République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abbès Laghrour-khenchela

Faculté des Sciences de la Nature et de Vie

Département : Biologie Moléculaire et Cellulaire

MEMOIRE

Pour l'Obtention du Diplôme de ***Master***

FILIERE : *Biologie*

Option : *Génétique*

THEME

Réponse de certaines lignées de carcinomes hépatocellulaires

aux agents alkylants utilisé en chimiothérapie (Cisplatine) .

Présentés par :
M^lle ABABSA Rayen
M^lle Merghad Tiba

Setenue publiquement le 15 /09/2020

Devant le Jury :

- **Encadreur : Dr FERROUDJ Sana** — **Université de khenchela**
- **Président(e) : Dr YAHIA Massinissa** — **Université de khenchela**
- **Examinateur : Dr HALASSI Ismahan** — **Université de khenchela**

Année Universitaire 2019/2020

Remerciements

N'est pas reconnaissant envers Dieu, celui qui n'est pas reconnaissant envers les gens. Nous tenons ici à adresser nos remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Pour l'honneur qu'ils nous font, nous remercient **Dr *HALASSI Ismahen*** et **Dr *YAHIA Massinissa*** d'avoir consacrés du temps pour juger ce travail.

Qu'ils soient assurés de notre estime et de notre reconnaissance.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à notre encadreur : ***Dr FERROUDJ Sana*** *pour son suivi, sa disponibilité et ses orientations.*

Nous remercions chaleureusement et avec gratitude nos enseignants de Département de Biologie moléculaire et Cellulaire

Enfin, un grand merci à nos familles de nous avoir soutenus pendant notre cursus universitaire.

ABABSA Rayen

Merghad Tiba

Dédicaces

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que :

*Je dédie cette thèse de **MASTER** à :*

***A Ma tendre Mère Fatma** :*

Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

***A Mon très cher Père Salah** :*

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.

*A mes chers beaux frères : **islam** et **Aymen***

*A mes chère belle sœurs : **Racha** et **Ritadj***

*à ma grande mére **Roza** et mes tantes **Beldia** et **Djamaa** ;à mes belles cuisines **Khawla** ; **wafa** ;**Sarah** ; **djihane** et toute ma famille.*

*À mon binôme **Tiba** et ma chére amie **Mouna***

*A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études. et notamment mon encadreur **Dr Ferroudj Sana***

Et tous ceux que j'ai connus et aimés.

ABABSA RAYEN

Listes des figures :

-Figure 1. Incidence et mortalité du cancer du foie, dans le monde, tous sexes confondus**.....05**

-Figure 2. Incidence du cancer du foie dans le monde en 2018, taux standardisés selon l'âge**……..06**

-Figure 3. Distribution selon le sexe, des taux d'incidence (standardisés selon l'âge), dans le monde en 2018**……...07**

-Figure 4. Estimation des taux d'incidence et de mortalité, dans le monde en 2018 (standardisés selon l'âge), tous sexes confondus. **……..…….....08**

-Figure 5. L'hépatocarcinogenèse induite par le VHB**…….…..…10**

-Figure6.Hépatocarcinogenèse : un processus multi-étapes**…….……...14**

-Figure 7 . Progression histopathologique du foie sain vers le CHC**……....15**

-Figure 8. Les voies de signalisation altérées dans l'hépatocarcinogenèse**……..……18**

-Figure 09: La voie Wnt /β-caténine**…….20**

-Figure10 : Altérations géniques dans les HCC(FU et*al.,*2002) **…….…..23**

-Figure 11 : Barcelone-ClinicLiver Cancer (BCLC) classement de la mise en scène et le calendrier de traitement (LIOVET et *al*., 2008**)……..….25**

Figure12: concept thérapeutique des HCC(LIOVET et *al*., 2008**)…….25**

-Figure 13. Différentes structures d'agents alkylants**…….……..…..27**

-Figure 14. Exemples de nitroso-urées**……..……..28**

-Figure 15. Exemple de sels de platine**…….……....29**

-Figure 16. Structuredusulfuredebis-(2-chloroéthyle)(ypérite)**……..……...29**

-Figure 17. StructuredelaChlorméthine(Caryolysine®)**……..30**

-Figure 18. StructureduCyclophosphamide(Endoxan®)**…….…30**

-Figure 19. le métabolite majeur du chlorambucil**…….……..31**

-Figure 20. Réaction chimique entre un nucléophile et un électrophile, formation d'une liaison covalente**……32**

-Figure 21. Interactions monoou bivalentes produites par les agents alkylants**…….....32**

-Figure 22. Sites d'interaction à l'ADN de différents agents alkylants. Les agents surlignés en jaune sont en essais cliniques**……..…….33**

-Figure 23. Structure chimique de cisplatine**…….…..…..35**

-Figure 24. Hydrolyse du cisplatine**…….…..…..36**

-Figure 25. Modes de fixation du cisplatine sur l'ADN**…….……....36**

-Figure 26. représentations 2D et 3D de la structure d'un adduit cisplatine-dodécamère**……..……37**

-Figure 27. Nature des adduits bifonctionnels du cisplatine formés avec l'ADN**……...39**

-Figure 28. Structure du glutathion**…….…....41**

-Figure 29 . Effet du Cisplatine sur la prolifération des cellules de la lignée cancéreuse Hep3B**……...……46**

-Figure30 . Effet du Cisplatine sur la prolifération des cellules de la lignée cancéreuse Snu449 **……..……...47**

-Figure31. Effet du Cisplatine sur la prolifération des cellules de la lignée cancéreuse Huh7 **……...49**

Tableaux

-Tableaux 1. Caractérisation des adduits du cisplatine**……..…..16**

-Tableaux 2.Récapitulatif des aberrations chromosomiques et des gènes cibles dans le CHC**……..……17**

-Tableaux3.Résumé des études de séquençage à haut débit de cancer du foie**…….40**

-Tableau04. Les moyennes des DO obtenues et la normalisation des percentages de vie de Hep3B calculé par Excel **……46**

-Tableau05. Les moyennes des DO obtenues et la normalisation des percentages de vie de Snu449 calculé par Excel **……..…….47**

-Tableau06. Les moyennes des DO obtenues et la normalisation des percentages de vie de Huh7 calculé par Excel **……..……48**

-Tableau07. Les valeurs des IC50 et la résistance relative des deux phénotypes des lignées cellulaires d'hépatocarcinomes testées et comparées à Huh7**…….…..50**

Liste des abréviation

AFP : Alpha-fœtoprotéine

APC : cellule présentatrice d'antigène

ARN : Acide Ribo Nucléique

ASMR : Age Standardized Mortality Rate

ATM : : Ataxia Telangectasia Mutated

CDKN2A : inhibiteur de kinase 2A dépendant de la cycline,

CHC : carcinome hépatocellulaire

C-MYC : Le proto-oncogène ; un facteur de transcription

CTL: lymphocytes T-cytotoxique

DNA : acide désoxyribonucléique,

FB1 : l'aflatoxine B1

JFH1 : L'hépatite fulminante japonais 1

GSH :Glutathion

IARC : International Agency for Research on Cancer

IL-6 : d'interleukine 6

IMC : L'indice de masse corporelle

LDRL : Low Density Lipo protein Receptor

LEF: lymphoid enhancer factor

LRP : low-density lipoprotein receptor-related protein

MMPs : La production des métalloprotéases matricielles

NAFLD : non alcoholic fatty liver disease

NASH : la stéato-hépatite non alcoolique

NGS : Next-generation sequencing

ORFS : open reading frame

P16 : gène suppresseur de tumeurs

RAS : un proto-oncogéne

RB1 : rétinoblastome RB1

RE : le réticulum endoplasmique

ROS: reactive oxygen species

SRBI: humans cavenger receptor class B type I

TEM : La transition épithélio-mésenchymateuse

TGF- β : Transforming Growth Factor Bêta

TH : lymphocytes T-helper

TP 53 : gène suppresseur de tumeur (Protein p53)

TCF : T-cell factor

LEF : factor/lymphoid enhancer factor

VHB : Le virus de l'hépatite B

VHC : Le virus de l'hépatite C

WNT : dérive du nom de ses deux orthologues « wingless », identifié chez la drosophile et « int-1 » chez la souris

SOMMAIRE

-LISTE DES FIGURES

-LISTE DES TABLEAUX

-LISTE DES ABREVIATION

- INTRODUCTION……2

-CHAPITRE01-CARCINOMES HEPATOCELLULAIRES

1 EPIDEMIOLOGIE 4

1.1 INCIDENCE 4
1.2 REPARTITION GEOGRAPHIQUE 5
1.3 AGE 6
1.4 SEXE 6
1.5 MORTALITE 7

2- LES FACTEURS DE RISQUE 8

2.1 LE VIRUS DE L' HEPATITE B 9
2.2 L'AFLATOXINEB1 10
2.3 LE VIRUS DE L' HEPATITE C VHC 11
2.4 LA CONSOMMATION EXCESSIVE D'ALCOOL 11
2.5 LES STEATOHEPATITES NON ALCOOLIQUES 12
2.5.1 complication majeure de la NASH 12
2.6 L'HEMOCHROMATOSE PRIMITIVE : 13

3 MECANISME DE L'HEPATO-CARCINOGENESE : 13

4 CLASSIFICATION MOLECULAIRE DES CARCINOMES HEPATOCELLULAIRES : 15

4.1 ALTERATIONS CHROMOSOMIQUES 15
4.2 MUTATIONS D'ONCOGENES ET DES GENES SUPPRESSEURS DE TUMEUR DANS LES CHC 17
4.2.1 Les mutations TP53 : 19
4.2.2 β−caténine et la voie Wnt 19
4.2.3 Retinoblastoma et les acteurs du cycle cellulaire 21
4.2.4 Voie TGF-bêta 22
4.2.5 Oncogènes ras et myc 22
4.2.5.1 C-Myc Le proto-oncogène : 22
4.2.5.2 Activation de la voie Ras 22

5 TRAITEMENT : 24

-CHAPITRE02-AGENTS ALKYLALTS

1 DEFINITION 27

2 DIFFERENTS AGENTS ALKYLANTS 28

2.1 *LES NITROSO-UREES* 28

2.2 *LES SELS DE PLATINE* 29
2.3 MOUTARDES A L'AZOTE 29
2.3.1 Chlorméthine 30
2.3.2 Cyclophosphamide 30
2.3.3 Le chlorambucil 31
3 MODE D'ACTION 31
4 LE CISPLATINE 33
4.1 HISTORIQUE 33
4.2 STRUCTURE CHIMIQUE 34
4.3 CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES 35
4.4 MECANISME D'ACTION 35
4.5 LESIONS DU CISPLATINE 37
4.5.1 Les adduits monofonctionnels 38
4.5.2 Les adduits bifonctionnels 38
4.6 MECANISMES DE RESISTANCE AU CISPLATINE. 40

-CHAPITRE03-MATERIEL ET METHODES

1 MATERIEL ET METHODES : 43
1.1 LIGNEES ET CULTURES CELLULAIRES : 43
2 TEST DE CYTOTOXICITE 43
2.1 TRAITEMENT DES CELLULES PAR LE CISPLATINE 43
2.2 EVALUATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE AU BLEU DE METHYLENE 44
3 RESULTATS 46
3.1 ANALYSE DES DONNEES 46
3.1.1 Effet du Cis-platine sur les différentes lignées de carcinomes hépatocellulaires. 46
3.2 PROFIL DE LA RESISTANCE DES CELLULES DU CHC AU CISPLATINE 49
4 DISCUSSION 52
- CONCLUSION……53
- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES……..55
- RESUME……..75

INTRODUCTION

Introduction

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la principale tumeur maligne primitive du foie (80 à 90 % des tumeurs hépatiques). Elle représente la cinquième tumeur la plus fréquente dans le monde en nombre de cas (5,4 % des nouveaux cas de cancer) et la quatrième en termes de mortalité (8,2 % des décès par cancer) . Il survient dans 90% des cas sur une cirrhose qui est un véritable état précancéreux, dont les étiologies sont représentées par l'hépatite virale B et C dans 80% des cas, l'alcoolisme, rarement sur une hémochromatose ou cirrhose biliaire primitive, sans oublier d'autres facteurs de risque de survenue de CHC en association avec les hépatites virales : comme le diabète, l'obésité, le tabac, et les carcinogènes chimiques(aflatoxine B1). Le CHC est une des tumeurs malignes la plus meurtrière et pour laquelle les options thérapeutiques sont limitées lorsque la maladie est diagnostiquée à un stade avancé. Généralement développé dans un contexte d'hépatopathie chronique, le plus souvent cirrhotique, il présente un mauvais pronostic, en partie du fait de sa forte résistance aux agents chimio-thérapeutiques.

La chimiothérapie anticancéreuse est basée sur l'administration de médicaments ayant le pouvoir d'entraver la prolifération des cellules tumorales en induisant leur apoptose. La majorité des traitements anticancéreux doivent leur efficacité à leur capacité d'endommager l'ADN. En effet, les cellules qui ne réparent pas efficacement ces dommages accumulent des lésions au niveau de leur ADN et meurent au moment de la division cellulaire. Les agents alkylants tels que les nitrosourés, les triazines et les sels de platine. constituent une classe importante de chimiothérapies de première ligne qui infligent des dommages à l'ADN. Ces composés électrophiles transfèrent de façon covalente un groupe alkyle au niveau des bases de l'ADN ***(Helleday et al., 2008)***.

Notre attention a été focalisée sur l'étude de la réponse de certaines lignées de carcinomes hépatocellulaires au Cis-platine. Ce manuscrit est organisé en trois parties. La première partie, composée de deux chapitre, est consacrées à l'étude bibliographique. A la suite de cette étude bibliographique et vu le contexte dela pandémie de coronavirus-19, on s'est limité dans la partie matériel et méthodes par l'analyse de données fournis par notre encadreur pour l'évaluation par le test de cytotoxicité de l'effet du Cis-platine sur la viabilité

cellulaires de trois lignées de carcinome hépatocellulaire. Dans la troisième partie , nous présentrons les résultats obtenus et terminerons par une discussion générale et une conclusion.

Chapitre01 :Le carcinome hépatocellulaire

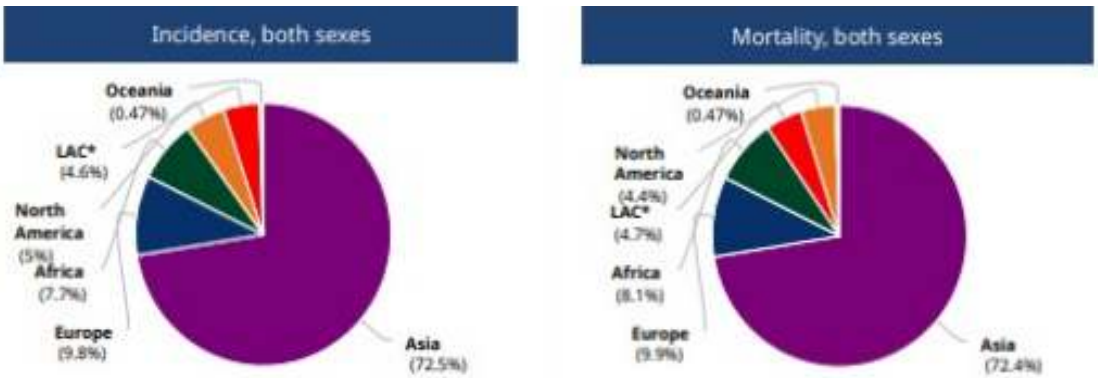
Le carcinome hépatocellulaire(CHC)

La carcinogénèse hépatique définie, en général, différents types de tumeurs telles que l'hépatoblastome de l'enfant (développé à partir des cellules embryonnaires du foie), le carcinome hépatocellulaire (CHC), (développé à partir des hépatocytes), le cholangiocarcinome (qui se développe à partir des cellules des voies biliaires) et l'angiosarcome (développé à partir des cellules des vaisseaux hépatiques). Le CHC, représente la forme majoritaire des tumeurs primitives du foie (80 à 90 %). Il se développe habituellement sur une cirrhose (75 à 80% des cas), plus rarement sur une hépatopathie chronique non cirrhotique, exceptionnellement sur un foie sain. En cas de cirrhose, il existe donc un cancer, un état précancéreux et une fonction hépatique précaire, particularités qui conditionnent le pronostic et la démarche thérapeutique **(Ferroudj., 2017).**

1 Epidémiologie

1.1 Incidence

Les nouveaux cas de cancers hépatiques sont de 841 080 en 2018 alors qu'en 2012 ils étaient estimés à environ 782500**(GLOBOCAN., 2018 ; Torre et al ., 2012)**(figure1) .Selonl'International Agency for Research on Cancer (IARC), l'incidence du cancer h épatique la plus élevée est en Asie suivie par l'Europe qui a compté 82 466 nouveaux cas en 2018 **(GLOBOCAN., 2018)**. l'incidence a augmenté au cours des 20 dernières années. Cela peut être lié à plusieurs facteurs et notamment l'augmentation du nombre de cas atteints par le virus de l'hépatite C (VHC), l'amélioration des méthodes diagnostiques, le progrès dans la prise en charge des autres complications de la cirrhose, l'augmentation de la consommation d'alcool mais aussi la prévalence de l'obésité et du diabète (https://www.snfge.org/content/7-carcinome-hepatocellulaire-cancer-primitifdu-foie).



Population	Number
Asia	609 596
Europe	82 466
Africa	64 779
North America	41 851
*Latin America and the Carribean	38 400
Oceania	3 988
Total	841 080

Population	Number
Asia	566 269
Europe	77 375
Africa	63 562
*Latin America and the Carribean	36 436
North America	34 339
Oceania	3 650
Total	781 631

Figure 1 : Incidence et mortalité du cancer du foie, dans le monde, tous sexes confondus.Source: International Agency for Research on Cancer/World HealthOrganization. GLOBOCAN 2018: Liver Cancer, estimated incidence, mortality and prevalenceWorldwide [Internet]. [Cited 2018 Sep 27]. Availablefrom: http://gco.iarc.fr/today/home/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf

1.2 Répartition géographique

Le CHC est prévalent surtout dans les pays asiatiques et africains (>20 cas par 100,000habitants). Le Sud et l'Est de l'Europe ainsi que l'Amérique du Nord ont une incidencemoyenne (10–15 cas par 100,000 habitants). Alors que les pays de l'Europe sont àfaibles risques (<10 cas par 100,000 habitants) (figure 2) **(GLOBOCAN., 2018).**

La distribution géographique dépend beaucoup de la distribution des facteurs de risque. Levirus de l'hépatite B (VHB) et l'aflatoxine sont surtout prédominant en Asie orientale etAfrique sub-saharienne. Par contre le VHC est le premier facteur de risque aux Etats Unis(30-50%), Europe (44-75%) et Japon (80-90%) **(Rawla et al., 2018 ; Tang et al. ,2018).**

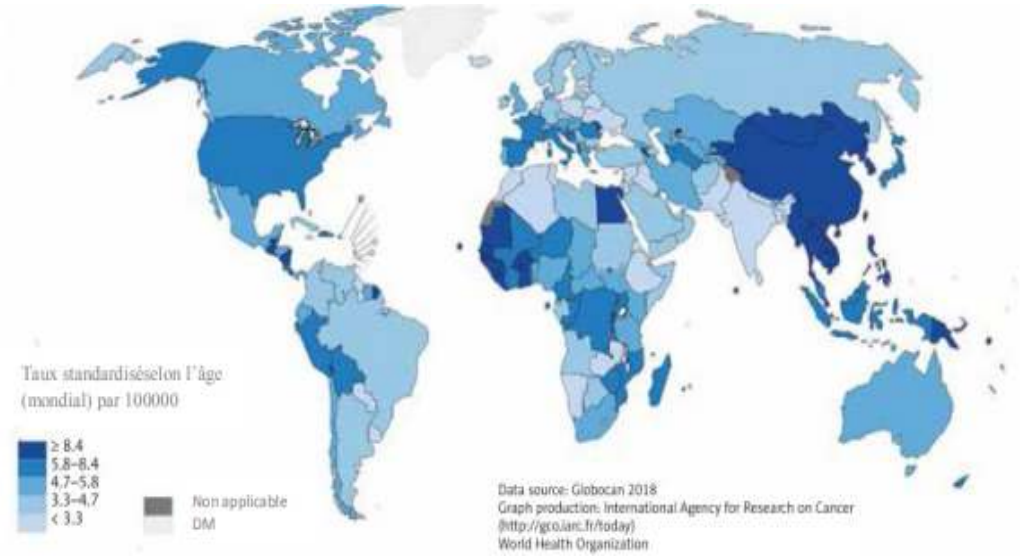


Figure 2 : Incidence du cancer du foie dans le monde en 2018, taux standardisés selon l'âge.

Source: International Agency for Research on Cancer/World HealthOrganization. GLOBOCAN 2018: Estimatedage-standardized rates (World) of incident cases/deaths, both sexes, liver cancer, worldwide [Internet]. [Cited 2018 Sep 27]. Availablefrom: http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map

1.3 Age

Le CHC peut apparaitre à tout âge mais il est rarement diagnostiqué avant 40-50 ans. La répartition mondiale du CHC par âge varie selon les régions, le sexe et, éventuellement, l'étiologie. Dans les populations à faible risque, les taux les plus élevés par âge sont observés après 75 ans. En revanche, dans les pays à haut risque de CHC, les taux d'incidence, par âge, augmentent jusqu'à 45 ans, puis se stabilisent **(Tang et al .,2018 ; Ozakyol .,2017).**

1.4 Sexe

La différence d'incidence du CHC entre les 2 sexes existe dans presque tous les pays (figure 3). Les hommes présentent un taux d'incidence 2 à 4 fois plus élevé que chez les femmes. Les raisons de cette différence sont encore mal connues mais peuvent en partie être expliquées par la prévalence de certains facteurs de risque selon le sexe mais aussi par les différences au niveau des hormones sexuelles, de l'épigénétique ou de la réponse immunitaire, l'infection chronique par le VHB et le VHC est plus fréquente chez les hommes que chez les femmes, de même que la consommation excessive d'alcool, le tabagisme ou les

taux sériques en fer plus élevés. En revanche, les œstrogènes pourraient limiter la transformation maligne des hépatocytes en régulant négativement la libération d'interleukine 6 (IL-6) par les cellules de Kupffer. De plus, les œstrogènes pourraient jouer un rôle protecteur contre la progression des infections à VHB en diminuant la transcription et les effets inflammatoires du VHB grâce aux cytokines. Cependant, toutes ces données n'expliquent pas complètement les différences observées entre les sexes et doivent être confirmées **(Tang et al .,2018 ; Ozakyol. ,2017).**

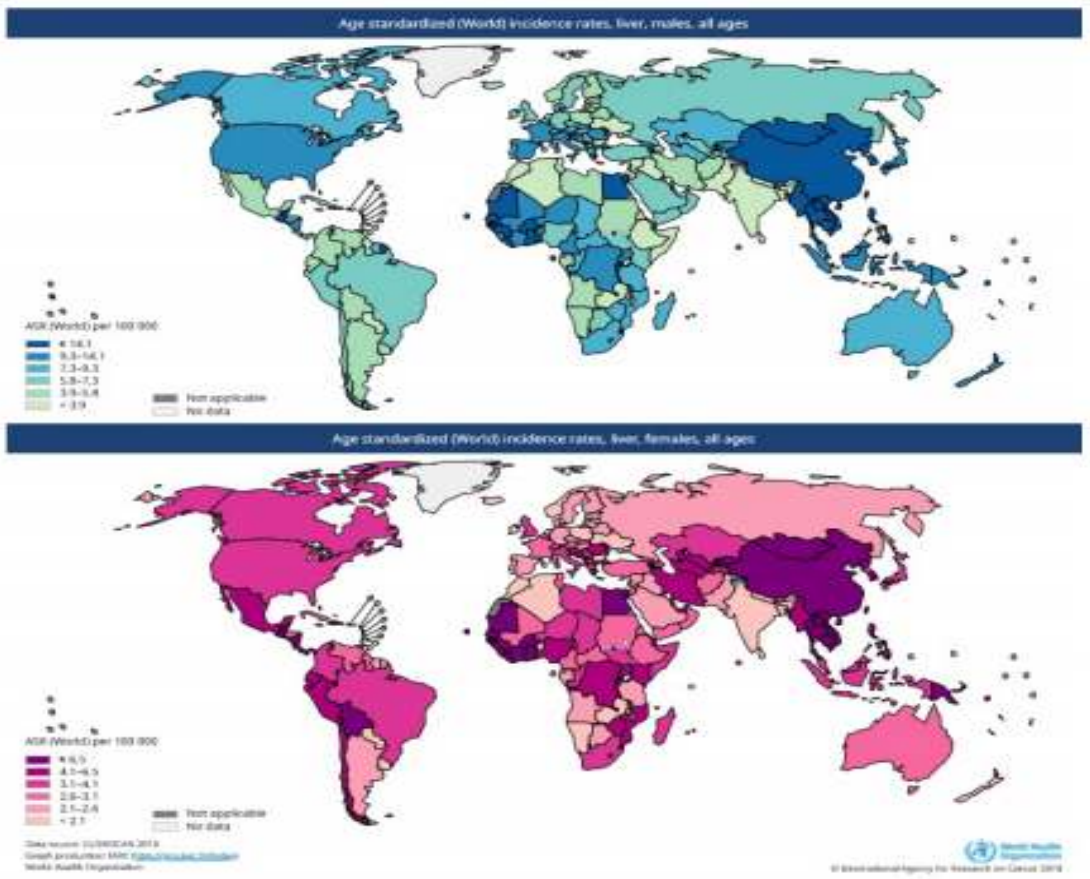


Figure 3 : Distribution selon le sexe, des taux d'incidence (standardisés selon l'âge), dans le monde en 2018.

Source: International Agency for Research on Cancer/World HealthOrganization. GLOBOCAN 2018: Liver Cancer, estimated incidence, mortality and prevalenceWorldwide [Internet]. [Cited 2018 Sep 27]. Availablefrom: www.gco.iarc.fr/today/home/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf

1.5 Mortalité

Les décès par cancer hépatique sont de 781 631 personnes en 2018 alors qu'en 2012 étaient estimés à environ 745 500 **(GLOBOCAN., 2018)**.

(figure 1). Selon l'IARC, les décès par cancer hépatique en Europe sont de 77 375 personnes en 2018 **(GLOBOCAN., 2018)**. Les taux de mortalité standardisés selon l'âge (ASMR : Age StandardizedMortality Rate) du cancer du foie en 2018 étaient les plus élevés en Asie orientale (16,0) et en Afrique du Nord (13,9), suivis de l'Asie du Sud-est (13,2) et de la Micronésie (12,0). L'ASMR le plus faible a 6 été observé en Asie Centrale du Sud (2,3), suivi de l'Europe du Nord, centrale, et orientale et de l'Asie occidentale (environ 3,8 à 4,0) (figure 4) **(GLOBOCAN., 2018).**

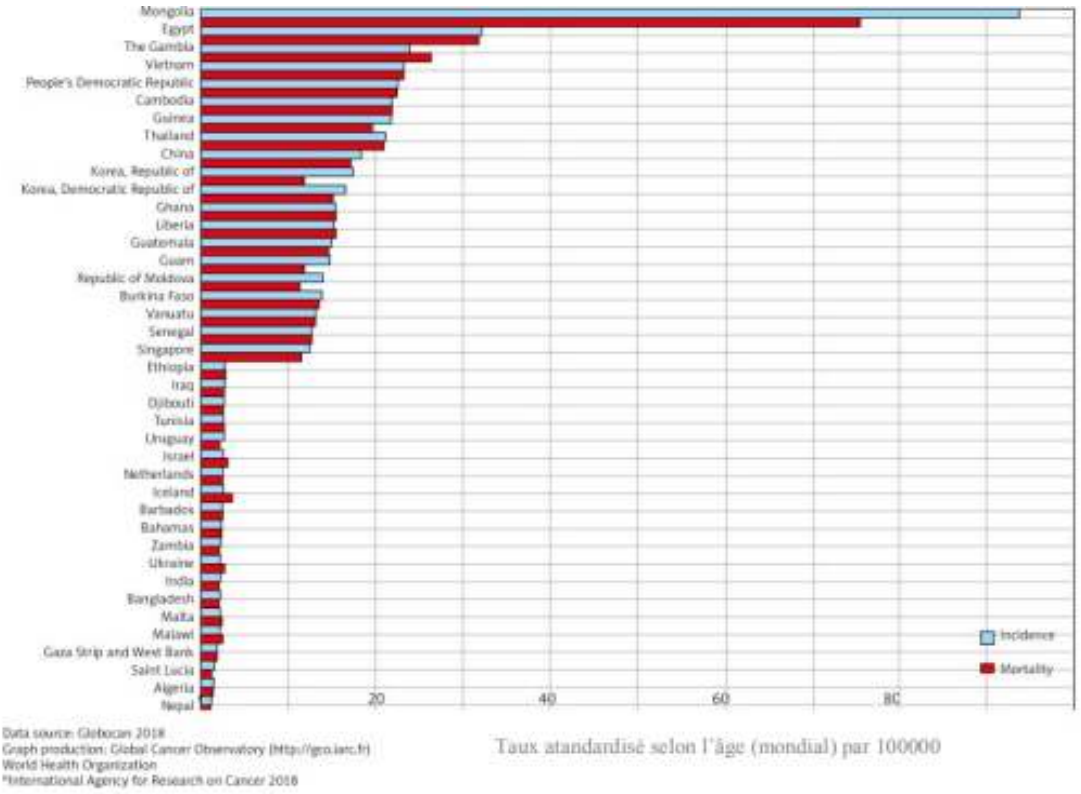


Figure 4 : Estimation des taux d'incidence et de mortalité, dans le monde en 2018 (standardisés selon l'âge), tous sexes confondus.

2- Les facteurs de risque

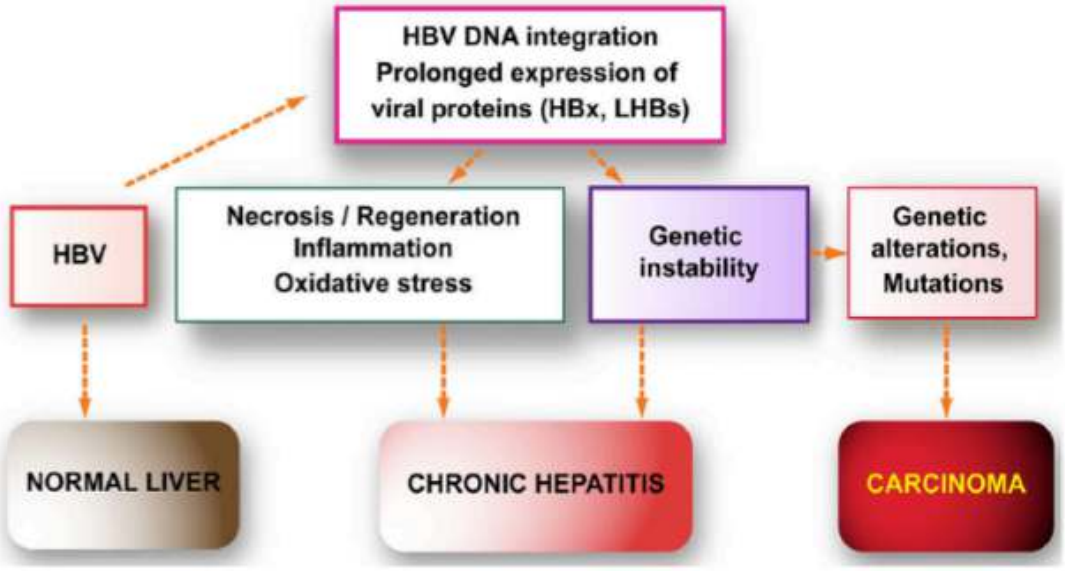
. Le CHC est un cancer hétérogène dont les facteurs varient d'une région géographique à une autre. Cette multitude de facteurs complique le diagnostic, le pronostic et le traitement . Les principaux facteurs identifiés comprennent l'infection virale par les virus de l'hépatite B (VHB) et l'hépatite C (VHC) **(El-Serag HB, 2011; Chen et al., 2011 , Ferroudj, 2017),** l'exposition à un carcinogène alimentaire dérivé des champignons Apergillusparasiticus et Aspergillus flavus qui est l'aflatoxine B1, la consommation excessive d'alcool **(Fattovich et**

al., 2004 , Ferroudj, 2017) et la stéato-hépatite non alcoolique (NASH) **(Borie et al., 2009, Ferroudj, 2017).** D'autres causes moins communes sont identifiées telles que l'hémochromatose héréditaire, le déficit en alpha1-antitrypsine, l'hépatite auto-immune, la cirrhose biliaire primitive et la maladie de Wilson **(El-Serag HB, 2011, Ferroudj, 2017)**. Le tabac est actuellement considéré comme un cofacteur dans le développement du CHC **(Ferroudj, 2017).**

2.1 Le virus de l' hépatite B

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

L'infection chronique par le VHB peut jouer un rôle dans la carcinogenèse hépatique de plusieurs façons. Bien que la majorité des cancers du foie se développe sur cirrhose, une fraction significative de CHC liés au VHB se produit dans un contexte d'hépatite chronique en l'absence de cirrhose **(Brechot, 2004).** Le pourcentage plus bas de CHC sur cirrhose par rapport aux autres étiologies suggère un rôle plus direct du VHB dans le processus hépatocarcinogenèse **(Honda M. et al., 2006).** L'intégration de l'ADN du VHB dans le génome de l'hôte et l'expression persistante de protéines virales peut activer des oncogènes, induire un stress oxydatif et une instabilité génomique, offrant un terrain favorable à l'émergence d'altérations génétiques et épigénétiques conduisant à la transformation maligne des hépatocytes (figure 05) **(Neuveut et al., 2010).**



.

Figure 05. L'hépatocarcinogenèse induite par le VHB**. (Neuveut et al., 2010).**

2.2 L'aflatoxineB1

L'Aflatoxine est une mycotoxine produite dans les climats chauds et humides des pays tropicaux par Aspergillus parasiticus ou Aspergillus flavus .

On trouve cette mycotoxine dans le maïs, les cacahuètes, les graines de coton. Le niveau quotidien de l'exposition humaine à l'Aflatoxine dans les régions exposées d'Afrique tropicale varie entre 3 et 200 ng par kg de la personne exposée.

Les métabolites de l'Aflatoxine sont présents dans les tissus et l'urine. Les taux les plus élevés sont retrouvés dans la Chine du Sud et dans l'Afrique subsaharienne où ils représentent la cause principale du CHC.

L'effet carcinogène de l'Aflatoxine a été confirmé sur le plan expérimental avec formation de « DNA adducts ». L'Aflatoxine est métabolisée par le cytochrome P450 en une forme oxydée et réactive qui induit une mutation avec transversions G:C to T:A sur le codon 249 du gène suppresseur de tumeur TP53. En outre, l'Aflatoxine 1 interfère sur la défense immunitaire et sur le métabolisme des protéines **(Sudakin , 2003).**

2.3 Le virus de l' hépatite C VHC

Le VHC est un virus à ARN qui ne s'intègre pas dans le génome. Les mécanismes induisant la transformation maligne des hépatocytes seraient liés à la protéine structurale du VHC « HCV core », qui agit sur la différenciation, la prolifération cellulaire et l'apoptose **(Tsai and Chung, 2010)**. De plus, 90% des individus infectés par le VHC développent une hépatite chronique, et 10 à 30% d'entre eux évoluent vers une cirrhose 25 à 30 ans après l'infection. Une fois la cirrhose établie, le risque de CHC augmente de 1 à 3% par anné **(Bruno et al., 2007; El-Serag and Rudolph, 2007).**

Ce virus, de 9 kb, code pour 9 protéines nommées NS5a, NS5b, NS4a, NS3, C, E1, E2, NS2, P7. La protéine NS5A, qui a une affinité particulière pour la protéine p53 et les « TATA binding protein », est potentiellement capable de déréguler les fonctions de réparation cellulaire, l'apoptose, la croissance cellulaire et l'expression de gènes cellulaires **(QADRIet*al.*, 2002).** Les protéines NS4A et NS4B peuvent inhiber la synthèse des protéines cellulaires **(FLORESEet*al.*, 2002).**

2.4 La consommation excessive d'alcool

La consommation excessive d'alcool qui représente une cause majeure de cirrhose dans les pays développés peut être la cause principale des CHC lorsque la prévalence de l'infection virale est faible . Les premiers stades de l'atteinte du foie par l'alcool sont la stéatose et la stéatohépatite.

La réponse inflammatoire au stress oxydatif et à l'hypoxie stimule la fibrose avec augmentation de la fibrogenèse par l'acétaldéhyde, métabolite de l'éthanol. L'acétaldéhyde provoque également des mutations oncogéniques avec altérations épigénétiques par méthylation du DNA pendant la régénération des cellules hépatiques. Enfin, l'alcool a un effet synergique sur les autres causes du CHC : les virus HBV et HCV, l'aflatoxine, le chlorure de vinyle **(Voigt , 2005).**

2.5 Les stéatohépatites non alcooliques

La stéatose non alcoolique, ou NAFLD pour nonalcoholicfattyliverdisease selon la terminologie anglo-saxonne, se présente comme un spectre d'entités histologiques allant de la stéatose isolée (accumulation cytoplasmique de triglycérides excédant 5 à 10 % des hépatocytes), qui est une lésion le plus souvent bénigne, à la stéatohépatite, ou NASH pour nonalcoholicsteatohepatitis, associant des signes d'inflammation et de souffrance hépatocytaire (ballonisationhépatocytaire). La NASH est susceptible d'évoluer vers la cirrhose et ses complications, dont le carcinome hépatocellulaire (CHC), après plusieurs années .

La majorité des patients ayant une NAFLD présente des signes cliniques et biologiques qui définissent le syndrome métabolique et qui incluent une obésité viscérale ainsi qu'une insulino résistance. La NAFLD est donc considérée comme la manifestation hépatique de ce syndrome **(Siegel et al, 2009, Starley et al 2010).**

2.5.1 complication majeure de la NASH

Entre 8 et 26 % des patients ayant une NASH évolueront vers la cirrhose. L'indice de masse corporelle (IMC) et le diabète sont des facteurs de risque indépendants de la progression de la fibrose **(Balsano et al, 2009)** . Il est hautement probable que la majorité des cirrhoses dites cryptogéniques soit la conséquence de l'évolution d'une NASH et d'un syndrome métabolique, car la plupart des patients atteints ont une prévalence élevée de diabète et d'obésité **(Starley et al 2010).**

Une étude récente indique que les patients ayant une cirrhose secondaire à une NASH ont un risque de développer un CHC proche de celui observé chez les patients ayant une cirrhose d'étiologie virale C (incidence cumulée annuelle de 2,6 et 4 %, respectivement) . L'obésité **(Nair et al, 2002 , Calle et al, 2003)** et le diabète **(Davila et al, 2005, El-Serag et al, 2004)** ont été clairement identifiés comme des facteurs de risque indépendants de CHC.

Le CHC est d'ailleurs le cancer dont l'occurrence et la progression sont les plus fortement affectées par l'obésité. À titre d'exemple, il a été montré, dans une étude américaine prospective conduite pendant 16 ans chez plus de 900 000 patients, que le risque relatif de mourir d'un CHC est 1,68 fois et 4,52 fois plus élevé chez les femmes et les hommes obèses (IMC> 35 kg/m2), respectivement **(Calle et al, 2003)**. Le risque de CHC conféré par l'obésité résulte vraisemblablement du risque accru de NAFLD pouvant évoluer vers une NASH, mais il n'est pas exclu qu'il existe également un potentiel carcinogénique propre à l'obésité. Le risque de CHC

consécutif au syndrome métabolique peut être très fortement augmenté – de manière synergique – en cas de maladie hépatique sous-jacente liée à une consommation excessive d'alcool ou à une hépatite virale chronique **(Chen et al, 2008 , Hassan et al, 2002)**. Enfin, les patients présentant une NASH ont fréquemment une surcharge hépatique en fer, ce qui semble conférer un risque accru de CHC **(Sorrentino et al, 2009).**

2.6 l'hémochromatose primitive :

L'hémochromatose est l'expression clinique d'une surcharge viscérale en fer ; elle peut être génétique ou secondaire. L'hémochromatose génétique est une anomalie héréditaire, résultant d'une erreur innée du métabolisme du fer responsable d'une hyperabsorption digestive de fer conduisant à une surcharge progressive en fer des cellules parenchymateuses du foie, du pancréas et du cœur ; à la phase d'état, l'altération de la structure et de la fonction de ces organes est source de complications **(Brissot P et Deugnier , 1999)** : cirrhose et carcinome hépatocellulaire, diabète sucré, cardiomyopathie, arthropathies, mélanodermie, insuffisance hypophysaire à prédominance gonadotrope, ostéoporose.

3 Mécanisme de l'hépato-carcinogenèse :

L'hépatocarcinogenèse ou carcinogénèse hépatique comporte plusieurs étapes dont l'inflammation chronique et la fibrose extensive qui constituent des étapes majeures dans la transformation hépatique. La cirrhose et l'hépatite chronique sont considérées comme des états précancéreux. Plusieurs facteurs, incriminés dans cette carcinogénèse, peuvent être de

nature virale (HVB, HVC) ou non virale (aflatoxineB1, maladies héréditaires du foie comme l'hémochromatose) **(Maillard, 2011 ; Khalaf et al, 2017)**. (**Figure1**) .

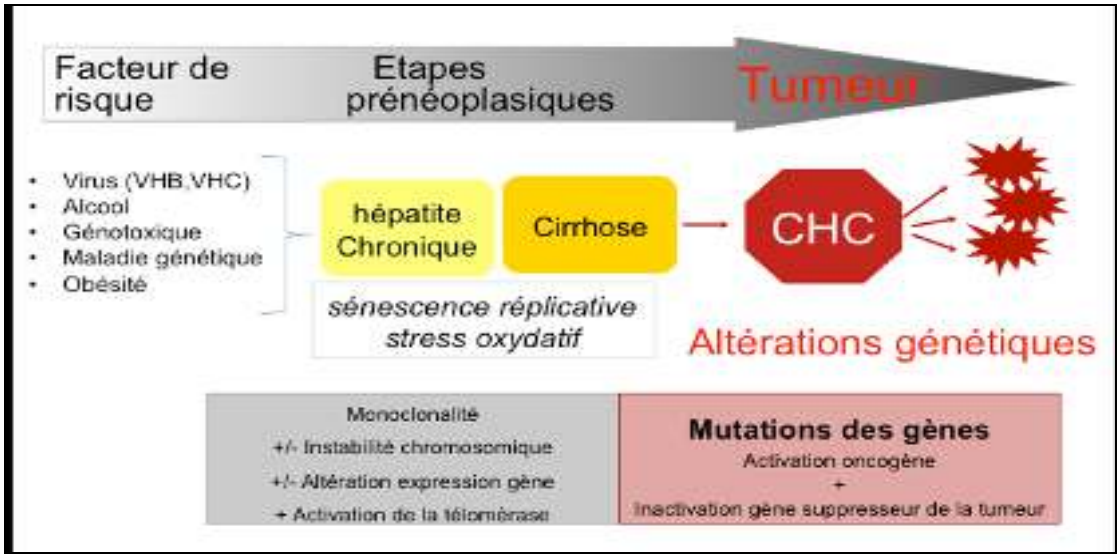


Figure06 : Hépatocarcinogenèse : un processus multi-étapes . **(Cao, Q. (2014).** ***Caractérisation moléculaire des carcinomes hépatocellulaires liés au virus de l'hépatite B*** **(Doctoral dissertation)).**

.

Les études sur les mécanismes de carcinogénèse hépatique ont constaté que ces agents peuvent favoriser le développement de CHC par les altérations génétiques provoquant ainsi de diverses conséquences :

• altération des voies de carcinogénèse (perte de la fonction de protéine suppresseur de tumeur p53 dans plus d'un quart de tumeurs, répression de la voie de rétinoblastomeRB1)

• activation de la voie de signalisation comme Wnt par mutation de β-caténine ou inactivation de l'axine

• activation de l'enzyme de l'immortalisation cellulaire (télomerase)

• fréquentes délétions chromosomiques **(Merle.,2005) .**

Les modifications au niveau de la méthylation de l'ADN, appelées anomalies épigénétiques ont été impliquées dans le développement de CHC chez l'homme, dont l'hyperméthylation du promoteur responsable d'une répression du gène suppresseur de tumeurs p16. Ces anomalies épigénétiques sont influencées par des facteurs environnementaux (apport en folates et méthionine) et génétiques (polymorphisme) (**Peyrin-Biroulet et al ., 2006 ; Herceg et Paliwal .,2011)**

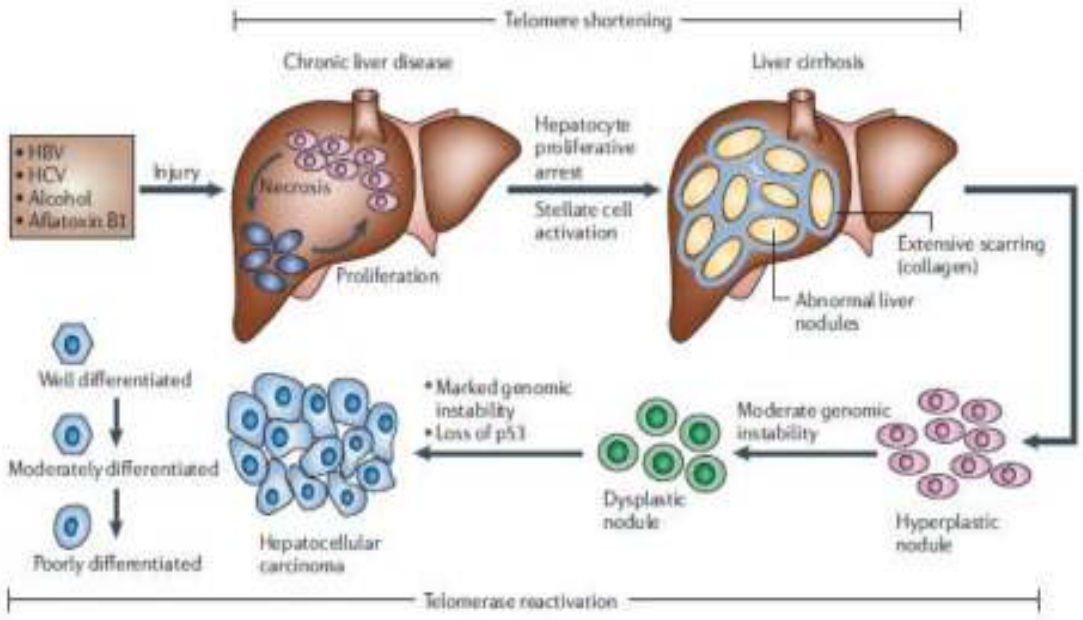


Figure 07 . Progression histopathologique du foie sain vers le CHC **(Farazi et DePinho.,2006)**

4 Classification moléculaire des carcinomes hépatocellulaires :

Les cancers sont des « maladies du génome » car elles sont le résultat d'une ou plusieurs altérations génétiques. L'altération de l'expression des gènes dans les tumeurs peut être la conséquence de modifications génétiques (mutation activatrice d'un oncogène et mutation inactivatrice d'un gène suppresseur de tumeurs) ou épigénétiques (comme des variations de méthylation des promoteurs)

4.1 Altérations chromosomiques

Dans les CHC, les hépatocytes tumoraux accumulent un nombre important de réarrangements chromosomiques conduisant au développement de caryotypes très complexes. L'ADN hyperploïde a été mis en évidence par cytométrie de flux dans la cellule tumorale, indiquant une augmentation moyenne du contenu génétique de la moitié des cas de CHC **(Chiu et al.,1992).**

L'hyperploïdie est également présente dans 43 % des lésions dysplasiques observées dans les troubles cirrhotiques **(Thomas et al., 1992).**

Ces niveaux élevés indiquent que la perte de chromosomes accompagnée d'une endomitose sont les premiers stades de l'hépatocarcinogenèse pour le sous-groupe tumoral du dysfonctionnement chromosomique **(Laurent-Puig et Zucman-Rossi .,2006).**

. Les études cytogénétique utilisant la CGH (Comparative Genomic Hybridization) ont démontrés que les bras chromosomiques 17p, 8p, 16q, 16p, 4q, 9p, 13q, 1p, et 6q sont les plus fréquemment perdus tandis que les bras chromosomiques 1q, 7q, 8q et 17q sont fréquemment amplifiés (Tableau 1) **(Marchio et al.,1997 ; Balsara et al.,2001).**

Tableau 1 : Récapitulatif des aberrations chromosomiques et des gènes cibles dans le CHC (**adapté de Liu et al., 2014).**

Chromosome	Type of aberration	Frequent aberration region and candidate target genes (Location)
1q	Gain	*CKS1B* (1q21.2), *CHD1L* (1q21.1), *JTB* (1q21), *MDM4* (1q32.1)
1p	Loss	*p18* (1p32), *14-3-3σ* (1p35), *p73* (1p36.3), *RIZ* (1p36.13-p36.23)
3q	Gain	*Gankyrin* (3q28)
3p	LOH, CpG methylation	*RASSF1A* (3p21.3), *CTNNB1* (3p21), *TGF-1βR11* (3q22)
4q	LOH	
6p	Gain	
6q	LOH	*M6P/IGF2R* (6q26-q27)
8q	Gain	*c-Myc* (8q24.21), *PTK2* (8q24.3), *EIF3S3* (8q23.3), *SGK3* (8q13.1)
8p	LOH, CpG methylation	*DLC-1* (8p21.3-22), *LPTS* (8p23), *CSMD1* (8p23.2)
9p	LOH, CpG methylation	*CDKN2A* (9p21), *CDKN2B* (9q21),
10q	LOH	*PTEN/MMAC1* (10q23.3)
11q	Gain	*cyclinD1* (11q13)
11p	LOH, CpG methylation	*KAI1* (11p11.2), *IGF-2* (11p15), *TSLC1* (11q23.2)
13q	LOH	*Rb1* (13q14.2), *BRCA2* (13q12.3), *Tg737* (13q12.1), *TFDP1* (13q34), *CUL4A* (13q34), *CDC1* (13q34)
16q	LOH, CpG methylation	*CDH1* (16q22.1)
16p	CpG methylation	*Axin1* (16p13.3), *SOCS-1* (16p13.3)
17p	LOH	*p53* (17p13.1), *HIC-1* (17p13.3), *HCCS1* (17p13.3)

Ces altérations chromosomiques sont trouvées dans les tissus hépatiques pré- néoplasiques ce qui indique que l'instabilité chromosomique peut se produire au stade précoce du CHC et s'accumule pendant la progression tumorale **(Kondo et al.,2000).**

Ainsi, l'instabilité chromosomique peut entraîner l'activation ou la perte de fonction de certains oncogènes importants ou de gènes suppresseurs de tumeurs, qui régissent la croissance cellulaire et la prolifération. Nombreuse études ont montrés que les segments amplifiés étaient le siège d'un nombre d'oncogène impliqués dans l'inhibition de l'apoptose, la régulation des mitoses et la promotion de la transition epithélio-mésenchymateuse **(Liu et al .,2014)** à l'opposé les segments perdus hébergeaient un nombre de gènes suppresseurs de tumeurs **(Bressac et al .,1990 ; Satoh et al.,2000).**

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

Au cours des 20 dernières années, diverses méthodes ont été utilisées pour classer les mutations des gènes somatiques dans les CSC, mais la plus courante était le séquençage de gènes candidats sur de grandes séries de tumeurs. Récemment, les progrès des technologies révolutionnaires de séquençage de la prochaine génération (NGS) ont permis le séquençage de tous les exons ou du génome entier. Cette méthode permet de reconnaître rapidement et facilement les événements génétiques primaires exhaustifs, y compris les cibles thérapeutiques moléculaires éventuellement impliquées dans la CHC (figure 3) **(Nault et Zucman-Rossi .,2014).** Plusieurs analyses de NGS sont résumées dans le tableau 2.

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

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

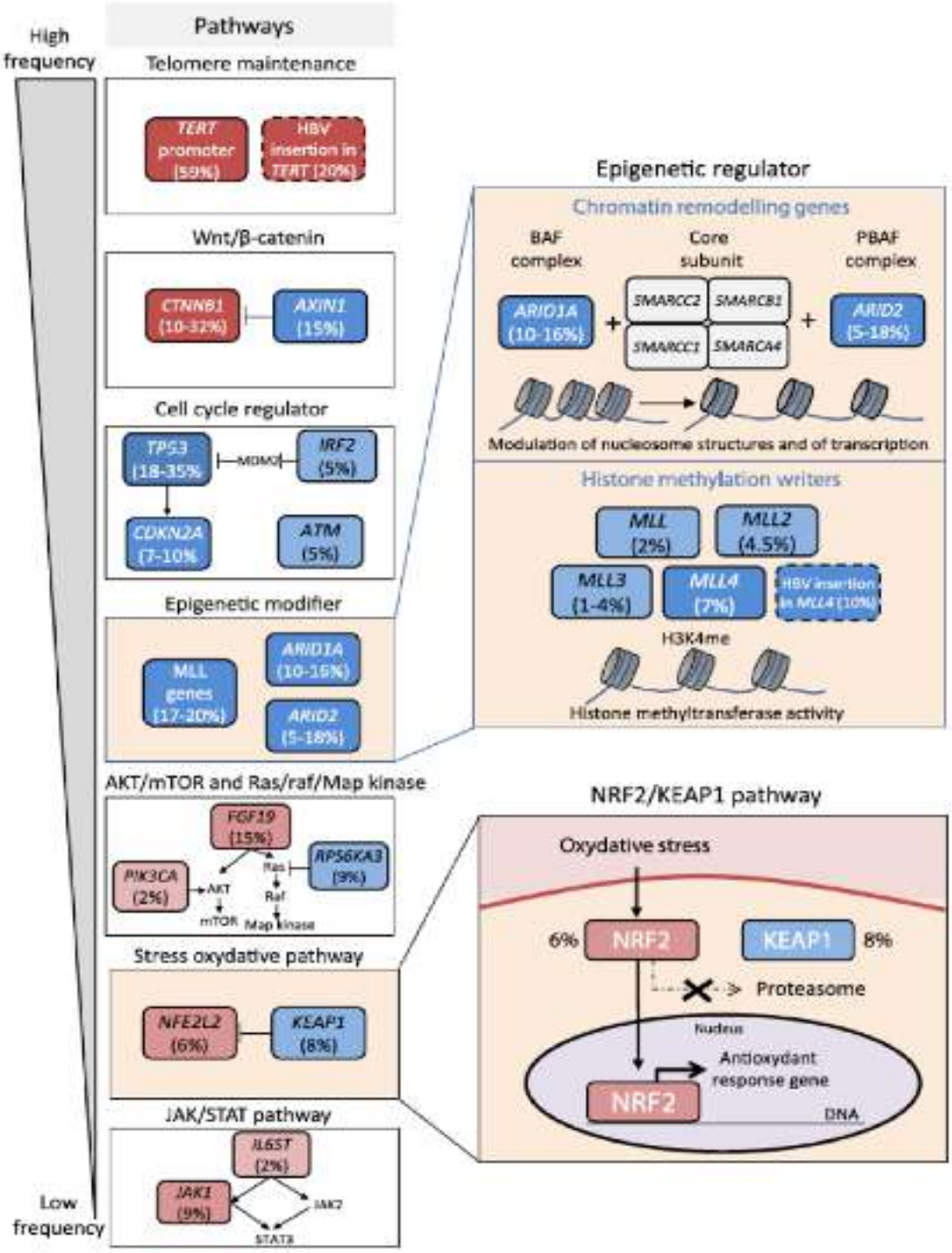


Figure 08. Les voies de signalisation altérées dans l'hépatocarcinogenèse. Les voies mutées récurrentes dans le CHC sont présentées dans le panneau à droit. Les oncogènes sont indiqués en rouge et les gènes suppresseurs de tumeur sont en bleu, avec les pourcentages des mutations **(Nault et Zucman-Rossi .,2014).**

4.2.1 Les mutations TP53 :

P53 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les CHC. p53 (17p13) dont l'inactivation semble impliquée lors du CHC, une perte d'hétérozygotie, c'est-à-dire une inactivation bi-allélique de p53 ayant été observée dans 20 à 50 % des CHC **(Debuire et al.,1993).** Si les mutations de p53 sont nettement plus fréquentes dans les CHC liés à une exposition à l'aflatoxine B1**(Hsu et al ., 1991)** , il ne semble pas en revanche exister d'accumulation particulière de mutations de p53 dans les CHC ou les hépatopathies liées au VHC (Caruso et Valentini ., 1999). on retrouve la présence d'un hot spot mutationnel à la position R249S dans les pays d'Asie du Sud Est (région de Qidong) et d'Afrique Sub-saharienne (Mozambique) où la population est fortement exposée à l'AFB1 on retrouve une association significative entre les mutations de TP53 et les tumeurs ayant une instabilité chromosomique, fréquemment associées à l'infection par le VHB et présentant un haut niveau d'activité mitotique. Ces associations n'ont pas été retrouvées dans des séries de CHC associés à l'infection par le VHC et elles restent à être précisées dans de plus grandes séries de CHC associés à l'alcool (**CHIANG et *al* ., 2008**) .

4.2.2 β−caténine et la voie Wnt

Wnt dérive du nom de ses deux orthologues « wingless », identifié chez la drosophile et « int-1 » chez la souris **(Rijsewijk et al., 1987)**. Les protéines de la famille WNT sont des ligands sécrétés dans le milieu extracellulaire qui vont se fixer à différents récepteurs à la surface membranaire tels que « Frizzled » (Fzd) et « low-density lipoprotein receptor-related protein » (LRP). La reconnaissance du ligand par son récepteur active la voie de signalisation Wnt/β-caténine en contrôlant la β-caténine. La β-caténine est un facteur de transcription retrouvé au niveau des jonctionscellulaires adhérentes où il interagit avec CDH1 (symbolisé par E-CAD sur la Figure 15) dans le cytoplasme et le noyau.

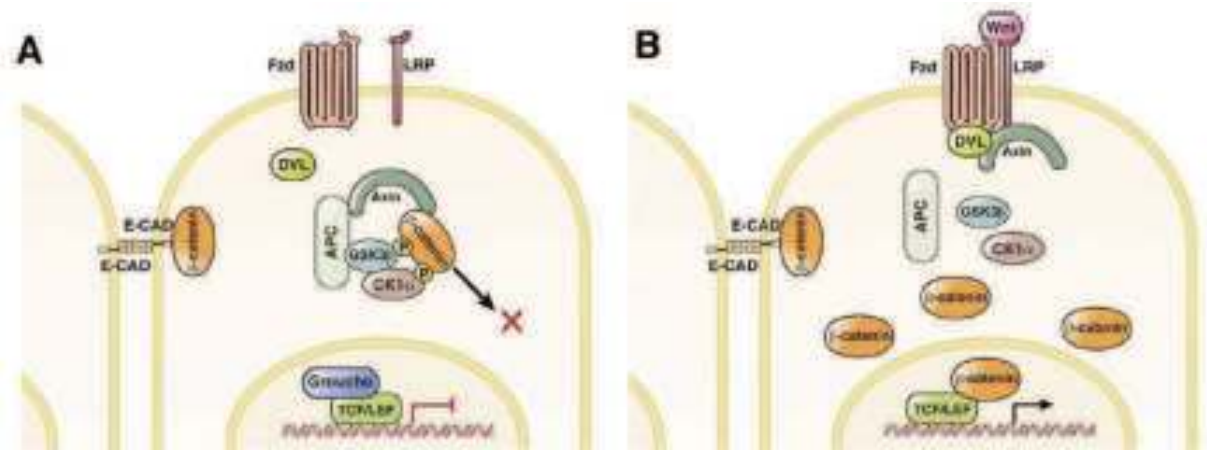


Figure09 : La voie Wnt/*β*-caténine (White et al., 2010).

En absence d'activation de la voie de signalisation (**Figure 09A)**, la □-caténine interagit avec CDH1 ou est phosphorylée par le complexe de destruction composé de l'Axine, de « adenomatous polyposis coli » (APC), de la « glycogen synthase kinase 3 » (GSK3) et de la « casein kinase 1 » (CK1). La phosphorylation de la □-caténine dans son extrémité N- terminale provoque son ubiquitinylation, ce qui induit son adressage au protéasome et sa dégradation. Dans cette configuration, l'expression des gènes cibles de la □-caténine est inhibée par Groucho, un répresseur transcriptionnel.

La liaison de Wnt aux récepteurs Fzd et LRP recrute « Disheveled » (DVL) et l'Axine à la membrane, ce qui dissocie le complexe de destruction **(Figure 09B)**. La β-caténine n'est plus phosphorylée, ce qui lui permet d'échapper à la dégradation par le protéasome, de s'accumuler dans le cytoplasme et d'être importée dans le noyau. Dans ce compartiment, la β- caténine interagit avec les membres de la famille de facteurs de transcription « T-cell factor/lymphoid enhancer factor » (TCF/LEF) et active la transcription de gènes cibles impliqués dans la différenciation, la prolifération, la migration et l'adhésion cellulaire.

La voie Wnt est constitutivement activée dans un tiers des CHC à cause (i) de mutations activatrices de la β-caténine (abolition de la phosphorylation du domaine

N-terminal), (ii) des mutations perte de fonction d'APC, (iii) de l'inactivation de CDH1 ou (iv) de la surexpression de Fzd ou de WNT **.(White et al., 2010)**. Le Glypican-3, un corécepteur de Wnt qui est surexprimé dans 72% des CHC, stimule la voie Wnt/□-caténine et augmente la croissance tumorale en facilitant l'interaction de Wnt avec ses récepteurs .**(Capurro et al.,2005)**

.

4.2.3 Retinoblastoma et les acteurs du cycle cellulaire

Le gène *Rb* (Rétinoblastoma), localisé sur le chromosome 13q, est le premier gène suppresseur de tumeur identifié et, avec *p53* l'un des plus fréquemment mutés dans les tumeurs humaines. Des pertes d'hétérozygoties sont fréquemment observées sur le locus 13q (25 à 50 % des cas de CHC). Cependant, le gène lui-même est en réalité rarement muté bien que son expression soit diminuée dans près de la moitié des cas. L'inactivation de Rb dans le CHC pourrait donc davantage être liée à l'altération des fonctions d'autres acteurs de la voie de signalisation interagissant avec Rb. Ainsi, l'inactivation du gène *p16-INK4*, semble constituer une voie majeure d'inactivation de Rb. Si les mutations de ce gène sont rares dans le CHC, c'est principalement l'association perte d'hétérozygotie – hyperméthylation du promoteur du gène (environ 50 % des cas) qui semble responsable de l'inactivation de p 16 (**JINet *al.,* 2000**). La valeur pronostique de cette inactivation dans le CHC reste encore controversée. D'autres acteurs du cycle cellulaire sont plus rarement touchés. C'est le cas par exemple de l'amplification génique observée pour certaines cyclines, en particulier D1 ou E (10 à 20 % des cas) ou de lasurexpression de *cdc2*, qui, en outre, pourraient constituer des marqueurs pronostiques défavorable. Plus récemment, une nouvelle protéine aux propriétés oncogéniques, la gankyrine, impliquée dans le processus de dégradation de Rb par le système protéasome, a été montrée fréquemment sur exprimée dans le CHC. La gankyrine pourrait, de plus, jouer, un rôle dans la diffusion métastatique du CHC et ainsi constituer un marqueur biologique intéressant (**FU et *al.*,2002**).

4.2.4 Voie TGF-bêta

La perte de la réponse au TGF-bêta, un puissant inhibiteur de croissance des cellules épithéliales, pourrait également jouer un rôle dans l'inactivation de Rb. Un gène candidat impliqué dans l'hépatocarcinogénèse est situé en 6q25, région chromosomique qui semble précocement et fréquemment délitée dans le CHC (LOH dans plus de 60 % des cas). Ce gène pourrait être le *M6P/IGF2R* (*mannose6-phosphate/insulin-likegrowth factor 2 receptor*) intervenant dans l'activation du TGF-bêta et la dégradation de l'IGF2, un mitogène dont l'expression est fréquemment augmentée dans certains cancers. La présence fréquente de mutations (plus de 20 % des cas) dans le CHC a toutefois été contestée. Par ailleurs, de rares mutations ont été mises en évidence dans les gènes de certains médiateurs intracellulaires de la voie TGF-bêta, comme Smad2 ou Smad4.

4.2.5 Oncogènes ras et myc

4.2.5.1 C-Myc Le proto-oncogène :

Le proto-oncogène c-Myc est un facteur de transcription essentiel, impliqué notamment dans la prolifération et la différenciation cellulaires, l'apoptose ou la tumorigenèse. Le gène c-Myc est amplifié et surexprimé dans environ 30% des CHC, ce qui est associé à un mauvais pronostic **(Abou-Elella et al., 1996).** Cette amplification est retrouvée plus fréquemment dans les CHC peu différenciés, métastatiques, multi-nodulaires, ou qui récidivent. De plus, on retrouve une corrélation entre la surexpression de c-Myc et l'altération de p53 dans le CHC **(Kawate et al., 1999).** L'expression conditionnelle et hépato-spécifique de c-Myc dans un modèle murin suffit à induire des CHC, et à l'inverse, son inactivation conduit à la régression tumorale des CHC induits chez la souris **(Murakami et al., 1993; Shachaf et al., 2004)**. Ces travaux démontrent le potentiel oncogénique de c-Myc dans le foie.

4.2.5.2 Activation de la voie Ras

Il existe trois gènes de la famille ras : *H-ras* , *K-ras* et *N-ras* . Ces gènes sont activés en oncogènes par mutations sur les codons 12, 13 et 61. De rares mutations somatiques **(Tsuda et al, 1989, Tada et al, 1990, Ogata et al, 1990, Stork et al 1991, Challen et al, 1992).**

sur le codon 61 des gènes *K-ras* et *N-ras* , et sur le codon 12 des gènes *K-ras* et *H-ras* ont été décrites dans les carcinomes hépatocellulaires. L'observation inconstante de ces mutations dans le foie non tumoral avoisinant suggère qu'il puisse s'agir d'un événement génétique précoce dans le développement du carcinome hépatocellulaire **(Tsuda et al, 1989, Tada et al, 1990, Ogata et al, 1990, Stork et al 1991, Challen et al, 1992).** Une surexpression de p21ras a également été rapportée aussi bien dans le carcinome hépatocellulaire que dans la cirrhose **(Zhang et al, 1990, Tiniakos et al, 1993)** . Elle semble moindre en cas de carcinome hépatocellulaire peu différencié **(Jagirdar et al, 1989)**. Au total, l'altération des gènes *Ras* semble présente dans 5 à 10 % des carcinomes hépatocellulaires chez l'homme.

Par ailleurs, des mutations des 3 principaux gènes *ras* ont été observées dans moins de 10 % des cas. Ces altérations ont été décrites comme des indicateurs de mauvais pronostic [8].

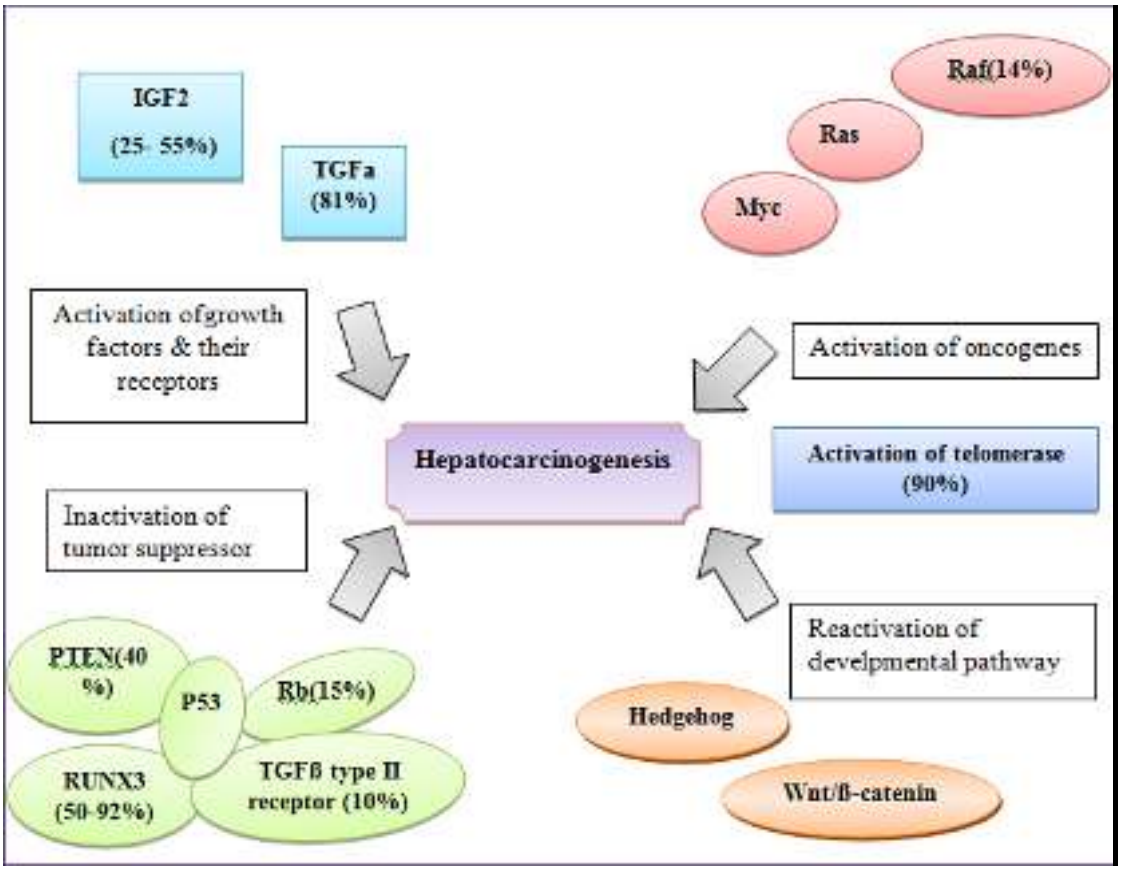


Figure10 : Altérations géniques dans les HCC(FU et*al.*,2002).

5 Traitement :

Les possibilités de traitement sont généralement réduites par la cirrhose qui limite l'utilisation de la chimiothérapie.Le pronostic du CHC était considéré comme dramatique il y a une vingtaine d'années, avec une survie inférieure à un an pour la plupart des patients. À présent ce scénario a considérablement évolué puisque le taux de survie à 5 ans peut excéder 70 % pour certaines séries de patients. Ces progrès sont principalement liés à l'amélioration de la précocité du diagnostic et de l'efficacité thérapeutique. En effet, le traitement curatif est aujourd'hui basé sur l'utilisation de la chirurgie, en particulier l'hépatectomie, et surtout la transplantation hépatique. Ce dernier reste toutefois réservée à un nombre restreint de patients, notamment en raison de la pénurie de greffon. Cette technique est classiquement proposée aux patients présentant des tumeurs de petite taille (<3 cm) dont le nombre de nodules est inférieur à trois et en l'absence de thrombose portale. Cependant l'hétérogénéité moléculaire du CHC est telle (petites tumeurs très agressives *versus* tumeurs volumineuses qui ne récidivent que tardivement) que beaucoup d'espoirs résident dans la caractérisation moléculaire de ce type tumoral, afin d'affiner le pronostic et aussi mieux cibler les patients pour lesquels ces techniques chirurgicales sont inapplicables (**LIOVET et *al.*, 2008**)

Le pronostic du CHC était considéré comme dramatique il y a une vingtaine d'années, avec une survie inférieure à un an pour la plupart des patients. À présent ce scénario a considérablement évolué puisque le taux de survie à 5 ans peut excéder 70 % pour certaines séries de patients. Ces progrès sont principalement liés à l'amélioration de la précocité du diagnostic et de l'efficacité thérapeutique. En effet, le traitement curatif est aujourd'hui basé sur l'utilisation de la chirurgie, en particulier l'hépatectomie, et surtout la transplantation hépatique. Ce dernier reste toutefois réservée à un nombre restreint de patients, notamment en raison de la pénurie de greffon. Cette technique est classiquement proposée aux patients présentant des tumeurs de petite taille (<3 cm) dont le nombre de nodules est inférieur à trois et en l'absence de thrombose portale. Cependant l'hétérogénéité moléculaire du CHC est telle (petites tumeurs très agressives *versus* tumeurs volumineuses qui ne récidivent que tardivement) que beaucoup d'espoirs résident dans la caractérisation moléculaire de ce type

tumoral, afin d'affiner le pronostic et aussi mieux cibler les patients pour lesquels ces techniques chirurgicales sont inapplicables.

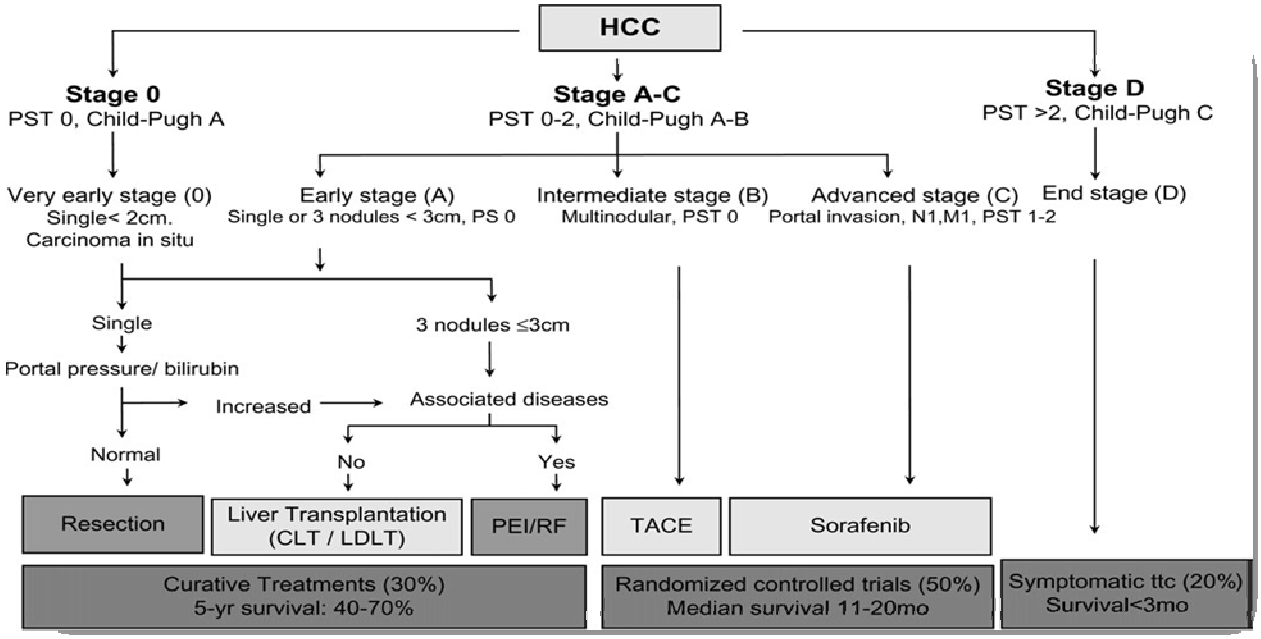


Figure 11 : Barcelone-ClinicLiver Cancer (BCLC) classement de la mise en scène et le calendrier de traitement (LIOVET et *al*., 2008).

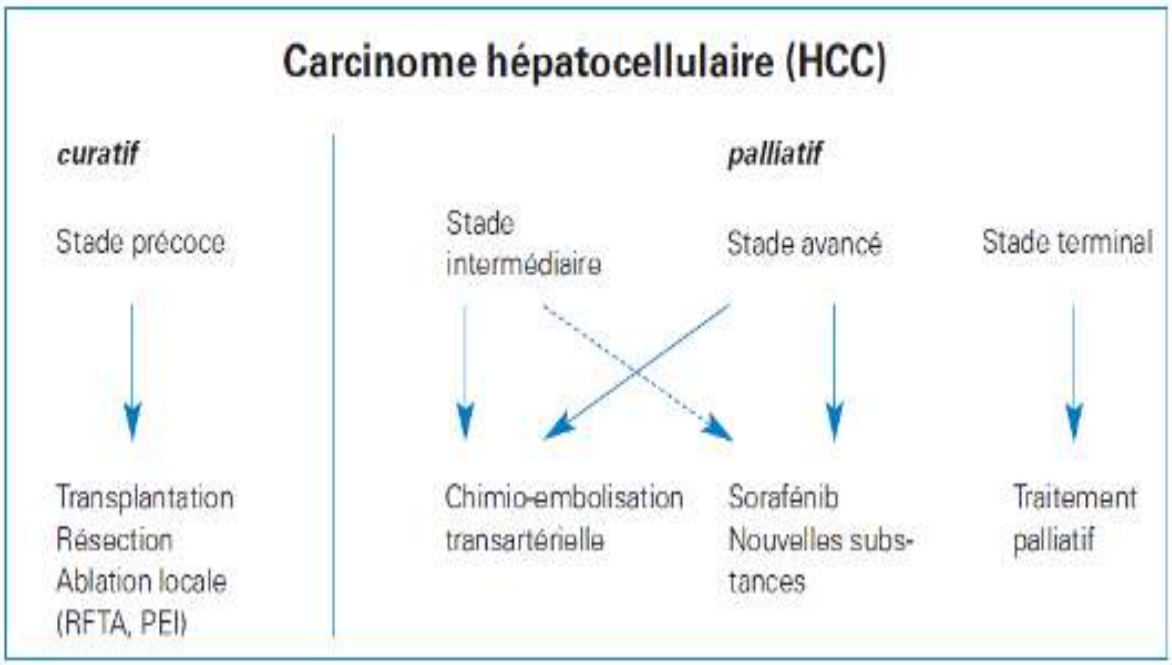


Figure 12 : concept thérapeutique des HCC(LIOVET et *al*., 2008)..

CHAPITRE 02 :LES AGENTS ALKYLALTS

AGENTS ALKYLALTS

1 Définition

Les alkylants font partie d'une des plus anciennes classes de médicaments en chimiothe´rapie. Leur introduction en clinique remonte a` 1942 avec la me´chlore´thamine pour le traitement des lymphomes **(Goodman et al ., 1946)**

Les agents alkylants sont capables de former des liaisons covalentes avec les bases puriques et pyrimidiques de l'ADN. Ces liaisons vont empêcher la réplication cellulaire en induisant des défauts dans la structure normale de la double hélice. Si la cellule ne dispose pas de mécanismes de réparation de l'ADN, ces altérations vont entraîner l'apoptose. On qualifie l'ensemble de ces médicaments du terme générique « moutarde à l'azote » en raison de leur fonction commune bischloroéthylamine. Les principaux représentants sont des promédicaments (oxazophosphorines) : la Cyclophosphamide (Endoxan®) et l'Isofamide (Holoxan®) . **(Alan et al.,2000)**Parmi cette classe de médicament, l'Estramustine associe un dérivé du 17β-œstradiol à une moutarde à l'azote. Son effet antitumoral serait plus lié à son interférence avec la formation ou la dépolymérisation des microtubules plutôt que son effet alkylant. Utilisé en monothérapie, ce composé a permis d'améliorer les symptômes de la maladie cancéreuse mais de nombreux effets secondaires sont apparus (toxicité, activité procoagulante). Aussi en association avec d'autres agents anticancéreux (en particulier avec les taxanes), son utilisation est améliorée.

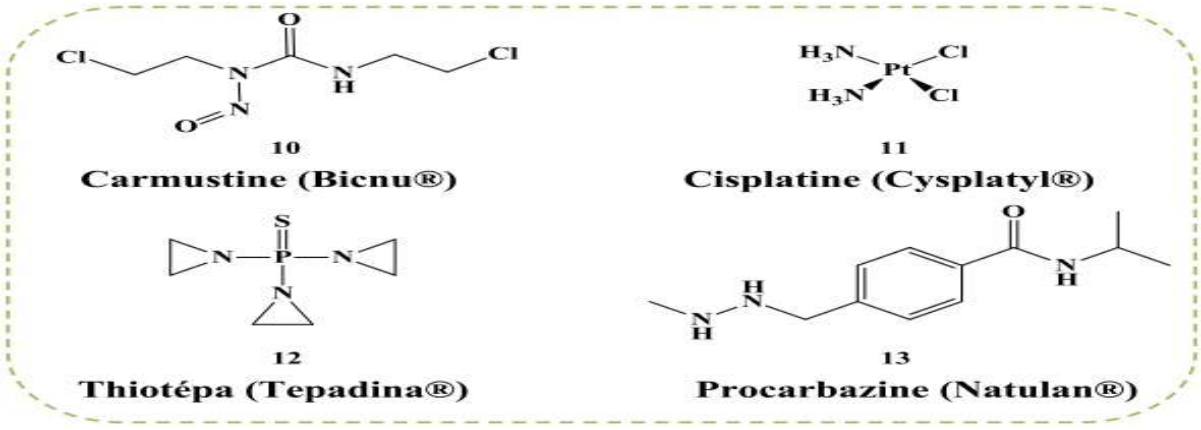


Figure13: Différentes structures d'agents alkylants

2 Différents agents alkylants

Les agents alkylants les plus utilisés sont les nitroso-urées , les sels de platine , les aziridines , les hydrazines et les dérivés de la moutarde à l'azote. Ces derniers sont les plus étudiées parmi les différents types d'agents alkylants .

2.1 *Les nitroso-urées*

Les nitrosourées sont des molécules liposolubles, ce qui favorise leur passage à travers la barrière-hémato-encéphalique. La carmustine (ou BCNU ou Bicnu®) est utilisée dans le traitement des tumeurs cérébrales malignes. Elle interagit principalement en N7 ou O6 des guanines **(Bodell .,2009)** et peut former ou non des cross links interbrins **(Eisenbrand et al.,1986 ;Ali-Osman et al .,1995)**. Même si les cross links ne représentent que 8% des adduits totaux, la cytotoxicité serait liée majoritairement à leur formation **(Wiencke et al . ,1995)**. De plus, les lésions induites en O6 par les nitrosourées sont réparées par une MGMT comme pour le témozolomide **(Ma et al.,2008 ; Yu et al ., 2010)**. Un traitement préalable avec un inhibiteur de MGMT sensibilise les cellules à la carmustine et au témozolomide **(Kokkinakis et al .,2003).**Enfin, la carmustine stabilise la double hélice et induit une distorsion minimale de l'ADN **(Wilds et al .,2008).**

.

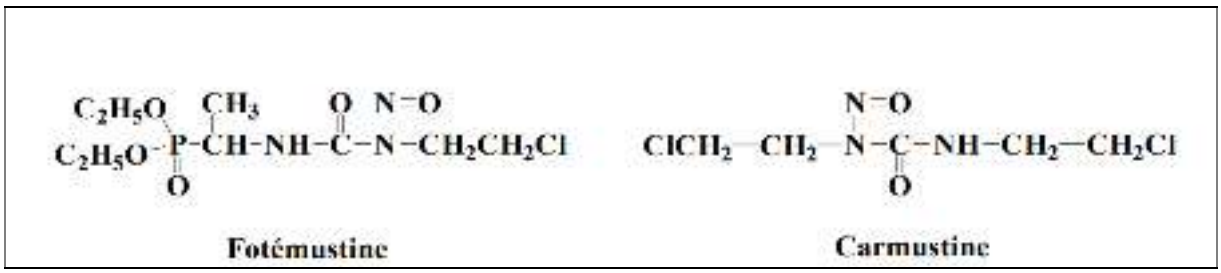
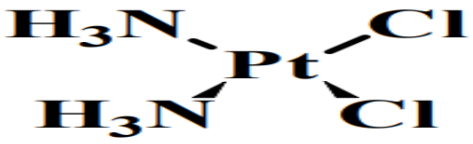


Figure14: Exemples de nitroso-urées.

2.2 *Les sels de platine*

Le cisplatinium ou cisplatine (schéma 3), utilisable uniquement par voie veineuse, est l'agent majeur de la chimiothérapie des tumeurs solides.



Cisplatine

Figure15 : Exemple de sels de platine.

Il a une action homologue à celle des moutardes azotées, en induisant des liaisons inter et intracaténaires dans l'ADN et les ponts ADN-protéines. Il inhibe la réparation de l'ADN et possède également une action intercalante **(Roberts et Friedlos., 1987).**

2.3 Moutardes à l'azote

Le nom moutarde vient d'une forme impure du gaz dont l'odeur ressemble à celle de la moutarde. La structure de ces dérivés est assez commune, ils possèdent deux chaînes chloroéthyles. Le premier agent anticancéreux a été découvert de manière fortuite la fin de la Première Guerre Mondiale, du fait des propriétés leucopéniantes sur des soldats gazés par l'ypérite (Sulfure de bis (2-chloroéthyle)), cette constatation a conduit à explorer son effet cytotoxique et anti-tumoral **(Adair et Bagg., 1931).**

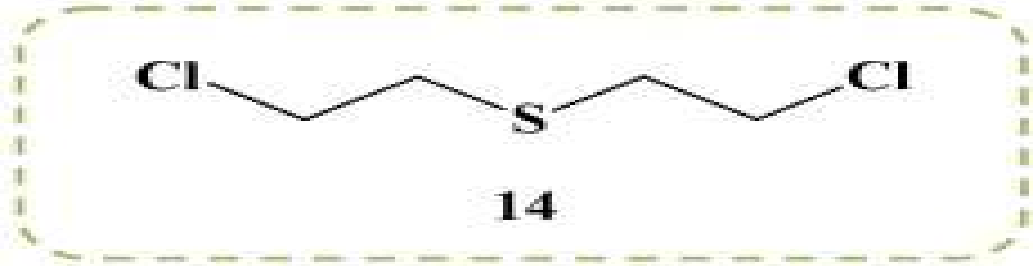


Figure16 : Structure du sulfure de bis-(2-chloroéthyle) (ypérite)

Il fallu encore plusieurs années pour mettre au point des dérivés moins toxiques, en remplaçant le soufre par l'azote pour obtenir des moutardes à l'azote. Différentes moutardes à l'azote sont utilisées pour le traitement de différentes formes de cancers.

2.3.1 Chlorméthine

C'est la première molécule à avoir fait la preuve d'une efficacité significative pour le traitement du cancer de différentes formes, des poumons, des ovaires, et plus spécialement la maladie de Hodgkin **(Goodman et al .,1946).**

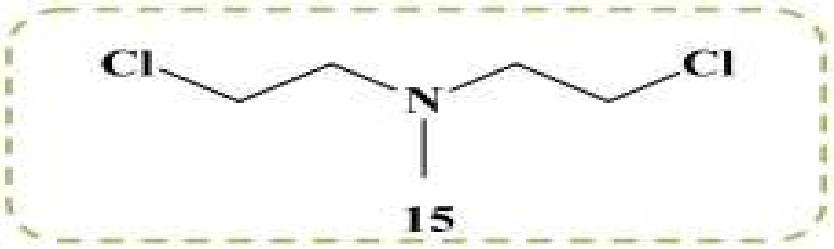


Figure17 : Structure de la Chlorméthine (Caryolysine®)

2.3.2 Cyclophosphamide

C'est un agent alkylant de la famille des oxazaphosphorines, utilisé pour le traitement adjuvant des cancers du sein et des ovaires**(Emadi et al., 2009).**

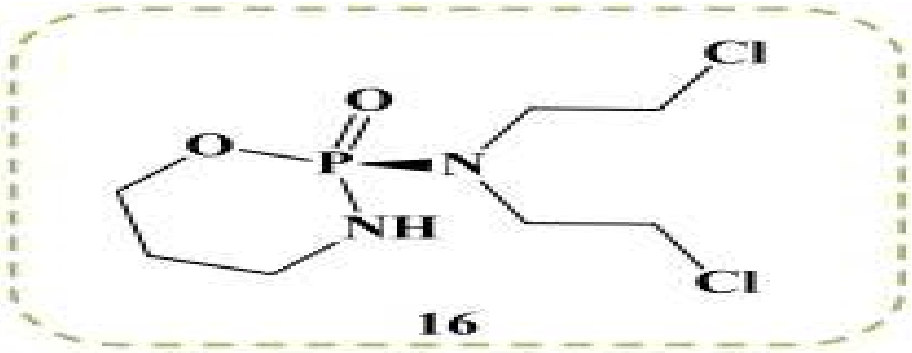


Figure18: Structure du Cyclophosphamide (Endoxan®)

2.3.3 Le chlorambucil

Dans les années 50, Ross et coll.4 ont synthétisé un analogue arylé de la chlorméthine, l'acide 4-[4-bis(2-chloroéthyl)aminophényl] butyrique appelé couramment chlorambucil (CLB) en greffant le groupe actif bis-(β-chloroéthyl)amine sur un support aromatique.

Dans ce cas le noyau aromatique aura tendance à entraîner dans son système de résonance les atomes présentant des doublets. Par conséquent, le doublet de l'azote devient de moins en moins disponible pour le phénomène de cyclisation (rencontré dans la chlorméthine).

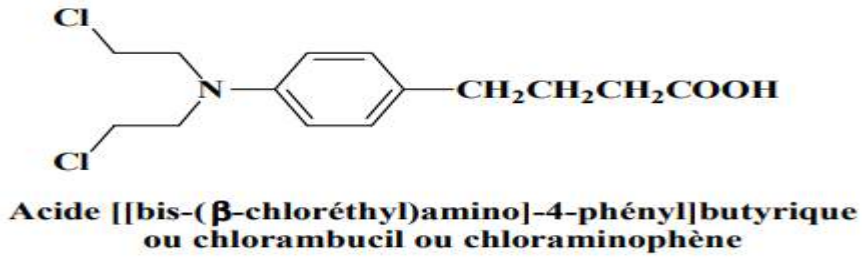


Figure19 : le métabolite majeur du chlorambucil

On diminue, donc la vitesse de formation de l'ion éthylène-imonium, ce qui entraîne une diminution de la réactivité du produit. Ceci se traduit par un meilleur effet pharmacologique car l'effet peut s'exercer à plus longue distance et est plus sûr. Connors et coll. ont démontré que le métabolite majeur du chlorambucil était issu d'une β-oxydation de la chaîne butyrique **(Sienkiewicz et al., 2004).**

3 Mode d'action

Les agents alkylants sont des composés fortement électrophiles qui vont réagir avec des molécules possédant des radicaux nucléophiles tels que les groupements -SH, -OH, -COOH ou –NH2 que l'on retrouve dans les acides nucléiques et les protéines (figure20).

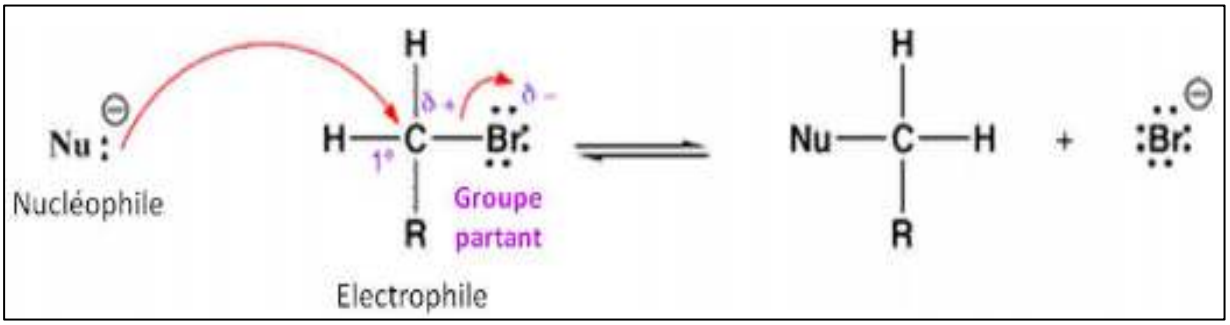


Figure 20: Réaction chimique entre un nucléophile et un électrophile, formation d'une liaison covalente.

L'interaction par liaison covalente entre l'agent alkylant et l'ADN produit différents types d'adduits:

- en fonction de l'isomérie et du métabolisme de l'alkylant, la fixation se fait de manière partielle ou quasi-complète ;
- monovalents (sur un nucléotide) ou bivalents (l'alkylant relie deux nucléotides adjacents pour former des ponts inter- ou intra-brins) (figure 21);
- au niveau de sites plus ou moins préférentiels au sein de l'ADN qui modifieront la structure de la double hélice (stabilisation/déstabilisation).

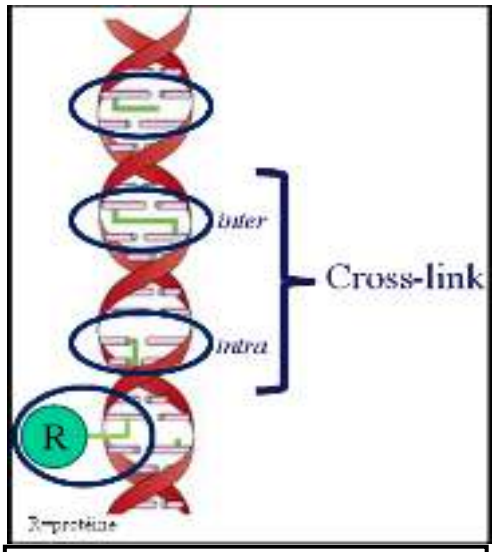


Figure 21: Interactions monoou bivalentes produites par les agents alkylants.

La fixation de ces molécules à l'ADN et notamment la formation de crosslinks interbrins empêche la réplication et la transcription **(Noll et al., 2006)** . De plus, ces lésions induisent souvent des cassures simple- ou double-brins de l'ADN ce qui conduit à l'apoptose de la cellule ou à la mise en exécution des systèmes de réparation pour le maintien de la prolifération des cellules tumorales (phénomène de résistance).

Les agents alkylants se fixent principalement au niveau des bases puriques, plus particulièrement au niveau des guanines qui présentent quatre sites potentiels de fixation (N2, N3, N7 et O6), alors que les adénines n'en présentent que deux (N7 et N3) (figure 22). L'azote N7 de la guanine est la cible principale de l'alkylation puisqu'il a le plus haut potentiel électrophile de l'ADN, puis les suivants ont des potentiels de moins en moins élevé : O6- guanine et N3-adénine > N2-guanine, N3 guanine et N7-adénine **(Pullman et al., 1981).**

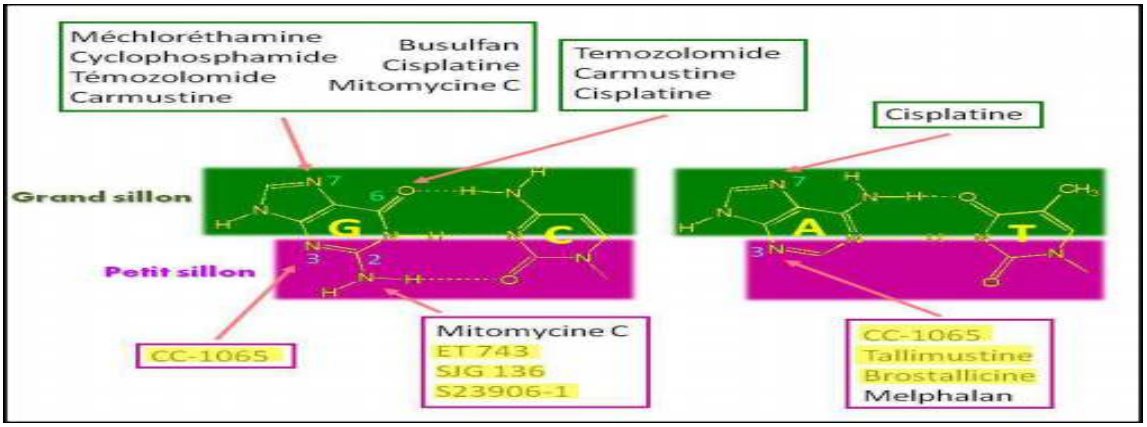


Figure 22: Sites d'interaction à l'ADN de différents agents alkylants. Les agents surlignés en jaune sont en essais cliniques.

Par rapport aux caractéristiques énumérées plus haut, les agents alkylants présenteront une efficacité cytotoxique et une activité anti-tumorale propre. La compréhension du mécanisme d'action de chacun d'entre eux permettra le développement de nouvelles molécules qui contourneront les éventuels phénomènes de résistance rencontrés. Dans un premier temps, il est donc important de présenter les avantages et les inconvénients de certains agents alkylant le grand sillon, connus pour la plupart depuis les années 40. Dans un second temps, nous verrons que les agents alkylant le petit sillon, découverts plus récemment, sont faiblement représentés et la majorité d'entre eux sont encore en essai clinique (figure22). Ces agents sont très prometteurs car ils pourraient contourner les phénomènes de résistance rencontrés avec certains agents alkylant du grand sillon.

4 Le Cisplatine

4.1 Historique

Le premier sel de platine à avoir été découvert est le cisplatine ou le cis-dichloro-diamine-platinium II : sa première synthèse date de 1844 **(ILTIS, 2013)** et a été réalisée pour la première fois par MichelePeyrone, un chimiste italien. Ce n'est qu'en 1965 que les propriétés cytotoxiques des complexes du platine ont été mises en évidence, au cours d'expérimentations électrochimiques sur des cultures bactériennes. Barnett Rosenberg a observé une inhibition de la croissance d'Escherichia coli, lorsque le milieu de culture contenait du chlorure d'ammonium et qu'il était soumis à un courant électrique établi entre

2 électrodes de platine. Il a réussi à montrer que cet effet inhibiteur n'était pas dû au courant parcourant le milieu de culture, mais à la formation d'un complexe entre le platine libéré par les électrodes et les molécules d'ammoniac et de chlorure du bain, c'est-à-dire par formation de dichlorodiamineplatine. Cette découverte accidentelle a alors lancé une série d'investigations et d'études sur les effets des composés du platine sur la division cellulaire **(SORIA et al., 2013 ; SAVARY, 2013).**

En 1970, B. Rosenberg et ses collègues ont montré que ces composés présentaient une activité anti-tumorale significative **(PAGE et al., 1999)** . Le cisplatine, isomère cis du dichlorodiamminoplatine, s'est révélé particulièrement actif lors d'expériences sur divers modèles tumoraux chez le rat et la souris, alors que l'isomère trans était totalement inactif. Les résultats encourageants des premiers essais cliniques sur des cancers testiculaires ou ovariens ont conduit à l'autorisation officielle du produit aux Etats-Unis par le 48 Food and Drug Administration en 1978. Cette molécule a très vite été reconnue comme efficace dans de nombreux autres types de cancers **(SAVARY, 2013).**

4.2 Structure chimique

Le cisplatine est un complexe de métal lourd renfermant un atome central de platine, à l'état d'oxydation II, Pt2+, entouré de 4 ligands :

- deux ligands chlore, de nature anionique et facilement échangeables par divers nucléophiles,

- deux groupements amines inertes non échangeables.

Sa formule moléculaire est $Cl_2H_6N_2Pt$ **(SAVARY, 2013).**

La structure chimique de cisplatine [CDDP cis-diammino-dichloro-platinum] ou Cis-DDPcomporte un complexe de configuration géométrique plane et carrée (figure23) avec un atome central de platine et des radicaux de chlore et d'ammonium en position Cis **(BOURIN et al., 1993)** . La disposition cis de la molécule est essentielle à son activité car c'est elle qui lui assure une certaine planéarité. La forme trans est totalement inactive **(SAVARY, 2013).**

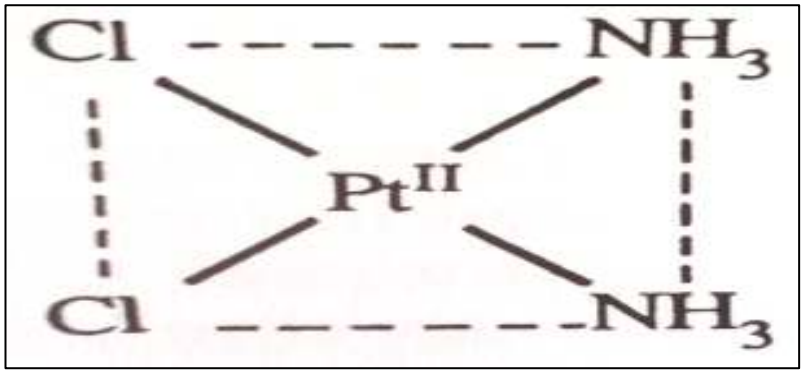


Figure23 : Structure chimique de cisplatine **(BOURIN et al.,1993).**

4.3 Caractéristiques physico-chimiques

Le cisplatine est une fine poudre jaune qui se décompose à haute température, à partir de 180°C et de façon complète à 270°C. Les principaux produits de dégradation sont le chlorure d'ammonium et l'acide chlorhydrique.

Le cisplatine est peu soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool et l'acétone mais soluble dans le diméthylformamide. Le cisplatine est très sensible à la lumière.

Il peut être identifié et dosé par spectrophotométrie dans l'ultraviolet et dans le visible **(SAVARY, 2013).**

4.4 Mécanisme d'action

De nombreuses études ont porté sur le mécanisme d'action du cisplatine (Rosenberg et al., 1965 ; Rosenberg, 1978) . Il a tout d'abord été montré que le complexe reste dans son état neutre tant qu'il circule dans les voies sanguines. La concentration en ions chlorures y est relativement forte (100 mM), et empêche l'hydrolyse du composé. Le cisplatine entre ensuite dans la cellule par diffusion passive à travers la membrane. La diminution de la concentration en ions chlorure facilite alors l'hydrolyse en complexes très réactifs. (figure 24) **(Bentefrit, 1996)**.

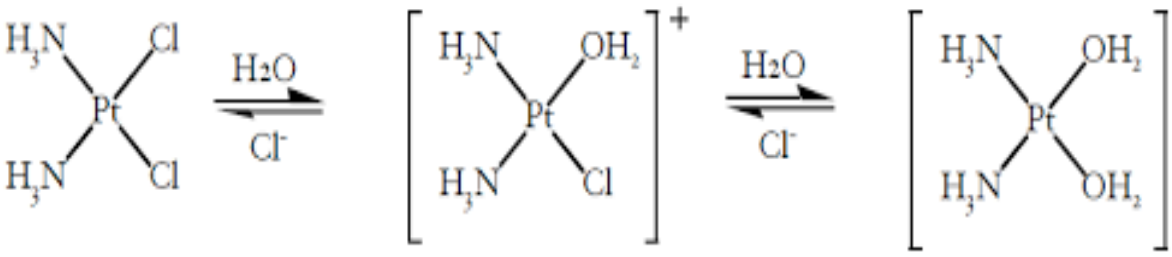


Figure 24: hydrolyse du cisplatine.

Les complexes très électrophiles obtenus par l'hydrolyse peuvent réagir avec divers nucléophiles cellulaires, comme l'ARN, l'ADN, les protéines, le glutathion ou la méthionine. Parmi ces composants cellulaires, les cibles principales sont les atomes d'azote des bases purines et pyrimidines de l'ADN, c'est à dire les atomes N7 et N1 de l'adénine, N3 de la cystéine et N7 de la guanine. L'établissement de ces liaisons avec l'ADN double brin donne lieu à différents adduits (figure 25) : bifonctionnels intrabrin (b) et interbrin (a), ainsi que monofonctionnels (c) **(Scott & Bradbury., 1994).**

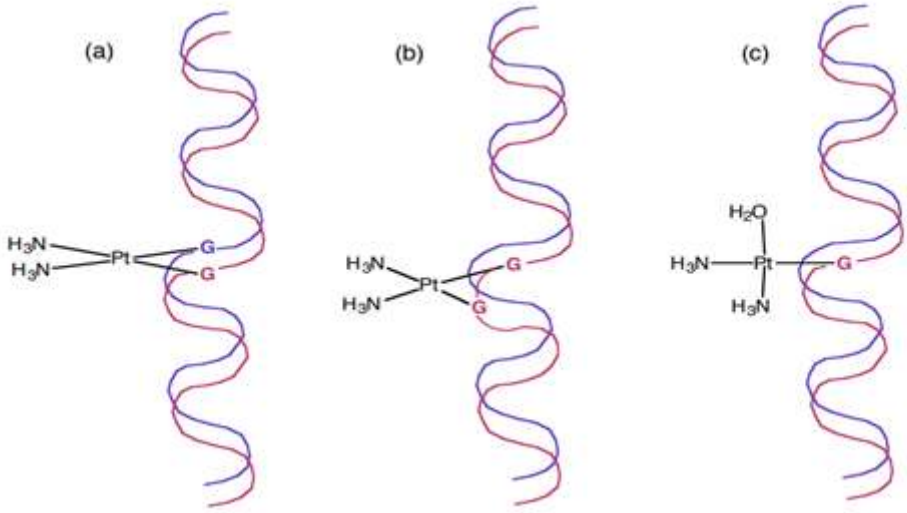


Figure 25 : modes de fixation du cisplatine sur l'ADN!: (a) bifonctionnel interbrin, (b)!bifonctionnel intrabrin, (c) monofonctionnel

Dans 90% des cas (figure25 a), les adduits sont formés entre deux bases purines adjacentes (65% sont formés entre deux guanines adjacentes, et 25% entre une guanine et une adénine). La formation de ces adduits ADN-cisplatine entraîne une modification de la structure de la double hélice, ce qui perturbe la réplication et la transcription de l'ADN.

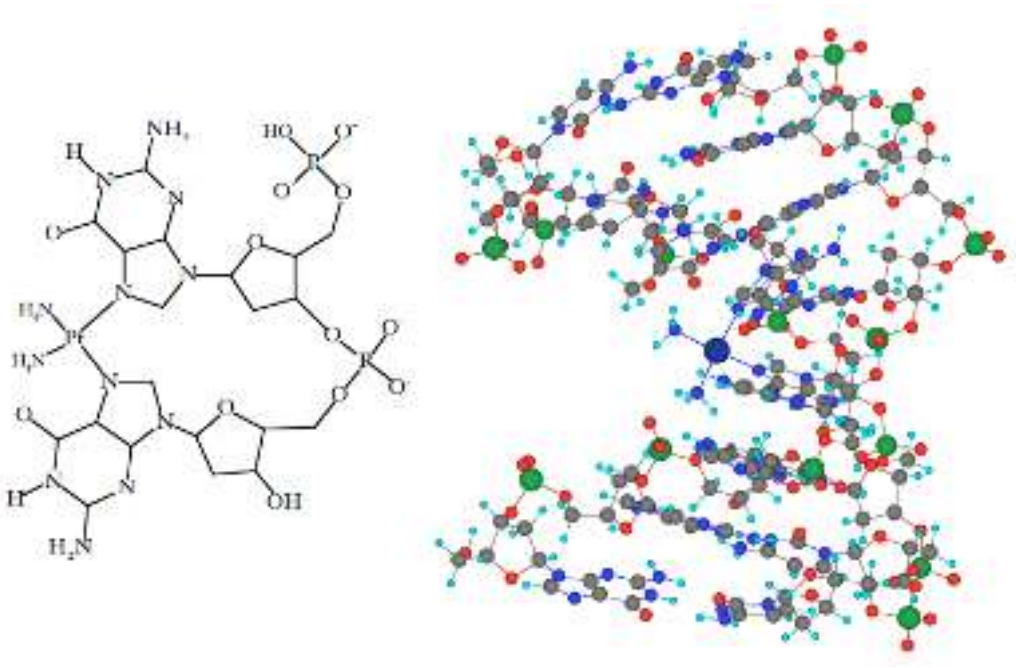


Figure 26 : représentations 2D et 3D de la structure d'un adduit cisplatine- dodécamère.

L'équipe de Coste a travaillé sur ces modifications, en utilisant un dodécamère formant une double hélice. La structure d'un adduit cisplatine-dodécamère a été résolue par diffraction des rayons X **(Coste et al., 1999)**. La représentation en trois dimensions de cette structure (figure26) permet de visualiser les distorsions de l'ADN induites par la présence de platine. La plus visible d'entre elles est l'angle formé par deux bases initialement parallèles, dont la valeur est ici de 47°.

4.5 Lésions du Cisplatine

La plus grande partie du cisplatine (90%) est éliminée par l'organisme (**Gormley et al., 1981**) et c'est seulement 2 à 3 % du cisplatine libre qui arrive dans le cytoplasme sous forme cationique pouvant réagir avec les espèces nucléophiles présentes dans les cellules. Dans le noyau, le cisplatine réagit avec les N7 des guanines et des adénines de l'ADN pour former principalement des adduits bifonctionnels (**Lepre et Lippard, 1990**).

4.5.1 Les adduits monofonctionnels

In vitro, la réaction du cisplatine avec l'ADN se fait en deux étapes. Après formation d'une liaison de coordination entre le platine et l'azote N7 d'une purine, l'adduit monofonctionnel, transitoire, va évoluer en 2-3 heures vers un adduit bifonctionnel après hydrolyse du second groupement chloro **(Bancroft et al., 1990**). La nature transitoire de ce type d'adduit ne permet pas de déterminer sa structure. Les informations sont obtenues par étude des adduits des dérivés du platine tel que le diéthylènechlorotriamineplatine(II) (dienPt) qui ne peut former que des adduits monofonctionnels.

Les adduits monofonctionnels ne représentent que 1 à 2% des lésions formées par le cisplatine **(Eastman, 1983 ; Fichtinger-Schepman et al., 1985)** et peuvent donner naissance à des pontages ADN-protéine. Aucune torsion de la double hélice n'a été détectée (**Bellon et Lippard, 1990**) mais la conformation de l'ADN est perturbée au niveau de la lésion. Cette dénaturation locale est influencée par la séquence environnante de la base pontée par le cisplatine **(Brabec et al., 1992, 1994).**

4.5.2 Les adduits bifonctionnels

Les pontages intrabrins formés entre deux purines présentes sur le même brin d'ADN sont les adduits majoritaires du cisplatine **(pour revue, Wang et Lippard, 2005**). Les adduits 1,2 se forment entre deux purines adjacentes tandis que les adduits 1,3 se forment avec deux guanines séparées par une base (figure27). Les pontages interbrins se font dans le site d(GC/CG) entre les deux guanines présentes chacune sur un brin d'ADN **(Lemaire et al., 1991 ; Hopkins et al., 1991).**

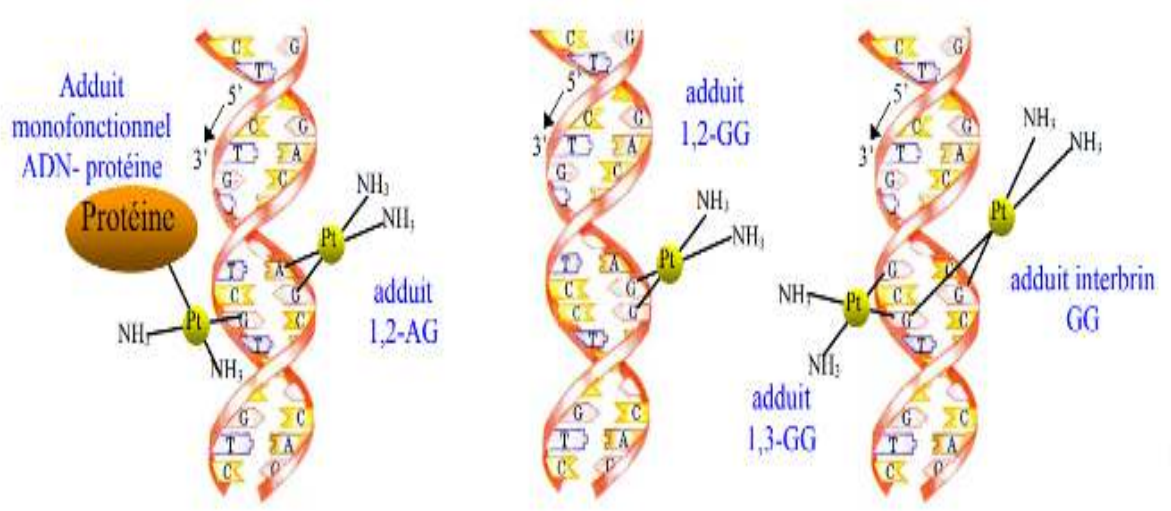


Figure 27. Nature des adduits bifonctionnels du cisplatine formés avec l'ADN **(d'après thèse de M. A. Elizondo-Riojas, 2001).**

Les adduits intrabrins 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) sont les adduits majoritaires formés par le cisplatine (respectivement 65 et 25% de la totalité des adduits du cisplatine). La guanine est dix fois plus réactive avec le cisplatine que l'adénine (**Caradonna et al., 1982)**. Il a été montré (**Monjardet-Bas et al., 2003 ; Mantri et al., 2007)** que la préférence du cisplatine à former les adduits ApG plutôt que GpA est due à la cinétique de la platination.

Les adduits 1,3-d(GpNpG) ne représentent que 5 à 10% des adduits (**FitchtingerSchepman et al., 1985 ; Eastman, 1987)** tandis que les adduits interbrins et les adduits pontages ADN/protéine sont minoritaires (**Plooy et al., 1984 ; Roberts et Friedlos, 1987)** (tableau03). Les études in vivo sur l'ADN de cellules de patients traités au cisplatine donnent les mêmes résultats **(Fichtinger-Schepman et al., 1987).**

Tableau03. Caractérisation des adduits du cisplatine : pourcentage de chaque adduit et déformations de l'ADN engendrées **(d'après Kartalou et Essigman, J. M., 2001**). Les techniques d'analyses des déformations (torsion et déroulement) sont l'électrophorèse (a), la cristallographie (b) et la RMN (c)

Adduit	% de la totalité des adduits	Courbure de l'ADN (en °)	Déroulement de l'ADN (en °)	Références bibliographiques
Monofonctionnel : ADN-protéine	1	0	5 (a)	Bellon et Lippard, 1990
Intrabrin 1, 2-d(GpG)	65	32-34 (a) 39-55 (b) 78 (c) 58 (c)	13 (a) 25 (c) 21 (c)	Bellon et Lippard, 1990 Takhara et coll., 1995 Gelasco et Lippard, 1998 Yang et coll., 1995
Inrabrin 1,2-d(ApG)	5-10	32-34 (a) 55 (c)	13 (a)	Bellon et Lippard, 1990 Fouchet et coll., 1997
Intrabrin 1,3-d(GpNpG)	5-10	35 (a) 20 (c)	23 (a) 19 (c)	Anin et Leng, 1990 Bellon et Lippard, 1990 van Garderen et van Houte, 1994
Interbrin d(G*pC/G*pC)	2	45 (a) 47 (b) 20 (c) 40 (c)	79 (a) 70 (b) 87 (c) 76 (c)	Malinge et coll., 1994 Coste et coll., 1999 Huang et coll., 1995 Paquet et coll., 1996

4.6 Mécanismes de résistance au cisplatine.

La chimiorésistance peut se définir comme la capacité des cellules cancéreuses à survivre à l'exposition d'agents cytotoxiques. Elle constitue la première cause d'inefficacité de la chimiothérapie. Elle se manifeste soit d'emblée, on l'appelle alors chimiorésistance innée (c'est le cas pour les cancers du rein), soit progressivement au cours du traitement, auquel cas elle sera dite acquise (cas des leucémies, cancers du sein, etc.). Il est important de garder à l'esprit que le métabolite actif du cisplatine réagit avec d'autres molécules que l'ADN, par exemple avec l'ARN ou certaines protéines. Ce complexe a également de fortes affinités pour les molécules contenant des thiols, en particulier la cystéine, le glutathion réduit, la méthionine, etc. Le glutathion (GSH) est un tripeptide de séquence Glu-Cys-Gly (figure 28). Sa concentration de 0,5 à 10mM fait de lui le thiol le plus abondant de la cellule. Ce nucléophile réagit avec le cisplatine, pour former un complexe platine-GSH qui est ensuite éliminé de la cellule **(Ishikawa & Ali-Osman., 1993)** . Le glutathion protège donc la cellule en interceptant les métabolites réactifs du cisplatine avant qu'ils ne puissent réagir avec

l'ADN. Les adduits cisplatine-glutathion ont été caractérisés par Dedon et Borch en 1987 **(Dedon & Borch, 1987)** par spectroscopie Infra rouge. L'absence de la bande caractéristique de la liaison S—H leur a permis de conclure que le tripeptide se fixe au platine par l'atome de soufre de la cystéine.

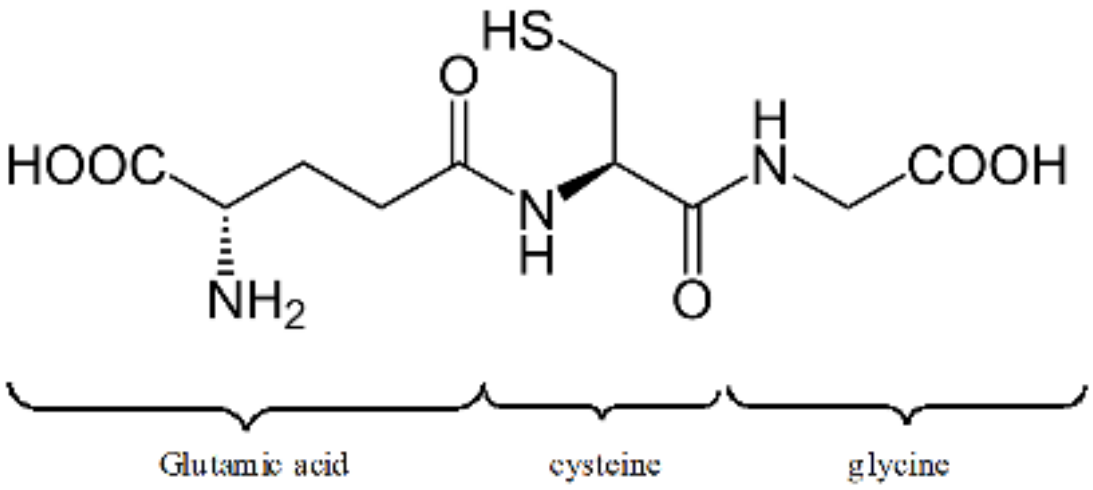


Figure 28 : structure du glutathion

Le glutathion protège aussi la cellule en favorisant la réparation de l'ADN, probablement en stabilisant les enzymes nécessaires (comme l'ADN polymérase a), ou en favorisant la formation de désoxyribonucléotides **(Wong & Giandomenico, 1999)** . Certaines lignées de cellules possédant une chimiorésistance acquise au cisplatine montrent un taux de glutathion particulièrement élevé. Il est donc probable que le stress créé par la tumeur augmente la capacité de la cellule à produire du glutathion **(Chu, 1994)** .

Le glutathion est donc particulièrement impliqué dans le mécanisme de résistance au cisplatine en formant des espèces inactives avec le médicament, et en favorisant la réparation de l'ADN.

Chapitre03 :

Matériel et méthodes

1 Matériel et méthodes :

Vu le contexte de la pandémie à Covid-19 et suite aux restrictions imposées par le confinement, l'accès au laboratoire pour la réalisation de la partie pratique au sein de la salle de la culture cellulaire été impossible. Cause pour laquelle on s'est limité dans notre travail pratique à l'analyse de données fournies par notre encadreur. Nous présentons ici juste le protocol d'obtention de ces données.

1.1 Lignées et cultures cellulaires :

Trois lignées d'hépatocarcinomes: Hep3B et SNU449 et Huh7 disponibles et stockées d'une manière régulière dans de l'azote liquide ont fait l'objet de notre étude. Ces lignées cellulaires sont toutes commercialisées chez American Type Culture Collection (ATCC).

Les cellules de la lignée Hep3B et Huh7sont cultivées dans le milieu DMEM Hight Glucose, 4,5g/l. Les cellules des lignées Snu449 sont cultivées dans le milieu RPMI 1640. Les milieux sont supplémentés de 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 1 % d'acides aminés non essentiels et 1 % d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine). Les cellules de toutes les lignées sont cultivées sur plastique à 37°C dans une étuve saturée en humidité sous une atmosphère contenant 5 % de CO2. Toutes les lignées cellulaires étaient régulièrement testées pour la contamination par les mycoplasmes .

2 Test de cytotoxicité

2.1 Traitement des cellules par le Cisplatine

Sachant que la majorité des cellules tumorales se multiplient plus rapidement que les cellules saines, les molécules impliquées directement ou indirectement dans les mécanismes de prolifération cellulaire et plus particulièrement l'ADN nucléaire et les protéines nucléaires associées, représentent de multiples cibles privilégiées des traitements antitumoraux classiques. La toxicité cellulaires du cisplatine, largement utilisées en chimiothérapie

et affectant la structure de l'ADN a été évaluée par le test de cytotoxicité. Cette molécule

qualifiée d'agent intercalant forme des ponts inter-brins (également dénommés « adduits » ou « Interstrand-Crosslinks », ICL) qui consistent en un lien covalent entre les 2 brins de l'ADN, générant des distorsions prononcées de la double hélice. La conséquence directe est que la réplication est rendue impossible : le « réplisome » ne peut plus progresser, car les brins ne peuvent plus être séparés, ce qui engendre un blocage de la fourche et des cassures d'ADN double brin **(McHugh et al., 2000, Tercero et al., 2001, Deans & West, 2011).**

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à des densités relatives au pouvoir prolifératif de chaque lignée. Après 24h d'incubation à 37°C (5 % de Co2) les cellules de chacune des lignées ont été traitées à des concentrations croissantes, obtenues par des dilutions en cascade, par les différentes drogues. Les plaques sont ensuite mises en culture à 37°C pendant 96h. Pour chaque lignée un ensemble de trois expérience indépendante et des triplicats de chaque concentration ont été réalisées.

2.2 Evaluation de la viabilité cellulaire au bleu de méthylène

Après 96 heures de traitement des cellules en plaque 96 puits, les surnageants de culture sont éliminés et les cellules sont rincées avec du PBS 1X puis fixées à l'éthanol absolu froid (-20°C) pendant 15 minutes à température ambiante. Après élimination de l'éthanol et séchage des puits 20 mn à 37°C les cellules sont colorées pendant 10 minutes par une solution de bleu de méthylène à 5% en tampon borate. Le bleu de méthylène pénètre dans les cellules fixées et n'est pas éliminé par les rinçages à l'eau successifs. Une fois les plaques séchées 1heure à 37°C , les cellules fixées et colorées en bleu sont lysées par une solution d'acide chlorhydrique 0,1 M. Ainsi, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes dans chaque puits. La mesure de l'absorbance à 570nm a été réalisée par un lecteur de microplaque. une valeur de 100% a été affectée aux puits témoin sans traitement.

Les moyennes des DO obtenues et la normalisation des pourcentage de vie sont calculés par Excel et la concentration de drogue qui réduit le nombre de cellules de 50% après 96h de traitement (IC50) a été calculée par le GraphPadPrism

Résultat

3 Résultats

3.1 Analyse des données

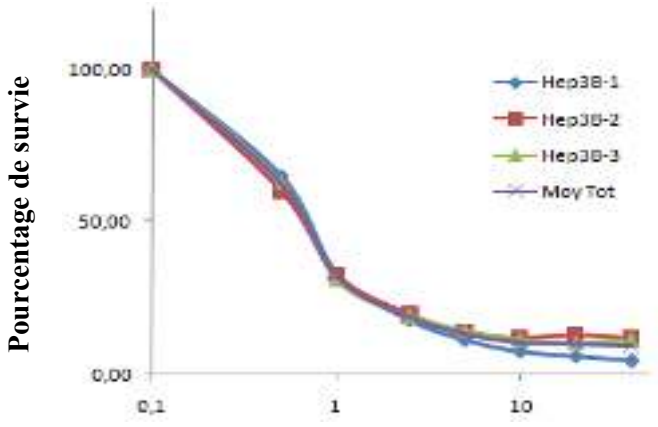
3.1.1 Effet du Cis-platine sur les différentes lignées de carcinomes hépatocellulaires.

La lignée Hep3B

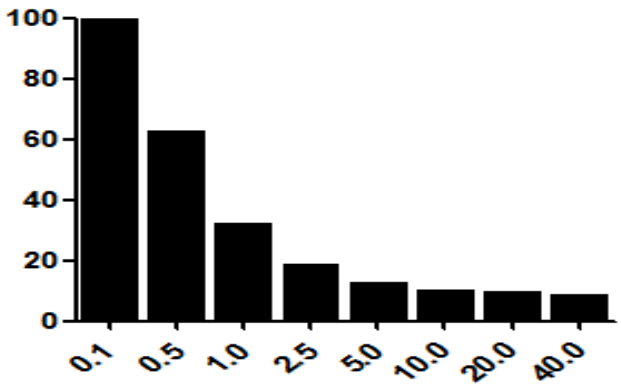
Tableau 04 : les moyennes des DO obtenues et la normalisation des percentages de vie de **Hep3B** calculé par Excel.

Cisplatine (µM)

	0,1	0,5	1	2,5	5	10	20	40
	1,00E-03	5,00E-01	1,00E+00	2,50E+00	5,00E+00	1,00E+01	2,00E+01	4,00E+01
Hep3B-1 3500cell/pt	2,476	1,555	0,776	0,472	0,245	0,175	0,094	0,084
	2,521	1,694	0,870	0,461	0,289	0,198	0,182	0,146
	2,470	1,618	0,817	0,402	0,290	0,187	0,178	0,086
Hep3B-2 3500cell/pt	2,810	1,610	0,895	0,531	0,341	0,366	0,356	0,301
	2,692	1,731	0,912	0,522	0,434	0,269	0,345	0,344
	2,740	1,597	0,874	0,571	0,352	0,334	0,331	0,319
Hep3B-3 3500cell/pt	2,612	1,663	0,892	0,522	0,357	0,296	0,283	0,301
	2,511	1,644	0,711	0,445	0,383	0,297	0,282	0,284
	2,591	1,570	0,788	0,505	0,367	0,286	0,247	0,274
Moy DO -1	2,49	1,62	0,82	0,45	0,27	0,19	0,15	0,11
Moy DO -2	2,75	1,65	0,89	0,54	0,38	0,32	0,34	0,32
Moy DO -3	2,57	1,63	0,80	0,49	0,37	0,29	0,27	0,29
Moy DO Tot	2,60	1,63	0,84	0,49	0,34	0,27	0,26	0,24
Noml-1	100	65,18	32,99	17,88	11,04	7,50	6,08	4,23
Noml-2	100	59,91	32,53	19,70	13,67	11,76	12,52	11,70
Noml-3	100	63,22	31,00	19,08	14,35	11,39	10,53	11,14
Noml tot	100	62,68	32,17	18,92	13,06	10,28	9,81	9,13



Log [Cisplatine](µM)



Log [Cisplatine](µM)

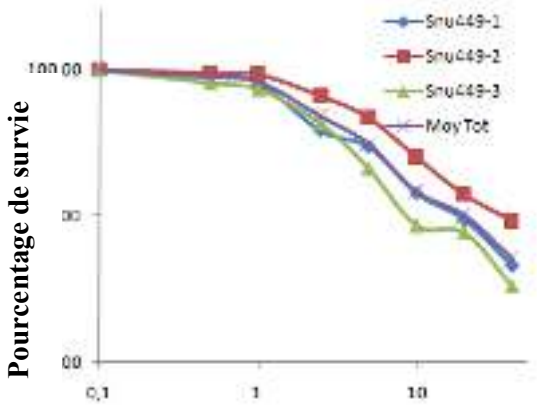
Figure29 : Effet du Cisplatine sur la prolifération des cellules de la lignée cancéreuse Hep3B

La lignée Snu449

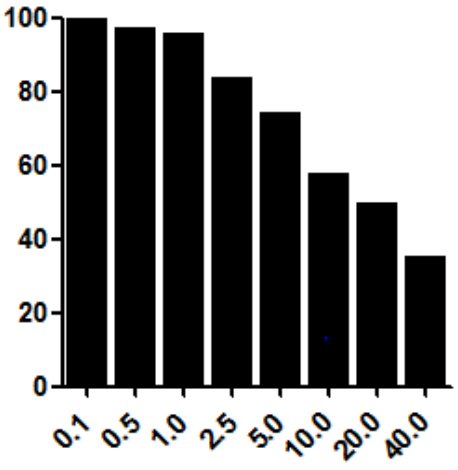
Tableau 05 : les moyennes des DO obtenues et la normalisation des percentages de vie de **Snu449** calculé par Excel.

Cisplatine(µM)

	0,1	0,5	1	2,5	5	10	20	40
	1,00E-03	5,00E-01	1,00E+00	2,50E+00	5,00E+00	1,00E+01	2,00E+01	4,00E+01
Snu449-1	1,354	1,391	1,226	1,060	1,020	0,774	0,638	0,432
4000cell/pt	1,368	1,306	1,346	1,063	0,979	0,782	0,679	0,481
	1,345	1,277	1,312	1,095	0,996	0,791	0,652	0,413
Snu449-2	1,352	1,313	1,328	1,244	1,146	0,963	0,759	0,623
4000cell/pt	1,276	1,231	1,293	1,182	1,086	0,925	0,749	0,638
	1,339	1,373	1,272	1,185	1,084	0,880	0,763	0,641
Snu449-3	1,292	1,213	1,219	1,019	0,855	0,622	0,577	0,322
4000cell/pt	1,275	1,322	1,258	1,092	0,946	0,612	0,592	0,357
	1,364	1,215	1,189	1,093	0,797	0,596	0,565	0,333
MoyDO -1	1,36	1,32	1,29	1,07	1,00	0,78	0,66	0,44
MoyDO -2	1,32	1,31	1,30	1,20	1,11	0,92	0,76	0,63
MoyDO -3	1,31	1,25	1,22	1,07	0,87	0,61	0,58	0,34
MoyDO Tot	1,33	1,29	1,27	1,11	0,99	0,77	0,66	0,47
Noml-1	100	97,71	95,50	79,12	73,64	57,71	48,41	32,60
Noml-2	100	98,74	98,13	91,03	83,59	69,78	57,25	47,95
Noml-3	100	95,40	93,26	81,51	66,09	46,55	44,11	25,74
Noml Tot	100	97,29	95,64	83,85	74,46	58,04	49,93	35,44



Log [Cisplatine (µM)]



Log [Cisplatine (µM)]

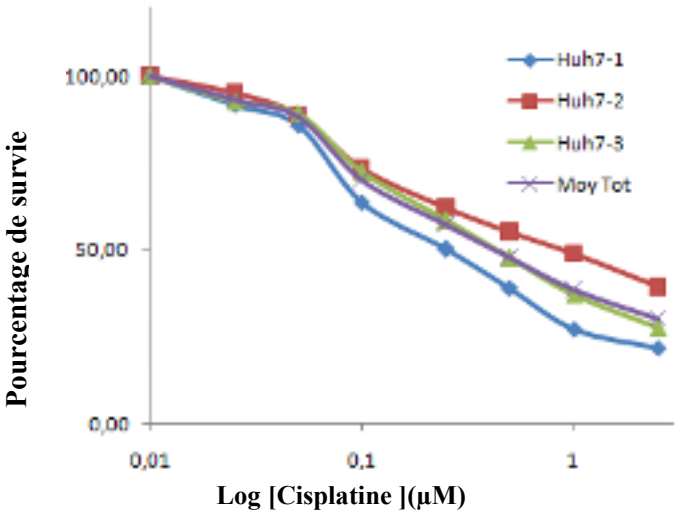
Figure 30 : Effet du Cisplatine sur la prolifération des cellules de la lignée cancéreuse Snu449

La lignée Huh7

Tableau 06 : les moyennes des DO obtenues et la normalisation des percentages de vie de **Huh7** calculé par Excel.

Cisplatine (µM)

	0,01	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	1	2,5
	1,00E-03	5,00E-01	1,00E+00	2,50E+00	5,00E+00	1,00E+01	2,00E+01	4,00E+01
Huh7-1 4000cell/pt	2,291 2,248 2,309	2,082 2,093 2,108	1,911 1,957 2,018	1,473 1,436 1,453	1,121 1,142 1,165	0,861 0,853 0,950	0,626 0,650 0,580	0,518 0,528 0,439
Huh7-2 4000cell/pt	2,760 2,764 2,906	2,767 2,624 2,634	2,563 2,474 2,459	2,197 1,971 2,019	1,829 1,686 1,738	1,560 1,523 1,557	1,351 1,410 1,364	1,105 1,068 1,140
Huh7-3 4000cell/pt	2,598 2,746 2,915	2,424 2,614 2,640	2,354 2,446 2,559	1,951 1,984 2,038	1,541 1,614 1,676	1,324 1,248 1,371	1,001 1,089 0,979	0,702 0,726 0,831
MoyDO-1	2,28	2,09	1,96	1,45	1,14	0,89	0,62	0,50
MoyDO-2	2,81	2,68	2,50	2,06	1,75	1,55	1,38	1,10
Moy DO-3	2,75	2,56	2,45	1,99	1,61	1,31	1,02	0,75
MoyDO Tot	2,62	2,44	2,30	1,84	1,50	1,25	1,01	0,78
Noml-1	100,00	91,75	85,95	63,70	50,06	38,90	27,10	21,69
Noml-2	100,00	95,20	88,92	73,39	62,31	55,04	48,93	39,30
Noml-3	100,00	92,97	89,10	72,32	58,49	47,74	37,16	27,35
Noml Tot	100,00	93,41	88,12	70,20	57,41	47,78	38,45	29,98



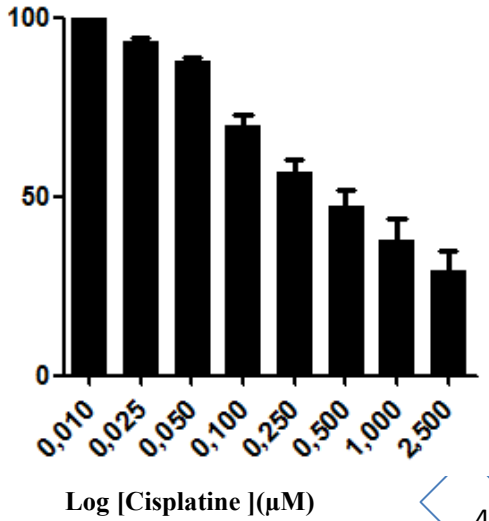


Figure 31 : Effet du Cisplatine sur la prolifération des cellules de la lignée cancéreuse Huh

Le bleu de méthylène a été utilisé afin d'évaluer l'effet cytotoxique du Cisplatine envers les trois lignées de cellules étudiées. Après 96 heures de traitement, les résultats obtenus ont montré, pour les trois lignées une diminution de la viabilité cellulaire proportionnelle à l'augmentation de la concentration du cisplatine. Les concentrations croissante du Cisplatine de 0,5 à 40µM n'ont pas exercé le même effet sur les trois lignées des cellules dont la réduction du nombre cellulaire diffère d'une lignée à une autre. Toutefois, il est intéressant de noter que la moyenne de plus de 50% de survie cellulaire des lignées Hep3B, Snu449 et Huh7 est inhibée à des concentration de 0,5 µM, 10 µM et 0,25 µM respectivement.

3.2 Profil de la résistance des cellules du CHC au Cisplatine

La réponse de trois lignées cellulaires d'hépatocarcinome à un agent alkylant a été évaluée par leur viabilité cellulaire. Le choix du Cis-platine a été basé sur sa capacité à engendrer, par liaison covalente, des pontages interbrins au niveau de la molécule d'ADN empêchant sa réplication et sa transcription (**Noll et al.,2006**). De plus, ces lésions induisent souvent des cassures simple- ou double-brin de l'ADN ce qui conduit à l'apoptose de la cellule ou à la mise en exécution des systèmes de réparation pour le maintien de la prolifération des cellules tumorales (phénomène de résistance).

L' effet du Cis-platine sur la croissance globale des différentes lignées étudiées (Huh7, Hep3B et Snu449) a été évalué par le test de cytotoxicité. Dans nos conditions expérimentales, on a sélectionné la lignée Huh7 comme référence pour l'évaluation de la résistance des autres lignées cellulaires de CHCs testées. En effet, la lignée Huh7 est déficiente dans la réparation des pontages interbrins à cause d'une mutation dans l'un des groupes de complémentation (FANCC) des gènes responsables de l'Anémie de Fanconi et démontre une hypersensible aux traitement testé (**Palagyi et al., 2010).**

Chaque test de cytotoxicité a été réalisé au moins trois fois en triplicats et la concentration pour laquelle 50 % des cellules sont vivantes après traitement (IC50) a été déterminée . Les

IC50 ont été moyennées sur les 3 lignées du CHC. Le tableau**08** résume les valeurs des IC50 et la résistance relative des deux phénotypes des lignées cellulaires d'hépatocarcinomes testées et comparées à Huh7.

Le tableau07: les valeurs des IC50 et la résistance relative des deux phénotypes des lignées cellulaires d'hépatocarcinomes testées et comparées à Huh7

Lignées cellulaires du carcinome hépatocellulaire	**Cis-platin** IC50 (µM)	RR*
Huh 7(déficiente)	*0.1528*	*1*
Hep3B	*0.3527*	*2*
Snu449	*9.586*	*63*

RR*: *Résistance relative comparée à la lignée cellulaire Huh7 hypersensible.*

Les deux lignées de carcinomes hépatocellulaires montrent une résistance plus au moins consistante au Cis-platine. Comme le montre le tableau, les cellules des deux lignées Hep3B et Snu449 présentent une résistance relative au Cisplatine 2 et 63 fois, respectivement, plus élevées comparée à Huh7.

Une hyper résistance est marquée dans la lignée cellulaire Snu449.

DISCUSSION

4 Discussion

Les différentes lignées cellulaires d'hépatocarcinome utilisées dans notre étude sont classée en deux phénotype cellulaire . La classification des lignées cellulaires du CHC en types "épithélial " tels que Huh7 et Hep3B et "mésenchymateux" tel que Snu449 est basée sur leurs critères morphologiques in vitro et leur expression différentielle de certains marqueurs tels que l' E-cadhérine et la vimentine (**Fuchs et al., 2008; Yuzugullu et al., 2009**). La transition entre les deux phénotype (TEM: Transition Epéthélio-Mésenshymateuse) est pré-requis pour la progression tumorale, suggérant que le phénotype épithélial et le phénotype mésenchymateux, correspondent respectivement aux stades précoce et avancé du CHC.

La carcinogenèse hépatique, fréquente en cas de cirrhose, est un processus multifactoriel et séquentiel. l'apparition du CHC nécessite une phase d'initiation des hépatocytes, puis de promotion tumorale et de progression. Dans ce schéma, les hépatocytes accumulent progressivement des anomalies moléculaires responsables des troubles fonctionnels (touchant notamment la réplication cellulaire), qui vont conférer à certains clones cellulaires un avantage de croissance. La transition vers les stades les plus évolués des CHCs est accompagnée par de véritables changements matérialisés par une transcription génique différentielle conférant à ces stades avancés leurs phénotypes malins et immortels.

L'émergence de la résistance aux drogues utilisées en thérapie conventionnelle présente un obstacle majeur dans le traitement des carcinomes hépatocellulaires **(Wong et al., 2009**). Dans notre étude, l'évaluation de la réponse des lignées cellulaires d'hépatocarcinomes a montré une résistance remarquable de la lignée cellulaire Snu449 de type mésenchymateux au cisplatine, agent induisant des pontages interbrins de l'ADN. Les pontages inter-brins de l'ADN sont des lésions extrêmement cytotoxiques qui, par la création de liaison covalente entre les brins Watson et Crick de l'ADN, bloquent la réplication et la transcription de l'ADN. Les agents pontant l'ADN sont largement utilisés dans la chimiothérapie, mais leur efficacité est souvent limitée par l'activation fréquente des mécanismes de réparation au sein des tumeurs et par conséquent, l'acquisition de résistance.

Conclusion

Le carcinome hépatocellulaire est une des principale cause de mortalité chez les patients cirrhotique. Les possibilités de traitement sont généralement réduites par la cirrhose qui limite l'utilisation de la chimiothérapie. Les résultats des chimiothérapies systémiques restent décevants chez les patients présentant un carcinome hépatocellulaire inopérable, probablement dû à la forte et fréquente expression de gènes impliqués dans la résistance pleïotropique aux agents anticancéreux conventionnels (MDR, MRP, haut niveau de thymidilate synthase, …).

De plus, l'administration de la chimiothérapie chez le patient cirrhotique est souvent délicate pour de nombreux médicaments à métabolisme ou excrétion hépatique, la réduction de la capacité du foie à métaboliser et à excréter les agents cytotoxiques s'accompagnant dans ce cas d'une augmentation de la toxicité. Le recours à d'autres alternatives semble impératif. Cependant, le développement des thérapies ciblés a conduit à des avancés dans le traitement des cancers.

Les Références Bibliographiques

Les Références bibliographiques :

Abou-Elella, A., Gramlich, T., Fritsch, C., & Gansler, T. (1996). c-myc amplification in hepatocellular carcinoma predicts unfavorable prognosis. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *9*(2), 95.

Ahn, S. M., Jang, S. J., Shim, J. H., Kim, D., Hong, S. M., Sung, C. O., ... & Chun, S. M. (2014). Genomic portrait of resectable hepatocellular carcinomas: implications of RB1 and FGF19 aberrations for patient stratification. *Hepatology*, *60*(6), 1972-1982.

Balsara, B. R., Pei, J., De Rienzo, A., Simon, D., Tosolini, A., Lu, Y. Y., ... & London, W. T. (2001). Human hepatocellular carcinoma is characterized by a highly consistent pattern of genomic imbalances, including frequent loss of 16q23. 1–24.1. *Genes, Chromosomes and Cancer*, *30*(3), 245-253.

Balzarini, P., Benetti, A., Invernici, G., Cristini, S., Zicari, S., Caruso, A., ... & Portolani, N. (2012). Transforming growth factor-beta1 induces microvascular abnormalities through a down-modulation of neural cell adhesion molecule in human hepatocellular carcinoma. *Laboratory investigation*, *92*(9), 1297-1309.

Bancroft, DP, Lepre, CA, et Lippard, SJ (1990). Études cinétiques et mécanistiques par RMN du platine 195 de la liaison cis et trans-diamminedichloroplatine (II) à l'ADN. *Journal de l'American Chemical Society* , *112* (19), 6860-6871.

Bellon, SF et Lippard, SJ (1990). Études de flexion de l'ADN spécifiquement modifié par le cisplatine, le trans-diamminedichloroplatine (II) et le cis- [Pt (NH3) 2 (N3-cytosine) Cl] +. *Chimie biophysique* , *35* (2-3), 179-188.

Bentefrit, F. (1996). *Analogues du cisplatine: quelques composes formes par le platine (ii) et (iv) ou palladium (ii) avec deux medicaments de la famille des biguanides (metformine et proguanil)* (Doctoral dissertation, Paris 11).

Biden, K., Young, J., Buttenshaw, R., Searle, J., Cooksley, G., Xu, D. B., & Leggett, B. (1997). Frequency of mutation and deletion of the tumor suppressor gene CDKN2A (MTS1/p16) in hepatocellular carcinoma from an Australian population. *Hepatology*, *25*(3), 593-597.

Biden, K., Young, J., Buttenshaw, R., Searle, J., Cooksley, G., Xu, D. B., & Leggett, B. (1997). Frequency of mutation and deletion of the tumor suppressor gene CDKN2A (MTS1/p16) in hepatocellular carcinoma from an Australian population. *Hepatology*, *25*(3), 593-597.

Blackwell, T. K., Huang, J. I. N. G., Ma, A. V. E. R. I. L., Kretzner, L., Alt, F. W., Eisenman, R. N., & Weintraub, H. (1993). Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Molecular and cellular biology*, *13*(9), 5216-5224**.**

Bodell, W.J., DNA alkylation products formed by 1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea as molecular dosimeters of therapeutic response. J Neurooncol, 2009. 91(3): p. 257-64.

Boige, V., Laurent-Puig, P., Fouchet, P., Fléjou, J. F., Monges, G., Bedossa, P., ... & Thomas, G. (1997). Concerted nonsyntenic allelic losses in hyperploid hepatocellular carcinoma as determined by a high-resolution allelotype. *Cancer research*, *57*(10), 1986-1990.

Bourin, M., Lièvre, M., & Allain, H. (Eds.). (1993). *Cours de pharmacologie*. Ellipses.

Brabec, V., Boudny, V. et Balcarova, Z. (1994). Les adduits monofonctionnels de platine (II) produisent dans l'ADN une dénaturation locale dépendante de la séquence. *Biochemistry*, *33* (6), 1316-1322.

Brabec, V., Reedijk, J., et Leng, M. (1992). Distorsions dépendantes de la séquence induites dans l'ADN par liaison monofonctionnelle au platine (II). *Biochemistry* , *31* (49), 12397-12402.

Bressac, B., Galvin, K. M., Liang, T. J., Isselbacher, K. J., Wands, J. R., & Ozturk, M. (1990). Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(5), 1973-1977.

Bressac, B., Kew, M., Wands, J., & Ozturk, M. (1991). Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, *350*(6317), 429-431**.**

Bruix, J.,& Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *53*(3), 1020**.**

Cancer Res 44, 2043-2051.

Capurro, M. I., Xiang, Y. Y., Lobe, C., & Filmus, J. (2005). Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer research*, *65*(14), 6245-6254 .

Caradonna, JP, Lippard, SJ, Gait, MJ et Singh, M. (1982). Le médicament antitumoral cis-dichlorodiammineplatine forme une réticulation intrastrand d (GpG) lors d'une réaction avec [d (ApGpGpCpCpT)] 2. *Journal of the American Chemical Society* , *104* (21), 5793-5795.

Caruso, ML et Valentini, AM (1999). Surexpression de p53 dans une grande série de patients atteints de carcinome hépatocellulaire: une corrélation clinicopathologique. *Recherche anticancéreuse* , *19* (5 B), 3853-3856.

Challen, C., Guo, K., Collier, J. D., Cavanagh, D., & Bassendine, M. F. (1992). Infrequent point mutations in codons 12 and 61 of ras oncogenes in human hepatocellular carcinomas. *Journal of hepatology*, *14*(2-3), 342-346.

Chem Soc 112, 6860-6871.

Chen, T. C., Hsieh, L. L., Kuo, T. T., Ng, K. F., YH, W. C., Jeng, L. B., & Chen, M. F. (2000). p16INK4 gene mutation and allelic loss of chromosome 9p21-22 in Taiwanese hepatocellular carcinoma. *Anticancer research*, *20*(3A), 1621-1626.

Cheng, A. L., Kang, Y. K., Chen, Z., Tsao, C. J., Qin, S., Kim, J. S., ... & Xu, J. (2009). Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The lancet oncology*, *10*(1), 25-34.

Chiang, CC, Croom, J., Chuang, ST, Chiou, PWS et Yu, B. (2008). Développement d'un système dynamique simulant la digestion gastrique du porc. *Journal asiatique-australasien des sciences animales* , *21* (10), 1522-1528.

Chiu, J. H., Kao, H. L., Wu, L. H., Chang, H. M., & Lui, W. Y. (1992). Prediction of relapse or survival after resection in human hepatomas by DNA flow cytometry. *The Journal of clinical investigation*, *89*(2), 539-545.

Chu, C. Y., Chang, C. C., Prakash, E., & Kuo, M. L. (2008). Connective tissue growth factor (CTGF) and cancer progression. *Journal of biomedical science*, *15*(6), 675-685.

Chu, G. (1994). Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(2), 787-790.

Chu, G. (1994). Réponses cellulaires au cisplatine. Les rôles des protéines de liaison à l'ADN et de la réparation de l'ADN. *Journal of Biological Chemistry* , *269* (2), 787-790.

Coste, F., Malinge, J. M., Serre, L., Leng, M., Zelwer, C., Shepard, W., & Roth, M. (1999). Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 Å resolution: hydration at the platinated site. *Nucleic acids research*, *27*(8), 1837-1846.

Coulouarn, C., Factor, V. M., & Thorgeirsson, S. S. (2008). Transforming growth factor-β gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. *Hepatology*, *47*(6), 2059-2067.

Cowling, V. H., & Cole, M. D. (2006, August). Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 16, No. 4, pp. 242-252). Academic Press. cytosine)Cl]+. *Biophys Chem 35, 179-188.*

De Souza, A. T., Hankins, G. R., Washington, M. K., Orton, T. C., & Jirtle, R. L. (1995). M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nature genetics*, *11*(4), 447-449.

De, A. S., Hankins, G. R., Washington, M. K., Fine, R. L., Orton, T. C., & Jirtle, R. L. (1995). Frequent loss of heterozygosity on 6q at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor locus in human hepatocellular tumors. *Oncogene*, *10*(9), 1725-1729.

Deans, A. J., & West, S. C. (2011). DNA interstrandcrosslinkrepair and cancer. *Nature reviews cancer*, *11*(7), 467-480.

Deans, AJ et West, SC (2011). Réparation de réticulation interstrand de l'ADN et cancer. *Nature reviews cancer* , *11* (7), 467-480.

Debuire, B., Paterlini, P., Pontisso, P., Basso, G., et May, E. (1993). Analyse du gène p53 dans les carcinomes hépatocellulaires et hépatoblastomes européens. *Oncogène* , *8* (8), 2303-2306.

Debuire, B., Paterlini, P., Pontisso, P., Basso, G., et May, E. (1993). Analyse du gène p53 dans les carcinomes hépatocellulaires et hépatoblastomes européens. *Oncogène* , *8* (8), 2303-2306.

Dedon, P. C., & Borch, R. F. (1987). Characterization of the reactions of platinum antitumor agents with biologic and nonbiologic sulfur-containing nucleophiles. *Biochemical pharmacology*, *36*(12), 1955-1964.

Drabsch, Y.,& Ten Dijke, P. (2012). TGF-β signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, *31*(3-4), 553-568.

Duvoux, C., Roudot–Thoraval, F., Decaens, T., Pessione, F., Badran, H., Piardi, T., ... & Dharancy, S. (2012). Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a model including α-fetoprotein improves the performance of Milan criteria. *Gastroenterology*, *143*(4), 986-994**.**

EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. J Hepatol 56, 908-43 (2012).

Eastman,A.(1983): Characterization of the adducts produced in DNA by *cis*diamminedichloroplatinum(II) and *cis*-dichloro(ethylenediamine)platinum(II). Biochemistry22, 3927-3933.

Eisenbrand, G., et al., DNA adducts and DNA damage by antineoplastic and carcinogenic Nnitrosocompounds. J Cancer Res Clin Oncol, 1986. 112(3): p. 196-204.

Emadi, A., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature reviews Clinical oncology*, *6*(11), 638.

Farazi, P. A., & DePinho, R. A. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews Cancer*, *6*(9), 674-687.

Firrincieli, D., Boissan, M., & Chignard, N. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in the liver. *Gastroentérologie clinique et biologique*, *34*(10), 523-528.

Forner, A., Gilabert, M., Bruix, J., & Raoul, J. L. (2014). Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. *Nature reviews Clinical oncology*, *11*(9), 525**.**

Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M., & Dryja, T. P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, *323*(6089), 643-646.

Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P. et Lee, CC (2002). Le gène circadien Period2 joue un rôle important dans la suppression des tumeurs et la réponse aux dommages à l'ADN in vivo. *cellule* , *111* (1), 41-50

Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P. et Lee, CC (2002). Le gène circadien Period2 joue un rôle important dans la suppression des tumeurs et la réponse aux dommages à l'ADN in vivo. *cellule* , *111* (1), 41-50.

Fuchs, J., Jovtchev, G., & Schubert, I. (2008). The chromosomal distribution of histone methylation marks in gymnosperms differs from that of angiosperms. *Chromosome research*, *16*(6), 891-898.

Fujiwara, Y., Monden, M., Mori, T., Nakamura, Y., & Emi, M. (1993). Frequent multiplication of the long arm of chromosome 8 in hepatocellular carcinoma. *Cancer research*, *53*(4), 857-860.

Giannelli, G., Mazzocca, A., Fransvea, E., Lahn, M., & Antonaci, S. (2011). Inhibiting TGF-β signaling in hepatocellular carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, *1815*(2), 214-223.

Goodman LS, Wintrobe MM, Dameshek W, et al. (1946) Nitrogen mustard therapy. JAMA 132: 126-31

Goodman, L. S. MM WINTROBE, W. DAMESHEK, MJ GOODMAN, A. GILMAN & MT MCLENNAN. 1946. *Nitrogen mustard therapy. J. Am. Med. Assoc*, *132*, 126-132.

Gormley, P. E., Gangji, D., Wood, J. H. & Poplack, D. G. (1981): Pharmacokinetic study of cerebrospinal fluid penetration of cis-diamminedichloroplatinum (II). Cancer Chemother Pharmacol 5, 257-260.

Harbour, J. W., & Dean, D. C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes & development*, *14*(19), 2393-2409.

Heldin, C. H., Landström, M., & Moustakas, A. (2009). Mechanism of TGF-β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial–mesenchymal transition. *Current opinion in cell biology*, *21*(2), 166-176.

Heldin, C. H.,& Moustakas, A. (2012). Role of Smads in TGFβ signaling. *Cell and tissue research*, *347*(1), 21-36.

Herceg, Z., & Paliwal, A. (2011). Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *727*(3), 55-61 .

Hickman, E. S., Moroni, M. C., & Helin, K. (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Current opinion in genetics & development*, *12*(1), 60-66.

Higashitsuji, H., Itoh, K., Nagao, T., Dawson, S., Nonoguchi, K., Kido, T., ... & Fujita, J. (2000). Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nature medicine*, *6*(1), 96-99.

Higashitsuji, H., Itoh, K., Nagao, T., Dawson, S., Nonoguchi, K., Kido, T., ... & Fujita, J. (2000). Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nature medicine*, *6*(1), 96-99.

Hooker, C. W., & Hurlin, P. J. (2006). Of myc and mnt. *Journal of cell science*, *119*(2), 208-216.

Hopkins, P. B., Millard, J. T., Woo, J., Weidner, M. F., M. F., Kirchner, J. J.,
Hoshida, Y., Nijman, S. M., Kobayashi, M., Chan, J. A., Brunet, J. P., Chiang, D. Y., ... & Watanabe, G. (2009). Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer research*, *69*(18), 7385-7392.

Hsu, I. C., Metcalf, R. A., Sun, T., Welsh, J. A., Wang, N. J., & Harris, C. C. (1991). Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, *350*(6317), 427-428.

Hsu, IC, Metcalf, RA, Sun, T., Welsh, JA, Wang, NJ et Harris, CC (1991). Point chaud de mutation dans le gène p53 dans les carcinomes hépatocellulaires humains. Nature , 350 (6317), 427-428.

Hsu, IC, Metcalf, RA, Sun, T., Welsh, JA, Wang, NJ et Harris, CC (1991). Point chaud de mutation dans le gène p53 dans les carcinomes hépatocellulaires humains. *Nature* , *350*(6317), 427-428.

Hussain, S. P., & Harris, C. C. (1999). p53 mutation spectrum and load: the generation of hypotheses linking the exposure of endogenous or exogenous carcinogens to human cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *428*(1-2), 23-32**.**

Iltis, A. (2013). *Étude rétrospective de la toxicité du cisplatine comparée à celle de l'oxaliplatine ou du carboplatine en association avec la cytarabine et la dexaméthasone dans les lymphomes* (Doctoral dissertation).in chinese hamster ovary cells treated with various platinum coordination compounds in interstrand cross-links and their repair in mammalian cells: relationship to toxicity.

Ishikawa, T.,& Ali-Osman, F. (1993). Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum (II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(27), 20116-20125.

Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Shirai, Y., Kiso, S., Tsushima, H., & Matsuzawa, Y. (1995). Positive correlation of plasma transforming growth factor-β1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer letters*, *89*(1), 45-48.

Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Takaishi, K., Shirai, Y., Kiso, S., ... & Tarui, S. (1991). Elevated levels of transforming growth factor β messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. *Cancer research*, *51*(15), 4080-4083.

Jagirdar, J. A. I. S. H. R. E. E., Nonomura, A., Patil, J. A. Y. G. O. N. D. A., Thor, A., & Paronetto, F. (1989). ras oncogene p21 expression in hepatocellular carcinoma. *Journal of experimental pathology*, *4*(1), 37-46.

Jin, H., Zhou, H., Cheng, X., Tang, R., Munoz, M. et Nguyen, N. (2000). Les virus respiratoires syncytiaux recombinants avec des délétions dans les gènes NS1, NS2, SH et M2-2 sont atténués in vitro et in vivo. *Virology* , *273* (1), 210-218.

Jin, H., Zhou, H., Cheng, X., Tang, R., Munoz, M. et Nguyen, N. (2000). Les virus respiratoires syncytiaux recombinants avec des délétions dans les gènes NS1, NS2, SH et M2-2 sont atténués in vitro et in vivo. *Virology* , *273* (1), 210-218.

Johnson, P. J., Qin, S., Park, J. W., Poon, R. T., Raoul, J. L., Philip, P. A., ... & Lu, L. (2013). Brivanib versus sorafenib as first-line therapy in patients with unresectable, advanced hepatocellular carcinoma: results from the randomized phase III BRISK-FL study. *J Clin Oncol*, *31*(28), 3517-3524.

Kaimori, A., Potter, J. J., Choti, M., Ding, Z., Mezey, E., & Koteish, A. A. (2010). Histone deacetylase inhibition suppresses the transforming growth factor β1–induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocytes. *Hepatology*, *52*(3), 1033-1045.

Kalluri, R.,& Weinberg, R. A. (2010). Erratum: The basics of epithelial-mesenchymal transition (The Journal of Clinical Investigation (2009) 119, 6,(1420-1428. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(5).

Kawate, S., Fukusato, T., Ohwada, S., Watanuki, A., & Morishita, Y. (1999). Amplification of c-myc in hepatocellular carcinoma: correlation with clinicopathologic features, proliferative activity and p53 overexpression. *Oncology*, *57*(2), 157-163.

Khalaf, N., Ying, J., Mittal, S., Temple, S., Kanwal, F., Davila, J., & El-Serag, H. B. (2017). Natural history of untreated hepatocellular carcinoma in a US cohort and the role of cancer surveillance. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *15*(2), 273-281.

Kluger, M. D., Salceda, J. A., Laurent, A., Tayar, C., Duvoux, C., Decaens, T., ... & Cherqui, D. (2015). Liver resection for hepatocellular carcinoma in 313 Western patients: tumor biology and underlying liver rather than tumor size drive prognosis. *Journal of hepatology*, *62*(5), 1131-1140**.**

Kokkinakis, D. M., Ahmed, M. M., Chendil, D., Moschel, R. C., & Pegg, A. E. (2003). Sensitization of pancreatic tumor xenografts to carmustine and temozolomide by inactivation of their O6-Methylguanine-DNA methyltransferase with O6-benzylguanine or O6-benzyl-2′-deoxyguanosine. *Clinical cancer research*, *9*(10), 3801-3807.

Kondo, Y., Kanai, Y., Sakamoto, M., Mizokami, M., Ueda, R., & Hirohashi, S. (2000). Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis—a comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *32*(5), 970-979.

Lammer, J., Malagari, K., Vogl, T., Pilleul, F., Denys, A., Watkinson, A., ... & Benhamou, Y. (2010). Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study. *Cardiovascular and interventional radiology*, *33*(1), 41-52.

Laurent-Puig, P., & Zucman-Rossi, J. (2006). Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene*, *25*(27), 3778-3786.

Laurent–Puig, P., Legoix, P., Bluteau, O., Belghiti, J., Franco, D., Binot, F., ... & Zucman–Rossi, J. (2001). Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, *120*(7), 1763-1773**.**

Le Pecq, J. B., & Lepecq, J. B. (1978). *Chimiothérapie anticancéreuse: mécanismes d'action des substances antitumorales* (Vol. 1388). Paris: Hermann.

Lee, T. K., Poon, R. T., Yuen, A. P., Ling, M. T., Kwok, W. K., Wang, X. H., ... & Fan, S. T. (2006). Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clinical cancer research*, *12*(18), 5369-5376**.**

Lemaire, M. A., Schwartz, A., Rahmouni, A. R. & Leng, M. (1991): Interstrand crosslinks

Lepre, CA et Lippard, SJ (1990). Interaction des composés antitumoraux du platine avec l'ADN. Dans *Nucleic Acids and Molecular Biology 4* (pp. 9-38). Springer, Berlin, Heidelberg

Levine, A. J., Hu, W., & Feng, Z. (2006). The P53 pathway: what questions remain to be explored?. *Cell Death & Differentiation*, *13*(6), 1027-1036.

Li, S., & Mao, M. (2013). Next generation sequencing reveals genetic landscape of hepatocellular carcinomas. *Cancer letters*, *340*(2), 247-253.

Liew, C. T., Li, H. M., Lo, K. W., Leow, C. K., Chan, J. Y., Hin, L. Y., ... & Leung, W. T. (1999). High frequency of p16 INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, *18*(3), 789-795.

Lin, Y. W., Sheu, J. C., Liu, L. Y., Chen, C. H., Lee, H. S., Huang, G. T., ... & Lu, F. J. (1999). Loss of heterozygosity at chromosome 13q in hepatocellular carcinoma: identification of three independent regions. *European Journal of Cancer*, *35*(12), 1730-1734.

Lin, Y., Shi, C. Y., Li, B., Soo, B. H., Mohammed-Ali, S., Wee, A., ... & Chan, S. H. (1996). Tumour suppressor p53 and Rb genes in human hepatocellular carcinoma.

Liu, F., & Matsuura, I. (2005). Inhibition of Smad antiproliferative function by CDK phosphorylation. *Cell cycle*, *4*(1), 63-66.

Liu, L., Dai, Y., Chen, J., Zeng, T., Li, Y., Chen, L., ... & Xie, D. (2014). Maelstrom promotes hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition by way of Akt/GSK-3β/Snail signaling. *Hepatology*, *59*(2), 531-543.

Llovet, J. M., & Bruix, J. (2003). Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival. *Hepatology*, *37*(2), 429-442**.**

Llovet, J. M., & Hernandez-Gea, V. (2014). Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III failure and novel perspectives on trial design. *Clinical cancer research*, *20*(8), 2072-2079.

Llovet, J. M., Fuster, J., & Bruix, J. (1999). Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology*, *30*(6), 1434-1440**.**

Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., ... & Schwartz, M. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England journal of medicine*, *359*(4), 378-390.

Llovet, JM, Di Bisceglie, AM, Bruix, J., Kramer, BS, Lencioni, R., Zhu, AX, ... et Gores, GJ (2008). Conception et critères d'évaluation des essais cliniques sur le carcinome hépatocellulaire. *Journal de l'Institut national du cancer* , *100*(10), 698-711.

Ma, L.C., et al., Transcriptional repression of O6-methylguanine DNA methyltransferase gene rendering cells hypersensitive to N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosurea in camptothecin-resistant cells. Mol Pharmacol, 2008. 74(2): p. 517-26.

Maillard E. Epidemiology, natural history and pathogenesis of hepatocellular carcinoma.Cancer/Radiothérapie 2011 ; 15 : 3-5

Mantri, Y., Lippard, S. J. & Baik, M. H. (2007): Bifunctional Binding of Cisplatin to

Marchio, A., Meddeb, M., Pineau, P., Danglot, G., Tiollais, P., Bernheim, A., & Dejean, A. (1997). Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes, Chromosomes and Cancer*, *18*(1), 59-65.

Matsuda, Y., Ichida, T., Matsuzawa, J., Sugimura, K., & Asakura, H. (1999). p16INK4 is inactivated by extensive CpG methylation in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, *116*(2), 394-400.

Matsuda, Y., Ichida, T., Matsuzawa, J., Sugimura, K., & Asakura, H. (1999). p16INK4 is inactivated by extensive CpG methylation in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, *116*(2), 394-400.

Mazzaferro, V., Llovet, J. M., Miceli, R., Bhoori, S., Schiavo, M., Mariani, L., ... & Adam, R. (2009). Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *The lancet oncology*, *10*(1), 35-43

Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, A., Bozzetti, F., ... & Gennari, L. (1996). Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *New England Journal of Medicine*, *334*(11), 693-700**.**

Mazzocca, A., Fransvea, E., Dituri, F., Lupo, L., Antonaci, S., & Giannelli, G. (2010). Down-regulation of connective tissue growth factor by inhibition of transforming growth factor β blocks the tumor–stroma cross-talk and tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *51*(2), 523-534**.**

McHugh, KP, Hodivala-Dilke, K., Zheng, MH, Namba, N., Lam, J., Novack, D., ... et Teitelbaum, SL (2000). Les souris dépourvues d'intégrines β3 sont ostéosclérotiques en raison d'ostéoclastes dysfonctionnels. *Le Journal d'investigation clinique* , *105* (4), 433-440.

Merle, P. (2005). Épidémiologie, histoire naturelle et pathogenèse du carcinome hépatocellulaire. *Cancer/Radiothérapie*, *9*(6-7), 452-457.

Moll, U. M., & Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 interaction. *Molecular cancer research*, *1*(14), 1001-1008.

Monjardet-Bas, V., Bombard, S., Chottard, J. C. & Kozelka, J. (2003) : GA and AG

Morishita, A**.,** Zaidi, M. R., Mitoro, A., Sankarasharma, D., Szabolcs, M., Okada, Y., ... & Chada, K. (2013). HMGA2 is a driver of tumor metastasis. *Cancer research*, *73*(14), 4289-4299.

Möröy, T., Marchio, A., Etiemble, J., Trépo, C., Tiollais, P., & Buendia, M. A. (1986). Rearrangement and enhanced expression of c-myc in hepatocellular carcinoma of hepatitis virus infected woodchucks. *Nature*, *324*(6094), 276-279.

Morrison, C. D., Parvani, J. G., & Schiemann, W. P. (2013). The relevance of the TGF-β Paradox to EMT-MET programs. *Cancer letters*, *341*(1), 30-40.

Moustakas, A., & Heldin, C. H. (2012, October). Induction of epithelial–mesenchymal transition by transforming growth factor β. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 22, No. 5-6, pp. 446-454). Academic Press.

Murakami, H., Sanderson, ND, Nagy, P., Marino, PA, Merlino, G., et Thorgeirsson, SS (1993). Modèle de souris transgénique pour les effets synergiques des oncogènes nucléaires et des facteurs de croissance dans la tumorigenèse: interaction du c-myc et du facteur de

croissance transformant α dans l'oncogenèse hépatique. *Recherche sur le cancer* , *53* (8), 1719-1723.

Nagai, H., Pineau, P., Tiollais, P., Buendia, M. A., & Dejean, A. (1997). Comprehensive allelotyping of human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, *14*(24), 2927-2933.

Nasarek, A., Werner, M., Nolte, M., Georgii, A., & Klempnauer, J. (1995). Trisomy 1 and 8 occur frequently in hepatocellular carcinoma but not in liver cell adenoma and focal nodular hyperplasia. A fluorescence in situ hybridization study. *Virchows Archiv*, *427*(4), 373-378.

Nault, J. C., & Zucman-Rossi, J. (2014). Genetics of hepatocellular carcinoma: the next generation. *J Hepatol*, *60*(1), 224-226.

Neel, J. C., Humbert, L., & Lebrun, J. J. (2012). The dual role of TGFβ in human cancer: from tumor suppression to cancer metastasis. *ISRN molecular biology*, *2012*.

Nieto, M. A. (2011). The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, *27*, 347-376.

N'Kontchou, G., Mahamoudi, A., Aout, M., Ganne-Carrié, N., Grando, V., Coderc, E., ... & Seror, O. (2009). Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: long-term results and prognostic factors in 235 Western patients with cirrhosis. *Hepatology*, *50*(5), 1475-1483**.**

Noll, D. M., Mason, T. M., & Miller, P. S. (2006). Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chemical reviews*, *106*(2), 277-301.

Noll, D. M., Mason, T. M., & Miller, P. S. (2006). Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chemical reviews*, *106*(2), 277-301.

Ogata, N., Tokino, T., Kamimura, T., & Asakura, H. (1990). A comparison of the molecular structure of integrated hepatitis B virus genomes in hepatocellular carcinoma cells and hepatocytes derived from the same patient. *Hepatology*, *11*(6), 1017-1023.

Padua, D. (2009). MassaguéJ. *Roles of TGFbeta in metastasis. Cell Res2009*, *19*, 89-102.

Padua, D., Zhang, X. H. F., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W. L., Gomis, R. R., & Massagué, J. (2008). TGFβ primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*, *133*(1), 66-77.

Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., &Dutton, P. L. (1999). Natural engineering principles of electrontunnelling in biologicaloxidation–reduction. *Nature*, *402*(6757), 47-52.

Palagyi, A., Neveling, K., Plinninger, U., Ziesch, A., Targosz, B. S., Denk, G. U., ... & Hanenberg, H. (2010). Genetic inactivation of the Fanconi anemia gene FANCC identified in the hepatocellular carcinoma cell line HuH-7 confers sensitivity towards DNA-interstrand crosslinking agents. *Molecular cancer*, *9*(1), 1-15.

Peng, S. Y., Lai, P. L., & Hsu, H. C. (1993). Amplification of the c-myc gene in human hepatocellular carcinoma: biologic significance. *Journal of the Formosan Medical Association= Taiwan yi zhi*, *92*(10), 866.

Peyrin-Biroulet, L., Barraud, H., Darfeuil, F., Lefebvre, M., Bigard, M. A., Gueant, J. L., & Bronowicki, J. P. (2006). Anomalies épigénétiques et carcinogenèse hépatique. *Gastroentérologie clinique et biologique*, *30*(12), 1354-1359.

Piao, Z., Park, C., Lee, J. S., Yang, C. H., Choi, K. Y., & Kim, H. (1998). Homozygous deletions of the CDKN2 gene and loss of heterozygosity of 9p in primary hepatocellular carcinoma. *Cancer letters*, *122*(1-2), 201-207.

Pinyol, R., Nault, J. C., Quetglas, I. M., Zucman-Rossi, J., & Llovet, J. M. (2014, November). Molecular profiling of liver tumors: classification and clinical translation for decision making. In *Seminars in liver disease* (Vol. 34, No. 04, pp. 363-375). Thieme Medical Publishers

platinum(II) produce in DNA a sequence-dependent local denaturation. Biochemistry 33,

Plooy, A. C., van Dijk, M. & Lohman, P. H. (1984): Induction and repair of DNA crosslinks

Pullman, A.,& Pullman, B. (1981). Molecular electrostatic potential of the nucleic acids. *Quarterly reviews of biophysics*, *14*(3), 289-380.

Ramesh, S., Qi, X. J., Wildey, G. M., Robinson, J., Molkentin, J., Letterio, J., & Howe, P. H. (2008). TGFβ-mediated BIM expression and apoptosis are regulated through SMAD3-dependent expression of the MAPK phosphatase MKP2. *EMBO*

Reedijk, J. (1985): Adducts of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II) with

Reichl, P., Haider, C., Grubinger, M., & Mikulits, W. (2012). TGF-β in epithelial to mesenchymal transition and metastasis of liver carcinoma. *Current pharmaceutical design*, *18*(27), 4135-4147.relation to platinum binding to DNA, cytotoxicity, mutagenicity, and antitumor activity.Rev Drug Discov 4, 307-320.

Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., &Nusse, R. (1987). The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*, *50*(4), 649-657.

Roberts, J. J. & Friedlos, F. (1987): Quantitative estimation of cisplatin-induced DNA Roberts, J. J., & Friedlos, F. (1987). Quantitative estimation of cisplatin-induced DNA interstrand cross-links and their repair in mammalian cells: relationship to toxicity. *Pharmacology & therapeutics*, *34*(2), 215-246.

Rosenberg B (1978) Platinum complex-DNA interactions and anticancer activity; Biochimie, 60, 859-867.

Rosenberg B, Camp LV and Krigas T (1965) Inhibition of cell division of Escherichia coli by electrolysis products from platinum electrode; Nature, 205, 698-699.

Salem, R., Lewandowski, R. J., Kulik, L., Wang, E., Riaz, A., Ryu, R. K., ... & Yaghmai, V. (2011). Radioembolization results in longer time-to-progression and reduced toxicity compared with chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, *140*(2), 497-507

Salem, R., Lewandowski, R. J., Mulcahy, M. F., Riaz, A., Ryu, R. K., Ibrahim, S., ... & Sato, K. T. (2010). Radioembolization for hepatocellular carcinoma using Yttrium-90 microspheres: a comprehensive report of long-term outcomes. *Gastroenterology*, *138*(1), 52-64.

Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., ... & Sasaki, Y. (2000). AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nature genetics*, *24*(3), 245-250.

SAVARY, P. THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE.

Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Alexandrov, L. B., Calderaro, J., Rebouissou, S., ... & Calatayud, A. L. (2015). Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature genetics*, *47*(5), 505-511.

Scott, J., & Bradbury, R. (1994). Pharmacokinetic Dosing of Carboplatin. *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center*, *1*(1), 56.

sequences of DNA react with cisplatin at comparable rates. **Chemistry** 9, 4739-4745.

Seror, O. (2014). Percutaneous hepatic ablation: what needs to be known in 2014. *Diagnostic and interventional imaging*, *95*(7-8), 665-675

Shachaf, C. M., Kopelman, A. M., Arvanitis, C., Karlsson, Å., Beer, S., Mandl, S., ... & Yang, Q. (2004). MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature*, *431*(7012), 1112-1117.

Shachaf, CM, Kopelman, AM, Arvanitis, C., Karlsson, Å., Beer, S., Mandl, S., ... et Yang, Q. (2004). L'inactivation de MYC révèle une différenciation pluripotente et une dormance tumorale dans le cancer hépatocellulaire. *Nature* , *431* (7012), 1112-1117.

Sherr, C. J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer research*, *60*(14), 3689-3695.

Shirai, Y., Kawata, S., Tamura, S., Ito, N., Tsushima, H., Takaishi, K., ... & Matsuzawa, Y. (1994). Plasma transforming growth factor-β1 in patients with hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases. *Cancer*, *73*(9), 2275-2279.

Sienkiewicz, P., Bielawski, K., Bielawska, A., & Pałka, J. (2004). Amidine analogue of chlorambucil is a stronger inhibitor of protein and DNA synthesis in breast cancer MCF-7 cells than is the parent drug. *European journal of pharmacology*, *492*(2-3), 95-101.

Sigmasson, S. T. & Rauche, S. (1991): Sequence preferences of DANN intrastrand crosslinking agents: Importance of minimal DNA structural reorganization on the cross-linking reactions of mechlorethamine, cisplatine and mitomycin C. Tetrahedon 47, 2475-2489.
Sigmasson, S. T. & Rauche, S. (1991): Sequence preferences of DANN intrastrand crosslinking agents: Importance of minimal DNA structural reorganization on the cross-linking reactions of mechlorethamine, cisplatine and mitomycin C. Tetrahedon 47, 2475-2489.

Soria, J. C., Mauguen, A., Reck, M., Sandler, A. B., Saijo, N., Johnson, D. H., ... & Meta-Analysis of Bevacizumab in Advanced NSCLC Collaborative Group. (2013). Systematicreview and meta-analysis of randomised, phase II/III trials addingbevacizumab to platinum-basedchemotherapy as first-line treatment in patients withadvanced non-small-celllung cancer. *Annals of oncology*, *24*(1), 20-30.

Stork, P., Loda, M., Bosari, S., Wiley, B., Poppenhusen, K., & Wolfe, H. (1991). Detection of K-ras mutations in pancreatic and hepatic neoplasms by non-isotopic mismatched polymerase chain reaction. *Oncogene*, *6*(5), 857-862.

Tada, M., Omata, M., & Ohto, M. (1990). Analysis of ras gene mutations in human hepatic malignant tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing. *Cancer research*, *50*(4), 1121-1124.

Taylor, M. A., Parvani, J. G., & Schiemann, W. P. (2010). The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-β in normal and malignant mammary epithelial cells. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, *15*(2), 169-190.

Tercero, J. A., &Diffley, J. F. (2001). Regulation of DNA replicationfork progression throughdamaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature*, *412*(6846), 553-557.

Tercero, J., Diaz, C., El Fallah, MS, Ribas, J., Solans, X., Maestro, MA, et Mahía, J. (2001). Synthèse, caractérisation et propriétés magnétiques de composés auto-assemblés basés sur des complexes homotrinucléaires discrets de Cu (II). *Chimie inorganique* , *40* (13), 3077-3083**.**

Thomas, R. M., Berman, J. J., Yetter, R. A., Moore, G. W., & Hutchins, G. M. (1992). Liver cell dysplasia: a DNA aneuploid lesion with distinct morphologic features.Hum Pathol, 23(5), 496- 503

Thuault, S., Tan, E. J., Peinado, H., Cano, A., Heldin, C. H., & Moustakas, A. (2008). HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(48), 33437-33446.

Tiniakos, D., Spandidos, D. A., Yiagnisis, M., & Tiniakos, G. (1993). Expression of ras and c-myc oncoproteins and hepatitis B surface antigen in human liver disease. *Hepato-gastroenterology*, *40*(1), 37-40.

Tsuda, H., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Ino, Y., Yoshida, T., & Terada, M. (1989). Low incidence of point mutation of c-Ki-ras and N-ras oncogenes in human hepatocellular carcinoma. *Japanese journal of cancer research*, *80*(3), 196-199.

van Malenstein, H., Maleux, G., Vandecaveye, V., Heye, S., Laleman, W., van Pelt, J., ... & Verslype, C. (2011). A randomized phase II study of drug-eluting beads versus transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Oncology Research and Treatment*, *34*(7), 368-376

Van Zijl, F., Zulehner, G., Petz, M., Schneller, D., Kornauth, C., Hau, M., ... & Mikulits, W. (2009). Epithelial–mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Future oncology*, *5*(8), 1169-1179.

Verslype, C., Rosmorduc, O., Rougier, P., & ESMO Guidelines Working Group. (2012). Hepatocellular carcinoma: ESMO–ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*, *23*(suppl_7), vii41-vii48.

Villanueva, A., Hoshida, Y., Toffanin, S., Lachenmayer, A., Alsinet, C., Savic, R., ... & Llovet, J. M. (2010). New strategies in hepatocellular carcinoma: genomic prognostic markers. *Clinical Cancer Research*, *16*(19), 4688-4694

Vincent, T., Neve, E. P., Johnson, J. R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., ... & Crystal, R. G. (2009). A SNAIL1–SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-β mediated epithelial–mesenchymal transition. *Nature cell biology*, *11*(8), 943-950.

Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, *408*(6810), 307-310.

Vousden, K. H. (2002). Switching from life to death: the Miz-ing link between Myc and p53. *Cancer cell*, *2*(5), 351-352.

Wada, I., Kanada, H., Nomura, K., Kato, Y., Machinami, R., & Kitagawa, T. (1999). Failure to detect genetic alteration of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) gene in hepatocellular carcinomas in japan. *Hepatology*, *29*(6), 1718-1721.

Wade, M., Li, Y. C., & Wahl, G. M. (2013). MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, *13*(2), 83-96.

Wang, D. & Lippard, S. J. (2005): Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nat

Wang, X. Q., Zhang, W., Lui, E. L., Zhu, Y., Lu, P., Yu, X., ... & Fan, S. T. (2012). Notch1-Snail1-E-cadherin pathway in metastatic hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer*, *131*(3), E163-E172.

Wanzel, M., Herold, S., & Eilers, M. (2003). Transcriptional repression by Myc. *Trends in cell biology*, *13*(3), 146-150.

Weihrauch, M., Benicke, M., Lehnert, G., Wittekind, C., Wrbitzky, R., & Tannapfel, A. (2001). Frequent k-ras-2 mutations and p16 INK4A methylation in hepatocellular carcinomas in workers exposed to vinyl chloride. *British journal of cancer*, *84*(7), 982-989.

Weihrauch, M., Benicke, M., Lehnert, G., Wittekind, C., Wrbitzky, R., & Tannapfel, A. (2001). Frequent k-ras-2 mutations and p16 INK4A methylation in hepatocellular carcinomas in workers exposed to vinyl chloride. *British journal of cancer*, *84*(7), 982-989.

White, B. D., Chien, A. J., & Dawson, D. W. (2012). Dysregulation of Wnt/β-catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*, *142*(2), 219-232 **.**

Wiencke, J.K. and J. Wiemels, Genotoxicity of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU). Mutat Res, 1995. 339(2): p. 91-119.

Wilds, C. J., Xu, F., & Noronha, A. M. (2008). Synthesis and Characterization of DNA Containing an N 1-2′-Deoxyinosine-ethyl-N 3-thymidine Interstrand Cross-Link: A Structural Mimic of the Cross-Link Formed by 1, 3-Bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Chemical research in toxicology*, *21*(3), 686-695.

Wong, E. et Giandomenico, CM (1999). État actuel des médicaments antitumoraux à base de platine. *Revues chimiques*, *99* (9), 2451-2466.

Wong, E.,& Giandomenico, C. M. (1999). Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chemical reviews*, *99*(9), 2451-2466.

Wong, RL, Kupper, H., Luo, MP, Sieper, J., Davis, JC, Van Der Heijde, D., et Maksymowych, WP (2009). *Demande de brevet US n ° 12/012 787* .

Woo, H. G., Wang, X. W., Budhu, A., Kim, Y. H., Kwon, S. M., Tang, Z. Y., ... & Thorgeirsson, S. S. (2011). Association of TP53 mutations with stem cell-like gene expression and survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, *140*(3), 1063-1070 **.**

Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF-β-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell research*, *19*(2), 156-172.

Yakicier, M. C., Irmak, M. B., Romano, A., Kew, M., & Ozturk, M. (1999). Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, *18*(34), 4879-4883.

Yakicier, M. C., Irmak, M. B., Romano, A., Kew, M., & Ozturk, M. (1999). Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, *18*(34), 4879-4883**.**

Yang, L. (2010). TGFβ and cancer metastasis: an inflammation link. *Cancer and Metastasis Reviews*, *29*(2), 263-271.

Yang, M. H., Chen, C. L., Chau, G. Y., Chiou, S. H., Su, C. W., Chou, T. Y., ... & Wu, J. C. (2009). Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *50*(5), 1464-1474.

Yu, Y. L., Yu, S. L., Su, K. J., Wei, C. W., Jian, M. H., Lin, P. C., ... & Lin, S. Z. (2010). Extended O6-methylguanine methyltransferase promoter hypermethylation following n-butylidenephthalide combined with 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) on inhibition of human hepatocellular carcinoma cell growth. *Journal of agricultural and food chemistry*, *58*(3), 1630-1638.

Yuzugullu, H., Benhaj, K., Ozturk, N., Senturk, S., Celik, E., Toylu, A., ... et Atabey, N. (2009). La signalisation canonique Wnt est antagonisée par Wnt5a non canonique dans les cellules de carcinome hépatocellulaire. *Molecular Cancer* , *8*(1),

Zhang, X. K., Huang, D. P., Qiu, D. K., & Chiu, J. F. (1990). The expression of c-myc and cN-ras in human cirrhotic livers, hepatocellular carcinomas and liver tissue surrounding the tumors. *Oncogene*, *5*(6), 909-914.

Zhang, X., Xu, H. J., Murakami, Y., Sachse, R., Yashima, K., Hirohashi, S., ... & Sekiya, T. (1994). Deletions of chromosome 13q, mutations in Retinoblastoma 1, and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma. *Cancer research*, *54*(15), 4177-4182.

Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J. C., & Llovet, J. M. (2015). Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, *149*(5), 1226-1239**.**

Résumé

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est un des cancers les plus fréquents à l'échelle mondiale et constitue un problème de santé publique majeur. Généralement développé dans un contexte d'hépatopathie chronique, le plus souvent cirrhotique, il présente un mauvais pronostic, en partie du fait de sa forte résistance aux agents chimio-thérapeutiques. Le caractère fortement résistant des CHC envers les thérapies conventionnelles, a été en partie attribué à son insensibilité aux agents anti-tumoraux et plus particulièrement à la difficulté de ce type de tumeur à entamer un processus de mort cellulaire. deux lignées de carcinome hépatocellulaire ont fait l'objet de l'étude de leurs profils de résistance vis-à-vis le cisplatine, un des agents pontant l'ADN et largement utilisé en chimiothérapie.L'évaluation de la viabilité cellulaire après traitement des cellules par des concentrations croissantes de cette drogue et le calcul de la concentration inhibitrice de 50 % de survie (IC50) a démontré une sensibilité différentielle des trois lignées qui peut être attribué à leur phénotype cellulaire.

Mots clés : carcinome hépatocellulaire , agents alkylants , Cisplatine, IC50, sensibilité

abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers worldwide and is a major public health problem. Generally developed in a context of chronic liver disease, most often cirrhotic, it has a poor prognosis, partly due to its strong resistance to chemotherapeutic agents. The strong resistance of HCC to conventional therapies has been partly attributed to its insensitivity to anti-tumor agents and more particularly to the difficulty of this type of tumor to initiate a process of cell death. Two hepatocellular carcinoma lines were studied for their resistance profiles to cisplatin, one of the DNA-bridging agents widely used in chemotherapy. The evaluation of cell viability after treatment of the cells with increasing concentrations of this drug and the calculation of the 50% survival inhibitory concentration (IC50) demonstrated a differential sensitivity of the three lines that can be attributed to their cell phenotype.

Keywords: hepatocellular carcinoma, alkylating agents, Cisplatin, IC50, sensitivity,

الملخص

سرطان الخلايا الكبدية (HCC) هو أحد أكثر أنواع السرطان شيوعًا في جميع أنحاء العالم وهو مشكلة صحية عامة رئيسية. عادة ما يتم تطويره في سياق مرض الكبد المزمن ، وغالبًا ما يكون تليف الكبد ، ولديه تشخيص ضعيف ، ويرجع ذلك جزئيًا إلى مقاومته القوية لعوامل العلاج الكيميائي. تُعزى الطبيعة الشديدة المقاومة لسرطان الكبد (HCC) تجاه العلاجات التقليدية جزئيًا إلى عدم حساسيتها للعوامل المضادة للأورام ، وبشكل أكثر تحديدًا إلى صعوبة هذا النوع من الورم لبدء عملية موت الخلايا. تم فحص خطين لسرطان الخلايا الكبدية لمقاومتها لسيسبلاتين ، وهو عامل جسر الحمض النووي المستخدم على نطاق واسع في العلاج الكيميائي. أظهر تقييم قابلية بقاء الخلية بعد معالجة الخلايا ذات التركيزات المتزايدة من هذا الدواء وحساب التركيز المثبط للبقاء على قيد الحياة بنسبة 50 ٪ (IC50) الحساسية التفاضلية للخطوط الثلاثة التي يمكن أن تُعزى إلى النمط الظاهري لخلاياها.

الكلمات الدالة

حساسية ،IC50, سرطان الخلايا الكبدية ،عوامل مؤلكلة، سيسبلاتين،