNases. Le lysat contenant les ARN a ensuite été mélangé à de l'éthanol à 70% avant d'être déposé sur une colonne contenant une membrane de silice. Après filtration, les ARN adsorbés sur la membrane ont été rincés successivement trois fois, puis élués dans un volume final de 80 μ l d'eau exempte de RNases. Les ARN ont été quantifiés par mesure de la densité optique à 260 nm.

3. Extraction des protéines totales

Les protéines totales ont été extraites à partir des tissus hépatiques congelés tumoraux et non tumoraux. Pour chaque échantillon, un fragment d'environ 5 mm³ a été prélevé en vapeur d'azote, puis dilacéré à 4°C à l'aide d'un dounce dans 400 µl de tampon de lyse RIPA 1X (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), auquel a été ajouté des inhibiteurs de phosphatases et protéases (PMSF, Phosphatase Inhibitor Cocktail et Orthovanadate de sodium, Santa Cruz Biotechnology), pour prévenir la dégradation des protéines. L'homogénat a ensuite été incubé sur glace pendant 60 min. Une étape de centrifugation de 10 min à 10 000 g a ensuite permis de culotter les débris cellulaires. Cette étape a été réitérée lorsque des débris étaient encore présents dans le surnageant. Ce surnageant, contenant la fraction protéique totale, a été stocké à -80°C. Les extraits protéiques ont été quantifiés grâce au kit BCATM Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, USA)

4. Extraction des protéines nucléaires

La fraction protéique nucléaire a été extraite à partir des tissus hépatiques congelés tumoraux et non tumoraux, en utilisant le kit NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce Biotechnology), conformément aux instructions du fabricant. Brièvement, pour chaque échantillon, un fragment d'environ 5 mm³ a été prélevé en vapeur d'azote, puis dilacéré à 4°C à l'aide d'un dounce dans 400 µl de tampon de lyse CERI, auquel a été ajouté des inhibiteurs de phosphatases et protéases (PMSF, Phosphatase Inhibitor Cocktail et Orthovanadate de sodium, Santa Cruz Biotechnology). L'homogénat a ensuite été incubé sur glace pendant 10 min, avant l'ajout de 22 µl de tampon de lyse CERII. Le lysat a ensuite été incubé sur glace pendant 1 min, puis centrifugé pendant 5 min à 16 000 g. Le surnageant, contenant la fraction protéique cytoplasmique a été récupéré et stocké à -80°C. Le culot, contenant les noyaux cellulaires, a été resuspendu dans 100 µl de tampon de lyse NER, puis incubé sur glace pendant 40 min. Une centrifugation de 10 min à 16 000 g a ensuite permis de culotter les débris cellulaires. Le surnageant, contenant la fraction protéique nucléaire, a été stocké à -80°C. Les concentrations des extraits protéiques nucléaires ont été déterminées grâce au kit BCATM Protein Assay (Pierce Biotechnology).

5. Criblage des mutations

▪ Amplification par PCR

Les amorces nécessaires pour le criblage des régions géniques codant les domaines kinase et pseudo-kinase de JAK1, JAK2 et TYK2 ont été obtenus en majorité grâce à l'outil ExonPrimer disponible sur le site de l'UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>). Les autres amorces ont été définies en utilisant le logiciel Amplify 3X (© Bill Engels, <http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>).

La plupart des amplifications ont été réalisées en multiplex, technique qui permet d'amplifier plusieurs régions simultanément au cours de la même réaction de PCR. Ces amplifications ont été réalisées dans un volume final de 20 µl contenant du tampon de réaction Master Mix[®] 1X (Qiagen) comprenant les dNTP et l'ADN polymérase, 0,2 µM de chacune des amorces nécessaires (Sigma-Genosys, St-Quentin Fallavier, France) et 40 ng d'ADN génomique.

Les amplifications en simplex ont été réalisées dans un volume final de 20 µl contenant du tampon de réaction 1X (Qiagen), 0,2 mM de chaque dNTP (Invitrogen), 0,3 µM de chacune des amorces sens et anti-sens, une unité de Taq polymérase HotStartTM (Qiagen) et 20 ng d'ADN génomique.

Les réactions de PCR ont été réalisées indifféremment sur des thermocycleurs PTC 100TM (MJ Research, Fontenay sous Bois, France) ou GeneAmp[®] PCR system 9700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) suivant des programmes dits "touchdown"²⁵ assurant des variations

cycliques décroissantes de la température d'hybridation, après une étape de dénaturation initiale de 15 min à 95°C permettant d'activer l'ADN polymérase.

- *Séquençage*

Des mutations dans les régions codantes pour les domaines kinase et pseudo-kinase des protéines JAK1, JAK2 et TYK2 ont été recherchées par séquençage direct des produits d'amplification. Ceux-ci ont été préalablement purifiés, soit, pour les produits des amplifications en multiplex avec le système de purification Multiscreen® (Millipore) utilisant le principe de la chromatographie d'exclusion sur une colonne de résine Sephadex™ G50, soit, pour les amplifications simples sur membrane Multiscreen® PCR (Millipore, St Quentin en Yvelines, France), conformément aux protocoles recommandés par le fournisseur. Les réactions de séquences ont été effectuées selon le principe de Sanger, en utilisant les amorces sens et anti-sens définies pour les amplifications par PCR ou des amorces internes.

Chaque réaction de séquence a été réalisée dans un volume final de 10 µl contenant du tampon de réaction BigDye™ 0,75X (Applied Biosystems), 1 µl de solution BigDye™ Terminator RR Mix (Applied Biosystems), 5 pmoles d'amorce sens ou anti-sens et une quantité variable de produit de PCR suivant la taille des amplicons (5 ng pour 100 pb). Le mélange réactionnel a ensuite été soumis au programme de thermocyclage suivant : 25 cycles incluant chacun 30 s de dénaturation à 96°C, 5 s d'hybridation à 55°C et 4 min d'élongation à 60°C. Chaque réaction de séquence a été purifiée sur résine Sephadex™ G50. Après migration des réactions de séquence sur un séquenceur 3100 (Applied Biosystems), les séquences ont été analysées par le logiciel Factura™ (Applied Biosystems) puis comparées à une séquence de référence grâce au logiciel AutoAssembler™ (Applied Biosystems).

6. Analyse du transcriptome / méthodes statistiques

Les profils d'expression des différents échantillons ont été obtenus en utilisant deux approches. La première analyse a été réalisée grâce à des puces à ADN complémentaire (ADNc) non commerciales manufacturées dans l'équipe de Sandrine Imbeaud et décrites dans Graudens et al²⁶ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL3282>, 11K_VJF-ARRAY).

Brièvement, pour 8 foies non tumoraux et 7 hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques, les ARN ont été amplifiés linéairement, à partir de 1 µg d'ARN total. 1 µg de chaque amplification, ainsi que d'une référence humaine universelle (Stratagène), ont été marqués respectivement avec du Cy5-dCTP et du Cy3-dCTP, puis co-hybridés sur des lames présentant 11 250 séquences d'ADNc. Deux hybridations par échantillons ont été effectuées en inversant les fluorochromes. La collecte des résultats, le filtrage et la normalisation des données d'expression ont été réalisés comme décrit dans Graudens et al²⁶.

La deuxième analyse a été réalisée avec des puces Affymetrix GeneChip™ HG-U133A, pour comparer les profils d'expression de 4 hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques à 4 foies non tumoraux. Les ARNc ont été obtenus à partir de 5 µg d'ARN total pour chaque échantillon. 20 µg d'ARNc ont été hybridés par échantillon. L'analyse statistique des résultats a été faite selon un protocole développé et validé dans l'équipe de Sandrine Imbeaud (Villejuif).

7. Validation des résultats par RT-PCR quantitative

- *Principe de l'essai TaqMan*

Cette technique exploite l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase pour cliver une sonde au cours de la réaction de PCR²⁷. La sonde présente en 5' un fluorochrome "reporter" dont l'émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur appelé "quencher", présent à l'extrémité 3'. Pendant la réaction d'amplification, le clivage de la sonde par l'activité 5'-3'

nucléolytique de l'ADN polymérase sépare le reporter du quencher, ce qui a pour effet d'augmenter la fluorescence émise par le reporter. L'accumulation de produit de PCR est détectée en continu en mesurant l'augmentation de fluorescence émise au cours des cycles d'amplification. Celle-ci est proportionnelle à la quantité de sonde clivée et reflète directement la quantité initiale de cible.

▪ *Transcription inverse*

Les réactions de rétro-transcription ont été réalisées en utilisant le High Capacity archive Kit (Applied Biosystems) dans un volume final de 100µl contenant du tampon de réaction 1X, les quatre dNTP 1X, des amorces hexamères aléatoires 1X, 100 unités d'inhibiteur de RNase Rnasine® (Promega), 250 unités de transcriptase inverse MultiScribe™ et 3 µg d'ARN total. Les réactions ont été effectuées dans un thermocycleur GeneAmp® PCR system 9700 selon le programme de thermocyclage suivant : 10 min à 25°C et 2h à 37°C. Les ADNc néo-synthétisés ont été dilués 15 fois dans de l'eau et stockés à -20°C.

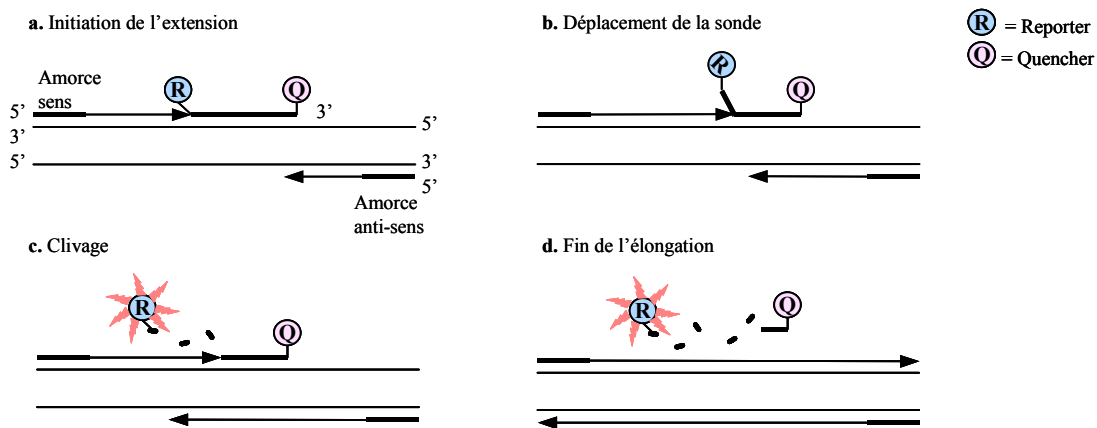


Figure 2 – Représentation schématique de la succession d'évènements se déroulant au cours d'un cycle d'amplification dans le contexte de la technologie TaqMan®.

▪ *PCR quantitative*

Le niveau d'expression relatif de 36 gènes incluant un gène de référence a été quantifié en utilisant des amorces et des sondes TaqMan® MGB-FAM™ commerciales spécifiques de ces gènes, développées par la société Applied Biosystems. Ces différents essais sont optimisés pour permettre l'amplification des cibles avec une efficacité proche de 100%. Les réactions d'amplification ont été réalisées selon un protocole standardisé commun aux différents essais, en utilisant le TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Ce mélange, optimisé pour les réactions TaqMan®, contient de l'ADN polymérase AmpliTaq Gold®, les quatre dNTPs, une référence passive fluorescente ROX™ permettant de contrôler les fluctuations de volume, sur laquelle le signal est normalisé, et un tampon de réaction. Chaque réaction a été effectuée dans un volume final de 20 µl contenant 1X de PCR Master Mix, 1X de mélange incluant la sonde et les deux amorces spécifiques du transcrit à quantifier et 5 µl d'ADNc (10 ng en équivalent ARN total). Les amplifications ont été réalisées en duplicat, en plaque de 384 puits dans un appareil 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) selon le profil de thermocyclage suivant : 10 min de dénaturation à 95°C permettant aussi d'activer l'ADN polymérase, suivi de 40 cycles comprenant chacun 15 s de dénaturation à 95°C et 1 min d'hybridation/extension à 60°C.

▪ *Analyse des résultats*

La première étape de l'analyse consiste à déterminer la ligne de base permettant de soustraire le bruit de fond du signal spécifique. Son niveau a été fixé deux cycles avant la détection du

premier échantillon. Le paramètre représentatif de la quantité de cible est le cycle seuil (C_T) défini comme le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence est significativement supérieur au bruit de fond. Le C_T est d'autant plus faible que le transcrit est plus exprimé. Cette valeur a été déterminée, dans un second temps, pour chaque échantillon, en positionnant un seuil de fluorescence au milieu de la phase exponentielle des courbes d'amplification. Ce seuil est commun à tous les échantillons testés pour un même transcrit. Les résultats ont été normalisés sur un gène de référence choisi pour la stabilité de son expression, *R18S*, et rapportés à la valeur normalisée du foie humain adulte commercial. Le niveau d'expression relatif des transcrits a été calculé par la méthode des $2^{-\Delta\Delta C_T}$ où $\Delta\Delta C_T = (C_{T\text{gène cible}} - C_{TR18S})_{\text{échantillon}} - (C_{T\text{gène cible}} - C_{TR18S})_{\text{foie humain adulte}}$ ²⁸. La comparaison des niveaux d'expression de chaque transcrit entre chacune des séries de tumeurs testées a été effectuée en utilisant le test statistique non paramétrique de Mann-Whitney, avec une différence considérée comme significative pour une valeur de $p < 0.05$

8. Western Blot

Une quantité équivalente de protéines pour chaque échantillon tumoral et non tumoral a été séparée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Le pourcentage de polyacrylamide a été adapté selon la masse moléculaire apparente des différentes protéines d'intérêt. Après la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) par électrotransfert. L'efficacité du transfert a été vérifiée par coloration des membranes au rouge ponceau. Après une étape de blocage des membranes, dans du lait écrémé 5%, les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire. Elles ont ensuite subi trois lavages successifs dans du tampon de lavage, pour ensuite être incubées avec l'anticorps secondaire. Après trois nouvelles étapes de lavages, le signal a été révélé à l'aide du kit SuperSignal® WestPico Chemiluminescent substrate (PIERCE).

Les détails concernant les anticorps utilisés et les facteurs de dilution sont regroupés dans le tableau 1.

	Protéine	Phosphorylation	Fournisseur	Dilution anticorps	Diluant	Quantité de protéine déposée (µg)	Taille protéine (kDa)
Anticorps primaires	STAT1	-	Cell Signaling	1/200	BSA 5%	50	84 et 91
	pSTAT1	Y701	Cell Signaling	1/500	BSA 5%	50	84 et 91
	STAT3	-	Cell Signaling	1/500	BSA 5%	50	79 et 86
	pSTAT3	Y705	Cell Signaling	1/500	BSA 5%	50	79 et 86
	JAK1	-	Cell Signaling	1/500	BSA 5%	75	130
	JAK2	-	Santa Cruz Biotechnology	1/750	lait 5%	75	125
	pJAK2	Y1007/1008	Cell Signaling	1/500	lait 5%	75	125
	TYK2	-	Cell Signaling	1/200	BSA 5%	75	140
	pTYK2	Y1054/1055	Cell Signaling	1/500	BSA 5%	75	140
	Anticorps secondaires	anti-Rabbit	-	Santa Cruz Biotechnology	1/2000	lait 5%	-
anti-Mouse		-	Amersham biosciences	1/4000	lait 5%	-	-

Tableau 1 – Caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés.

BSA : Bovine Serum Albumin

RESULTATS

I. Hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et adénomes inflammatoires

1. Analyse du transcriptome

L'analyse du transcriptome des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux a été faite juste avant mon arrivée au laboratoire. La comparaison des profils d'expression entre foies non tumoraux et hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques, combinant les données obtenues à partir des microarrays cDNA et Affymetrix, a été réalisée sur le plan statistique par Sandrine Imbeaud (Villejuif) (Cf. Matériel et Méthodes, paragraphe 6.). Cette analyse a permis d'établir une liste de 226 et 393 gènes respectivement significativement sur- et sous-exprimés dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux. Les dérégulations des gènes en commun aux deux analyses concordent à 93%. Parmi ces 619 gènes différentiellement exprimés entre les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et les foies non tumoraux, environ 10% étaient impliqués dans les réponses immunes et inflammatoires, ce qui est à mettre en parallèle avec la présence d'infiltrats inflammatoires, caractéristique fréquente des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques.

2. Etude immunohistochimique

Dans la liste des 619 gènes différentiellement exprimés dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux, une dizaine codent des protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Parmi les plus sur-exprimés dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques figure SAA, codant une protéine particulièrement sur-exprimée durant les épisodes inflammatoires²⁹.

Ces différentes observations nous ont conduit à chercher à identifier quel contingent hépatocytaire exprimait SAA au sein des tumeurs, en particulier la localisation de la sur-expression de cette protéine, par rapport à la localisation des cellules tumorales et des cellules inflammatoires.

L'analyse immunohistochimique des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques a été effectuée en collaboration avec le Pr P. Bioulac-Sage grâce à un anticorps anti-SAA (fig. 3). De manière intéressante, le marquage révèle une expression spécifiquement hépatocytaire de la protéine SAA au sein des tumeurs. Les hépatocytes non tumoraux ne sont pas marqués, même à proximité de la tumeur. De plus, les hépatocytes tumoraux sont marqués de manière

homogène sur l'ensemble de la lésion, sans renforcement à proximité des infiltrats inflammatoires. Cette analyse suggère donc que la sur-expression des protéines de la phase aiguë, et plus particulièrement de SAA, est spécifique et constitutive des hépatocytes tumoraux des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques.

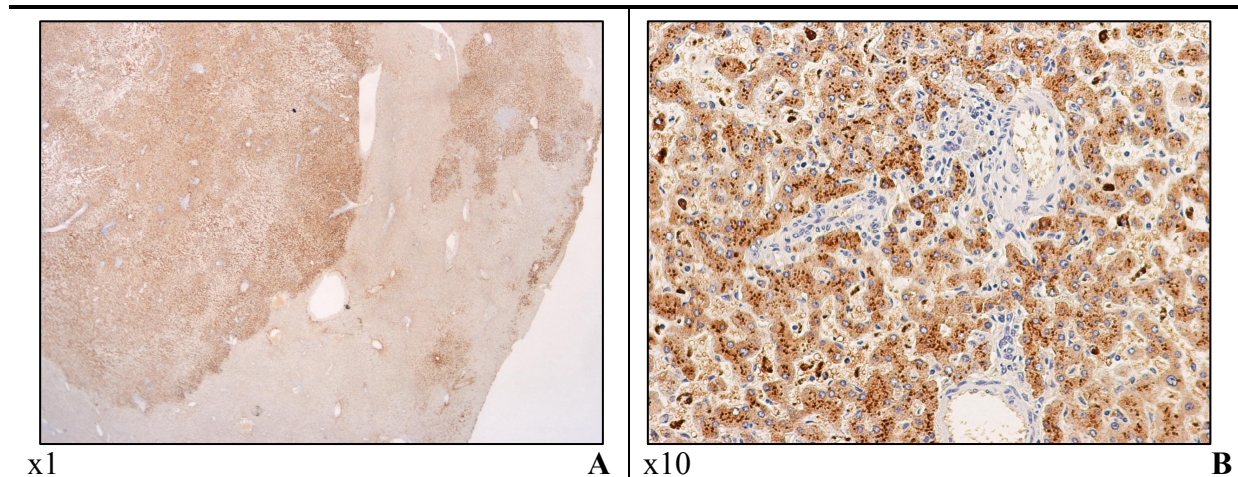


Figure 3 – Biopsie d'une hyperplasie nodulaire focale télangiectasique. L'immunohistochimie a été réalisée avec un anticorps anti-SAA (A) x1, (B) x10

3. Validation de l'expression des gènes

Dans le but de valider les dérégulations transcriptomiques observées en microarray, et de tester si ces altérations étaient présentes dans les adénomes inflammatoires, j'ai analysé le profil d'expression de 31 gènes en RT-PCR quantitative. J'ai réalisé cette étude sur une série de 7 échantillons de foies non tumoraux, 7 hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et 10 adénomes avec infiltrats inflammatoires. Les quatre hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques qui avaient été hybridées sur les puces Affymetrix font partie de cette série de validation. Parmi les 31 gènes étudiés, 19 et 4 étaient respectivement significativement sur- et sous-exprimés dans l'analyse microarray des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux. Les niveaux d'expression des 8 derniers gènes ne montraient pas de variations significatives mais ils ont été inclus dans la série de validation car ils codent des protéines impliquées dans les voies de l'inflammation.

a. Gènes de la phase aigüe de l'inflammation

Les gènes *SAA2*, *CRP*, *FGB*, *SOD2*, *SPINK1*, *HIF1A* et *BCL2A1* codent des protéines sur-exprimées lors de la phase aigüe de l'inflammation, et étaient particulièrement sur-exprimés dans l'analyse microarray des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques. Les résultats obtenus en RT-PCR quantitative confirment la sur-expression significative de ces gènes dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non

tumoraux, ainsi que dans les adénomes inflammatoires (fig. 4A). Les rapports de la moyenne des différentiels d'expression des foies tumoraux et non tumoraux (T/N) pour les gènes *CRP*, *SAA2*, *SOD2*, *SPINK1*, *BCL2A1*, *FGB* et *HIF1A* sont respectivement de 15,4 ; 84 ; 3,7 ; 49,5 ; 17 ; 1,6 et 3 pour les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et 17,3 ; 53 ; 4,6 ; 81,7 ; 12 ; 1,6 et 2,6 pour les adénomes inflammatoires.

b. Gènes des voies NF- κ B et interférons

J'ai validé le niveau d'expression des gènes *NFKB1* et *NFKB2*, codant respectivement les sous-unités p50 et p52 du facteur de transcription NF- κ B, qui contrôle entre autres l'expression de gènes impliqués dans la régulation du système immunitaire, l'inflammation, la survie et la prolifération cellulaire^{30, 31}. J'ai également validé le niveau d'expression des gènes *IFNGR1* et *IFNGR2* codant les sous-unités du récepteur à l'interféron γ , et des gènes *IRF7* et *ISGF3G* codant respectivement les protéines IRF7 et IRF9, impliquées dans la régulation des voies interférons. Les gènes *IFNGR1*, *IRF7*, *ISGF3G* et *NFKB2* étaient par ailleurs sur-exprimés dans l'analyse microarray des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux. Les sur-expressions d'*IFNGR1* et *IFNGR2* ont été validées dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques, ainsi que dans les adénomes inflammatoires, par rapport aux foies non tumoraux (T/N de 2,4 et 2,2 pour les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et 2,3 et 2,7 pour les adénomes inflammatoires) (fig. 4B). Les niveaux d'expression de *NFKB2*, *IRF7* et *ISGF3G* sont significativement augmentés dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux (T/N : 2,1 ; 1,2 et 1,7), et leur expression est également augmentée dans les adénomes hépatocellulaires inflammatoires, bien que de manière non significative par rapport aux foies non tumoraux. De plus, la différence entre les niveaux d'expression de ces gènes entre les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et les adénomes inflammatoires n'est pas statistiquement significative. La validation du niveau d'expression de *NFKB1* confirme également que ce dernier ne varie pas dans les tumeurs testées (fig. 4B)

c. Gènes du locus HLA

Les gènes *TAP1*, *HLA-E*, *HLA-DRA*, *PSMB8* et *PSMB9*, appartiennent au complexe HLA et leur expression peut être induite par l'interféron γ , via l'activation du facteur NF- κ B. Ces gènes étaient sur-exprimés dans l'analyse microarray des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques. Les sur-expressions des gènes *HLA-DRA* et *HLA-E* sont validées aussi bien dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques que dans les adénomes

inflammatoires par rapport aux foies normaux (T/N de 3,3 et 1,8, et 3,5 et 1,8), celle de *PSMB8* et de *PSMB9* ne sont confirmées que dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux (T/N de 1,7 et 1,8 respectivement).

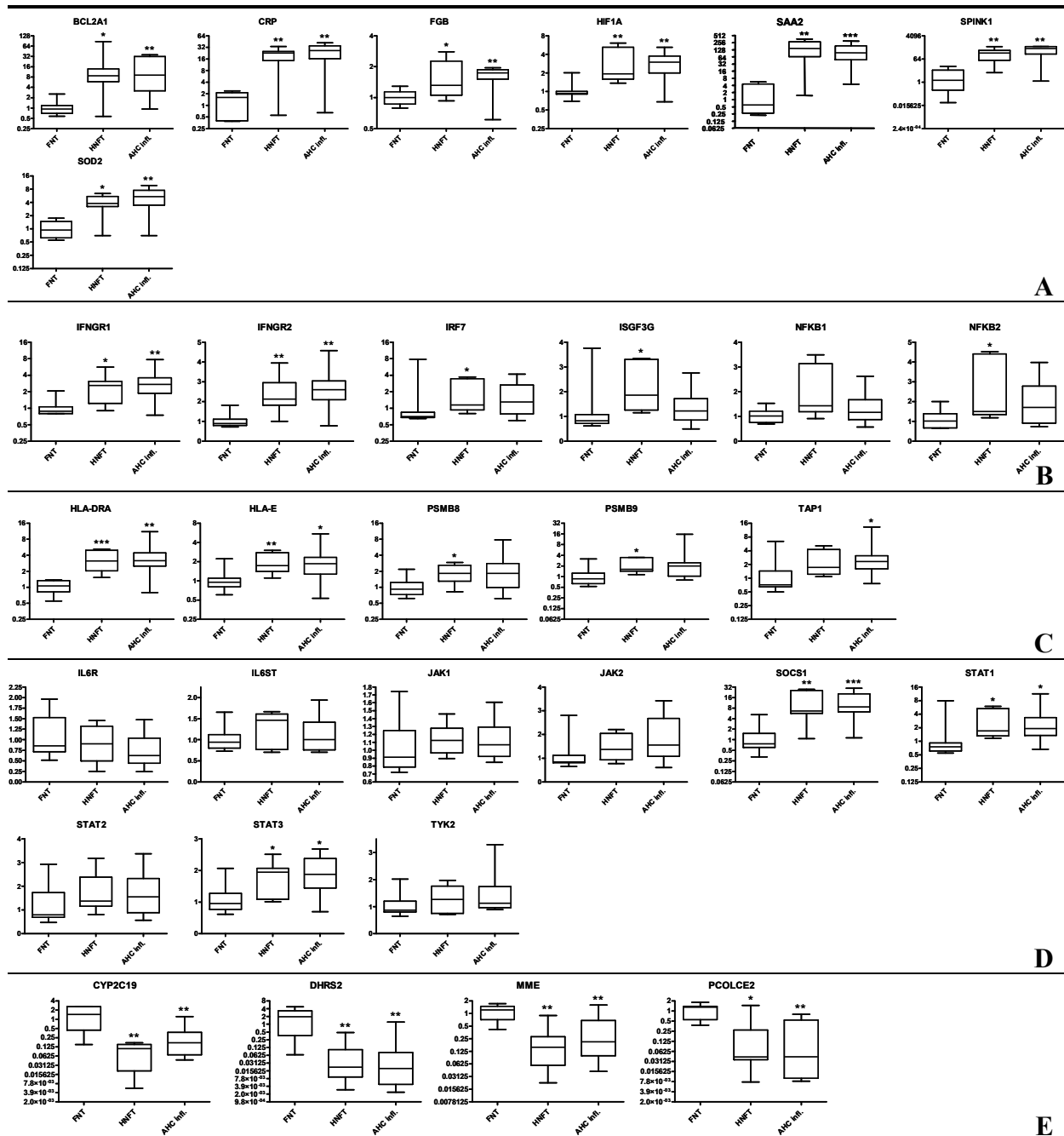


Figure 4 – Niveaux d'expression des 31 gènes validés en RT-PCR quantitative. Résultats obtenus pour les gènes de la phase aigue (A), les gènes des voies NF- κ B et interférons (B), les gènes du locus HLA (C) les gènes des voies IL-6 et JAK/STAT (D) et les gènes sous-exprimés dans l'analyse microarray (E). Les distributions des résultats, exprimés en $2^{-\Delta\Delta Ct}$, obtenus pour chaque gène sont représentés en fonction du type d'échantillon (respectivement : foies non tumoraux (FNT), hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques (HNFT) et adénomes inflammatoires (AHC infl.). Les barres du haut et du bas indiquent respectivement les 1^{er} et 9^{ème} déciles. La boîte symbolise 50% des valeurs et la barre indique la médiane. *, **, *** Différence par rapport aux foies non tumoraux, test de Mann-Whitney. * 0.01 < p < 0.05, ** 0.001 < p < 0.01, *** p < 0.001

Enfin, le niveau d'expression de *TAP1* par rapport aux foies non tumoraux n'est augmenté significativement que dans les adénomes inflammatoires dans cette série de validation (T/N de 1,9). Toutefois, il n'y a aucune différence significative entre les résultats obtenus pour les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et les adénomes inflammatoires (fig. 4C).

d. Gènes des voies IL-6 et JAK/STAT

IL6R et *IL6ST* codent respectivement pour les sous-unités des récepteurs à l'interleukine 6. Ces gènes ont été inclus dans cette étude afin de confirmer que leurs niveaux d'expression ne varient pas dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques. Les résultats obtenus confirment ceux de l'analyse microarray (fig. 4D).

Les signaux induits par l'IL-6 et les interférons sont médiés entre autres par la voie JAK/STAT, plus précisément par les protéines codées par *JAK1*, *JAK2*, *TYK2*, *STAT1*, *STAT2* et *STAT3*. *SOCS1* est une phosphatase de la famille des SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling), dont l'un des rôles est la terminaison des signaux médiés par la voie JAK/STAT. La sur-expression des gènes *STAT1*, *STAT3*, et *SOCS1* est validée dans les adénomes inflammatoires et les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux (T/N de 1,7 ; 1,6 et 9 et 1,5 ; 1,6 et 7,5). L'expression des gènes *JAK1*, *JAK2*, *TYK2* et *STAT2* n'est pas significativement différente entre les foies non tumoraux et les différents types de tumeurs testés (fig. 4D).

e. Gènes sous-exprimés dans l'analyse microarray

Les niveaux d'expression de quatre gènes sous-exprimés dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux, *DHRS2*, *PCOLCE2*, *CYP2C19* et *MME* ont également été testés. Ces gènes sont tous significativement sous-exprimés dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et les adénomes inflammatoires par rapport aux foies non tumoraux dans cette série de validation, ce qui confirme, en ce qui concerne les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques, les données de l'analyse microarray (T/N de -20,2 ; -3,8 ; -15,6 et -4,5 et -13,7 ; -3 ; -5,7 et -2,6) (fig. 4E).

Ces analyses confirment donc globalement les données issues de l'analyse du transcriptome des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux. Par ailleurs, il est à noter que les profils d'expression de tous les gènes testés sont non-significativement différents entre les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et les adénomes inflammatoires.

Afin de tester la spécificité des gènes dérégulés dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et les adénomes inflammatoires par rapport aux autres types de tumeurs hépatiques bénignes, j'ai analysé les niveaux d'expression des mêmes 31 gènes dans une série complémentaire d'échantillons par RT-PCR quantitative. Cette série comportait 2 échantillons de foie non tumoral inflammatoire prélevé chez des patients porteurs du virus de l'hépatite C, 6 adénomes mutés pour HNF1 α , 6 adénomes mutés pour la β -caténine et 7 hyperplasies nodulaires focales typiques.

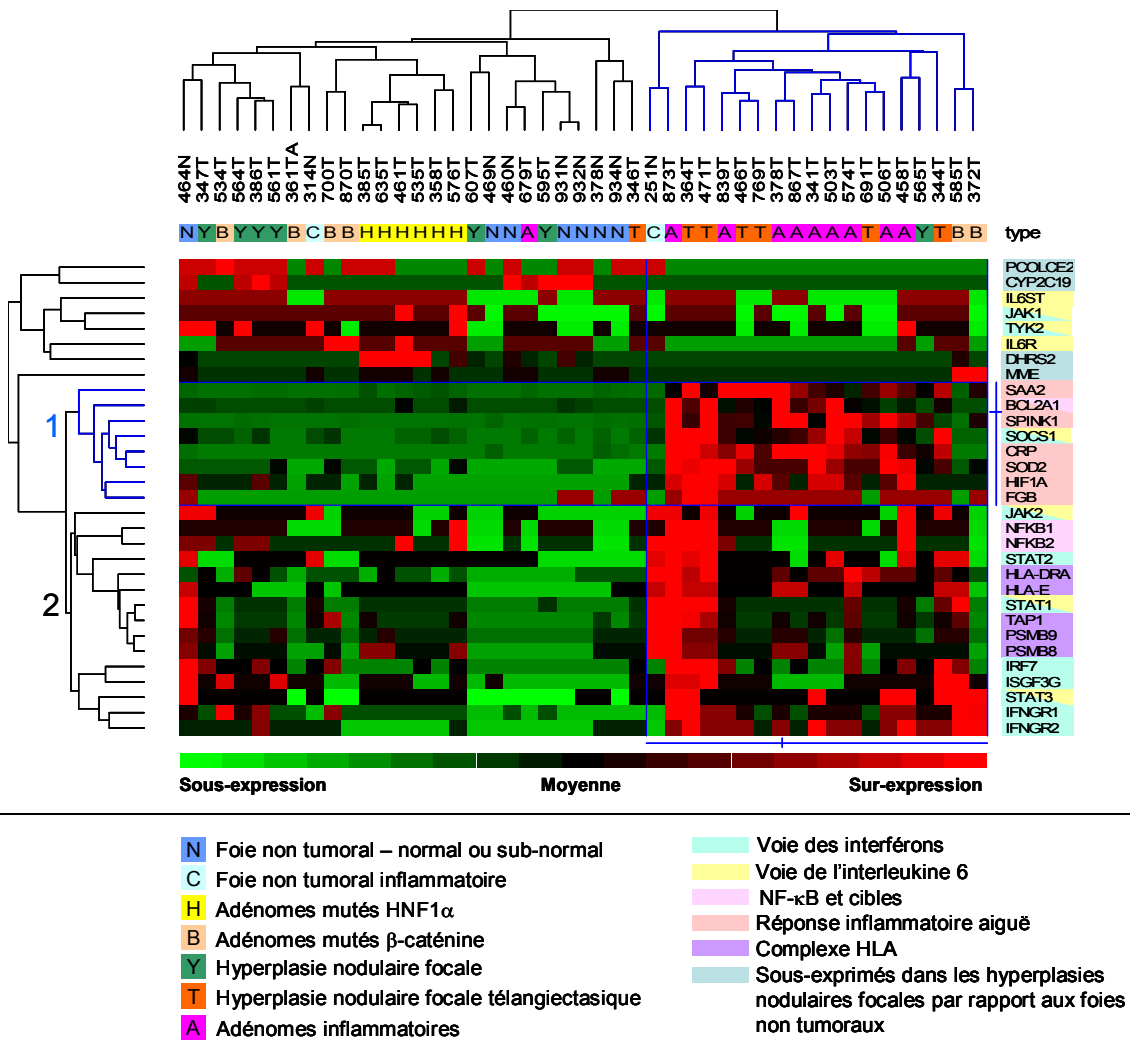


Figure 5 – Analyse hiérarchique non supervisée des 31 gènes dont l'expression a été validée en RT-PCR quantitative. Le dendrogramme a été obtenu à partir des profils d'expression de chacun des gènes testés dans une série de 7 foies non tumoraux, normaux ou sub-normaux, 2 foies non tumoraux inflammatoires, 6 adénomes mutés pour HNF1 α , 6 adénomes mutés pour la β -caténine, 7 hyperplasies nodulaires focales typiques, 7 hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et 10 adénomes inflammatoires. Les niveaux d'expression supérieurs et inférieurs à la moyenne de l'ensemble des échantillons sont indiqués en rouge et vert respectivement.

J'ai effectué une analyse hiérarchique non-supervisée des données obtenues en RT-PCR quantitative dans cette série de validation (fig. 5). Ce clustering classe les adénomes inflammatoires et les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques dans le même groupe de tumeurs. Seuls un adénome inflammatoire et une hyperplasie nodulaire focale télangiectasique sont mal classés. D'autre part, la classification hiérarchique des gènes en fonction de leurs profils d'expression dans la série d'échantillons testée définit trois groupes de gènes.

- Les gènes codant pour les protéines de la phase aigue sont regroupés dans un premier sous-ensemble (noté "1" sur la figure 5), et sont constamment sur-exprimés dans tous les adénomes inflammatoires et hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux autres échantillons.

- Les gènes du complexe HLA, ainsi que ceux codant pour les facteurs STAT et NFκB, le récepteur à l'IFNγ, et *JAK2*, *IRF7* et *ISGF3G* sont réunis dans un second sous-ensemble (noté "2" sur la figure 5). Sur 13 adénomes inflammatoires et hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques, 5 présentent un profil de sur-expression globale de ces gènes (344T, 364T, 471T, 574T et 873T).

- Les gènes restants constituent le dernier groupe. Leurs niveaux d'expression ne varient pas parmi les échantillons testés.

Cette analyse semble donc confirmer d'une part que les adénomes inflammatoires et hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques ne forment qu'une seule entité, et d'autre part l'existence de deux profils de dérégulation des gènes au sein de ce groupe de tumeurs, en particulier pour les gènes codant les facteurs NFκB et les interacteurs de la voie JAK/STAT.

4. Analyse des promoteurs

Pour étudier les mécanismes de dérégulation des gènes différentiellement exprimés dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux, j'ai réalisé une analyse des promoteurs de ces 619 gènes, en utilisant le logiciel BiblioSphere (<http://www.genomatix.de/>). Cette ressource bio-informatique, développée par Genomatix, permet d'analyser les promoteurs d'une liste de gènes donnée, et en particulier de rechercher la présence d'un site de reconnaissance à un facteur de transcription donné. La présence du site d'un facteur de transcription est considérée comme validée au niveau d'un gène lorsque (1) la séquence consensus de ce site est présente au niveau de la séquence du promoteur de ce gène et (2) lorsque le gène et le facteur de transcription d'intérêt sont co-cités dans la littérature.

La localisation de sites de reconnaissance de 8 facteurs de transcription a été recherchée dans la listes des 619 gènes sur- et sous-exprimés dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques en comparaison aux foies non tumoraux. Cette étude a permis d'estimer de manière qualitative l'enrichissement éventuel en sites de facteurs de transcription parmi ces gènes par rapport au total des gènes testés sur les puces Affymetrix.

Les facteurs de transcription testés sont STAT3 et STAT1, de la famille des STAT (Signal Transductor and Activator of Transcription), et CEBP β sont impliqués, entre autres, dans les voies de signalisation inflammatoires induites par les interférons et l'interleukine 6³²⁻³⁵, ainsi que NF- κ B, terme générique regroupant les dimères formés par les protéines NFKB1, NFKB2, REL, RELA et RELB.

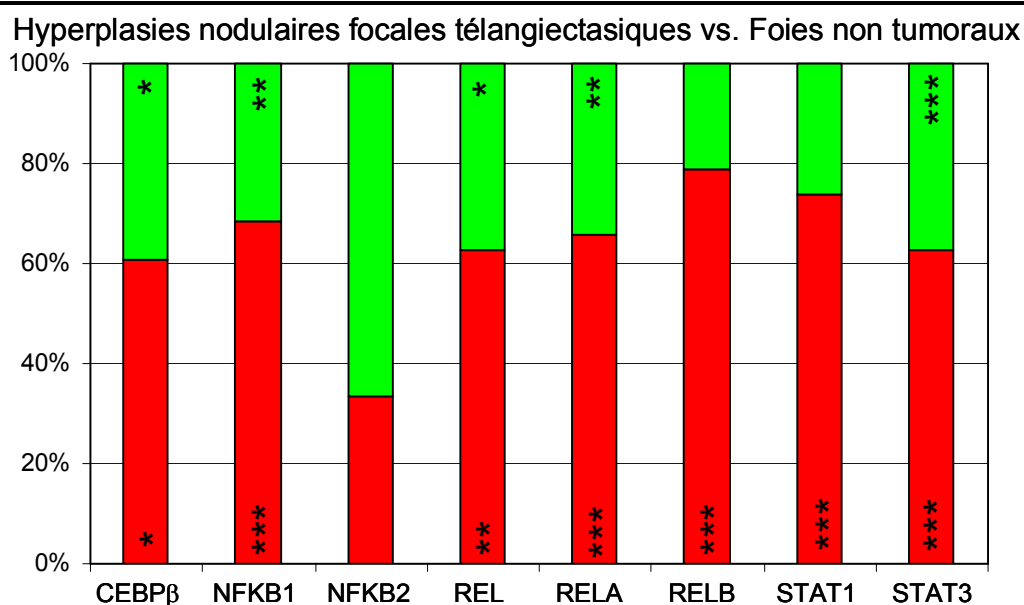


Figure 6 – Etude de l'enrichissement en site de facteurs de transcription dans le transcriptome des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques comparés aux foies non tumoraux. Pour chaque facteur de transcription étudié (CEBP β , NFKB1, NFKB2, REL, RELA, RELB, STAT1 et STAT3) Les proportions de gènes sur- ou sous-exprimés et présentant un site du facteur de transcription, indiqué sous chaque colonne, sont représentées respectivement en rouge et en vert. *, **, *** Différence entre la proportion de gènes sur- ou sous-exprimés présentant un site du facteur de transcription par rapport à la proportion de gènes exprimés représentés sur la puce Affymetrix présentant un site de ce même facteur de transcription. * 0.01<p<0.05 ** 0.001<p<0.01 *** p<0.001.

Cette analyse a montré dans un premier temps que parmi les 619 gènes différentiellement exprimés, 16% présentaient au niveau de leur promoteur un site de reconnaissance pour STAT3, dont le transcrit était lui-même sur-exprimé dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux. D'autre part, l'étude statistique montrait un enrichissement significatif des sites de tous les facteurs de transcription testés sauf NFKB2 au niveau des gènes sur-exprimés dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par

rapport aux foies non tumoraux (fig. 6). De plus, une sur-représentation des sites CEBP β , NFKB1, REL, RELA et STAT3 est observée dans les gènes sous-exprimés du transcriptome des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques.

L'étude des sites du facteur NFKB2 n'est finalement pas conclusive dans la mesure où très peu de gènes présentant un site de ce facteur de transcription sont représentés au niveau de la puce Affymetrix (0,49%) d'une part et d'autre part dans la liste de gènes testée (0,69%, soit 3 gènes).

Les résultats de cette analyse des promoteurs des gènes différentiellement exprimés dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux suggèrent un enrichissement en site de facteurs de transcription généralement associés aux phénomènes d'inflammation³⁶. Ces données, bien qu'issues d'une analyse qualitative, sont en accord avec les observations précédentes.

II. Voie JAK/STAT

1. Analyse protéique

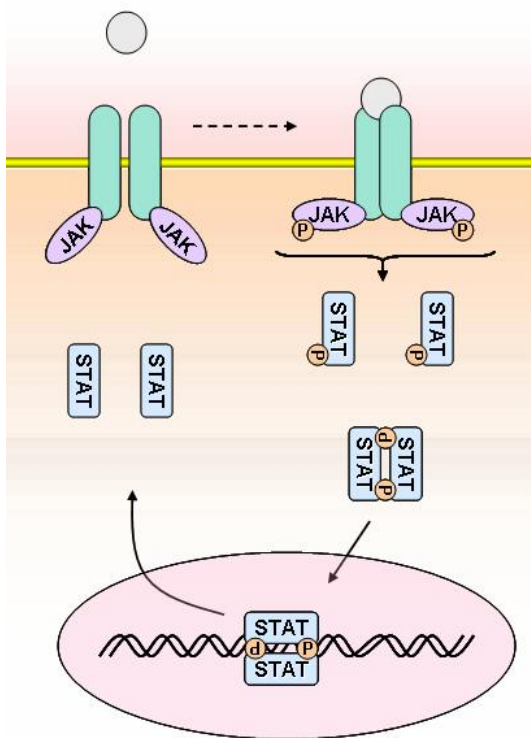


Figure 7 - Représentation schématique simplifiée de la voie de signalisation JAK/STAT. Le récepteur est indiqué en vert, son ligand en gris. Les protéines de la famille JAK sont représentées en violet, et celles de la famille STAT en bleu.

La voie de transduction du signal JAK/STAT est associée à l'activité de tous les récepteurs cytokiniques. Cette voie joue d'une manière générale un rôle majeur dans la signalisation des voies inflammatoires. Les récepteurs induisant la voie JAK/STAT n'ont pas d'activité kinase

intrinsèque, et sont tous associés de manière covalente à une protéine de la famille JAK (Janus Kinase). Lors de leur activation par fixation du ligand, les changements de conformation du récepteur induisent la trans-phosphorylation des protéines JAK. Ceci permet ainsi le recrutement des facteurs de transcription de la famille STAT au niveau du récepteur. Les protéines JAK activent les protéines STAT par phosphorylation, qui vont alors s'homo- ou hétéro-dimériser et être transloquées dans le noyau, où elles activent l'expression de leurs gènes cibles (fig. 7).

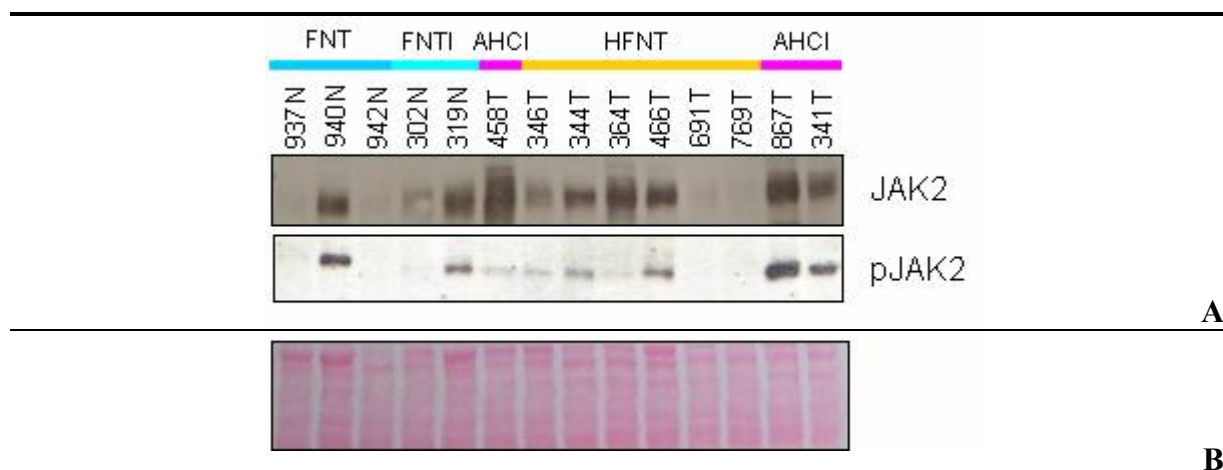


Figure 8 – Expression protéique de JAK2 et pJAK2 (Y1007/1008). (A) Les niveaux d'expression de ces protéines ont été appréciés par Western Blot dans une série de 3 foies non tumoraux (FNT, bleu), 2 foies non tumoraux inflammatoires (FNTI, bleu clair), 6 hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques (HFNT, orange) et 3 adénomes inflammatoires (AHCI, rose). (B) La coloration au rouge ponceau des membranes après transfert a été utilisée comme contrôle de quantification.

La sur-représentation de sites du facteur de transcription STAT3 parmi les promoteurs des 619 gènes différemment exprimés dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies normaux, ainsi que la sur-expression de *STAT1* et *STAT3* dans les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et adénomes inflammatoires par rapport aux foies non tumoraux, nous ont conduit à vérifier l'expression protéique de certains des interacteurs de la voie JAK/STAT. Ainsi, j'ai étudié l'expression protéique de JAK1, JAK2, TYK2, STAT1 et STAT3, et leur statut d'activation par phosphorylation dans une série d'échantillons constituée de 4 foies non tumoraux (deux foies normaux non inflammatoires et deux présentant une inflammation liée à l'infection par le virus C), 7 hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et 5 adénomes inflammatoires.

Les résultats obtenus par western blot montrent trois profils d'expression distincts des protéines testées (fig. 8 et 9, et données non montrées).

- 8 tumeurs sur 12 testées sur-expriment JAK2, STAT1, STAT3 et leurs formes phosphorylées ainsi que TYK2. Il est intéressant de constater que d'une manière générale, les

tumeurs sur-exprimant phospho-JAK2 (pJAK2) sur-expriment globalement toutes les protéines testées sauf JAK1 et phospho-TYK2 (pTYK2).

- Deux tumeurs (458T et, dans une moindre mesure, 867T) sur-expriment toutes les protéines testées y compris JAK1 et pTYK2
- Trois tumeurs (382T, 691T et 769T) sur 12 testées ne montrent aucune sur-expression protéique notable.

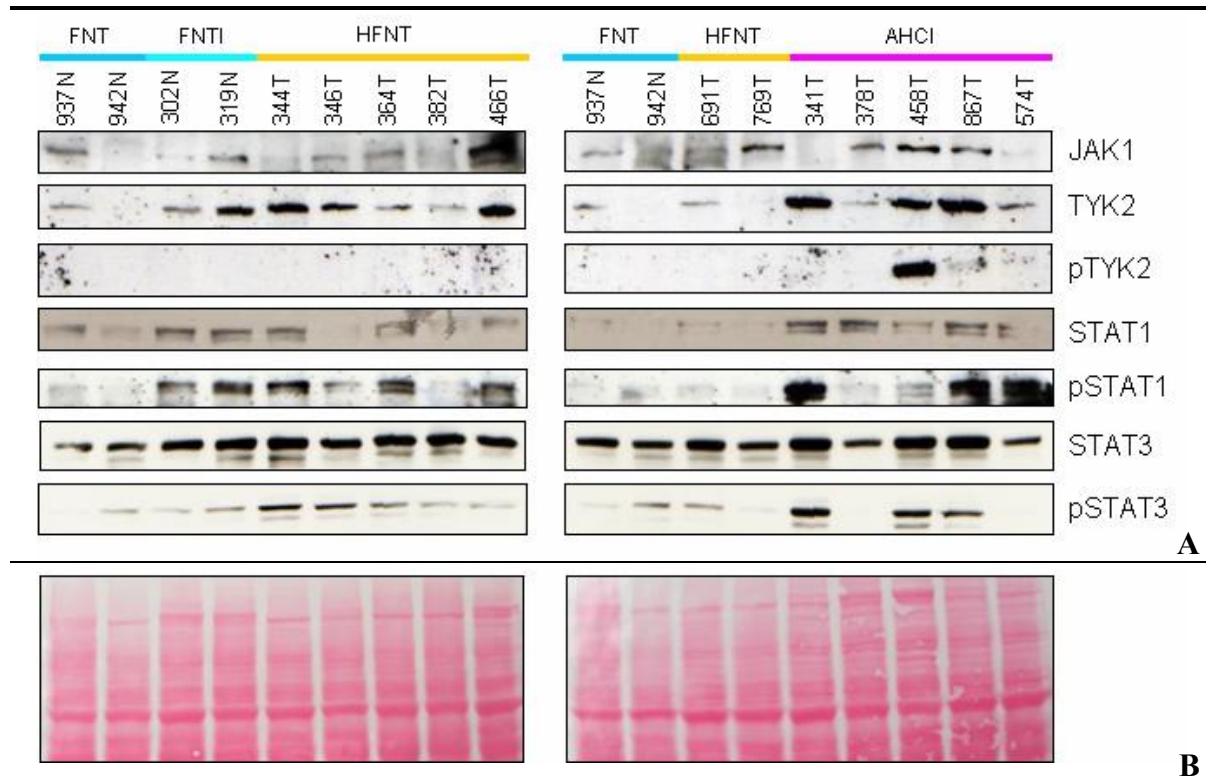


Figure 9 – Expression protéique de JAK1, TYK2, pTYK2 (Y1054/1055), STAT1, pSTAT1 (Y701), STAT3 et pSTAT3 (Y705). (A) Les niveaux d'expression de ces protéines ont été appréciés par Western Blot dans une série de 2 foies non tumoraux (FNT, bleu), 2 foies non tumoraux inflammatoires (FNTI, bleu clair), 7 hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques (HNFT, orange) et 5 adénomes inflammatoires (AHCI, rose). (B) La coloration au rouge ponceau des membranes après transfert a été utilisée comme contrôle de quantification.

Il serait cependant nécessaire de vérifier la pureté tumorale de chaque extrait protéique utilisé en détectant le niveau d'expression de la protéine SAA par western blot (en cours).

Parmi les échantillons non-tumoraux, les deux foies inflammatoires sur-expriment STAT1, phospho-STAT1 (pSTAT1) et STAT3, et seulement l'un des deux sur-exprime JAK2, pJAK2 et TYK2. L'échantillon 940N présente également une sur-expression notable de JAK2 et pJAK2, mais ceci peut être dû au prélèvement qui a été effectué à proximité de la lésion tumorale.

Enfin, globalement, les résultats obtenus pour la série d'échantillons tumoraux testée ne suggèrent pas de différence significative entre les adénomes inflammatoires et les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques.

2. Recherche d'altérations génétiques

Les dérégulations de l'expression des protéines de la voie JAK/STAT observées dans 70% des tumeurs nous ont donc conduit à rechercher des altérations des gènes *JAK1*, *JAK2* et *TYK2* pour lesquelles des mutations activatrices ont été identifiées dans des pathologies tumorales^{37, 38}.

Dans le cadre de ces observations, j'ai recherché par séquençage direct des mutations au niveau des exons codant les domaines JH1 et JH2 des protéines JAK1, JAK2 et TYK2 (fig. 10) dans une série de 5 adénomes hépatocellulaires inflammatoires et 8 hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques. Les domaines JH2 et JH1 codent respectivement le domaine pseudo-kinase et le domaine à activité tyrosine kinase des protéines JAK (fig. 10). Le domaine pseudo-kinase est nécessaire pour la régulation de l'activité catalytique portée par le domaine JH1.

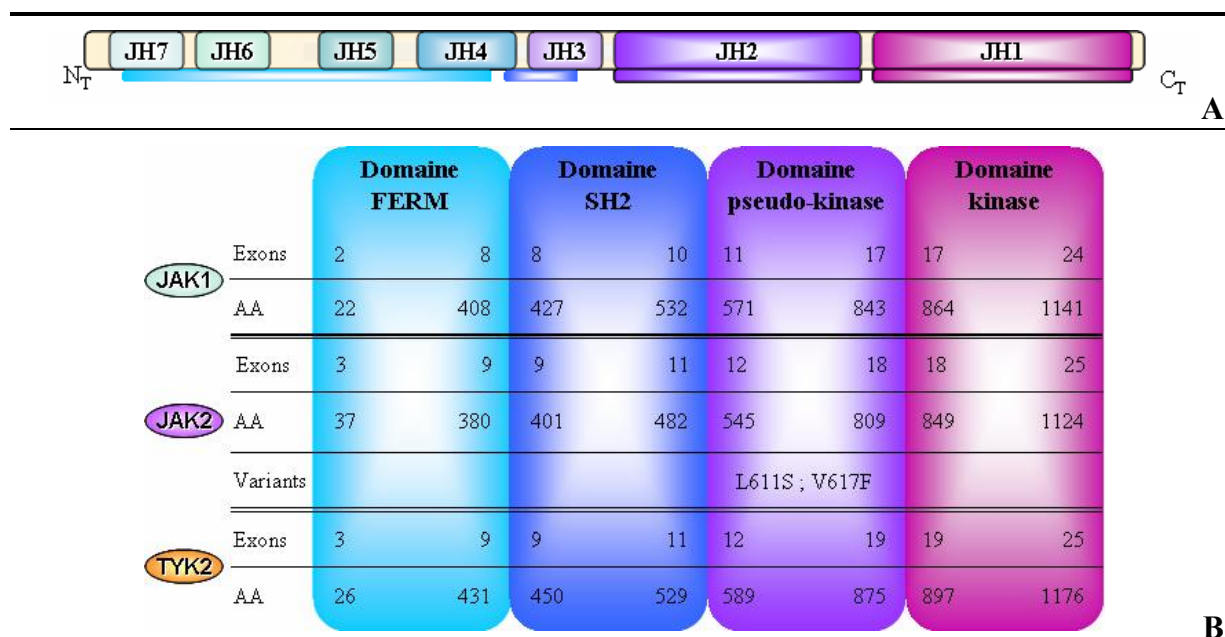


Figure 10 – (A) Représentation schématique de la structure des protéines de la famille des Janus Kinases. Les domaines JH (Janus Homology) sont représentés, ainsi que les domaines FERM (bleu clair), SH2 (bleu), pseudo-kinase (violet) et kinase (rose). (B) Détail des exons codant les domaines FERM, SH2, pseudo-kinase et kinase des protéines JAK1, JAK2 et TYK2. La position des acides aminés délimitant chaque domaine est également indiquée.

Au total, un variant de *JAK1*, un variant de *JAK2* et trois variants de *TYK2* ont été identifiés à l'état hétérozygote dans des échantillons tumoraux et non-tumoraux correspondants (Tableau 2).

La transversion 3323 A>G de *JAK2*, identifiée dans un cas, prédit la substitution de l'asparagine 1108 en sérine et touche un acide aminé de *JAK2* non-conservé au cours de l'évolution.

La transition 3310 C>G de *TYK2* conduisant à la substitution du résidu proline 1104 touche un acide aminé conservé au cours de l'évolution chez les Mammifères et les Poissons. La substitution d'une proline en alanine pourrait avoir des conséquences sur la structure tertiaire de la protéine, voire sur sa fonction, d'autant que le résidu touché se situe dans le domaine tyrosine kinase de *TYK2*. Tous ces arguments nous ont conduit à vérifier la fréquence d'apparition de ce variant dans une population contrôle du CEPH constituée de 91 femmes et 89 hommes. La mutation P1104A a été identifiée chez 5 femmes et 3 hommes de cette population. La fréquence d'apparition de la P1104A n'est pas significativement différente entre le groupe testé d'hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et d'adénomes inflammatoires et le groupe contrôle (test de χ^2 , $p = 0,0857$).

Enfin, trois variants silencieux sans conséquence sur la traduction protéique (*JAK1* : R647R, *TYK2* : I651I et T890T) ont été identifiés chacun dans une tumeur isolée. Ces variants n'étaient pas référencés comme polymorphismes dans les bases de données.

L'ensemble des variants identifiés dans nos tumeurs sont donc très probablement des polymorphismes rares encore non référencés dans les bases de données.

Aucune des mutations V617F ou L611S connues comme activatrices de *JAK2* n'a été retrouvée dans la série de tumeurs testées. Enfin, le polymorphisme rare P1104A ne semble pas être corrélé avec une sur-expression protéique de *TYK2*. De même, la variation N1108S de *JAK2* ne semble pas affecter son expression protéique par rapport aux foies non tumoraux.

Gène	Exon	Variant	Echantillon
<i>JAK1</i>	13	1941 C>T, R647R	867T
<i>JAK2</i>	25	3323 A>G, N1108S	769T
<i>TYK2</i>	13	1953 C>T, I651I	346T
	19	2670 G>C, T890T	574T
	23	3310 C>G, P1104A	364T / 769T

Tableau 2 – Variants de *JAK1*, *JAK2* et *TYK2* identifiés dans la série d'adénomes inflammatoires et d'hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques. L'exon dans lequel se trouve la mutation identifiée est indiqué dans la deuxième colonne. Tous ces variants ont été identifiés dans les échantillons indiqués dans la dernière colonne, ainsi que dans les foies non tumoraux correspondant.

DISCUSSION

Dans une première partie de ce travail, l'analyse transcriptomique globale des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques a permis d'identifier des gènes codant des interacteurs de l'inflammation et du système immunitaire comme étant différentiellement exprimés par rapport aux foies non tumoraux. La validation de l'expression d'une large série de gènes par RT-PCR quantitative, dans une série de différents types de tumeurs bénignes hépatiques, confirme les dérégulations observées par l'analyse microarray des hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques par rapport aux foies non tumoraux, et notamment la sur-expression spécifique des gènes codant pour les protéines de la phase aiguë de l'inflammation. De plus cette étude a montré que les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques et adénomes inflammatoires présentent les mêmes profils de dérégulation des gènes testés. Enfin, l'analyse immunohistochimique de l'une des protéines de la phase aiguë, SAA, particulièrement sur-exprimée lors des épisodes inflammatoires, montre le même profil de sur-expression dans les deux types de tumeurs, de manière homogène dans les hépatocytes.

L'ensemble de ces arguments confirme donc que les hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques font partie de la catégorie des adénomes hépatocellulaires, plus spécifiquement des adénomes inflammatoires, et devraient être considérées comme tels dans la prise en charge des patients.

Le deuxième objectif de ce travail était d'élucider les voies de carcinogenèse impliquées dans le développement des adénomes inflammatoires. Le caractère inflammatoire de ces lésions, ainsi que l'analyse des données transcriptomiques indiquent d'une manière générale une dérégulation des voies de l'inflammation dans ces tumeurs.

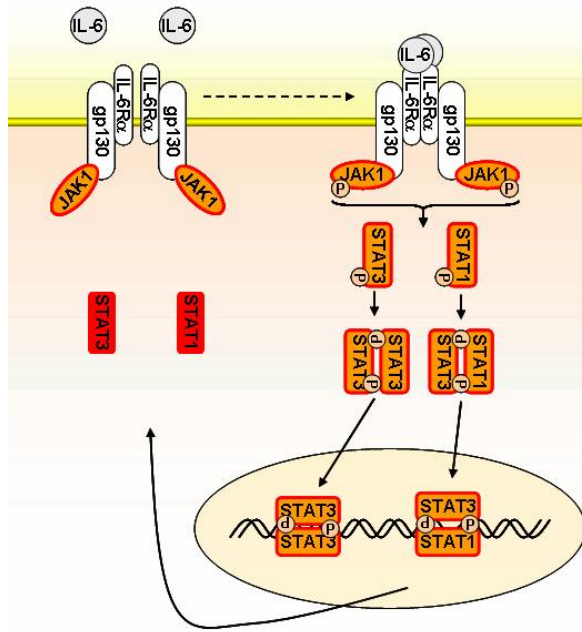
De nombreux cas d'association entre processus inflammatoire et tumorigenèse ont été décrits dans la littérature^{36, 39, 40}, bien que les relations précises entre les deux ne soient pas clairement établies. Dans certains cas, l'inflammation semble à l'origine du développement tumoral. L'épisode inflammatoire aigu initial peut ne pas être résolu, suite à des altérations des mécanismes de l'apoptose et/ou de la phagocytose des cellules inflammatoires présentes au site initial de la lésion. La mise en place d'un contexte d'inflammation chronique entraîne la persistance des dommages tissulaires et de la prolifération cellulaire, ainsi que l'accumulation de ROS (Reactive oxygen species) et de RNS (Reactive Nitrogen species). L'ensemble de ces événements, dans le contexte d'une inflammation chronique, peut contribuer à la création d'un micro-environnement propice au développement tumoral. L'inflammation se maintient après

l'initiation de la formation tumorale, générant des infiltrats intra- et péri-tumoraux, et contribue à sa progression. De plus, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent que les phénomènes d'inflammation chronique prédisposent à la formation et à la progression tumorale, comme par exemple dans le cas de l'infection par les virus des hépatites B et C et le développement des carcinomes hépatocellulaires³⁶.

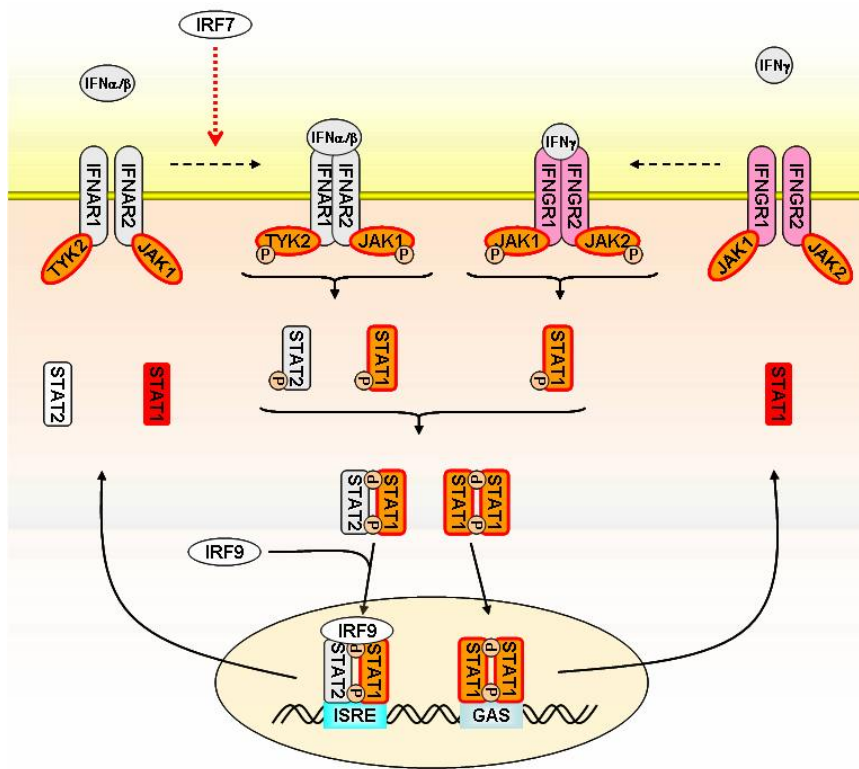
D'autre part, une migration des cellules du système immunitaire est souvent observée aux sites tumoraux, où elles participent à l'établissement d'un micro-environnement inflammatoire. Dans ce cas de figure, l'inflammation est secondaire à la formation tumorale, et consécutive à la sécrétion par les cellules tumorales de cytokines et chemokines, qui entraînent l'accumulation locale de cellules du système immunitaire^{36, 39, 40}.

L'analyse immunohistochimique des adénomes hépatocellulaires inflammatoires a révélé une expression spécifiquement hépatocytaire de l'une des protéines particulièrement sur-exprimée lors des épisodes d'inflammation aiguë, SAA²⁹. Le marquage homogène des hépatocytes au sein de la tumeur n'est pas associé à un renforcement local à proximité des infiltrats inflammatoires. Ceci suggère dans le cas de ces tumeurs que l'apparition des infiltrats inflammatoires ne serait pas à l'origine de la formation tumorale, mais plutôt secondaire à celle-ci.

L'analyse transcriptomique des adénomes hépatocellulaires inflammatoires indique, outre la sur-expression spécifique des gènes codant pour les protéines de la phase aiguë de l'inflammation, une sur-expression des gènes codant les facteurs de transcription STAT1 et STAT3. De plus, l'analyse qualitative des promoteurs des gènes différenciellement exprimés dans les adénomes inflammatoires par rapport aux foies non tumoraux suggère une sur-représentation des sites STAT3. Ces facteurs de transcription sont des médiateurs de la voie de transduction du signal JAK/STAT, voie de signalisation associée à tous les récepteurs cytokiniques³⁵. L'étude au niveau protéique de différents interacteurs de la voie JAK/STAT, JAK1, JAK2, TYK2, STAT1 et STAT3 a révélé une sur-expression de ces protéines, ainsi qu'une activation de JAK2, STAT1 et STAT3 dans certaines des tumeurs testées. Ces résultats indiquent une dérégulation de la voie JAK/STAT dans la plupart des adénomes inflammatoires.



A



B

Figure 11 – Représentation schématique simplifiée des dérégulations de la voie de signalisation JAK/STAT induite par l'interleukine 6 (A) ou par les interférons de type I (à gauche) et de type II (à droite) (B) dans les adénomes hépatocellulaires inflammatoires. Les sur-expressions validées en RT-PCR quantitative sont indiquées en rose, en rouge lorsqu'elles ont été validées en western blot. Les protéines dont la sur-expression n'a été observée qu'en western blot sont représentées en orange. Lorsqu'aucune dérégulation n'a été identifiée en RT-PCR quantitative ni en analyse western blot, les protéines sont indiquées en fond blanc. Les interacteurs de ces voies qui n'ont pas été testés en RT-PCR quantitative ou en western blot sont représentés en gris.

JAK1, STAT1 et STAT3 sont les médiateurs de la voie induite par l'IL-6^{32, 33}. Cette cytokine pro-inflammatoire a récemment été associée à la progression tumorale *in vitro* et *in vivo* dans certains cancers du colon^{41, 42}. De plus, l'activation constitutive de STAT3 en réponse à l'IL-6 a été associée à plusieurs types de tumeurs⁴³⁻⁴⁵. Par ailleurs, l'une des fonctions de cette cytokine est d'induire la sécrétion des protéines de la phase aigue par les hépatocytes^{32, 33}. Ces données concordent avec le phénotype et les altérations moléculaires observées dans les adénomes hépatocellulaires inflammatoires, et suggèrent une activation de la voie IL-6 dans ces tumeurs (fig. 11A). Par ailleurs, la sur-expression de JAK2 et de TYK2, ainsi que l'activation de JAK2 dans 6 des tumeurs testées suggèrent l'altération d'une autre voie que celle de l'IL-6, car le récepteur de cette dernière n'est associé qu'à la protéine JAK1.

JAK1, JAK2, TYK2 et STAT1 sont également impliqués dans les voies de signalisation induites par les interférons de type I, dont les interférons α et β (IFN α et IFN β), et de type II, c'est à dire l'interféron γ (IFN γ)^{34, 46, 47}. La sur-expression des gènes codant pour les sous-unités du récepteurs à l'IFN γ a été validée dans les adénomes inflammatoires par rapport aux foies non tumoraux. Les résultats obtenus autant au niveau du transcriptome que par l'étude de l'expression protéique suggèrent une activation de la voie de l'interféron γ dans certaines tumeurs (fig. 11B).

L'un des rôles de l'IFN γ est la régulation de l'expression des gènes du complexe HLA, gènes également sur-exprimés dans les adénomes inflammatoires par rapport aux foies non tumoraux, via l'activation du facteur de transcription NF- κ B⁴⁶. L'analyse des données de la série de validation par RT-PCR quantitative suggère qu'une partie des adénomes inflammatoires présentent une dérégulation de cette voie. NF- κ B contrôle entre autres l'expression de gènes impliqués dans la régulation du système immunitaire, l'inflammation, la survie et la prolifération cellulaire^{30, 31}. Les altérations de la voie NF- κ B sont fréquemment associées aux processus de tumorigenèse⁴⁸⁻⁵⁰, et son activation ectopique a été associée à différentes pathologies inflammatoires. De plus, il a récemment été montré que l'activation de la voie NF- κ B pouvait être induite par une activation de STAT3 dans des lignées cellulaires issues de cancer de la prostate et cancer du sein⁵¹. L'ensemble de ces données suggère que l'activation du facteur NF- κ B dans les adénomes inflammatoires pourrait être impliquée dans les processus de tumorigenèse de certaines de ces tumeurs, éventuellement en réponse à l'activation du facteur de transcription STAT3.

La sur-expression des gènes codant les protéines de la phase aigue est une caractéristique commune à tous les adénomes inflammatoires, qui définit cette entité. Cependant, les profils d'expression des gènes codant les médiateurs des voies JAK/STAT et de la voie NF- κ B ne sont pas identiques dans toutes les tumeurs, suggérant l'existence de différents types de dérégulations au sein des adénomes inflammatoires. Les différents éléments rassemblés dans cette étude semblent donc indiquer d'une part une activation de la voie de l'interleukine 6, commune à toutes les tumeurs, et d'autre part une altération de la voie NF- κ B restreinte à un sous-groupe d'adénomes inflammatoires. Le niveau d'altération de ces deux voies reste cependant à préciser.

D'une manière générale, les cellules inflammatoires présentes au site tumoral peuvent être impliquées dans les mécanismes d'échappement au système immunitaire des tumeurs. De plus, dans certains cas, elles peuvent aussi jouer un rôle plus direct en facilitant la prolifération tumorale, l'angiogenèse, l'invasion et, à terme, les processus métastatiques de part la sécrétion de facteurs de croissance et pro-angiogéniques, ou en induisant d'autres molécules effectrices, telles que le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) ou l'interleukine 6^{36, 39, 40}. Les malformations vasculaires importantes observées au niveau des adénomes inflammatoires suggèrent une altération des processus de l'angiogenèse.

Le phénotype des adénomes inflammatoires ainsi que les résultats transcriptomiques préliminaires nous ont conduit à étudier les voies de l'inflammation afin d'en caractériser les altérations. Cependant, la tumorigenèse est un processus multi-étapes, et d'autres voies de carcinogenèse restent à identifier. Nous allons donc poursuivre ce projet en affinant l'étude des différentes voies potentiellement impliquées, en particulier celle de l'angiogenèse.

REMERCIEMENTS

Je remercie le Docteur Marco Giovannini de m'avoir accueillie au sein de son unité.

Je tiens à remercier le Docteur Jessica Zucman-Rossi, qui m'a donné l'opportunité de travailler sur un sujet aussi captivant. Je la remercie tout particulièrement pour la qualité de son encadrement, son support constant, sa confiance, sa patience, son dynamisme et sa disponibilité. (et son canapé !)

Mes remerciements vont également aux chirurgiens et anatomopathologistes qui nous ont fournis les échantillons tumoraux et les renseignements cliniques des patients. Merci en particulier à Charles Balabaud et Paulette Bioulac-Sage.

Je souhaite par ailleurs remercier Sandra Rebouissou pour sa gentillesse, son aide et sa patience, Sandrine Boyault pour son dynamisme et ses conseils, Gabrielle Couchy et Emmanuelle Jeannot pour leurs conseils et leur soutien, ainsi que Lucille Mellotée et Karine Poussin pour leur sympathie. D'une manière générale, je les remercie toutes de leur accueil et leur bonne humeur, et pour les nombreuses discussions techniques et scientifiques (et moins scientifiques).

Je tiens enfin à adresser mes remerciements aux membres de l'U674 et du CEPH, avec qui mes rapports furent aussi divers qu'enrichissants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rooks JB, Ory HW, Ishak KG, Strauss LT, Greenspan JR, Hill AP, Tyler CW, Jr. Epidemiology of hepatocellular adenoma. The role of oral contraceptive use. *Jama* 1979;242:644-8.
2. Grazioli L, Federle MP, Brancatelli G, Ichikawa T, Olivetti L, Blachar A. Hepatic adenomas: imaging and pathologic findings. *Radiographics* 2001;21:877-92; discussion 892-4.
3. Edmondson HA, Henderson B, Benton B. Liver-cell adenomas associated with use of oral contraceptives. *N Engl J Med* 1976;294:470-2.
4. Reddy KR, Kligerman S, Levi J, Livingstone A, Molina E, Franceschi D, Badalamenti S, Jeffers L, Tzakis A, Schiff ER. Benign and solid tumors of the liver: relationship to sex, age, size of tumors, and outcome. *Am Surg* 2001;67:173-8.
5. Flejou JF, Barge J, Menu Y, Degott C, Bismuth H, Potet F, Benhamou JP. Liver adenomatosis. An entity distinct from liver adenoma? *Gastroenterology* 1985;89:1132-8.
6. Ferrell L. Liver pathology: cirrhosis, hepatitis, and primary liver tumors. Update and diagnostic problems. *Mod Pathol* 2000;13:679-704.
7. Foster JH, Berman MM. The malignant transformation of liver cell adenomas. *Arch Surg* 1994;129:712-7.
8. Ferrell LD. Hepatocellular carcinoma arising in a focus of multilobular adenoma. A case report. *Am J Surg Pathol* 1993;17:525-9.
9. Paradis V, Laurent A, Flejou JF, Vidaud M, Bedossa P. Evidence for the polyclonal nature of focal nodular hyperplasia of the liver by the study of X-chromosome inactivation. *Hepatology* 1997;26:891-5.
10. Bioulac-Sage P, Rebouissou S, Sa Cunha A, Jeannot E, Lepreux S, Blanc JF, Blanche H, Le Bail B, Saric J, Laurent-Puig P, Balabaud C, Zucman-Rossi J. Clinical, morphologic, and molecular features defining so-called telangiectatic focal nodular hyperplasias of the liver. *Gastroenterology* 2005;128:1211-8.
11. Chen YW, Jeng YM, Yeh SH, Chen PJ. P53 gene and Wnt signaling in benign neoplasms: beta-catenin mutations in hepatic adenoma but not in focal nodular hyperplasia. *Hepatology* 2002;36:927-35.
12. Zucman-Rossi J, Jeannot E, Nhieu JT, Scoazec JY, Guettier C, Rebouissou S, Bacq Y, Leteurtre E, Paradis V, Michalak S, Wendum D, Chiche L, Fabre M, Mellottee L, Laurent C, Partensky C, Castaing D, Zafrani ES, Laurent-Puig P, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. *Hepatology* 2006;43:515-24.
13. Takayasu H, Motoi T, Kanamori Y, Kitano Y, Nakanishi H, Tange T, Nakagawara A, Hashizume K. Two case reports of childhood liver cell adenomas harboring beta-catenin abnormalities. *Hum Pathol* 2002;33:852-5.
14. Wanless IR, Mawdsley C, Adams R. On the pathogenesis of focal nodular hyperplasia of the liver. *Hepatology* 1985;5:1194-200.
15. Mathieu D, Kobeiter H, Maison P, Rahmouni A, Cherqui D, Zafrani ES, Dhumeaux D. Oral contraceptive use and focal nodular hyperplasia of the liver. *Gastroenterology* 2000;118:560-4.
16. Sadowski DC, Lee SS, Wanless IR, Kelly JK, Heathcote EJ. Progressive type of focal nodular hyperplasia characterized by multiple tumors and recurrence. *Hepatology* 1995;21:970-5.

17. Kaji K, Kaneko S, Matsushita E, Kobayashi K, Matsui O, Nakanuma Y. A case of progressive multiple focal nodular hyperplasia with alteration of imaging studies. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2568-72.
18. Gaffey MJ, Iezzoni JC, Weiss LM. Clonal analysis of focal nodular hyperplasia of the liver. *Am J Pathol* 1996;148:1089-96.
19. Chen TC, Chou TB, Ng KF, Hsieh LL, Chou YH. Hepatocellular carcinoma associated with focal nodular hyperplasia. Report of a case with clonal analysis. *Virchows Arch* 2001;438:408-11.
20. Wanless IR, Albrecht S, Bilbao J, Frei JV, Heathcote EJ, Roberts EA, Chiasson D. Multiple focal nodular hyperplasia of the liver associated with vascular malformations of various organs and neoplasia of the brain: a new syndrome. *Mod Pathol* 1989;2:456-62.
21. Oligny LL, Lough J. Hepatic sinusoidal ectasia. *Hum Pathol* 1992;23:953-6.
22. Lepreux S, Laurent C, Le Bail B, Saric J, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Multiple telangiectatic focal nodular hyperplasia: vascular abnormalities. *Virchows Arch* 2003;442:226-30.
23. Nguyen BN, Flejou JF, Terris B, Belghiti J, Degott C. Focal nodular hyperplasia of the liver: a comprehensive pathologic study of 305 lesions and recognition of new histologic forms. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1441-54.
24. Paradis V, Benzekri A, Dargere D, Bieche I, Laurendeau I, Vilgrain V, Belghiti J, Vidaud M, Degott C, Bedossa P. Telangiectatic focal nodular hyperplasia: a variant of hepatocellular adenoma. *Gastroenterology* 2004;126:1323-9.
25. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 1991;19:4008.
26. Graudens E, Boulanger V, Mollard C, Mariage-Samson R, Barlet X, Gremy G, Couillaud C, Lajemi M, Piatier-Tonneau D, Zaborski P, Eveno E, Auffray C, Imbeaud S. Deciphering cellular states of innate tumor drug responses. *Genome Biol* 2006;7:R19.
27. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7276-80.
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
29. Jensen LE, Whitehead AS. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochem J* 1998;334 (Pt 3):489-503.
30. Lin X, Mu Y, Cunningham ET, Jr., Marcu KB, Geleziunas R, Greene WC. Molecular determinants of NF-kappaB-inducing kinase action. *Mol Cell Biol* 1998;18:5899-907.
31. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-60.
32. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1-20.
33. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;334 (Pt 2):297-314.
34. Plataniias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 2005;5:375-86.

35. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2003;3:900-11.
36. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Mol Cancer Res* 2006.
37. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779-90.
38. Kratz CP, Boll S, Kontny U, Schrappe M, Niemeyer CM, Stanulla M. Mutational screen reveals a novel JAK2 mutation, L611S, in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2006;20:381-3.
39. Rollins BJ. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur J Cancer* 2006;42:760-7.
40. van Kempen LC, de Visser KE, Coussens LM. Inflammation, proteases and cancer. *Eur J Cancer* 2006;42:728-34.
41. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 2004;21:491-501.
42. Schneider MR, Hoeflich A, Fischer JR, Wolf E, Sordat B, Lahm H. Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 2000;151:31-8.
43. Bromberg J, Darnell JE, Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000;19:2468-73.
44. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;19:2474-88.
45. Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:2502-12.
46. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163-89.
47. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2005;23:307-36.
48. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2:301-10.
49. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005;5:749-59.
50. Arsur M, Cavin LG. Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 2005;229:157-69.
51. Nadiminty N, Lou W, Lee SO, Lin X, Trump DL, Gao AC. Stat3 activation of NF- κ B p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7264-9.