

**UNIVERSITÉ PARIS-DESCARTES (Paris 5)**

**École doctorale : Biologie et Biotechnologie**

Institut Universitaire d'Hématologie

**THÈSE**

pour l'obtention du diplôme de  
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS 5  
Spécialité : Hématologie et Oncologie

présentée par

**Julien Calderaro**

**CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES ADENOMES HEPATOCYTAIRES ET DES  
LESIONS PRENEOPLASIQUES HEPATIQUES**

Thèse dirigée par le Pr. Jessica Zucman-Rossi

Soutenue le 30/10/2014

**JURY**

|                          |                     |
|--------------------------|---------------------|
| Pr. Benoit Terris        | Président           |
| Dr. Fabienne Rajas       | Rapporteur          |
| Pr. Jean-Yves Scoazec    | Rapporteur          |
| Dr. Chantal Desdouets    | Examineur           |
| Pr. Elie-Serge Zafrani   | Examineur           |
| Pr. Jessica Zucman-Rossi | Directrice de thèse |

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Docteur Rajas et le Professeur Jean-Yves Scoazec qui ont accepté de rapporter ce travail. J'adresse également mes très sincères remerciements au Professeur Benoit Terris qui me fait l'honneur de présider mon jury, et au Docteur Desdouets et Professeur Zafrani pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Jessica, je souhaite t'adresser mes vifs remerciements et ma reconnaissance pour avoir encadré ce travail avec dynamisme et enthousiasme. Tu m'as transmis une rigueur et de précieuses connaissances scientifiques qui m'ont donné envie de continuer à m'impliquer dans des travaux de recherche. Je suis très heureux que tu aies dirigé ce travail et j'ai particulièrement apprécié ta disponibilité et ta confiance. Je te dois beaucoup et il est certain que ces années compteront beaucoup pour moi.

Je tiens également à remercier Paulette et Charles, pour ces collaborations toujours enrichissantes, et l'ensemble des membres, passés ou présents, de l'U674 (ou plutôt 1162 maintenant): Gabrielle, qui a guidé mes premiers pas, Yannick, Estelle, Jean-Charles, Camila, Karine, Abdelhadi, Qian, Shalini, Many, Kornelius, Sandrine, Emilie, Anaïs, Isabelle, Eric, Marie-Claude, Annie, Audrey, Sylvie, Isabelle, Alexandra, Karine, Benoit, Emmanuel, Sandrine, Cécile, Marie-Christine, Ichraffe, Jean-Charles, Emmanuelle, Didier, Matthieu, Thomas et tous ceux que j'ai oubliés.

Une pensée pour Laura, mes parents et un "saliou" bien sûr à Giuliana, Carlos et Fabrizia, pour les pâtes et surtout (tout) le reste.

## SOMMAIRE

|   |    |
|---|----|
| Abréviations.....   | 5  |
| Introduction.....   | 8  |
| Première partie : Les tumeurs hépatocytaires bénignes.....  | 9  |
| 1.Histologie normale du foie.....   | 9  |
| 2.Hyperplasie nodulaire focale.....   | 11 |
| 3.Adénomes hépatocellulaires.....   | 13 |
| 3.1 <i>Facteurs étiologiques</i> .....  | 13 |
| 3.2 <i>Aspects cliniques, diagnostic et complications des AHC</i> .....                                       | 14 |
| 3.3 <i>Caractéristiques anatomopathologiques générales des AHC</i> .....                                      | 15 |
| 4. Classification moléculaire des AHC.....  | 15 |
| 4.1 <i>Adénomes inflammatoires</i> .....  | 16 |
| 4.2 <i>Adénomes inactivés pour HNF1A</i> .....  | 19 |
| 4.3 <i>Adénomes avec mutation activatrice de la bêta caténine</i> .....                                       | 23 |
| 4.4 <i>Adénomes inclassés</i> .....   | 26 |
| 5. Altérations génétiques et prédisposition au développement d'AHC.....                                       | 26 |
| 5.1 <i>Diabètes héréditaires</i> .....  | 26 |
| 5.2 <i>Mutations constitutionnelles de CYP1B1</i> .....   | 26 |
| 5.3 <i>Syndrome de Mac Cune Albright</i> .....  | 27 |
| 5.4 <i>Glycogénoses</i> .....   | 27 |
| Deuxième partie : Tumorigénèse maligne et lésions préneoplasiques du parenchyme<br>hépatique cirrhotique..... | 29 |
| 1. Lésions précancéreuses sur foie cirrhotique .....  | 31 |
| 1.1 <i>Dysplasie hépatocytaire</i> .....  | 31 |
| 1.2 <i>Dysplasie à grandes cellules</i> .....   | 31 |
| 1.3 <i>Dysplasie à petites cellules</i> .....   | 32 |
| 2. Macronodules.....  | 34 |
| 2.1 <i>Macronodules de bas grade</i> .....  | 34 |
| 2.2 <i>Macronodules de haut grade</i> .....   | 35 |
| 2.3 <i>Transformation maligne en CHC précoce et petit CHC</i> .....   | 36 |
| 3. Carcinome hépatocellulaire.....  | 39 |
| 3.1 <i>Aspects anatomopathologiques</i> .....   | 39 |
| 3.2 <i>Altérations moléculaires du carcinome hépatocellulaire</i> .....                                       | 40 |
| 3.2.1 <i>Altérations chromosomiques</i> .....   | 40 |
| 3.2.2 <i>Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur dans le CHC</i> .....                                      | 40 |
| 3.2.3 <i>Classifications transcriptomiques du CHC</i> .....   | 44 |

|   |     |
|---|-----|
| Contexte.....   | 48  |
| Tumeurs hépatocytaires bénignes.....  | 49  |
| Lésions préneoplasiques hépatiques.....   | 50  |
| Résultats.....  | 51  |
| Article 1: Molecular characterization of hepatocellular adenomas developed in patients with glycogen storage disease type I. ....                               | 52  |
| Article 2: TERT promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the malignant transformation of cirrhotic nodules in hepatocellular carcinoma ..... | 61  |
| Annexe 1) Les tumeurs hépatocytaires bénignes.....  | 85  |
| Article 3: Genomic profiling of hepatocellular adenomas reveals recurrent FRK-activating mutations and the mechanisms of malignant transformation. ....         | 86  |
| Article 4: Biochemical and functional analyses of gp130 mutants unveil JAK1 as a novel therapeutic target in human inflammatory hepatocellular adenoma. ....    | 100 |
| Annexe 2) Tumorigénèse maligne et lésions préneoplasiques du parenchyme hépatique cirrhotique.....  | 109 |
| Article 5: A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection. ....   | 110 |
| Article 6: ALDH3A1 is overexpressed in a subset of hepatocellular carcinoma characterised by activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. ....              | 123 |
| Article 7: High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. ....            | 131 |
| Article 8: Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma.....            | 137 |
| Article 9: Synchronous Synchronous hepatocellular carcinoma and Castleman's disease: the role of the interleukin-6-signaling pathway.....                       | 144 |
| Discussion.....   | 148 |
| Première partie : Les tumeurs hépatocytaires bénignes.....  | 149 |
| Deuxième partie : Tumorigénèse maligne et lésions préneoplasiques du parenchyme hépatique cirrhotique.....  | 154 |
| Conclusion et perspectives.....   | 161 |
| Références.....   | 163 |

## ABREVIATIONS

4EBP1: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1

ACACA: Acetyl-CoA Carboxylase Alpha

ACLY: ATP Citrate Lyase

ADN: Acide Désoxiribonucléique

AHC: Adénome Hépatocellulaire

AHC-H: Adénome Hépatocellulaire inactivé pour *HNF1A*

AHCI: Adénome Hépatocellulaire inflammatoire

AKT: Protein Kinase B

ANGPT1, Ang 1: Angiopoietin 1

ANGPT2, Ang 2: Angiopoietin 2

APC: Adenomatous Polyposis Coli

ARID1A: AT Rich Interactive Domain 1A

ARID2: AT rich interactive domain 2

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ATP: Adénosine Triphosphate

ATRX: Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked

$\beta$ -AHC: Adénome Hépatocellulaire muté pour la bété caténine

CCND1: Cycline D1

CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CGH: Comparative Genomic Hybridization

CHC: Carcinome Hépatocellulaire

CRP: C-Reactive Protein

CTNNB1: Catenin beta 1

CYP1B1: Cytochrome P450 1B1

DAXX: Death-Domain Associated Protein

DGC: Dysplasie à grandes cellules

DPC: Dysplasie à petites cellules

ELOVL: fatty acid elongase  
FABP1, L-FABP: Fatty Acid Binding Protein 1, liver  
FADS1: Fatty Acid Desaturase 1  
FADS2: Fatty Acid Desaturase 2  
FASN: Fatty Acid Synthase  
FGF 19: Fibroblast growth Factor 19  
FISH: Fluorescent In Situ Hybridization  
G6PT1: Glucose-6-Phosphate Transporter 1  
GCKR: Glucokinase (hexokinase 4) Regulator  
GNAS: GNAS complex locus  
GPI: glucose-6-phosphate isomerase  
GS, GLUL: Glutamine Synthétase  
GSD: Glycogen Storage Disease  
GSDI: Glycogen Storage Disease Type I  
GSDIa: glycogen Storage Disease Type Ia  
GSK3 $\beta$ : Glycogen Synthase Kinase 3 beta  
hTR: Human Telomerase RNA  
HES: Hématéine-Eosine-Safran  
HNF: Hyperplasie Nodulaire Focale  
HNF1A (TCF1): Hepatocyte Nuclear Factor 1 alpha  
IL-6: Interleukine 6  
IL6R: interleukin 6 receptor  
IL6ST: interleukin 6 signal transducer  
JAK: Janus Kinase  
LOH: Loss Of Heterozygotity  
ME1: malic enzyme 1  
miARN: microARN  
MLL: myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia  
MN: Macronodule  
MNBG: Macronodule en dysplasie de bas grade  
MNHG: Macronodule en dysplasie de haut grade

MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young

MODY3: Maturity Onset Diabetes of the Young type 3

MYC: Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog

NFE2L2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCK1: Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1

PCK2: Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2

PDGFFA: Platelet-derived growth factor subunit A

PDGFRB: Beta-type platelet-derived growth factor receptor

PI3K: Phosphoinositide-3 Kinase

RPS6KA3: Ribosomal Protein S6 Kinase, 90kDa, Polypeptide 3

SAA: Serum Amyloid A

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

SWI/SNF: SWItch/Sucrose NonFermentable

S6K1: Ribosomal protein S6 kinase beta-1

TGF $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$

UGT2B7: UDP Glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B7

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

## **INTRODUCTION**

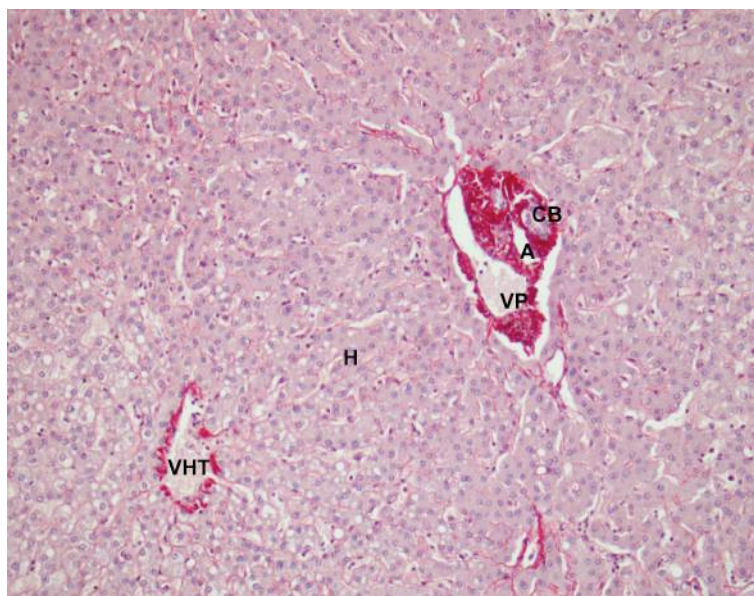


## PREMIERE PARTIE:

### LES TUMEURS HEPATOCYTAIRES BENIGNES

#### 1. Histologie normale du foie

Le foie normal a une structure lobulaire (1, 2). Le lobule classique est centré par la veine hépatique terminale, et en périphérie il est délimité par les espaces portes (Figure 1, 2) (1, 2). Les hépatocytes s'organisent en travées, et joignent espaces portes et veines hépatiques terminales (Figure 1, 2). Il convient de préciser qu'il existe d'autres modes de description de l'architecture hépatique (lobule portal, acinus hépatique) (1, 2).



**Figure 1.** Aspect histologique d'un foie normal. A=artériole porte, VP=veinule porte, CB=canal biliaire, H=hépatocytes, VHT=veine hépatique terminale.

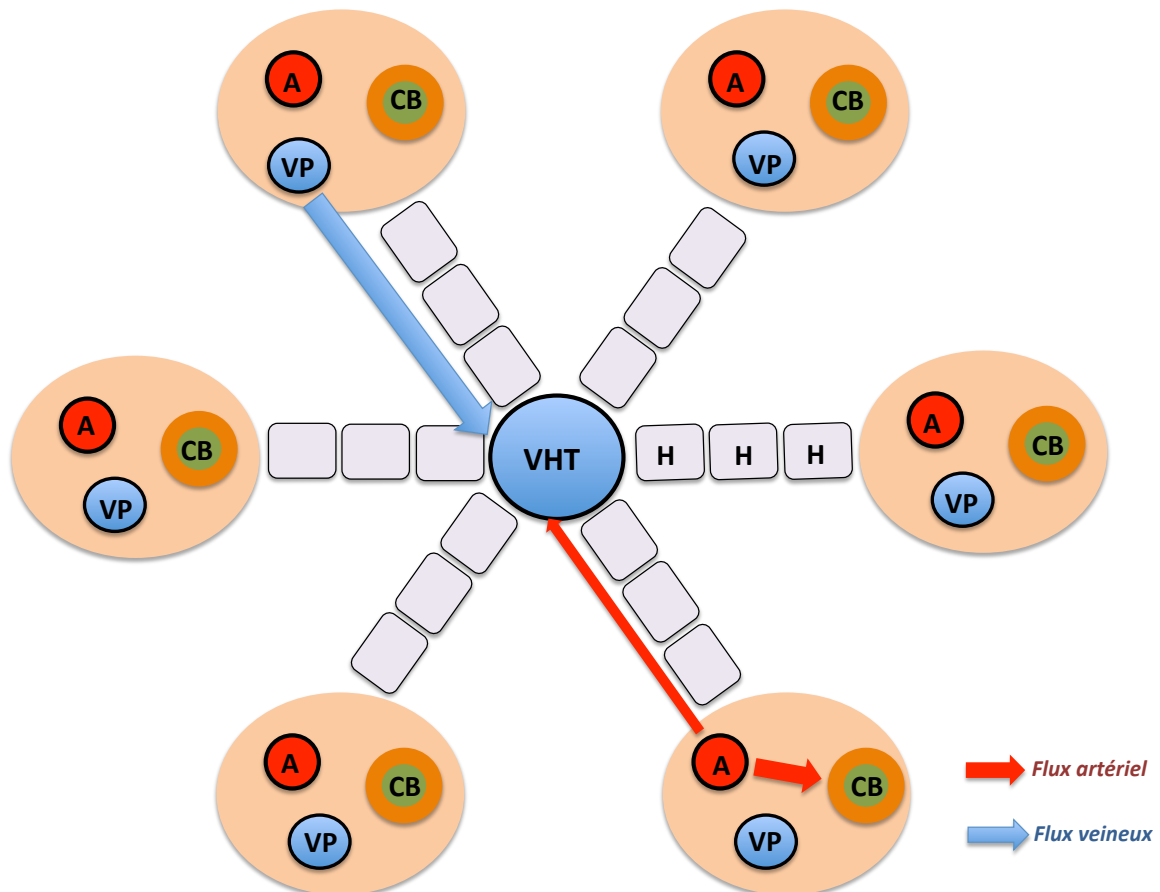
En fonction de leur position dans le lobule hépatique (périportale, médiolobulaire ou centrolobulaire), les hépatocytes ont des fonctions métaboliques différentes. En effet, les hépatocytes périportaux sont impliqués dans les mécanismes de néoglucogénèse, de détoxification de l'ammoniaque et de formation de l'urée, alors que les hépatocytes centrolobulaires contribuent plus particulièrement à la glycolyse et au métabolisme des drogues et des xénobiotiques. Chaque espace porte comporte une artériole, une veinule porte (vaisseaux afférents du foie) et un canal biliaire interlobulaire (Figure 1) (1, 2). Les

artérioles et veinules portes sont issues de la ramification de l'artère hépatique et de la veine porte, respectivement (1, 2).

Les capillaires sinusoides, situés entre les travées hépatocytaires, sont bordés par des cellules endothéliales et drainent le sang qui provient des veinules portes et qui se jette dans les veines hépatiques terminales. Le sang provenant des artérioles portes sert principalement à vasculariser les voies biliaires (1, 2) (Figure 2).

Les sinusoides renferment d'autre part les cellules de Küpfer (macrophages résidents du foie).

La bile est produite par les hépatocytes, sécrétée dans les canalicules biliaires qui convergent pour rejoindre le canal biliaire interlobulaire qui est bordé de cellules biliaires (1, 2).



**Figure 2.** Organisation du lobule hépatique. A=artériole porte, B=veinule porte, CB=canal biliaire, H=hépatocyte, VHT=veine hépatique terminale, VP= veinule porte.

Les tumeurs bénignes hépatiques peuvent se développer à partir des différents sous types cellulaires hépatiques: hépatocytes, cellules biliaires, fibroblastes, cellules endothéliales et macrophages (1, 2).

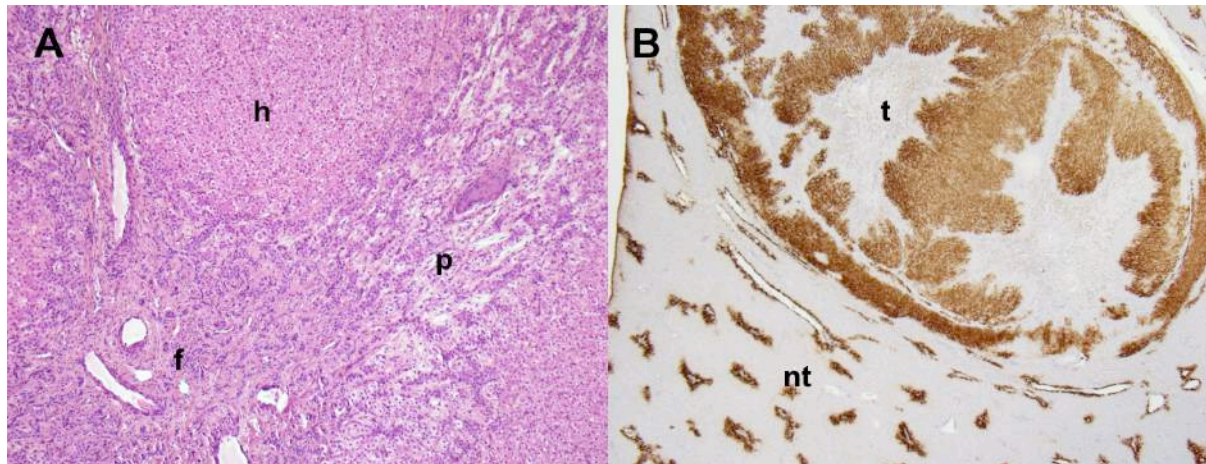
Les tumeurs hépatocytaires bénignes sont dues à la prolifération bénigne de cellules hépatocytaires, et comprennent les adénomes hépatocellulaires (AHC) et les hyperplasies nodulaires et focales (HNF) (1, 2). Il existe d'autres tumeurs hépatiques bénignes développées à partir de cellules biliaires ou conjonctives : elles ne seront pas abordées.

## **2. Hyperplasie nodulaire focale**

L'HNF, décrite en 1958 par Edmondson, est la deuxième tumeur hépatique la plus fréquente après l'hémangiome (1-3). Elle survient le plus souvent entre 20 et 50 ans mais peut s'observer à tout âge, et présente une forte prédominance féminine avec un sex ratio estimé à environ 1/8 (H/F) (1-5).

Les facteurs étiologiques de l'HNF sont peu connus.

Histologiquement, il s'agit d'une lésion d'architecture multinodulaire, composé d'hépatocytes réguliers, sans atypies. Les travées peuvent être très discrètement épaissies (1-3). L'HNF typique est d'autre part caractérisée par la présence d'une cicatrice fibreuse centrale qui comporte de nombreux vaisseaux dystrophiques associés à une prolifération cholangiolaire marquée (Figure 3A) (1-3).



**Figure 3.** A) Aspect histologique d'une HNF : la lésion est centrée par une zone fibreuse (f) comportant un infiltrat inflammatoire, des vaisseaux et une prolifération cholangiolaire (p) marquée. Les hépatocytes s'organisent en nodules et ne présentent pas d'atypies cytologiques (h) (HES, X200). B) La glutamine synthétase est exprimée, dans la lésion (t), de façon zonale, réalisant ainsi un aspect dit en « carte de géographie ». Dans le foie non tumoral adjacent (nt), elle est uniquement exprimée autour des veines hépatiques terminales, dans les régions centrolobulaires (X20).

Des études de clonalité (profil d'inactivation du gène X) ont montré que les HNF étaient tumeurs polyclonales (6), et aucune mutation somatique de gènes impliqués dans la carcinogénèse hépatique n'a jusqu'à présent été identifiée. Ceci explique que les HNF soient plus considérées comme un processus réactionnel que comme une authentique lésion néoplasique (5, 7).

Il a également été rapporté dans ces lésions des modifications significatives de l'expression de gènes impliqués dans les processus d'angiogénèse, avec notamment une augmentation du rapport des transcrits ANGPT1/ANGPT2 (8). ANGPT1 est connu pour favoriser la formation de néovaisseaux, alors qu'ANGPT2 agit comme un antagoniste d'ANGPT1 (8). Ces anomalies suggèrent que les HNF pourraient constituer des lésions réactionnelles à des anomalies vasculaires (8, 9).

Les analyses transcriptomiques menées au laboratoire ont montré que les HNF sont également caractérisées par une surexpression de gènes cibles de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, comme *GLUL* (10), qui encode la Glutamine Synthétase (5). Dans le foie normal, la voie est activée uniquement dans les régions centrolobulaires, autour des veines hépatiques terminales (figure 3B). Dans les HNF, la voie est fortement activée en périphérie des nodules, et l'on observe un marquage immunohistochimique caractéristique, dit en « carte de géographie » (5) (figure 3B). A l'opposé, autour de la cicatrice fibreuse, on observe une activation de la voie du TGF $\beta$ , de PDGFA et PDGFRB, vraisemblablement à l'origine de la

sécrétion des protéines de la matrice extra-cellulaire (5). De manière intéressante, les zones des HNF activées pour la  $\beta$ -caténine et pour le TGF $\beta$  sont donc mutuellement exclusives, respectivement situées en périphérie et au centre des tumeurs. Conformément à la nature polyclonale de ces lésions, il n'a pas jusqu'à présent été identifié de mutations activatrices somatiques de *CTNNB1*, le gène codant la  $\beta$ -caténine.

Les complications des HNF sont exceptionnelles et l'intervention chirurgicale n'est pas indiquée dans la très grande majorité des cas.

### **3. Adénomes hépatocellulaires**

L'AHC, décrit pour la première fois par von Frerichs en 1861, est la troisième tumeur hépatique bénigne la plus fréquente après l'hémangiome et l'hyperplasie nodulaire focale. Il se développe dans la grande majorité des cas sur un foie histologiquement normal, sans contexte d'hépatopathie chronique connue. Il est le plus souvent observé chez la femme jeune, avec un sex ratio allant de 1 pour 8 à 1 pour 15 selon les études (11-14). Il s'agit d'une tumeur rare, son incidence étant estimée à environ 1 cas pour 100 000 habitants (11, 12).

Les AHC sont des proliférations monoclonales de cellules hépatocytaires, le plus souvent uniques, parfois multiples. Le terme d'adénomatose est utilisé si le nombre de tumeurs est égal ou supérieur à 10 (15).

#### **3.1 Facteurs étiologiques**

Le principal facteur de risque connu est la prise de contraception orale (11, 13, 16).

L'incidence des AHC a fortement augmenté parallèlement à l'introduction des contraceptifs oraux, au début des années 1970. Les premiers cas d'AHC développés chez des femmes prenant des contraceptifs oraux ont été rapportés en 1973 par Baum et collaborateurs (16), et cette association a été par la suite confirmée par de nombreuses autres études (11, 13, 17-19). Il a été montré que ce risque était lié à la durée de la contraception: l'incidence, estimée à environ 1/1 000 000 chez les femmes n'ayant pas utilisé de contraceptifs oraux

ou pendant moins de 2 ans, est d'environ de 3 à 4/100 000 en cas d'exposition prolongée (>5ans) (11, 13, 20).

La plupart des études épidémiologiques, menées dans les années 1970 et 1980, ont rapportés des AHC associés à des contraceptifs fortement dosés en œstrogènes (17-19). L'introduction, au début des années 1990, de pilules contraceptives faiblement dosées aurait réduit le risque de développement d'AHC, et l'on estime que l'incidence des AHC chez les femmes utilisant ce mode de contraception se rapproche de celle de la population générale.

D'autres facteurs étiologiques moins fréquents ont été incriminés dans le développement d'AHC, comme notamment la prise de stéroïdes anabolisants (21, 22) et certaines maladies métaboliques héréditaires rares, comme le diabète MODY3 (Maturity Diabetes Onset of the Young 3) (23-25) et les glycogénoses de type I (26, 27).

### **3.2 Aspects cliniques, diagnostic et complications des AHC.**

La découverte d'un AHC est le plus souvent fortuite, lors d'un examen radiologique comme une échographie ou une tomodensitométrie abdominale réalisée pour une autre indication.

Les cas symptomatiques sont plus rares, et les manifestations cliniques sont variables: gêne ou pesanteur abdominale, masse palpable, douleur aigue en cas de d'hémorragie intra-tumorale ou intra-péritonéale.

Si le bilan biologique est le plus souvent normal, on peut parfois observer, en fonction du sous type moléculaire de la tumeur, une augmentation modérée de la C-reactive protein (CRP) et de la vitesse de sédimentation (marqueurs inflammatoires) (28).

L'imagerie joue un rôle capital dans la prise en charge des AHC, et dans certains cas où les lésions présentent des caractéristiques radiologiques typiques (29), on peut s'abstenir de la confirmation histologique du diagnostic (30, 31).

Une ponction biopsie est cependant réalisée dans la plupart des cas, et permet d'assurer un diagnostic de certitude (30).

Les complications des AHC sont essentiellement l'hémorragie et la transformation en CHC (1, 3). L'hémorragie intra-tumorale peut secondairement entraîner un hématome sous-capsulaire, voire un hémopéritoine pouvant parfois conduire au décès du patient. La transformation maligne en CHC est démontrée mais reste un évènement rare dont la

fréquence exacte reste difficile à déterminer (environ 5 à 10%). Ce risque dépend du sexe, du sous-type moléculaire de l'AHC et des facteurs étiologiques (32-34). Il semble plus élevé chez l'homme, en cas d'AHC présentant une activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, et pour les AHC compliquant une administration de stéroïdes anabolisants ou une glycogénose de type I (35-38).

La prise en charge des AHC est complexe et son but est essentiellement d'éviter la survenue de ces deux principales complications. Dans tous les cas, la poursuite de la contraception orale ou de la prise d'androgène doit être interrompue, des cas de régression des lésions après arrêt de ce type de facteurs étiologiques ayant été rapportés (39-41).

Il n'y a pas à l'heure actuelle de consensus sur le traitement à adopter, et la décision se fonde actuellement sur le sexe des patients, la taille et le nombre des AHC, et plus récemment, sur leurs caractéristiques moléculaires et phénotypiques (30).

La résection chirurgicale reste le traitement de référence, cependant elle peut parfois être compliquée en cas de tumeurs volumineuses (42, 43), centrohépatiques ou multiples, et depuis une dizaine d'années les techniques d'ablation percutanée (radiofréquence) ont connu un développement important (43, 44).

### ***3.3 Caractéristiques anatomopathologiques générales des AHC***

Macroscopiquement, les AHC sont le plus souvent des tumeurs grossièrement arrondies, relativement bien limitées et très rarement encapsulées (3). Leur taille est extrêmement variable, allant de quelques millimètres jusqu'à 30 cm de grand axe. Leur aspect est variable: jaune, brun, rougeâtre (en cas de remaniements hémorragiques) ou vert (en cas de production de bile par les cellules tumorales). Des zones de nécrose peuvent être observées (1, 3).

Microscopiquement, les AHC sont composés d'une prolifération d'hépatocytes d'aspect sensiblement normal, organisés en travées fines ou discrètement épaissies (1, 3).

Les noyaux des hépatocytes tumoraux sont peu ou pas atypiques, les mitoses sont rares et le rapport nucléo-cytoplasmique n'est pas augmenté (1, 3).

De nombreux autres aspects histologiques peuvent être observés: vaisseaux dystrophiques et télangiectasies, stéatose tumorale, infiltrats inflammatoires, foyers de dilatation sinsusoïdale ou encore formations pseudoglandulaires. Ils dépendent du sous type moléculaire de la lésion (1, 3, 34, 45, 46).

#### **4. Classification moléculaire des AHC**

Il a longtemps été considéré que l'AHC était une entité homogène. Au cours de ces quinze dernières années, différentes études moléculaires et phénotypiques ont mis en évidence le caractère hétérogène des AHC, et ont permis de mieux comprendre les anomalies qui sous-tendaient leur développement. Elles ont abouties à une classification des AHC, basée sur la confrontation entre les altérations moléculaires et les caractéristiques anatomo-pathologiques des lésions (3, 30, 45-47).

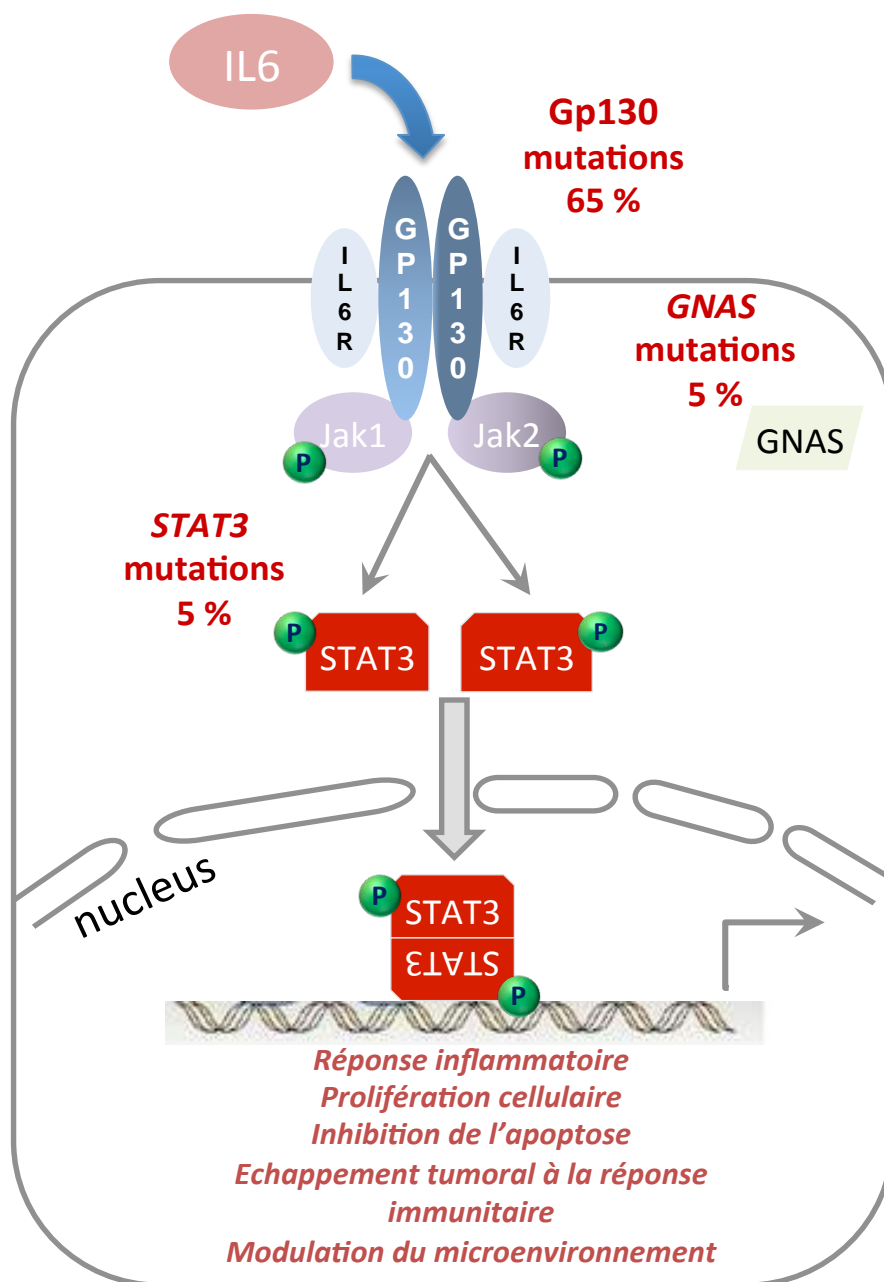
Cette classification est désormais utilisée en pratique diagnostique quotidienne, les lésions étant typées par les pathologistes grâce au développement de différents marqueurs immunohistochimiques (3, 30, 45, 46).

##### **4.1 Adénomes inflammatoires (AHC<sub>I</sub>)**

Il s'agit du sous type le plus fréquent, représentant plus de 50% des adénomes. Ils sont caractérisés par une activation de la voie de signalisation JAK/STAT (30).

Ils ont été initialement identifiés par la revue détaillée des caractéristiques histologiques des AHC qui a révélé la présence d'infiltrats inflammatoires dans un sous-groupe d'adénome (34). Par la suite, des analyses transcriptomiques ont mis en évidence que ce sous-groupe d'AHC présentait une surexpression de plusieurs gènes cibles de la voie JAK/STAT (48). Cette voie est activée physiologiquement par l'interleukine 6 (IL6) : la transduction du signal se fait la formation d'un complexe comprenant deux molécules d'IL6, deux IL6R (récepteur de l'IL6) et deux GP130 (corecepteur de l'IL6). L'homodimérisation des protéines GP130 entraîne une phosphorylation des JAK Kinases (JAK1 et JAK2). Ces kinases vont ensuite assurer la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) (Figure 4), qui est transloqué dans le noyau et va moduler l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (CRP, SAA), la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, les interactions avec le micro-environnement et l'échappement à la réponse immunitaire anti-tumorale (Figure 4) (49-51).





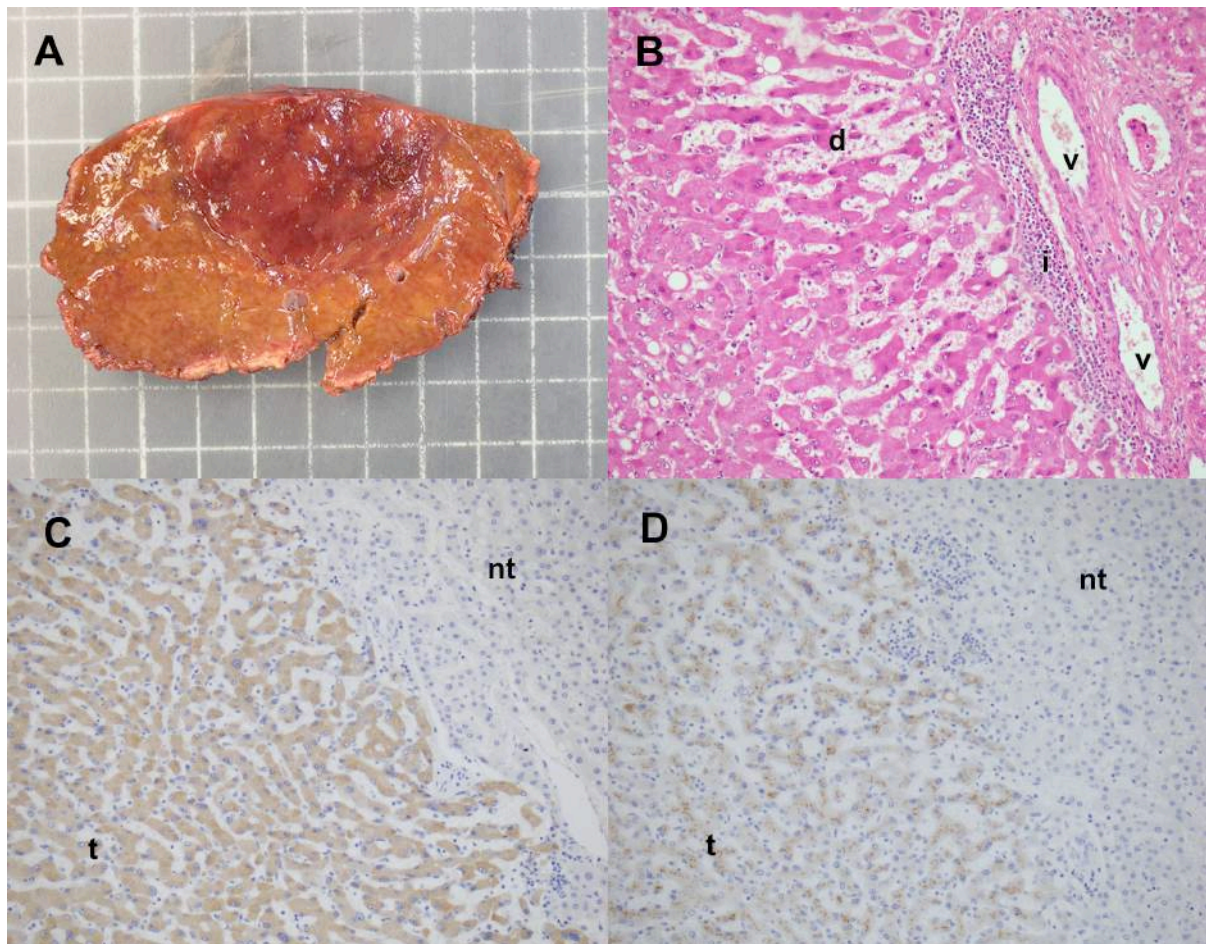
**Figure 4.** Représentation schématique de la voie de signalisation de l'interleukine 6/Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription et des différents gènes mutés dans les adénomes inflammatoires. Le pourcentage de tumeurs mutées parmi les AHCI est indiqué. D'après Nault et al., Gastroenterology, 2013.

Grâce à des approches de type gènes candidats, des mutations somatiques activatrices de plusieurs effecteurs de la voie ont été découvertes (48, 52, 53). Les plus fréquentes (60%) sont les mutations du gène *IL6ST* qui encode GP130. Il s'agit principalement de délétions et de duplications en phase localisés dans l'exon 6 et intéressant le site de fixation de l'IL6 (48).

Ces mutations sont responsables d'une activation constitutive du récepteur, même en l'absence de son ligand (48). D'autres gènes sont moins fréquemment mutés, comme *STAT3* ou *GNAS* (*GNAS* complex locus) (52, 53).

Les AHCI sont également caractérisés par un phénotype particulier (3, 34, 45, 46).

Macroscopiquement, ils présentent souvent des remaniements hémorragiques, fibreux ou encore nécrotiques (Figure 5).



**Figure 5.** A) Aspect macroscopique d'un AHCI: la tumeur est rougeâtre, congestive. B) Aspect microscopique d'un AHCI: foyers de dilatation sinusoidale (d), artères à paroi épaisse (v), et infiltrats inflammatoires (i) (HES, x200). C) Expression de la CRP par les cellules tumorales (t) et absence d'expression dans le foie non tumoral (nt). D) Expression de la SAA par les cellules tumorales (t) et absence d'expression dans le foie non tumoral (nt).

Leur examen histologique met le plus souvent en évidence des vaisseaux dystrophiques (artères à paroi épaisse), des foyers de dilatation sinusoidale, des infiltrats inflammatoires, des remaniements fibreux ainsi qu'une prolifération cholangiolaire (Figure 5) (3, 45, 46). Certaines de ces caractéristiques histologiques sont également fréquemment observées dans les HNF, et expliquent qu'une grande partie des AHCI étaient auparavant considérés comme une variante d'HNF (« hyperplasie nodulaire et focale télangiectasique ») (54, 55).

Sur le plan immunohistochimique, les AHC se caractérisent par une surexpression de la C-Reactive Protein (CRP) et la protéine amyloïde A (SAA) qui sont codés par deux gènes régulés par STAT3 (Figure 5) (3, 30, 45, 46).

#### **4.2 Adénomes inactivés pour HNF1A (Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha)**

Les AHC inactivés pour *HNF1A* (AHC-H) représentent le deuxième sous type d'AHC le plus fréquent, représentant environ 30% des AHC (30).

Les études moléculaires ont mis en évidence, dans ce sous type d'AHC, des altérations moléculaires inactivant le facteur de transcription HNF1A (47).

Ces altérations sont bi-alléliques, avec existence de deux événements mutationnels affectant chacun des deux allèles du gène (47). Il s'agit de mutations ponctuelles et de délétions dans 90% et 10% des cas, respectivement (47).

Ces altérations entraînent une perte de fonction d'HNF1A, par l'expression de protéines tronquées, de protéines avec substitution d'acide aminé dans des domaines fonctionnels ou par une absence d'expression (transcrits instables).

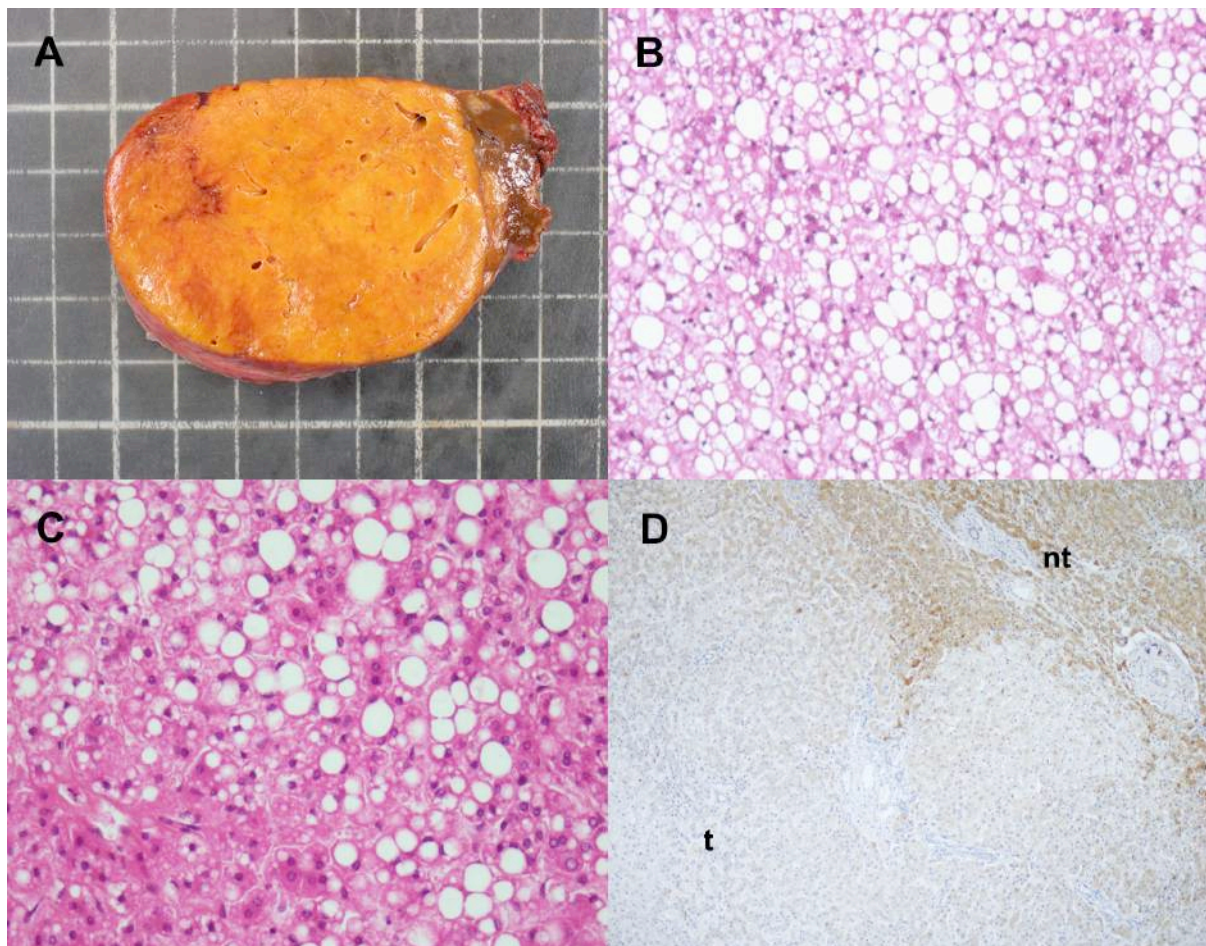
HNF1A (ou TCF1), reconnaît des séquences nucléotidiques palindromiques dans les régions promotrices des gènes et interagit avec l'ADN par la formation d'homodimères ou d'hétérodimères avec la protéine HNF1 $\beta$  (56, 57). Il joue un rôle majeur dans la différenciation hépatocytaire et la régulation du métabolisme du glucose et des lipides (58-61), et contrôle notamment la transcription du gène *LFABP*, qui code pour la Liver Fatty Acid Binding Protein, protéine impliquée dans le transport intracellulaire des acides gras.

Une étude a mis en évidence que l'inactivation d'*HNF1A* avait de multiples conséquences pouvant promouvoir la prolifération cellulaire et la carcinogénèse : activation de la voie PI3K/AKT, augmentation de l'expression de la cycline D1 et diminution de la dégradation de l'œstradiol (Figure 6) (62).



d'assurer un environnement acide favorisant l'invasion tumorale et l'échappement tumoral aux réponses immunitaires (64-66). La glycolyse permet d'autre part de maintenir, même en conditions hypoxiques, la génération de molécules d'ATP nécessaires aux cellules tumorales (67-69). La synthèse d'acides gras assure quant à elle la formation de substrats indispensables à la production des membranes cellulaires (70). Des études fonctionnelles ont montré que l'activation de la lipogenèse de novo était nécessaire à la survie des cellules tumorales, et que l'inhibition de la fatty acid synthase (FASN) entraînait une diminution de la prolifération des cellules tumorales (70-72).

L'aspect macroscopique des AHC-H est le plus souvent caractéristique, ces lésions étant très souvent de couleur jaunâtre en raison de la stéatose (Figure 8).



**Figure 8.** A) Aspect macroscopique d'un AHC-H: la tumeur est jaunâtre. B) La quasi-totalité des cellules tumorales présentent une vacuole optiquement vide de stéatose (HES, x200). C) Absence d'atypies cytonucléaires et rapport nucléocytoplasmique conservé (HES, x200). D) Perte d'expression de la LFABP dans la tumeur (t) et expression normale dans le foie adjacent (nt) (HES, x100).

Histologiquement, les adénomes inactivés pour HNF1A constituent un groupe homogène de tumeurs caractérisées par des contours mal limités, lobulés, et par l'existence d'une stéatose

le plus souvent marquée, responsable de leur aspect macroscopique jaunâtre (Figure 8) (3, 45, 46, 73). Ils sont souvent mal limités et ne présentent pas d'atypie ni d'infiltrat inflammatoire (Figure 8) (3, 45, 46, 73). Un critère diagnostique majeur des AHC-H est la mise en évidence d'une perte d'expression immunohistochimique de la LFABP, protéine codée par un gène dont l'expression est étroitement régulée par HNF1A (Figure 8).

#### **4.3 Adénomes avec mutation activatrice de la bêta-caténine**

Les AHC avec mutations activatrices de *CTNNB1* ( $\beta$ -AHC), le gène codant la  $\beta$ -caténine, représentaient initialement 10 à 15% des AHC (30) ; ils sont plus fréquents chez l'homme et peuvent survenir dans un contexte particulier comme la prise de stéroïdes anabolisants ou l'existence d'une glycogénose de type I (30). Ils constituent le sous type d'adénome le plus à risque de transformation maligne (32-34).

Les mutations somatiques de *CTNNB1* entraînent une activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (Figure 9). Ce gène est également muté dans 30 à 40% des CHC (74).

A l'état physiologique, cette voie joue régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la zonation hépatique et le métabolisme (*GLUL*, codant la glutamine synthétase, *GLT-1*, *OAT*), la prolifération cellulaire (*BCL1*, *c-Myc*), les interactions intercellulaires, et la régénération hépatique (Figure 9) (10, 75-77).

Au niveau immunohistochimique, ils sont caractérisés par une expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine et une expression diffuse et forte de la glutamine synthétase, gène cible de la  $\beta$ -caténine (Figure 11) (10).

#### **4.4 Adénomes inclassés**

Les AHC inclassés (AHC-U) sont le quatrième sous-groupe d'AHC, et représentent environ 10% de ces lésions.

Ces tumeurs ne présentent pas d'anomalies moléculaires récurrentes connues, et les altérations génétiques qui sous tendent leur développement restent à déterminer.

### **5. Altérations génétiques et prédisposition au développement d'AHC**

Il existe plusieurs maladies pouvant prédisposer au développement d'AHC.

#### **5.1 Diabètes héréditaires**

Les MODY sont des formes héréditaires de diabète non insulino-dépendants, et représentent 2 à 5% de ce type de diabète (24). Ce sont des pathologies génétiques, à transmission autosomique dominante, qui se caractérisent par la survenue d'un diabète le plus souvent avant l'âge de 25 ans (24). Le MODY3, sous-type le plus fréquent de diabète de type MODY, est défini par la présence de mutations constitutionnelles monoalléliques d'*HNF1A* (25) et les patients atteints de ce type de diabète présentent un risque accru de développer des AHC-H (47, 85). On retrouve alors dans les tumeurs la mutation constitutionnelle ainsi qu'une deuxième mutation somatique ("second hit").

#### **5.2 Mutations constitutionnelles de *CYP1B1***

Il a été récemment mis en évidence qu'une autre altération génétique, les mutations constitutionnelles hétérozygotes de *CYP1B1*, pouvait également prédisposer au développement d'AHC-H (86). *CYP1B1* est une enzyme de type monooxygénase impliquée dans le métabolisme des œstrogènes et l'étude *in vitro* des conséquences fonctionnelles de ces différents variants a montré qu'ils entraînaient tous une diminution significative de l'activité enzymatique de la protéine (86). L'inactivation de *CYP1B1* pourrait déréguler le métabolisme des œstrogènes dans le foie, conduisant, de manière hypothétique, à

l'accumulation d'un dérivé génotoxique qui pourrait induire l'apparition de mutations d'*HNF1A*.

### **5.3 Syndrome de Mac Cune Albright**

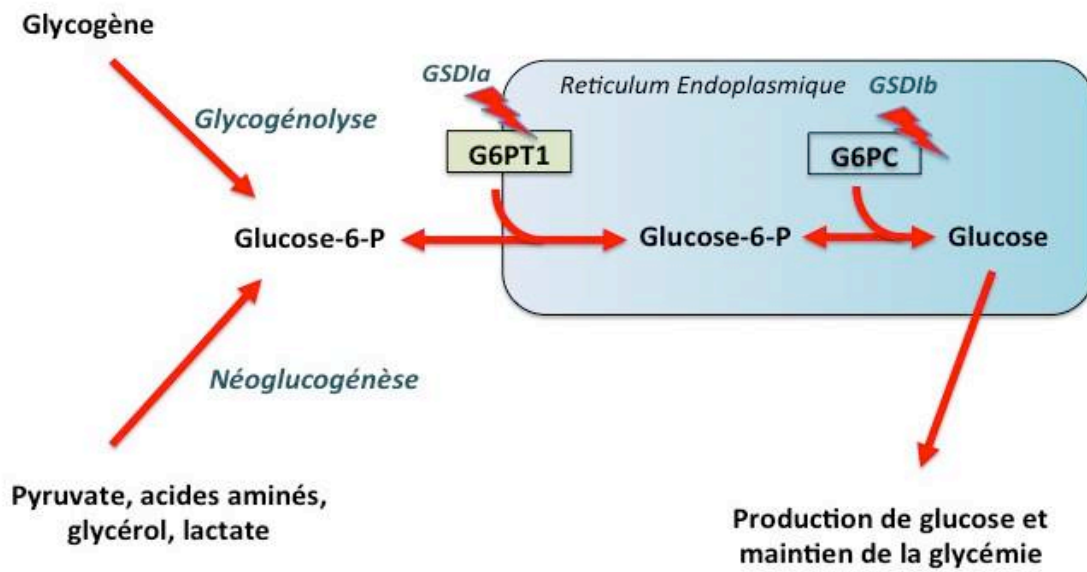
Le syndrome de Mac Cune Albright, également appelé dysplasie fibreuse des os, est une maladie congénitale non héréditaire due à des mutations somatiques activatrices et mosaïques du gène *GNAS* (87). Sur le plan clinique ce syndrome est caractérisé par des lésions osseuses, des troubles endocriniens et des anomalies cutanées (88). Il a été récemment mis en évidence que ce syndrome prédisposait au développement d'AHC-I: en effet les mutations activatrices de *GNAS* sont capables d'entraîner une phosphorylation de STAT3 et donc d'activer la voie JAK/STAT (52).

### **5.4 Glycogénoses**

Les glycogénoses de type I (GSDI) (et plus rarement, de type III) constituent probablement les pathologies prédisposant le plus au développement d'AHC. Ce sont des affections génétiques de transmission autosomique récessive dont l'incidence annuelle est d'environ 1/100 000 naissances (89). La GSDI, également appelée maladie de von Gierke, comprend les type Ia (GSDIa, 80%) et Ib (GSDIb, 20%), et se caractérise par une intolérance au jeûne, un retard de croissance et une hépatomégalie par accumulation de glycogène et de graisse dans le foie (90). Le glucose est le principal substrat énergétique des cellules et est stocké par le foie et les muscles sous forme de glycogène. Entre les repas, la glycémie diminue et le foie hydrolyse progressivement le glycogène (glycogénolyse) pour libérer du glucose dans le sang et ainsi maintenir la glycémie. Au cours du jeûne prolongé, la glycémie est maintenue par la production de glucose à partir de substrats non glucidique, comme le lactate, glycérol et certains acides aminés (néoglucogenèse) (Figure 12).

Les GSDI sont dues à des dysfonctionnement du système de la glucose 6 phosphatase, enzyme qui catalyse la dernière étape de la glycogénolyse en hydrolysant le glucose-6-phosphate en glucose. Des mutations du gène codant la sous unité catalytique de la glucose 6 phosphatase (*G6PC*) et du gène codant pour le transporteur du glucose 6 phosphate (*G6PT*) sont à l'origine des GSDIa et Ib, respectivement (Figure 12) (89). Ces mutations aboutissent à une absence de production endogène de glucose.

Une des principales complications de ces pathologies est le développement d'AHC multiples, mettant en jeu le pronostic vital des patients par rupture hémorragique ou par transformation maligne en CHC (27, 35, 90-95). On estime qu'après 30 ans environ 80% des patients développent un ou plusieurs AHC (90).



**Figure 12.** Après le transport du Glucose-6-Phosphate (Glucose-6-P) dans le réticulum endoplasmique par le G6PT (muté dans la GSDIb), la G6PC (mutée dans la GSDIa) catalyse son hydrolyse et assure ainsi la production de glucose.

Si le profil moléculaire des AHC développés dans le cadre de diabète MODY ou de syndrome de Mac Cune Albright est connu, le profil des tumeurs associées aux GSDI reste à déterminer.



## DEUXIEME PARTIE:

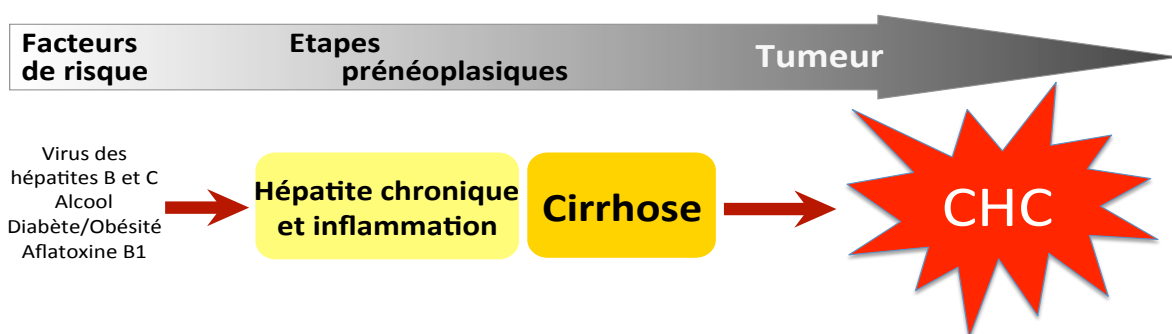
### TUMORIGENESE MALIGNE ET LESIONS PRENEOPLASIQUES DU PARENCHYME HEPATIQUE CIRRHOTIQUE

Le carcinome hépatocellulaire, développé à partir des hépatocytes, est la tumeur maligne hépatique primitive la plus fréquente (1, 3).

Il représente le cinquième cancer le plus fréquent dans le monde et la troisième cause de mortalité liée au cancer (96). Son incidence est très variable en fonction des zones géographiques: elle est maximale en Asie du sud est et en Afrique sub-saharienne (20 cas/an pour 100000 habitants), intermédiaire dans les pays européen du bassin méditerranéen (environ 15 cas/an pour 100000 habitants) et basse en Europe du Nord, Amérique du Nord et Océanie (moins de 5 cas/an pour 100000 habitants). Il existe une forte prédominance masculine et l'âge moyen au diagnostic est compris entre 50 et 70 ans (96).

Les principaux facteurs de risque du CHC sont les infections par les virus de l'hépatite B et C, la consommation excessive d'alcool, les stéatohépatites non alcooliques, certaines maladies génétiques comme l'hémochromatose et l'exposition à l'aflatoxine B1 (96). Ces différents facteurs de risque ont pour point commun d'entraîner une inflammation chronique du parenchyme hépatique. On estime qu'environ 80% des CHC se développent sur cirrhose, la cirrhose représentant l'évolution terminale des hépatopathies chroniques, quelle que soit leur étiologie (Figure 13).

Dans 20% des cas, le CHC peut se développer sur foie histologiquement normal, ou sur foie fibreux non cirrhotique. Ceci est notamment particulièrement fréquent chez les patients atteints de stéatopathie hépatique non alcoolique.



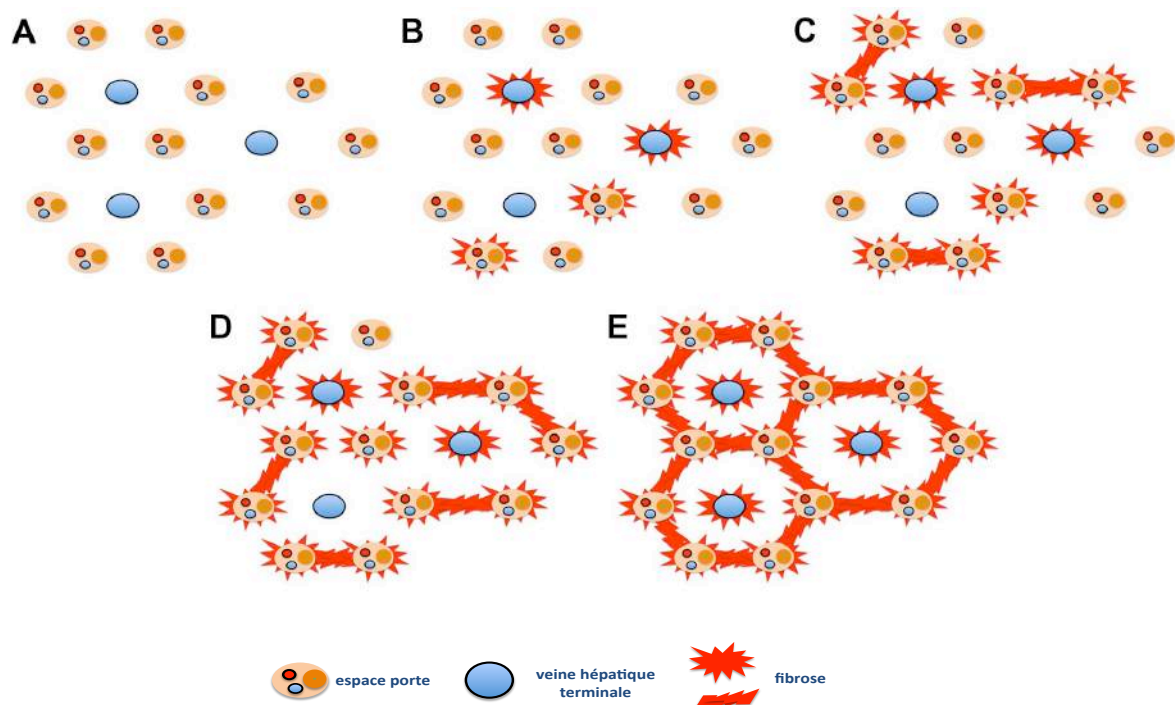
**Figure 13.** Différentes étapes de la carcinogénèse hépatique sur cirrhose. La présence d'un ou de

F

plusieurs facteurs de risque entraîne une inflammation chronique du parenchyme hépatique qui peut aboutir à une cirrhose et ensuite au développement d'un CHC.

La définition de la cirrhose est histologique: elle consiste en l'existence d'une fibrose diffuse qui détruit l'architecture du foie et délimite des nodules hépatocytaires. C'est un processus lent, qui se déroule le plus souvent sur plusieurs années ou décennies (Figure 14) (1).

La fibrose peut initialement se développer au niveau portal, périportal, périsinusoidal ou centrolobulaire puis progressivement vont se constituer des septa fibreux reliant entre eux espaces portes voisins ou espaces portes et veines centrolobulaires.



**Figure 14.** Evolution de la fibrose hépatique. A : Architecture hépatique normale, sans fibrose, caractérisé par une alternance d'espaces portes et de veines hépatiques terminales (3 lobules sont représentés). B : Fibrose débutante et focale, développée autour de certains espaces portes et de certaines veines hépatiques terminales. C : Présence de quelques septa fibreux joignant quelques espaces portes entre eux. D : Nombreux septa fibreux joignant des espaces portes entre eux. E : Fibrose diffuse, mutilante, concentrique, délimitant des nodules hépatocytaires.

Le processus de transformation maligne de la cirrhose en CHC est séquentiel, et passe par différentes étapes prénéoplasiques (97, 98).

Nous aborderons, dans ce chapitre, les caractéristiques et les principales anomalies moléculaires des différentes lésions prénéoplasiques et du CHC.

## 1. Lésions précancéreuses sur foie cirrhotique

Le processus de développement d'un CHC est séquentiel, et nécessite l'accumulation de nombreuses altérations moléculaires. Plusieurs lésions cirrhotiques sont considérées comme précancéreuses (dysplasie à petites cellules, macronodules) ou associées au CHC (dysplasie à grandes cellules).

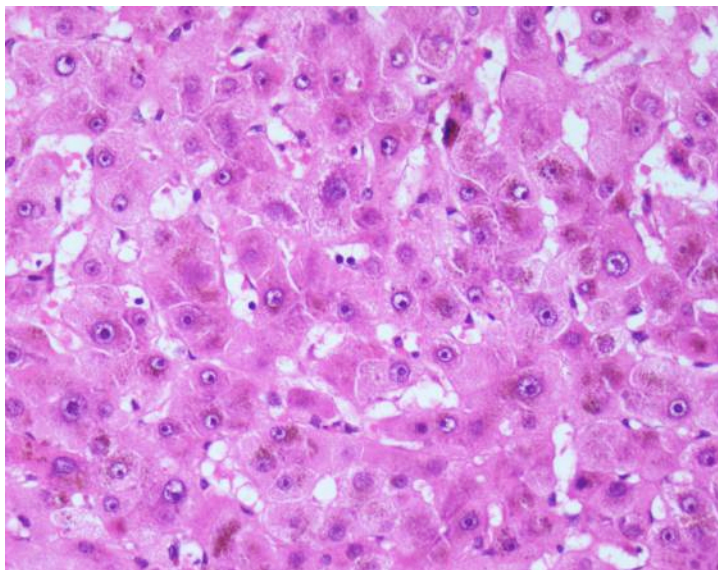
### 1.1 Dysplasie hépatocytaire

Les lésions de dysplasie hépatocytaire ne sont pas identifiables par les examens d'imagerie ou par l'examen macroscopique des pièces opératoires. Elles sont identifiées lors de l'examen histologique des biopsies ou des prélèvements chirurgicaux.

Il existe 2 types de dysplasie hépatocytaire de signification très différente: la dysplasie à grande cellules (DGC) et la dysplasie à petites cellules (DPC).

#### 1.1.2 Dysplasie à grandes cellules

La DGC (aussi appelée « large cell change ») est une lésion fréquente, pouvant être retrouvée quelque soit l'étiologie de la cirrhose. Elle est définie par l'existence d'hépatocytes atypiques et de grande taille. Leurs noyaux sont souvent hyperchromatiques, multiples, nucléolés et le rapport nucléocytoplasmique n'est pas augmenté (Figure 15).



**Figure 15.** Foyer de dysplasie à grandes cellules avec noyaux volumineux et nucléolés, sans augmentation du rapport nucléocytoplasmique.

La taille des foyers de DGC est variable, et ils ne peuvent parfois intéresser que quelques dizaines d'hépatocytes.

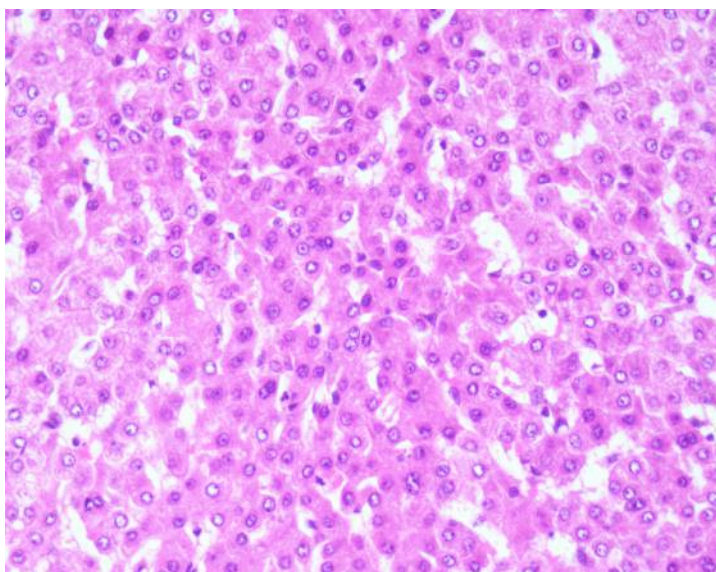
La signification de la DGC reste débattue mais elle est plutôt considérée comme une lésion réactionnelle que précancéreuse. Les données soutenant la nature réactionnelle de la DGC sont qu'elle est caractérisée par un faible degré de prolifération cellulaire, une augmentation des marqueurs d'apoptose et par l'absence d'altérations moléculaires commune avec le CHC (Tableau 1) (99-102).

Il semble cependant que la DGC soit une entité hétérogène, une étude récente ayant mis en évidence que certains foyers de DGC développés chez des patients infectés par le virus de l'hépatite B présentaient des anomalies particulières pouvant suggérer une nature préneoplasique, comme un raccourcissement de la longueur des télomères et une augmentation du degré de prolifération cellulaire (Tableau 1) (99).

Plusieurs études ont d'autre part démontré que l'identification de foyers de DGC sur biopsies de patients cirrhotiques avait une forte valeur prédictive de développement d'un CHC (103-106).

### **1.2.3 Dysplasie à petites cellules**

La DPC est caractérisée, sur le plan histologique, par une augmentation du rapport nucléocytoplasmique des hépatocytes, un cytoplasme basophile et des travées hépatocytaires parfois discrètement épaissies (Figure 16) (1, 3).



**Figure 16.** Foyer de dysplasie à petites avec augmentation du rapport nucléocytoplasmique et de la densité cellulaire.

A l'inverse de la DGC, elle semble constituer une authentique lésion précancéreuse.

En effet, ces lésions sont caractérisées par une activité proliférative plus importante que le parenchyme adjacent, un raccourcissement des télomères ainsi qu'une diminution de l'expression de protéines régulant le cycle cellulaire, comme p16 et p21 (Tableau 1) (98, 99, 101, 107).

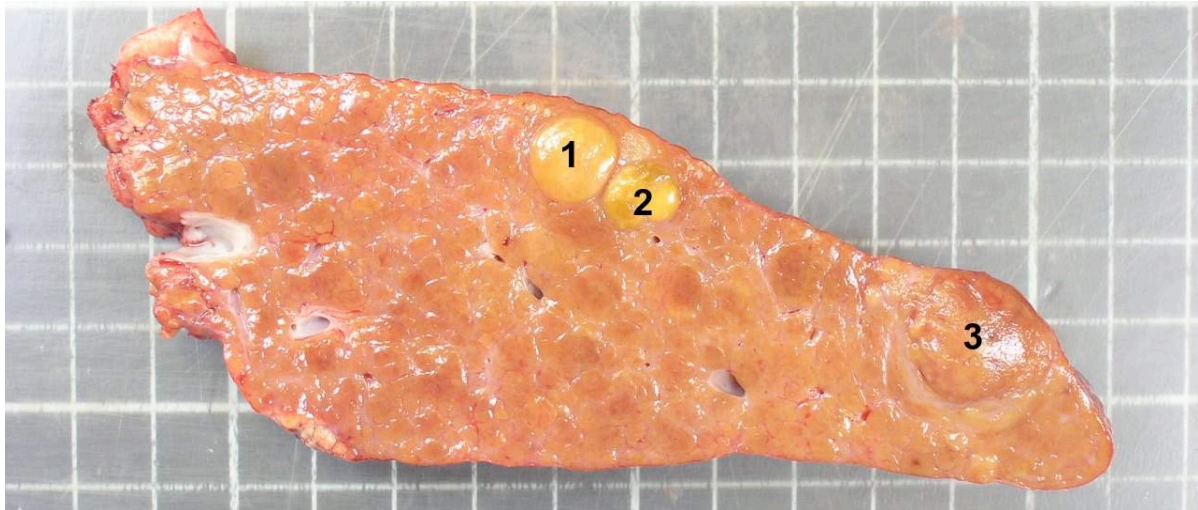
| Techniques employées            | Lésion étudiée    | Altérations moléculaires identifiées   | Référence   |
|---------------------------------|-------------------|--|---|
| <i>Immunohistochimie, TUNEL</i> | <i>DGC</i>        | <i>Faible activité proliférative, promotion de l'apoptose</i>  | <i>Lee, Hepatology, 1997</i>                                |
| <i>CGH</i>                      | <i>DGC</i>        | <i>Absence d'anomalies chromosomiques</i>  | <i>Marchio, Modern Pathology, 2001</i>                      |
| <i>In situ hybridization</i>    | <i>DGC</i>        | <i>Polysomie</i>   | <i>Terris, J Hepatol, 1997</i>                              |
| <i>Immunohistochimie, FISH</i>  | <i>DGC et DPC</i> | <i>Diminution de l'expression de p21, p27, p16 plus importante dans la DPC par rapport à la DGC ;<br/>Acitivité proliférative (ki67) plus importante dans la DPC ;<br/>Diminution de la longueur des télomères plus importante dans la DPC par rapport à la DGC ;<br/>Diminution de l'activité bêta-galactosidase dans la DGC et absence dans la DPC</i> | <i>Kim, Hepatology, 2009</i>                                |
| <i>CGH</i>                      | <i>DPC</i>        | <i>anomalies chromosomiques comparables à cellules retrouvées dans les tumeurs adjacentes</i>  | <i>Marchio, Modern Pathology, 2001</i>                      |
| <i>Microscopie électronique</i> | <i>DGC</i>        | <i>Aspect régénératif (reticulum endosplamique de grande taille, mitochondries abondantes</i>  | <i>Watanabe, Cancer, 1983</i>                               |
| <i>Cytométrie en flux</i>       | <i>DGC</i>        | <i>Anomalies du contenu en ADN</i>   | <i>Roncalli, International journal of Cancer, 1989</i>      |
| <i>Cytométrie en flux</i>       | <i>DGC</i>        | <i>Anomalies du contenu en ADN</i>   | <i>Thomas, Human Pathology, 1992</i>                        |
| <i>Cytométrie en flux</i>       | <i>DGC et DPC</i> | <i>Anomalies du contenu en ADN</i>   | <i>El Sayed, Canadian Journal of Gastroenterology, 2004</i> |
| <i>Immunohistochimie, FISH</i>  | <i>DGC et DPC</i> | <i>Diminution de la taille des télomères plus importante dans la DPC que la DGC<br/>Réduction de l'expression de p16 et p21 dans la DPC par rapport au parenchyme cirrhotique adjacent et à la DGC</i>   | <i>Plentz, Hepatology, 2007</i>                             |

**Tableau 1.** Principales études moléculaires des foyers de DGC et DPC



## 2. Macronodules

Les macronodules (MN) sont des nodules dont l'aspect (couleur, taille) tranche avec le tissu hépatique adjacent, attirant ainsi l'attention du radiologiste ou du pathologiste (Figure 17).



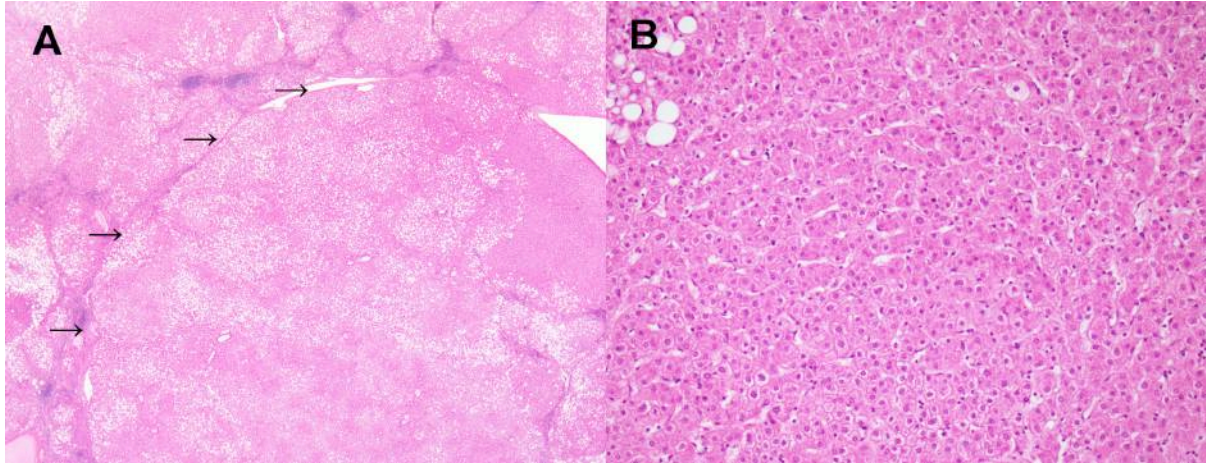
**Figure 17.** Section d'une pièce chirurgicale de segmentectomie hépatique: l'examen macroscopique du prélèvement met en évidence 3 macronodules distincts du parenchyme adjacent par leur couleur (1,2) et/ou leur taille (3).

Il existe plusieurs types de MN, classés en fonction de leur évolution vers une lésion maligne: MN de bas grade (MNBG), MN de haut grade (MNHG), CHC précoce (ou "early HCC", correspondant à un macronodule dysplasique avec foyer de transformation en CHC) et petit CHC (ou "small and progressed HCC", CHC de petite taille, <2cm). Sur des arguments pathologiques et cliniques, on considère qu'il existe une séquence MNBG>MNHG>CHC précoce> petit CHC. En effet, les macronodules présentent, en fonction de leur degré de dysplasie, des aspects histologiques se rapprochant de celui des CHC.

### 2.1 Macronodules de bas grade

Le terme MNBG regroupe deux types de lésions: les MN de régénération et les MN en dysplasie de bas grade.

Les MN de régénération ont un aspect histologique comparable à celui du parenchyme hépatique cirrhotique adjacent, et ne présentent pas d'atypie significative (1, 3).

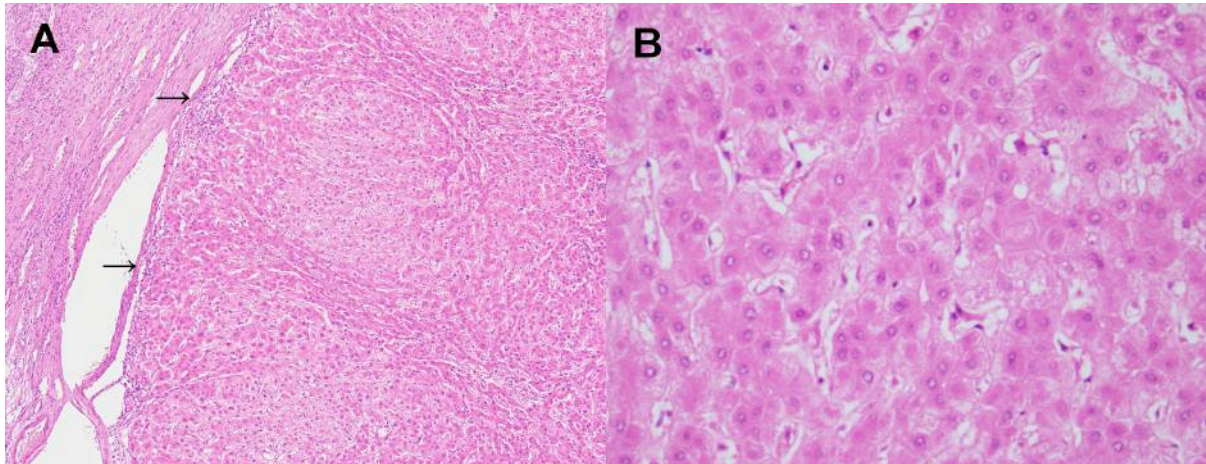


**Figure 18.** A : MN en dysplasie de bas grade, se démarquant du foie adjacent par sa taille (flèches). B : Il est constitué de d'hépatocytes organisés en travées fines.

Les MN en dysplasie de bas grade présentent des anomalies histologiques mineures, comme une discrète augmentation du rapport nucléocytoplasmique, la présence de quelques artères isolées, ou une discrète augmentation de l'épaisseur des travées hépatocytaires (Figure 18) (1, 3, 97).

## **2.2 Macronodules de haut grade**

Les MNHG sont caractérisés par des atypies plus marquées que les macronodules en dysplasie de bas grade: le rapport nucléocytoplasmique peut être augmenté, les travées hépatocytaires sont plus épaissies, il existe de nombreuses artères isolées et parfois quelques formations pseudoglandulaires (Figure 19) (1, 3, 97).



**Figure 19.** A : Macronodule de haut grade, entouré par des bandes de fibrose (flèches). B : La densité cellulaire est augmentée ; le nodule est constitué d'hépatocytes atypiques (augmentation du rapport nucléocytoplasmique) se regroupant en travées épaissies.

### **2.3 Transformation maligne en CHC précoce et petit CHC**

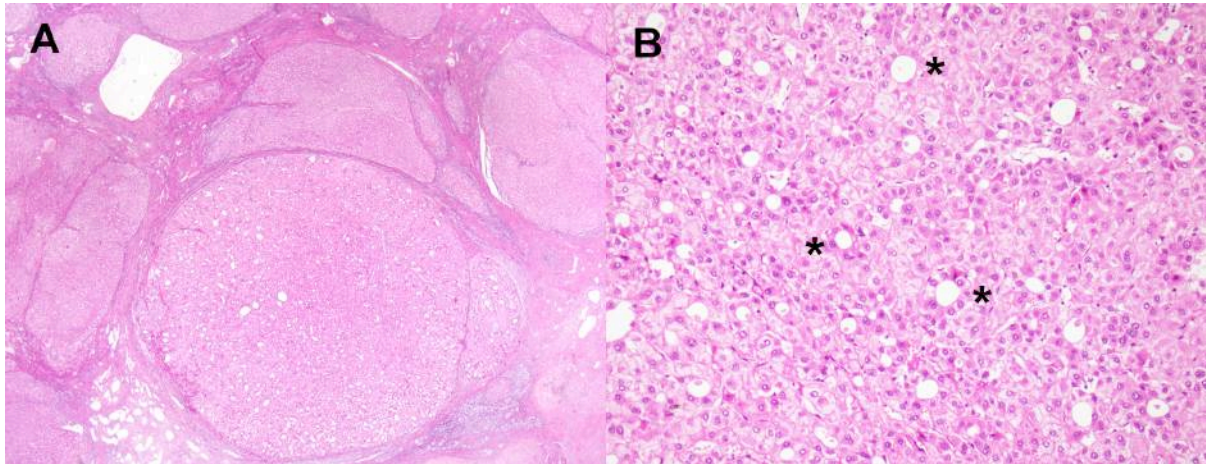
Il existe différents arguments supportant la nature prénéoplasique des macronodules et leur évolution possible vers le CHC.

Sur le plan clinique, Les MNBG et MNHG sont plus fréquemment identifiées sur les pièces de résection hépatiques chez les patients ayant un authentique CHC, et les patients cirrhotiques avec MN ont un risque accru de développer un CHC, ce risque étant plus important en cas de MNHG (108, 109). .

Au niveau anatomopathologique, l'aspect morphologique des MNBG et MNHG se rapprochent progressivement de celui des CHC. Des études cliniques ont également montré que les MNHG avaient un risque plus grand de transformation maligne que les MNBG (108, 109).

On désigne les MN présentant des microfoyers de transformation maligne par le terme CHC précoce ("early HCC") et les nodules entièrement composés de CHC mais dont la taille est inférieure à 2cm par le terme petit CHC ("small and progressed HCC") (Figure 20).





**Figure 20.** A : Petit CHC: le nodule est bien limité à faible grossissement (HES, X20). B : Le degré d'atypie cytonucléaire est marqué, avec une augmentation du rapport nucléocytoplasmique et la présence de nombreuses formations pseudoglandulaires (\*) (HES, X200).

Des données immunophénotypiques supportent également cette voie de carcinogenèse hépatique : en effet les MN expriment de manière graduelle, en fonction de leur degré de dysplasie, certains marqueurs immunohistochimiques fréquemment exprimés dans le CHC (110).

Les trois marqueurs immunohistochimiques les plus utilisés dans l'évaluation des MN sont: la glutamine synthétase (GS), le glypican 3 (GPC3) et l'heat shock protein 70 (HSP70) (110).

La glutamine synthétase est un gène cible de la  $\beta$ -caténine, et son degré d'expression reflète l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, fréquemment impliquée dans le CHC (10, 111). Une forte expression de la GS est retrouvée dans 14% des MNHG, 70% des CHC précoces, et 59% des petits CHC. Son expression est faible ou négative dans les MNBG.

Le GPC3 est un protéoglycane de la famille des glypicans dont le rôle dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose a été démontré (112-116), et qui est actuellement largement utilisé comme marqueur de malignité (110, 117, 118). Une expression du GPC3 est retrouvée dans 9% des MNHG, 60% des CHC précoces, et 72% des petits CHC (110). Le GPC3 n'est pas exprimée par les MNBG (110).

HSP70 appartient à la famille des protéines chaperonnes qui préviennent l'agrégation des protéines altérées, éliminent les protéines anormales et contribuent à la conformation correcte des peptides nouvellement synthétisés (119-121). Elle est exprimée dans 0% des MNBG, 4,5% des MNHG, 90% des CHC précoces et 73% des petits CHC (110).

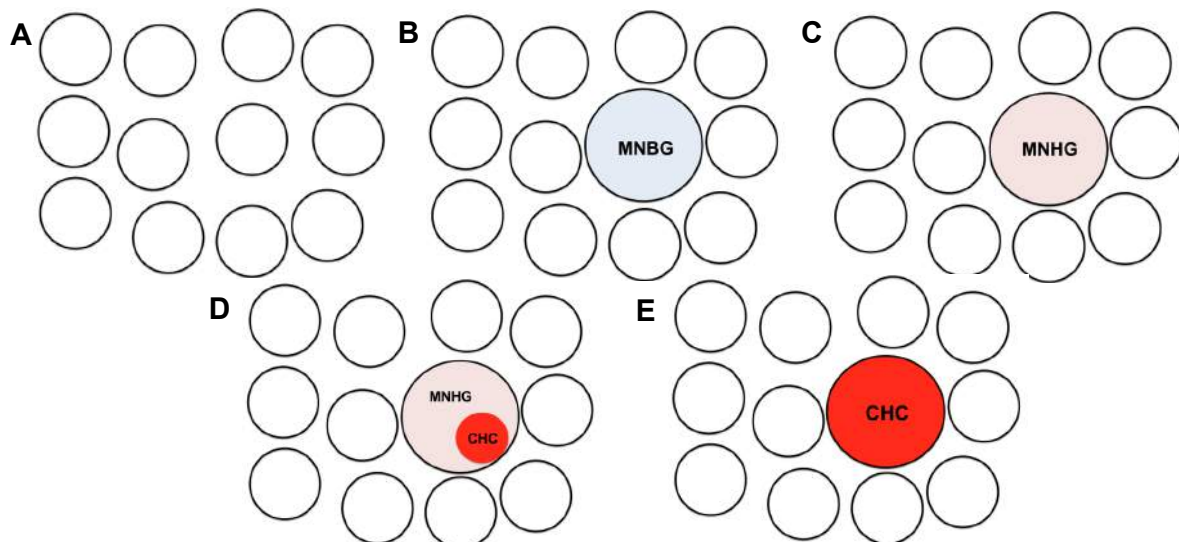
Les données moléculaires sont plus rares, car les MN sont de lésions de petite taille, et il y a peu de centres réalisant de manière systématique des prélèvements congelés de ces lésions, ce qui limite les analyses réalisables.

Diverses altérations moléculaires suggèrent cependant la nature prénoplasique des MN, comme des anomalies de la ploïdie, une augmentation de l'activité de la télomérase, l'existence de nodules clonaux, ou des pertes d'hétérozygotie (Tableau 2) (122-129).

| Techniques employées et nombre de cas étudiés         | Etiologie de la cirrhose   | Altérations moléculaires identifiées   | Référence                                   |
|---|--|--|---|
| PCR n=14  | Infections virales B et C, alcool, cirrhoses cryptogéniques  | Pertes 1p, 4q, 13q, 18q  | Roncalli et al., <i>Hepatology</i> , 2000.  |
| PCR n=20  | Infections par les virus de l'hépatite B et C, alcool  | Pertes 4q, 8p  | Maggioni et al., <i>Hepatology</i> , 2000   |
| PCR, Inactivation du chromosome X (HUMARA) n=7        | nd   | Pertes 4q, 8p, Xq, Monoclonalité   | Yeh et al., <i>Gastroenterology</i> , 2001  |
| CGH n=3   | Infection par le virus de l'hépatite B   | Gains 1q32   | Wong, <i>Am J Pathol</i> , 1999             |
| PCR n=135   | Infections par les virus de l'hépatite B et C, alcool, déficit en alpha-1-antitrypsine, cirrhoses autoimmunes cryptogéniques | Pertes 1p  | Sun et al., <i>Hepatology</i> , 2000        |
| CGH n=26  | Infections virales B et C  | Gains 1q, pertes 8p  | Tornillo et al. <i>Lab Invest</i> , 2002    |
| Analyse de la longueur des télomères, TRAP assay n=36 | Infection par le virus de l'hépatite B   | Augmentation de l'activité télomérase, raccourcissement des télomères                                      | Oh et al., <i>J Hepatol</i> , 2003          |
| PCR quantitative                                      | Infection par le virus de l'hépatite B   | Augmentation de l'expression de l'ARN messager de TERT   | Oh et al., <i>Am J Gastroenterol</i> , 2006 |
| Southern Blot, immunohistochimie                      | Infection par le virus de l'hépatite B   | Raccourcissement des télomères, inactivation du point de contrôle du cycle cellulaire lié à p21(WAF1/CIP1) | Lee et al., <i>Mod Pathol</i> , 2009        |

**Table 2.** Principales anomalies moléculaires identifiées dans les MN.

L'ensemble de ces données soutient l'existence d'une voie de carcinogénèse associée aux MN, et l'existence d'une séquence MNBG>MNHG>CHC précoce>petit CHC (Figure 21).



**Figure 21.** A) Parenchyme cirrhotique constitué de nodules non dysplasiques, d'aspect identique. B) Développement d'un MNBG à partir d'un nodule pré-existant. C) Evolution du MNBG en MNHG. D) Développement d'un foyer de CHC au sein d'un MNHG (CHC précoce). E) Nodule entièrement transformé en CHC (petit CHC).

### 3. Carcinome hépatocellulaire

#### 3.1 Aspects anatomopathologiques

Les caractéristiques macroscopiques du CHC sont très variables (1, 3). Il peut s'agir de nodules uniques ou multiples, dont la taille peut aller de quelques millimètres et à plus de 30 cm. Leur aspect peut être blanc, jaune ou encore verdâtre en cas de production abondante de bile.

Sur le plan microscopique, ils sont constitués de cellules tumorales ressemblant plus ou moins à des hépatocytes (1, 3). Elles peuvent se regrouper en travées, formations pseudoglandulaires, massifs, ou encore en nappes diffuses, sans architecture particulière (1, 3).

Différents aspects cytologiques peuvent être observés: cellules pléomorphes (atypies marquées avec noyaux multiples et/ou irréguliers, volumineux), cellules claires (cytoplasme clair en raison de la présence de glycogène), aspect sarcomatoïde (cellules fusiformes), inclusions cytoplasmiques éosinophiles (1, 3).

Le stroma est le plus souvent peu abondant et consiste en des cavités vasculaires ressemblant à des sinusoides. Dans certains cas, on peut observer un stroma fibreux, hyalin (1, 3).

### **3.2 Altérations moléculaires du carcinome hépatocellulaire**

#### **3.2.1 Altérations chromosomiques**

Comme de nombreuses tumeurs solides, le CHC est souvent caractérisé par un caryotype complexe, avec de nombreux réarrangements chromosomiques (79, 130-142).

Les anomalies les plus fréquentes sont les pertes 17p, 8p, 16q, 16p, 4q, 9p, 13q, 1p, et 6q et les gains 1q, 7q, 8q, et 17q (79, 130-142).

Le degré d'instabilité chromosomique est positivement corrélé aux mutations des gènes *TP53* et *AXIN1* (138, 143, 144)

Des amplifications de gènes impliqués dans l'angiogénèse (*VEGFA*), la prolifération et la survie cellulaire (*MYC*, *CCND1*, *RSPO2*, *FGF19*) ont également été rapportées (145-148).

#### **3.2.2 Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur dans le CHC**

Les récentes technologies de séquençage haut débit permettent d'analyser l'ensemble de la séquence codante de génomes tumoraux en quelques semaines. Ainsi, plusieurs études, dont une réalisée par le laboratoire, ont affiné notre connaissance du paysage mutationnel et des voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse hépatique (Tableau 3) (79, 82-84).

Ces études ont confirmé l'activation fréquente de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine due aux mutations activatrices de *CTNNB1* (10-30%). La voie Wnt/ $\beta$ -caténine joue un rôle majeur dans la physiologie hépatique, en régulant la zonation, la prolifération et la différenciation des hépatocytes (75-77). Les CHC mutés pour *CTNNB1* sont connus pour présenter une stabilité chromosomique, des altérations du métabolisme des acides aminés et pour surexprimer différents oncogènes comme par exemple *TBX3* (10, 80, 149). Audard et collaborateurs ont d'autre part montré que les mutations de *CTNNB1* étaient associées à un phénotype particulier caractérisé par une bonne différenciation, la présence d'une architecture microtrabéculaire, un faible degré d'atypie et la présence de cholestase tumorale (111). Les mutations bilatérales inactivatrices d'*AXIN1* (15%) peuvent également être responsable d'une activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, même si les CHC mutés pour *AXIN1* ont un profil différent de ceux mutés pour *CTNNB1* (150). En collaboration avec l'équipe de Christine Perret (Institut Cochin, Paris) le laboratoire a en effet précédemment montré que l'inactivation d'*AXIN1* n'était pas équivalente à l'activation de *CTNNB1* (150). A la différence des tumeurs mutées pour *CTNNB1*, les CHC inactivés pour *AXIN1* présentent d'autre part

une forte instabilité chromosomique (143). L'expression de gènes cibles classiques de *CTNNB1*, comme *GLUL*, est également habituellement modérée dans les tumeurs mutées pour *AXIN1* (150).

Les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire sont également fréquemment mutés : en plus des altérations déjà connues de *TP53* (18-35%) ou *CDKN2A* (7-10%), des mutations récurrentes inactivatrices récurrentes d'*ATM* (5%) et d'*IRF2* (5%) ont été rapportées (147). *ATM* est une protéine impliquée dans la réparation des cassures double brin de l'ADN et des études fonctionnelles réalisées par le laboratoire ont montré qu'*IRF2* agissait comme un régulateur de la voie p53 (79).

De fréquentes altérations des gènes codant pour des protéines impliquées dans la structure de la chromatine ont également été mises en évidence. En particulier, des mutations somatiques récurrentes inactivatrices d'*ARID1A* et d'*ARID2* ont été identifiées dans environ 10% des CHC (79). Ces 2 gènes, mutés dans de nombreux types de tumeurs humaines, codent pour des sous-unités des complexes SWI/SNF, qui sont capables de modifier la position des nucléosomes le long des molécules d'ADN, et de réguler ainsi la transcription des gènes.

| Voie de signalisation impliquée              | Altérations moléculaires                             | Fréquence |
|--|--|-----------|
| <i>Maintien de la longueur des télomères</i> | Mutations du promoteur de TERT                       | 60%       |
|  | Insertion virale (VHB) dans le promoteur             |           |
| <i>Voie Wnt/<math>\beta</math>-caténine</i>  | Mutations activatrices de <i>CTNNB1</i>              | 30-40%    |
|  | Mutations inactivatrices d' <i>AXIN1</i>             | 15%       |
| <i>Voir p53/cycle cellulaire</i>             | Mutations inactivatrices de TP53                     | 18-35%    |
|  | Mutations inactivatrices et délétions d' <i>IRF2</i> | 5%        |
|  | Amplifications de <i>CCND1</i>                       | 5-10%     |
|  | Délétions homozygotes de <i>Rb1</i>                  | 3%        |
|  | Délétions homozygotes de <i>CDKN2A</i>               | 5-10%     |
|  | Mutations inactivatrices d' <i>ATM</i>               | 5%        |
| <i>Epigénétique</i>                          | Mutations inactivatrices des gènes <i>MLL</i>        | 17-20%    |
|  | Mutations inactivatrices d' <i>ARID1A</i>            | 10-16%    |
|  | Mutations inactivatrices d' <i>ARID2</i>             | 5-18%     |
| <i>Stress oxydatif</i>                       | Mutations activatrices de <i>NFE2L2</i>              | 6%        |
|  | Mutations inactivatrices de <i>KEAP1</i>             | 8%        |
| <i>Voie PI3K/AKT</i>                         | Mutations activatrices de <i>PI3KCA</i>              | 2%        |
| <i>Voie JAK/STAT</i>                         | Mutations activatrices d' <i>IL6ST</i>               | 2%        |
|  | Mutations activatrices de <i>JAK1</i>                | 9%        |
| <i>Voie des MAP-Kinases</i>                  | Mutations inactivatrices de <i>RPS6KA3</i>           | 9%        |
|  | Amplifications de <i>FGF19</i>                       | 5%        |

**Tableau 3.** Principaux gènes mutés dans le CHC.

Les conséquences fonctionnelles des mutations de ces gènes sont complexes et encore peu comprises. La restauration de l'expression de la forme sauvage de la protéine ARID1A dans des lignées de cancer de l'ovaire mutées pour *ARID1A* inhibe la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* (151). Huang et collaborateurs ont montré par des techniques d'ARN interférence dans 4 lignées de CHC non mutés pour *ARID1A* qu'une diminution de son expression était responsable d'une promotion de la prolifération et de la migration cellulaire (84). D'autres travaux ont observé que les mutations d'ARID1A et/ou sa perte d'expression immunohistochimique était des facteurs de mauvais pronostic dans de nombreux types de tumeurs comme les adénocarcinomes gastriques, les cancers urothéliaux ou encore les adénocarcinomes rénaux à cellules claires (152-156). Une corrélation entre les mutations ou la perte d'expression d'ARID1A et l'activation de la voie PI3K/AKT, connue pour promouvoir la prolifération et la survie cellulaire, a également été observée dans plusieurs sous types de cancers humains (157-159).

D'autres gènes impliqués dans les phénomènes épigénétiques ont été identifiés comme mutés de façon récurrente dans le CHC: il s'agit de *MLL* (4,5%), *MLL2* (4,5%), *MLL3* (1%) et *MLL4* (7%) (83, 160). Ils jouent un rôle majeur dans la méthylation et l'acétylation des histones et sont ainsi également susceptibles de modifier la transcription de divers gènes.

L'implication de la voie du stress oxydatif a également été identifiée par les nouvelles techniques de séquençage, avec les mutations activatrices de *NFE2L2* et inactivatrices de *KEAP1*. NRF2, la protéine codée par *NFE2L2*, est un facteur de transcription qui à l'état physiologique se fixe à KEAP1, et est ensuite dégradé par le protéasome (161, 162). Lorsqu'il est activé, soit par l'augmentation d'espèces réactives de l'oxygène ou par des mutations, NRF2 se dissocie de KEAP1, est transloqué dans le noyau et active la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif (161, 162). Cette activation confère aux cellules tumorales un avantage prolifératif et une résistance aux agents anticancéreux (163-165).

Les autres voies impliquées dans la carcinogénèse hépatique sont les voies JAK/STAT (mutations activatrices d'*IL6ST* (2%) et de *JAK1* (9%)), PI3K/AKT (mutations activatrices de *PI3KCA*) et la voie des MAP-Kinases (mutations inactivatrices de *RPS6KA3* (9%)).

De nouvelles informations ont également rapidement émergé de l'analyse des séquences non-codantes : le laboratoire a ainsi mis en évidence des mutations somatiques de la séquence promotrice du gène codant pour la télomérase transcriptase inverse (*TERT*) (166).

d'adopter une classification moléculaire commune du CHC.

## **CONTEXTE**



## **Tumeurs hépatocytaires bénignes**

Les travaux effectués par le laboratoire avant mon arrivée ont permis d'établir une classification moléculaire des AHC. La plupart de ces études avaient cependant été réalisées sur des AHC sporadiques, et le profil moléculaire des AHC associés aux GSDI restait à déterminer. La première partie de mon projet a donc consisté à étudier les caractéristiques moléculaires de ces lésions, pour déterminer si ces maladies métaboliques prédisposent à un sous type particulier d'AHC. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le profil moléculaire des AHC développés chez des patients atteints de GSDI était différent de celui des AHC sporadiques, avec une absence complète d'AHC-H et une importante fréquence de  $\beta$ -AHC. La deuxième partie du projet a permis de mettre en évidence des anomalies métaboliques (activation de la glycolyse et de la synthèse d'acides gras) communes au foies non tumoraux des patients atteints de GSDI et aux AHC-H sporadiques. Ces anomalies sont connues pour favoriser la prolifération cellulaire et pourraient expliquer au moins en partie le développement d'AHC chez ces patients.

## **Lésions prénéoplasiques hépatiques**

Les récentes technologies de séquençage haut débit des séquences codantes ont permis d'affiner notre connaissance du paysage mutationnel et des voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse hépatiques. Ils ont permis de confirmer la fréquence des mutations de *CTNNB1*, d'*AXIN1* et de *TP53*, mais également d'identifier de nouveaux gènes comme *ARID1A*, *ARID2*, *NFE2L2*, *RPS6KA3* ou encore *MLL*. De nouvelles informations ont rapidement émergé de l'analyse des séquences non-codantes : ainsi il a été identifié a mis des mutations somatiques de la séquence promotrice du gène codant pour la télomérase transcriptase inverse (*TERT*). Ces altérations sont retrouvées dans environ 60% des CHC et représentent à ce jour l'altération moléculaire la plus fréquente.

Nous avons cherché à identifier, dans une série de lésions prénéoplasiques et néoplasiques précoces, des mutations du promoteur de *TERT* pour déterminer à quel stade de la carcinogénèse hépatique elles pouvaient intervenir.

## **RESULTATS**

## **DISCUSSION**

## PREMIERE PARTIE:

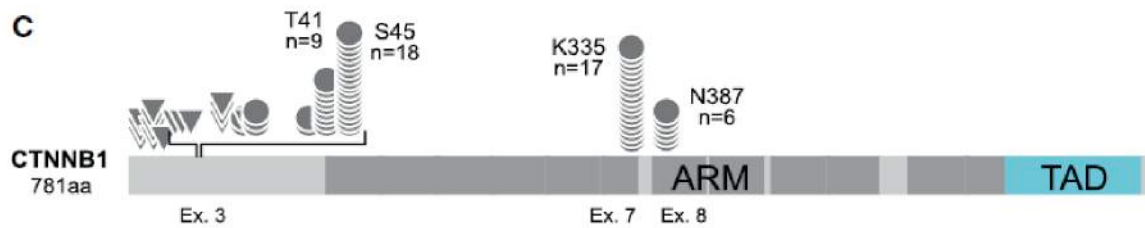
### LES TUMEURS HEPATOCYTAIRES BENIGNES

Grâce aux progrès réalisés dans la prise en charge métabolique et nutritionnelle, les patients atteints de GSDI atteignent le plus souvent l'âge adulte, et les AHC sont, avec l'insuffisance rénale, la principale cause de morbidité/mortalité, par hémorragie ou transformation maligne (90, 93, 95).

Notre étude a permis de mettre en évidence que le profil moléculaire des AHC développés chez ces patients était différent de celui des AHC sporadiques. Il est caractérisé par une importante fréquence de  $\beta$ -AHC et par une absence totale d'AHC-H.

Il est désormais bien établi que les  $\beta$ -AHC représentent le sous type d'AHC le plus à risque de transformation maligne (32-34). Ces observations pourraient en partie expliquer le risque accru de transformation maligne des AHC développés dans un contexte de GSDI : il a été en effet rapporté que les AHC développés au cours des GSDI avait un risque de transformation compris entre 10 et 20%, alors qu'il est estimé à environ 5% dans la population générale (30, 32, 36, 92, 174). Ces données sont cependant issues d'études portant sur un nombre limité de patients et sont à valider sur des séries plus importantes.

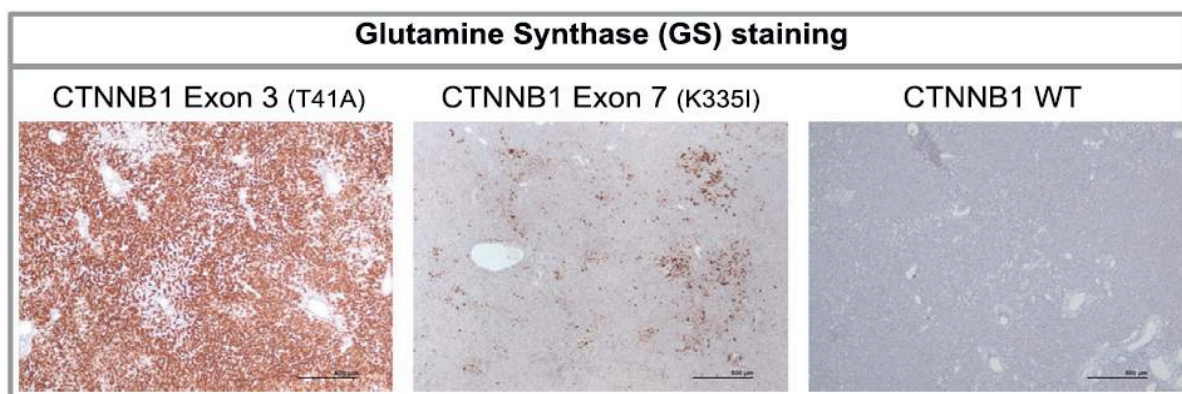
Le spectre de mutation de *CTNNB1* observé dans notre série était inhabituel, avec 3 mutations sur 7 localisées au niveau de l'exon 7 (K335I). Ce hot spot mutationnel ainsi qu'un autre au niveau de l'exon 8 (N387) avait été précédemment été identifié par le laboratoire dans le CHC (79). Nos résultats ont démontré que ces mutations pouvaient également survenir dans les AHC, ce qui a ensuite été validé dans une série complémentaire plus importante de 50  $\beta$ -AHC (Figure 26) (175).



**Figure 26.** Spectre de mutations de CTNNB1 dans une série de 50  $\beta$ -AHC. ARM=amadillo; TAD=transactivation domain. D'après Pilati et al. Cancer Cell, 2014.

Ces mutations n'intéressent pas les sites de phosphorylations codés par l'exon 3 qui permettent la prise en charge et la dégradation de la  $\beta$ -caténine par le protéasome, et leur signification précise reste à déterminer. Des expériences in vitro ont montré qu'elles étaient capables d'activer la  $\beta$ -caténine mais de manière plus faible que les mutations classiques de l'exon 3 (175). Les études immunohistochimiques réalisées sur les  $\beta$ -AHC avec ce type de mutations rares sont cohérentes avec ces résultats obtenus in vitro : ces lésions sont en effet caractérisées par une absence d'accumulation nucléaire de la  $\beta$ -caténine et une expression faible de la GS (Figure 27) (175).

Des études complémentaires devront déterminer si le risque de transformation en CHC est différent en fonction de la localisation des mutations.



**Figure 27.** Expression de la GS dans les  $\beta$ -AHC mutés au niveau de l'exon 3, de l'exon 7 et dans un AHC non muté pour CTNNB1. D'après Pilati et al., Cancer Cell, 2014.

Le profil moléculaire des AHC développé dans un contexte de GSDI était également caractérisé par une absence complète d'AHC-H, alors que ce sous type d'AHC représente environ 30% des AHC sporadiques.

Cette absence d'AHC-H a également été identifiée par Sakellariou et collaborateurs qui ont analysé, par technique immunohistochimique, une série de 38 nodules développés chez 7 patients atteints de GSDI (94). Ces nodules correspondaient à des AHC-I (69%, 26/38), des AHC-U (18%, 7/38) et des HNF (13%, 5/38)

Contrairement à notre étude, ils n'ont identifié aucun  $\beta$ -AHC dans leur série. Cette différence pourrait être expliquée par 1) les différences de techniques employées dans la caractérisation des lésions (immunohistochimiques dans leur cas et moléculaires dans le nôtre) 2) une sensibilité insuffisante de l'immunohistochimie pour la détection des mutations de *CTNNB1*, en particulier celles localisées au niveau des exons 7 et 8 et 3) par des biais de recrutement (leur série comportait exclusivement des patients transplantés et la notre était constitué de patients réséqués ou transplantés).

L'absence complète d'AHC-H chez les patients atteints de GSDI nous a conduits à essayer d'identifier d'éventuelles anomalies communes entre les foies non tumoraux des patients atteints de GSDI et les AHC-H.

Une étude du laboratoire avait précédemment mis en évidence que les AHC-H présentaient différentes anomalies métaboliques : inhibition de la néoglucogénèse et activation de la glycolyse et de la synthèse d'acides gras (63).

Comme attendu, en raison des mutations de la *G6PC* ou de *G6PT*, les foies non tumoraux des patients sont caractérisés par une inhibition de la néoglucogénèse. De manière intéressante nous avons également observé, comme dans les AHC-H, une activation de la glycolyse et de la synthèse d'acides gras. Notre analyse de clustering hiérarchique non supervisé a également montré que les foies non tumoraux des patients se regroupaient avec les AHC-H et avaient un profil différent de celui des foies non tumoraux de patients non atteints de GSDI.

Le lien entre pathologies métaboliques et carcinogénèse hépatique (bénigne ou maligne) est désormais clairement établi (96). Il a été notamment démontré que l'obésité était un facteur de risque de CHC mais également d'AHCI (176). Bien que le risque relatif des patients obèses de développer un CHC soit relativement faible en comparaison à des patients exposés aux autres facteurs de risque, son impact à l'échelle de la santé publique pourrait être considérable compte tenu de la prévalence mondiale croissante de l'obésité.

Si les anomalies métaboliques constituent d'importants facteurs de risque, elles sont également très souvent des caractéristiques intrinsèques aux tumeurs.

Il est en effet établi que la plupart des cellules tumorales sont caractérisées par une activation de glycolyse, quelles que soit les conditions métaboliques, aérobies ou anaérobies (65, 67, 68). Ce phénomène, appelé «l'effet Warburg », permet aux cellules tumorales de générer rapidement des molécules d'ATP ainsi que des éléments (ribose-5-phosphate notamment) nécessaires à la synthèse d'acides nucléiques (67, 68) .

Il a été d'autre part été démontré plus spécifiquement dans la carcinogénèse hépatique que les anomalies métaboliques jouaient un rôle probablement majeur (69, 177, 178).

Ma et collaborateurs ont observé que les CHC humains étaient caractérisées par une inhibition de la néoglucogénèse, et, en utilisant un modèle murin d'allogreffe, que le rétablissement de la néoglucogénèse par l'administration de dexaméthasone, une hormone corticoïde de synthèse, avait une activité antiproliférative significative (69).

Par des approches de type spectrométrie de masse sur une série de CHC humains, Beyoglu et collaborateurs ont identifié une augmentation d'un facteur 4 de la glycolyse et une diminution d'un facteur 2 de la néoglucogénèse (177). Si les mécanismes de ces modifications métaboliques restent peu connus, il a été montré que l'activation de la voie JAK/STAT, fréquemment observé dans le CHC, régulait négativement la néoglucogénèse en induisant la surexpression d'un microARN, mir23a, qui cible directement deux gènes codant pour des enzymes impliquées dans la néoglucogénèse, dont la *G6PC* (179).

L'activation de la synthèse des acides gras est également l'une des principales caractéristiques métaboliques des cellules cancéreuses (70-72). Une surexpression de la FASN, enzyme clé de la voie, est observée dans de très nombreuses tumeurs humaines et son inhibition a démontré une activité anti-tumorale significative (70, 72).

Certains facteurs de risque de CHC, comme l'infection par le VHB, le VHC, ou les hépatites alcooliques sont également associés à une surexpression de FASN (180-182). Calvisi et collaborateurs ont mis en évidence que le niveau de lipogénèse dans le CHC était positivement corrélé à l'activation d'une voie majeure de la carcinogénèse humaine, la voie PI3K/AKT (183). Ils ont également mis en évidence qu'une lipogénèse accrue était corrélé à un mauvais pronostic et à un phénotype agressif (183).

Les conséquences biologiques de l'activation de la lipogénèse ne sont pas complètement comprises, elle pourrait jouer un rôle antiapoptotique par stabilisation du potentiel de membrane mitochondrial et assurer la formation de substrats indispensables à la synthèse de nouvelles membranes cellulaires (70).



Les différents points communs que nous avons observé entre les foies non-tumoraux des patients atteints de GSDI et les AHC-H sont également concordants avec les travaux d'Hiraiwa et collaborateurs, qui avaient montré dans un modèle murin qu'*HNF1A* régulait de manière positive la transcription de *G6PT* et que les manifestations cliniques des patients atteints de GSDI (retard de croissance, hépatomégalie, insuffisance rénale, hyperlipidémie) étaient également observées chez les souris *HNF1A*<sup>-/-</sup> (184).

Le rôle crucial du métabolisme dans le développement des AHC chez les patients atteints de GSDI est supporté par plusieurs travaux fondamentaux ou cliniques.

Lee et collaborateurs ont montré qu'une correction des anomalies métaboliques par thérapie génique (vecteur de type adénovirus) prévenait la formation des AHC (185). Une étude rétrospective de 117 patients suggère qu'il existe une association entre les anomalies métaboliques sanguines (taux de triglycérides) et la formation des tumeurs, et de rares cas de régression de tumeurs hépatiques après traitement nutritionnel ont été rapportés (186, 187). Il faut cependant préciser que pour certains de ces cas le diagnostic de tumeur avait été porté uniquement sur des critères radiologiques, sans confirmation histologique.

En conclusion, les altérations métaboliques communes observées dans les hépatocytes déficients pour *G6PC*, *G6PT* ou *HNF1A* pourraient expliquer l'absence d'AHC-H en cas de GSDI et conférer des propriétés prénéoplasiques aux hépatocytes des patients atteints de GSDI, expliquant le développement de multiples adénomes.

Notre approche ciblée n'a pas permis d'identifier des anomalies somatiques propres aux AHC développées sur GSDI: de nouvelles études par séquençage haut débit (exome, séquençage des transcrits ou du génome entier) pourront dans le futur déterminer si des gènes sont impliqués de manière spécifique dans les AHC développées dans ce contexte.

Un travail collaboratif a d'autre part été amorcé avec l'équipe du Dr Rajas (Inserm U855, Lyon Est) qui a récemment mis au point un modèle murin d'atteinte hépatique de GSDIa, en invalidant le gène *G6PC* spécifiquement dans le foie, grâce à une stratégie Cre-lox inducible (souris L-*G6pc*<sup>-/-</sup>) (188). Ces souris L-*G6pc*<sup>-/-</sup>, contrairement aux souris complètement invalidées pour *G6PC*, sont viables et reproduisent la pathologie hépatique de la GSDIa, avec notamment le développement de tumeurs hépatiques (AHC et CHC) après environ 9 mois d'invalidation (188). De l'ARN des tumeurs et du foie non tumoral des souris est en cours de typage, et nous espérons pouvoir démontrer qu'il s'agit d'un modèle relevant pouvant être utilisé pour des tests thérapeutiques, préventifs ou curatifs.

**DEUXIEME PARTIE:**

**TUMORIGENESE MALIGNE ET LESIONS PRENEOPLASIQUES DU  
PARENCHYME HEPATIQUE CIRRHOTIQUE**

Bien que le modèle de transformation maligne MNBG>MNHG>CHC soit largement accepté, peu de données moléculaires le soutenaient. Des travaux avaient mis en évidence des anomalies chromosomiques ou une augmentation de l'activité télomérase dans ces lésions, mais le statut mutationnel des principaux gènes mutés dans le CHC restait inconnu.

Dans notre étude, nous avons montré que les mutations du promoteur de *TERT* étaient un évènement précoce dans la carcinogénèse hépatique sur cirrhose. L'incidence de ces mutations augmentait avec le degré de dysplasie : leur taux de survenue était de 6% dans les MNBG, 20% dans les MNHG, 59% dans les CHC précoces et 42% dans les petits CHC (une précédente étude du laboratoire avait observé un taux de survenue de 60 % environ dans les CHC de plus grande taille ((166) Article 7). Les mutations du promoteur de *TERT* étaient positivement corrélées à des marqueurs de malignité histologiques (formations pseudoglandulaires, atypies cytologiques, artères isolés) et immunohistochimiques (expression de GPC3 et HSP70).

L'ensemble de ces observations soutient l'existence d'une séquence de transformation maligne MNBG>MNHG>CHC précoce>CHC qui avait été initialement proposée sur des critères anatomopathologiques.

Dans les 31 MNBG, MNHG, et CHC précoces analysés, nous n'avons d'autre part identifié aucune mutation dans 10 gènes fréquemment mutés dans le CHC, ce qui renforce le rôle précoce et probablement déterminant des mutations du promoteur de *TERT* dans la transformation maligne des lésions préneoplasiques.

La survenue de ces mutations dans des lésions considérées comme préneoplasiques (MNBG et MNHG) est particulièrement intéressante, et suggère que ces mutations seraient être nécessaires mais pas suffisantes pour la transformation maligne en CHC: elles joueraient ainsi un rôle "gatekeeper" dans la carcinogénèse hépatique sur cirrhose, comme par exemple les mutations d'*APC* dans la carcinogénèse colique.

Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si les mutations du promoteur de *TERT* jouent également un rôle dans les foyers de DPC. En effet, la DPC est considérée comme une lésion préneoplasique, et la présence de mutations du promoteur de *TERT* pourrait permettre de confirmer cette hypothèse. Il serait également important de s'assurer que les foyers de DGC, considérés comme régénératifs ou réactionnels, ne soient pas mutés.

La survenue précoce des mutations du promoteur *TERT* au cours de la carcinogénèse a été également observée dans d'autres organes. En effet, si elles sont extrêmement fréquentes dans de nombreux cancers, elles ont également été identifiées dans diverses lésions préneoplasiques ou de bas grade, comme les adénomes vésiculaires de la thyroïde ou le carcinome in situ et les tumeurs superficielles de bas grade de la vessie (189-191).

Nous pouvons émettre l'hypothèse que les MN avec mutations du promoteur de *TERT* ont un risque accru de transformation en CHC. La recherche de ces mutations dans les MNBG et MNHG pourrait permettre d'évaluer leur potentiel d'évolution et ainsi d'adapter la prise en charge des patients. Nous avons d'autre part montré que l'identification de ces altérations moléculaires était réalisable non seulement sur tissu congelé mais également sur tissu fixé en formol et inclus en paraffine, ce qui pourrait permettre d'utiliser plus facilement ce biomarqueur dans les laboratoires de pathologie.

Les MNHG sont actuellement le plus souvent traités comme des CHC, et il sera très important dans le futur de déterminer si les MNBG mutés doivent également être traités comme des CHC.

Il sera d'autre part intéressant d'affiner notre connaissance des relations entre génotype et phénotype, en particulier par l'étude de nouveaux cas de MNBG mutés et non mutés pour le promoteur de *TERT*. La comparaison des caractéristiques cliniques, morphologiques et immunohistochimiques des MNBG mutés et non mutés pourrait permettre d'identifier

certaines caractéristiques propres à ces lésions, et ainsi d'affiner la classification des macronodules.

Dans les lésions complètement transformées, le laboratoire avait retrouvé une association entre les mutations du promoteur de *TERT* et les mutations de *CTNNB1*, suggérant que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine pourrait initier la carcinogenèse hépatique lorsqu'elle survient dans des cellules dysplasiques déjà mutées pour *TERT*.

Il a d'autre part été mis en évidence qu'environ 50% des AHC avec des foyers de transformation en CHC présentaient une mutation du promoteur de *TERT* et une mutation de *CTNNB1*, renforçant ainsi l'hypothèse d'une coopération entre *TERT* et la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et la carcinogénèse hépatique, quel que soit le contexte (parenchyme sain ou fibreux).

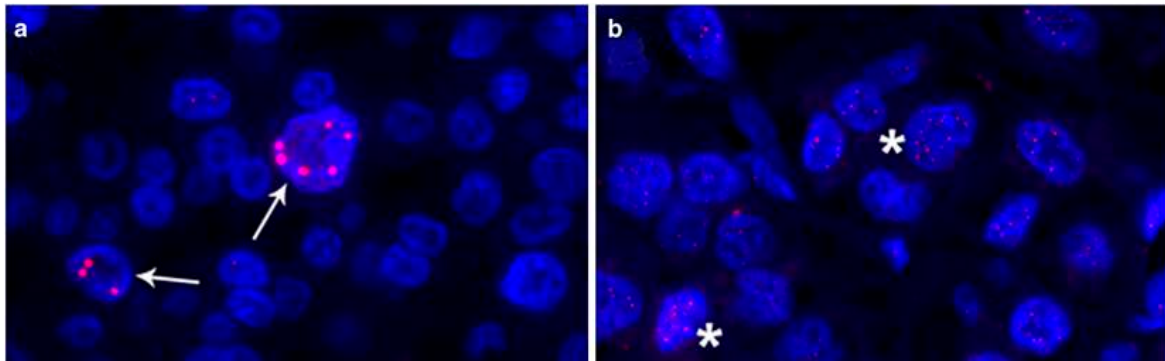
Si les mutations du promoteur sont un évènement particulièrement fréquent, elles ne permettent pas d'expliquer que l'activité télomérase et/ou les niveaux d'ARN messager de *TERT* sont rapportés comme augmentés dans la majorité des CHC et des MN (192-196). D'autres mécanismes doivent exister pour assurer une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de la télomérase.

Dans les cas de CHC liés à l'infection par le VHB, une augmentation de l'expression de la télomérase sans mutation du promoteur de *TERT* peut s'expliquer par les fréquentes insertions d'ADN viral dans la séquence promotrice du gène (197, 198).

Certains cancers ne surexpriment pas la télomérase, et il existe d'autres mécanismes permettant d'assurer le maintien de la longueur des télomères, sans augmentation de l'expression et/ou de l'activité de la télomérase: les cellules peuvent mettre en place un mécanisme alternatif d'élongation de l'ADN télomérique, l'ALT (Alternative lengthening of Telomeres), fondé sur des recombinaisons homologues entre chromosomes. Ce phénomène peut être mis en évidence par des expériences de Telomere FISH: les cellules présentent alors un phénotype particulier caractérisé par la présence de télomères très volumineux émettant un signal très intense et de grande taille.

Certains travaux suggèrent que la voie ALT pourrait être impliquée dans le maintien de la longueur des télomères dans le CHC (199).

Une étude récente a en effet mis en évidence qu'un sous groupe de CHC, caractérisés par un aspect morphologique particulier ("chromophobe HCC with abrupt anaplasia") présentaient par une activation de ALT (Figure 28) (199).



**Figure 28.** A) Telomere FISH dans un cas de CHC avec phénotype ALT : les signaux fluorescents sont intenses et de grande taille. B) Telomere FISH dans un cas de CHC sans phénotype ALT : les signaux sont de plus petite taille (D'après Wood et al., *Modern Pathology*, 2013).

L'acquisition de ce phénotype pourrait être attribuée à des mutations des gènes *ATRX* ou *DAXX*: Heaphy et collaborateurs ont montré dans une série de tumeurs neuroendocrines pancréatiques que l'activation de ALT était fréquemment associée à des altérations de ces gènes (199). *ATRX* et *DAXX* sont cependant mutés de façon très rare dans le CHC (<1%) mais pourraient contribuer, dans un faible nombre de cas, à l'acquisition de ce phénotype.

Le rôle probablement majeur de la télomérase dans l'initiation de la carcinogénèse hépatique suggère qu'elle pourrait être un très bon candidat à des thérapies ciblées. Le fait que son expression dans les cellules normales soit limitée à certains compartiments particuliers (cellules germinales, souches) pourrait également faire de l'inhibition de la télomérase une thérapie tumeur-spécifique, et ainsi limiter ses potentiels effets secondaires.

Plusieurs stratégies d'inhibition de l'activité de TERT ont été envisagées et développées (167) (Tableau 4).

|  | Principe   | Avantages éventuels  | Inconvénients   |
|--|--|--|---|
| <i>Inhibition de la télomérase</i>                   | <i>Inhibition directe de l'activité enzymatique de la télomérase</i>   | <i>Synthèse pharmacologique simple et rapide</i>   | <i>Délai entre administration et réponse effective<br/>Inhibition longue probablement nécessaire</i>  |
| <i>Immunothérapie</i>                                | <i>Développement d'une réponse immunitaire contre les cellules exprimant la télomérase</i>   | <i>Effets prolongés<br/>Utilisation préventive chez sujets à haut risque?<br/>Synthèse difficile et coûteuse</i> | <i>Effets compromis par l'immunodépression relative des patients atteints de cancer?</i>  |
| <i>Agents altérant la structure des télomères</i>    | <i>Altération de la structure des télomères entraînant une incapacité des télomères à se lier à la télomérase ou une mort cellulaire immédiate</i> | <i>Réponse rapide possible</i>   | <i>Toxicité probablement élevée</i>   |
| <i>Thérapie "Suicide-gène"</i>                       | <i>Administration, via par exemple un vecteur viral, d'un gène entraînant la mort cellulaire et contrôlé par le promoteur de télomérase</i>        | <i>Réponse rapide possible</i>   | <i>Administration du vecteur viral difficile<br/>Réponse immunitaire anti-vecteur possible</i>  |
| <i>Agents bloquant l'expression de la télomérase</i> | <i>Administration d'agents entraînant une diminution d'expression de la télomérase (ARN interférents)</i>  | <i>Approche directe</i>  | <i>Délai entre administration et réponse effective<br/>Inhibition longue probablement nécessaire<br/>Administration de agents difficile</i> |

**Tableau 4.** Principes, avantages et inconvénients des différentes stratégies thérapeutiques ciblant la télomérase. D'après Harley, Nat Rev Cancer, 2008.

Le GRN163L (Imetelstat®) est une des molécules les plus prometteuses. Développée par Asai et collaborateurs (200), il s'agit d'un oligonucléotide dont la séquence est complémentaire de celle de l'ARN hTR utilisé par la télomérase pour ajouter des nucléotides aux extrémités des télomères. Cet oligonucléotide s'hybride à la séquence d'ARN au niveau du site actif et empêche la fixation des télomères (Figure 29) (200). Son efficacité anti-tumorale *in vitro* a été mise en évidence dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales dérivées de tumeurs solides (adénocarcinome du poumon, du pancréas, de la prostate, glioblastome), ou hématologiques (myélome multiple) (167, 201).



La télomérase joue d'autre part un rôle important dans les capacités d'autorenouvellement des cellules souches et progénitrices normales, et il sera indispensable d'identifier dans le futur les éventuels effets à long terme des thérapies anti-télomérase sur ce compartiment cellulaire.



## **CONCLUSION ET PERPECTIVES**

Le travail mené sur les AHC liés à la GSDI a permis de mettre en évidence que cette maladie génétique héréditaire prédisposait à des AHC de profil moléculaire particulier. Cependant, pour affiner la caractérisation de ces lésions, d'autres approches, plus globales (exome, séquençage des transcrits ou génome entier) seront indispensables pour mieux déterminer l'ensemble des anomalies moléculaires qui sous-tendent leur développement. Ce type de technique pourrait permettre de savoir si au sein d'un même sous-type d'AHC, il existe des particularités propres aux lésions développées chez les patients atteints de GSDI. Elles pourraient également permettre d'identifier des cibles thérapeutiques.

La caractérisation du modèle murin de GSDIa permettra également probablement de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la carcinogénèse hépatique dans ce contexte métabolique.

La seconde partie de mon travail a permis de mettre en évidence que les mutations du promoteur de *TERT* étaient un événement précoce et probablement déterminant de la progression tumorale sur parenchyme cirrhotique. Avec les progrès des examens d'imagerie, de plus en plus de macronodules sont détectés lors des protocoles de surveillance des patients cirrhotiques. La caractérisation radiologique de ces lésions est souvent difficile, et ils sont parfois biopsiés pour établir un diagnostic de certitude. Des études complémentaires devront être réalisées pour valider l'intérêt éventuel de la recherche de cette altération moléculaire sur matériel biopsique pour évaluer le potentiel de transformation maligne des macronodules.

Il serait également intéressant de déterminer si une autre lésion considérée comme préneoplasique, la dysplasie à petites cellules, peut présenter ce type d'altération moléculaire.

## REFERENCES

1. MacSween RNM, Burt AD, Portmann B, Ferrell LD. MacSween's pathology of the liver. In: 6th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2011. p. 1 online resource (1 v.).
2. Mills SE. Histology for pathologists. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: xi, 1272 p.
3. Bosman FT, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2010: 417 p.
4. Nguyen BN, Flejou JF, Terris B, Belghiti J, Degott C. Focal nodular hyperplasia of the liver: a comprehensive pathologic study of 305 lesions and recognition of new histologic forms. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1441-1454.
5. Rebouissou S, Couchy G, Libbrecht L, Balabaud C, Imbeaud S, Auffray C, Roskams T, et al. The beta-catenin pathway is activated in focal nodular hyperplasia but not in cirrhotic FNH-like nodules. *J Hepatol* 2008;49:61-71.
6. Paradis V, Laurent A, Flejou JF, Vidaud M, Bedossa P. Evidence for the polyclonal nature of focal nodular hyperplasia of the liver by the study of X-chromosome inactivation. *Hepatology* 1997;26:891-895.
7. Rebouissou S, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J. Molecular pathogenesis of focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma. *J Hepatol* 2008;48:163-170.
8. Paradis V, Bieche I, Dargere D, Laurendeau I, Nectoux J, Degott C, Belghiti J, et al. A quantitative gene expression study suggests a role for angiopoietins in focal nodular hyperplasia. *Gastroenterology* 2003;124:651-659.
9. Gouw AS, Zeng W, Buiskool M, Platteel I, van den Heuvel MC, Poppema S, de Jong KP, et al. Molecular characterization of the vascular features of focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma: a role for angiopoietin-1. *Hepatology* 2010;52:540-549.
10. Cadoret A, Ovejero C, Terris B, Souil E, Levy L, Lamers WH, Kitajewski J, et al. New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene* 2002;21:8293-8301.
11. Rooks JB, Ory HW, Ishak KG, Strauss LT, Greenspan JR, Hill AP, Tyler CW, Jr. Epidemiology of hepatocellular adenoma. The role of oral contraceptive use. *JAMA* 1979;242:644-648.
12. Grazioli L, Federle MP, Brancatelli G, Ichikawa T, Olivetti L, Blachar A. Hepatic adenomas: imaging and pathologic findings. *Radiographics* 2001;21:877-892; discussion 892-874.
13. Edmondson HA, Henderson B, Benton B. Liver-cell adenomas associated with use of oral contraceptives. *N Engl J Med* 1976;294:470-472.
14. Reddy KR, Kligerman S, Levi J, Livingstone A, Molina E, Franceschi D, Badalamenti S, et al. Benign and solid tumors of the liver: relationship to sex, age, size of tumors, and outcome. *Am Surg* 2001;67:173-178.
15. Flejou JF, Barge J, Menu Y, Degott C, Bismuth H, Potet F, Benhamou JP. Liver adenomatosis. An entity distinct from liver adenoma? *Gastroenterology* 1985;89:1132-1138.
16. Baum JK, Bookstein JJ, Holtz F, Klein EW. Possible association between benign hepatomas and oral contraceptives. *Lancet* 1973;2:926-929.
17. Christopherson WM, Mays ET, Barrows G. A clinicopathologic study of steroid-related liver tumors. *Am J Surg Pathol* 1977;1:31-41.
18. Lansing PB, McQuitty JT, Bradburn DM. Benign liver tumors: what is their relationship to oral contraceptives? *Am Surg* 1976;42:744-760.
19. Vana J, Murphy GP, Aronoff BL, Baker HW. Primary liver tumors and oral contraceptives. Results of a survey. *Jama* 1977;238:2154-2158.
20. Rooks JB, Ory HW, Ishak KG, Strauss LT, Greenspan JR, Tyler CW, Jr. The association between oral contraception and hepatocellular adenoma--a preliminary report. *Int J Gynaecol Obstet* 1977;15:143-144.
21. Sale GE, Lerner KG. Multiple tumors after androgen therapy. *Arch Pathol Lab Med* 1977;101:600-603.
22. Lesna M, Spencer I, Walker W. Letter: Liver nodules and androgens. *Lancet* 1976;1:1124.

23. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 2001;345:971-980.
24. Fajans SS, Bell GI, Bowden DW, Halter JB, Polonsky KS. Maturity onset diabetes of the young (MODY). *Diabet Med* 1996;13:S90-95.
25. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 1996;384:455-458.
26. Janecke AR, Mayatepek E, Utermann G. Molecular genetics of type 1 glycogen storage disease. *Mol Genet Metab* 2001;73:117-125.
27. Howell RR, Stevenson RE, Ben-Menachem Y, Phyliky RL, Berry DH. Hepatic adenomata with type 1 glycogen storage disease. *JAMA* 1976;236:1481-1484.
28. Bioulac-Sage P, Laumonier H, Laurent C, Zucman-Rossi J, Balabaud C. Hepatocellular adenoma: what is new in 2008. *Hepatol Int* 2008;2:316-321.
29. Laumonier H, Bioulac-Sage P, Laurent C, Zucman-Rossi J, Balabaud C, Trillaud H. Hepatocellular adenomas: magnetic resonance imaging features as a function of molecular pathological classification. *Hepatology* 2008;48:808-818.
30. Nault JC, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J. Hepatocellular benign tumors-from molecular classification to personalized clinical care. *Gastroenterology* 2013;144:888-902.
31. Ronot M, Bahrami S, Calderaro J, Valla DC, Bedossa P, Belghiti J, Vilgrain V, et al. Hepatocellular adenomas: accuracy of magnetic resonance imaging and liver biopsy in subtype classification. *Hepatology* 2011;53:1182-1191.
32. Farges O, Ferreira N, Dokmak S, Belghiti J, Bedossa P, Paradis V. Changing trends in malignant transformation of hepatocellular adenoma. *Gut* 2011;60:85-89.
33. Van der Borght S, Libbrecht L, Katoonizadeh A, Aerts R, Nevens F, Verslype C, Roskams TA. Nuclear beta-catenin staining and absence of steatosis are indicators of hepatocellular adenomas with an increased risk of malignancy. *Histopathology* 2007;51:855-856.
34. Zucman-Rossi J, Jeannot E, Nhieu JT, Scoazec JY, Guettier C, Rebouissou S, Bacq Y, et al. Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. *Hepatology* 2006;43:515-524.
35. Conti JA, Kemeny N. Type Ia glycogenosis associated with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1992;69:1320-1322.
36. Franco LM, Krishnamurthy V, Bali D, Weinstein DA, Arn P, Clary B, Boney A, et al. Hepatocellular carcinoma in glycogen storage disease type Ia: a case series. *J Inherit Metab Dis* 2005;28:153-162.
37. Henderson JT, Richmond J, Sumerling MD. Androgenic-anabolic steroid therapy and hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1973;1:934.
38. Johnson FL, Lerner KG, Siegel M, Feagler JR, Majerus PW, Hartmann JR, Thomas ED. Association of androgenic-anabolic steroid therapy with development of hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1972;2:1273-1276.
39. Buhler H, Pirovino M, Akobiantz A, Altorfer J, Weitzel M, Maranta E, Schmid M. Regression of liver cell adenoma. A follow-up study of three consecutive patients after discontinuation of oral contraceptive use. *Gastroenterology* 1982;82:775-782.
40. Svrcek M, Jeannot E, Arrive L, Poupon R, Fromont G, Flejou JF, Zucman-Rossi J, et al. Regressive liver adenomatosis following androgenic progestin therapy withdrawal: a case report with a 10-year follow-up and a molecular analysis. *Eur J Endocrinol* 2007;156:617-621.
41. Daldrup HE, Reimer P, Rummeny EJ, Fischer H, Bocker W, Peters PE. [The regression of a hepatocellular adenoma after the withdrawal of hormonal contraception]. *Rofo* 1995;163:449-451.
42. Atwell TD, Brandhagen DJ, Charboneau JW, Nagorney DM, Callstrom MR, Farrell MA. Successful treatment of hepatocellular adenoma with percutaneous radiofrequency ablation. *AJR Am J Roentgenol* 2005;184:828-831.
43. van der Sluis FJ, Bosch JL, Terkivatan T, de Man RA, Ijzermans JN, Hunink MG. Hepatocellular adenoma: cost-effectiveness of different treatment strategies. *Radiology* 2009;252:737-746.

44. van Vledder MG, van Aalten SM, Terkivatan T, de Man RA, Leertouwer T, Ijzermans JN. Safety and efficacy of radiofrequency ablation for hepatocellular adenoma. *J Vasc Interv Radiol* 2011;22:787-793.
45. Bioulac-Sage P, Blanc JF, Rebouissou S, Balabaud C, Zucman-Rossi J. Genotype phenotype classification of hepatocellular adenoma. *World J Gastroenterol* 2007;13:2649-2654.
46. Bioulac-Sage P, Laumonier H, Couchy G, Le Bail B, Sa Cunha A, Rullier A, Laurent C, et al. Hepatocellular adenoma management and phenotypic classification: the Bordeaux experience. *Hepatology* 2009;50:481-489.
47. Bluteau O, Jeannot E, Bioulac-Sage P, Marques JM, Blanc JF, Bui H, Beaudoin JC, et al. Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat Genet* 2002;32:312-315.
48. Rebouissou S, Amessou M, Couchy G, Poussin K, Imbeaud S, Pilati C, Izard T, et al. Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature* 2009;457:200-204.
49. He G, Karin M. NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res* 2011;21:159-168.
50. Rebe C, Vegran F, Berger H, Ghiringhelli F. STAT3 activation: A key factor in tumor immunoescape. *JAKSTAT* 2013;2:e23010.
51. Teng Y, Ross JL, Cowell JK. The involvement of JAK-STAT3 in cell motility, invasion, and metastasis. *JAKSTAT* 2014;3:e28086.
52. Nault JC, Fabre M, Couchy G, Pilati C, Jeannot E, Tran Van Nhieu J, Saint-Paul MC, et al. GNAS-activating mutations define a rare subgroup of inflammatory liver tumors characterized by STAT3 activation. *J Hepatol* 2012;56:184-191.
53. Pilati C, Amessou M, Bihl MP, Balabaud C, Nhieu JT, Paradis V, Nault JC, et al. Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas. *J Exp Med* 2011;208:1359-1366.
54. Paradis V, Benzekri A, Dargere D, Bieche I, Laurendeau I, Vilgrain V, Belghiti J, et al. Telangiectatic focal nodular hyperplasia: a variant of hepatocellular adenoma. *Gastroenterology* 2004;126:1323-1329.
55. Bioulac-Sage P, Rebouissou S, Sa Cunha A, Jeannot E, Lepreux S, Blanc JF, Blanche H, et al. Clinical, morphologic, and molecular features defining so-called telangiectatic focal nodular hyperplasias of the liver. *Gastroenterology* 2005;128:1211-1218.
56. Mendel DB, Hansen LP, Graves MK, Conley PB, Crabtree GR. HNF-1 alpha and HNF-1 beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro. *Genes Dev* 1991;5:1042-1056.
57. Mendel DB, Khavari PA, Conley PB, Graves MK, Hansen LP, Admon A, Crabtree GR. Characterization of a cofactor that regulates dimerization of a mammalian homeodomain protein. *Science* 1991;254:1762-1767.
58. Bach I, Galcheva-Gargova Z, Mattei MG, Simon-Chazottes D, Guenet JL, Cereghini S, Yaniv M. Cloning of human hepatic nuclear factor 1 (HNF1) and chromosomal localization of its gene in man and mouse. *Genomics* 1990;8:155-164.
59. Bach I, Mattei MG, Cereghini S, Yaniv M. Two members of an HNF1 homeoprotein family are expressed in human liver. *Nucleic Acids Res* 1991;19:3553-3559.
60. Kyrmizi I, Hatzis P, Katrakili N, Tronche F, Gonzalez FJ, Talianidis I. Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev* 2006;20:2293-2305.
61. Lemaigre FP. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology* 2009;137:62-79.
62. Pelletier L, Rebouissou S, Paris A, Rathahao-Paris E, Perdu E, Bioulac-Sage P, Imbeaud S, et al. Loss of hepatocyte nuclear factor 1alpha function in human hepatocellular adenomas leads to aberrant activation of signaling pathways involved in tumorigenesis. *Hepatology* 2010;51:557-566.
63. Rebouissou S, Imbeaud S, Balabaud C, Boulanger V, Bertrand-Michel J, Terce F, Auffray C, et al. HNF1alpha inactivation promotes lipogenesis in human hepatocellular adenoma

- independently of SREBP-1 and carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP) activation. *J Biol Chem* 2007;282:14437-14446.
64. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011;11:85-95.
  65. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011;11:325-337.
  66. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008;13:472-482.
  67. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;4:891-899.
  68. Gatenby RA, Gillies RJ. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:1358-1366.
  69. Ma R, Zhang W, Tang K, Zhang H, Zhang Y, Li D, Li Y, et al. Switch of glycolysis to gluconeogenesis by dexamethasone for treatment of hepatocarcinoma. *Nat Commun* 2013;4:2508.
  70. Kuhajda FP. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res* 2006;66:5977-5980.
  71. Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* 2000;16:202-208.
  72. Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, Dick JD, Pasternack GR. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6379-6383.
  73. Bioulac-Sage P, Balabaud C, Zucman-Rossi J. Subtype classification of hepatocellular adenoma. *Dig Surg* 2010;27:39-45.
  74. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8847-8851.
  75. Cavard C, Colnot S, Audard V, Benhamouche S, Finzi L, Torre C, Grimber G, et al. Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma pathogenesis and liver physiology. *Future Oncol* 2008;4:647-660.
  76. Monga SP. Role of Wnt/beta-catenin signaling in liver metabolism and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:1021-1029.
  77. Thompson MD, Monga SP. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* 2007;45:1298-1305.
  78. Chen YW, Jeng YM, Yeh SH, Chen PJ. P53 gene and Wnt signaling in benign neoplasms: beta-catenin mutations in hepatic adenoma but not in focal nodular hyperplasia. *Hepatology* 2002;36:927-935.
  79. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, Calderaro J, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2012;44:694-698.
  80. Legoix P, Bluteau O, Bayer J, Perret C, Balabaud C, Belghiti J, Franco D, et al. Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity. *Oncogene* 1999;18:4044-4046.
  81. Terris B, Pineau P, Bregeaud L, Valla D, Belghiti J, Tiollais P, Degott C, et al. Close correlation between beta-catenin gene alterations and nuclear accumulation of the protein in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 1999;18:6583-6588.
  82. Chen Y, Wang L, Xu H, Liu X, Zhao Y. Exome capture sequencing reveals new insights into hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma at the early stage of tumorigenesis. *Oncol Rep* 2013;30:1906-1912.
  83. Cleary SP, Jeck WR, Zhao X, Chen K, Selitsky SR, Savich GL, Tan TX, et al. Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing. *Hepatology* 2013;58:1693-1702.
  84. Huang J, Deng Q, Wang Q, Li KY, Dai JH, Li N, Zhu ZD, et al. Exome sequencing of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2012;44:1117-1121.

85. Reznik Y, Dao T, Coutant R, Chiche L, Jeannot E, Clauin S, Rousselot P, et al. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene inactivation: cosegregation between liver adenomatosis and diabetes phenotypes in two maturity-onset diabetes of the young (MODY)3 families. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1476-1480.
86. Jeannot E, Poussin K, Chiche L, Bacq Y, Sturm N, Scoazec JY, Buffet C, et al. Association of CYP1B1 germ line mutations with hepatocyte nuclear factor 1alpha-mutated hepatocellular adenoma. *Cancer Res* 2007;67:2611-2616.
87. Lietman SA, Schwindinger WF, Levine MA. Genetic and molecular aspects of McCune-Albright syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev* 2007;4 Suppl 4:380-385.
88. Lietman SA, Levine MA. Fibrous dysplasia. *Pediatr Endocrinol Rev* 2013;10 Suppl 2:389-396.
89. Froissart R, Piraud M, Boudjemline AM, Vianey-Saban C, Petit F, Hubert-Buron A, Eberschweiler PT, et al. Glucose-6-phosphatase deficiency. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:27.
90. Rake JP, Visser G, Labrune P, Leonard JV, Ullrich K, Smit GP. Glycogen storage disease type I: diagnosis, management, clinical course and outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSD I). *Eur J Pediatr* 2002;161 Suppl 1:S20-34.
91. Lee PJ. Glycogen storage disease type I: pathophysiology of liver adenomas. *Eur J Pediatr* 2002;161 Suppl 1:S46-49.
92. Limmer J, Fleig WE, Leupold D, Bittner R, Ditschuneit H, Beger HG. Hepatocellular carcinoma in type I glycogen storage disease. *Hepatology* 1988;8:531-537.
93. Rosh JR, Collins J, Groisman GM, Schwersenz AH, Schwartz M, Miller CM, LeLeiko NS. Management of hepatic adenoma in glycogen storage disease Ia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;20:225-228.
94. Sakellariou S, Al-Hussaini H, Scalori A, Samyn M, Heaton N, Portmann B, Tobal K, et al. Hepatocellular adenoma in glycogen storage disorder type I: a clinicopathological and molecular study. *Histopathology* 2012;60:E58-65.
95. Wang DQ, Fiske LM, Carreras CT, Weinstein DA. Natural history of hepatocellular adenoma formation in glycogen storage disease type I. *J Pediatr* 2011;159:442-446.
96. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557-2576.
97. International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. The International Consensus Group for Hepatocellular N. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 2009;49:658-664.
98. Park YN. Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:704-715.
99. Kim H, Oh BK, Roncalli M, Park C, Yoon SM, Yoo JE, Park YN. Large liver cell change in hepatitis B virus-related liver cirrhosis. *Hepatology* 2009;50:752-762.
100. Lee RG, Tsamandas AC, Demetris AJ. Large cell change (liver cell dysplasia) and hepatocellular carcinoma in cirrhosis: matched case-control study, pathological analysis, and pathogenetic hypothesis. *Hepatology* 1997;26:1415-1422.
101. Marchio A, Terris B, Meddeb M, Pineau P, Duverger A, Tiollais P, Bernheim A, et al. Chromosomal abnormalities in liver cell dysplasia detected by comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol* 2001;54:270-274.
102. Watanabe S, Okita K, Harada T, Kodama T, Numa Y, Takemoto T, Takahashi T. Morphologic studies of the liver cell dysplasia. *Cancer* 1983;51:2197-2205.
103. Borzio M, Bruno S, Roncalli M, Mels GC, Ramella G, Borzio F, Leandro G, et al. Liver cell dysplasia is a major risk factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Gastroenterology* 1995;108:812-817.
104. Koo JS, Kim H, Park BK, Ahn SH, Han KH, Chon CY, Park C, et al. Predictive value of liver cell dysplasia for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:738-743.
105. Libbrecht L, Craninx M, Nevens F, Desmet V, Roskams T. Predictive value of liver cell dysplasia for development of hepatocellular carcinoma in patients with non-cirrhotic and cirrhotic chronic viral hepatitis. *Histopathology* 2001;39:66-73.



106. Ganne-Carrie N, Chastang C, Chapel F, Munz C, Pateron D, Sibony M, Deny P, et al. Predictive score for the development of hepatocellular carcinoma and additional value of liver large cell dysplasia in Western patients with cirrhosis. *Hepatology* 1996;23:1112-1118.
107. Plentz RR, Park YN, Lechel A, Kim H, Nellesen F, Langkopf BH, Wilkens L, et al. Telomere shortening and inactivation of cell cycle checkpoints characterize human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2007;45:968-976.
108. Kobayashi M, Ikeda K, Hosaka T, Sezaki H, Someya T, Akuta N, Suzuki F, et al. Dysplastic nodules frequently develop into hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral hepatitis and cirrhosis. *Cancer* 2006;106:636-647.
109. Borzio M, Fargion S, Borzio F, Fracanzani AL, Croce AM, Stroffolini T, Oldani S, et al. Impact of large regenerative, low grade and high grade dysplastic nodules in hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol* 2003;39:208-214.
110. Di Tommaso L, Franchi G, Park YN, Fiamengo B, Destro A, Morengi E, Montorsi M, et al. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. *Hepatology* 2007;45:725-734.
111. Audard V, Grimber G, Elie C, Radenen B, Audebourg A, Letourneur F, Soubrane O, et al. Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying beta-catenin mutations. *J Pathol* 2007;212:345-352.
112. Filmus J, Selleck SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest* 2001;108:497-501.
113. Farooq M, Hwang SY, Park MK, Kim JC, Kim MK, Sung YK. Blocking endogenous glypican-3 expression releases Hep 3B cells from G1 arrest. *Mol Cells* 2003;15:356-360.
114. Huang N, Lin J, Ruan J, Su N, Qing R, Liu F, He B, et al. MiR-219-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting glypican-3. *FEBS Lett* 2012;586:884-891.
115. Liu S, Li Y, Chen W, Zheng P, Liu T, He W, Zhang J, et al. Silencing glypican-3 expression induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;419:656-661.
116. Sun CK, Chua MS, He J, So SK. Suppression of glypican 3 inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells through up-regulation of TGF-beta2. *Neoplasia* 2011;13:735-747.
117. Libbrecht L, Severi T, Cassiman D, Vander Borgh S, Pirenne J, Nevens F, Verslype C, et al. Glypican-3 expression distinguishes small hepatocellular carcinomas from cirrhosis, dysplastic nodules, and focal nodular hyperplasia-like nodules. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1405-1411.
118. Wang XY, Degos F, Dubois S, Tessitore S, Allegretta M, Guttman RD, Jothy S, et al. Glypican-3 expression in hepatocellular tumors: diagnostic value for preneoplastic lesions and hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol* 2006;37:1435-1441.
119. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis* 2013;34:1181-1188.
120. Rerole AL, Jago G, Garrido C. Hsp70: anti-apoptotic and tumorigenic protein. *Methods Mol Biol* 2011;787:205-230.
121. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996;381:571-579.
122. Maggioni M, Coggi G, Cassani B, Bianchi P, Romagnoli S, Mandelli A, Borzio M, et al. Molecular changes in hepatocellular dysplastic nodules on microdissected liver biopsies. *Hepatology* 2000;32:942-946.
123. Roncalli M, Bianchi P, Grimaldi GC, Ricci D, Laghi L, Maggioni M, Opocher E, et al. Fractional allelic loss in non-end-stage cirrhosis: correlations with hepatocellular carcinoma development during follow-up. *Hepatology* 2000;31:846-850.
124. Wong N, Lai P, Lee SW, Fan S, Pang E, Liew CT, Sheng Z, et al. Assessment of genetic changes in hepatocellular carcinoma by comparative genomic hybridization analysis: relationship to disease stage, tumor size, and cirrhosis. *Am J Pathol* 1999;154:37-43.
125. Yeh SH, Chen PJ, Shau WY, Chen YW, Lee PH, Chen JT, Chen DS. Chromosomal allelic imbalance evolving from liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2001;121:699-709.
126. Lee YH, Oh BK, Yoo JE, Yoon SM, Choi J, Kim KS, Park YN. Chromosomal instability, telomere shortening, and inactivation of p21(WAF1/CIP1) in dysplastic nodules of hepatitis B virus-associated multistep hepatocarcinogenesis. *Mod Pathol* 2009;22:1121-1131.

127. Sun M, Eshleman JR, Ferrell LD, Jacobs G, Sudilovsky EC, Tuthill R, Hussein MR, et al. An early lesion in hepatic carcinogenesis: loss of heterozygosity in human cirrhotic livers and dysplastic nodules at the 1p36-p34 region. *Hepatology* 2001;33:1415-1424.
128. Tornillo L, Carafa V, Sauter G, Moch H, Minola E, Gambacorta M, Vecchione R, et al. Chromosomal alterations in hepatocellular nodules by comparative genomic hybridization: high-grade dysplastic nodules represent early stages of hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 2002;82:547-553.
129. Oh BK, Jo Chae K, Park C, Kim K, Jung Lee W, Han KH, Nyun Park Y. Telomere shortening and telomerase reactivation in dysplastic nodules of human hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2003;39:786-792.
130. Balsara BR, Pei J, De Rienzo A, Simon D, Tosolini A, Lu YY, Shen FM, et al. Human hepatocellular carcinoma is characterized by a highly consistent pattern of genomic imbalances, including frequent loss of 16q23.1-24.1. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:245-253.
131. Boige V, Laurent-Puig P, Fouchet P, Flejou JF, Monges G, Bedossa P, Bioulac-Sage P, et al. Concerted nonsyntenic allelic losses in hyperploid hepatocellular carcinoma as determined by a high-resolution allelotype. *Cancer Res* 1997;57:1986-1990.
132. Fujimori M, Tokino T, Hino O, Kitagawa T, Imamura T, Okamoto E, Mitsunobu M, et al. Allelotype study of primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1991;51:89-93.
133. Fujimoto Y, Hampton LL, Wirth PJ, Wang NJ, Xie JP, Thorgeirsson SS. Alterations of tumor suppressor genes and allelic losses in human hepatocellular carcinomas in China. *Cancer Res* 1994;54:281-285.
134. Guan XY, Fang Y, Sham J, Kwong D, Zhang Y, Liang Q, Li H, et al. Recurrent chromosome alterations in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:110.
135. Hsu HC, Peng SY, Lai PL, Sheu JC, Chen DS, Lin LI, Slagle BL, et al. Allelotype and loss of heterozygosity of p53 in primary and recurrent hepatocellular carcinomas. A study of 150 patients. *Cancer* 1994;73:42-47.
136. Marchio A, Meddeb M, Pineau P, Danglot G, Tiollais P, Bernheim A, Dejean A. Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;18:59-65.
137. Nagai H, Pineau P, Tiollais P, Buendia MA, Dejean A. Comprehensive allelotyping of human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1997;14:2927-2933.
138. Pineau P, Marchio A, Battiston C, Cordina E, Russo A, Terris B, Qin LX, et al. Chromosome instability in human hepatocellular carcinoma depends on p53 status and aflatoxin exposure. *Mutat Res* 2008;653:6-13.
139. Sheu JC, Lin YW, Chou HC, Huang GT, Lee HS, Lin YH, Huang SY, et al. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Br J Cancer* 1999;80:468-476.
140. Simon D, Knowles BB, Weith A. Abnormalities of chromosome 1 and loss of heterozygosity on 1p in primary hepatomas. *Oncogene* 1991;6:765-770.
141. Takahashi K, Kudo J, Ishibashi H, Hirata Y, Niho Y. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 22 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1993;17:794-799.
142. Yakicier MC, Legoix P, Vaury C, Gressin L, Tubacher E, Capron F, Bayer J, et al. Identification of homozygous deletions at chromosome 16q23 in aflatoxin B1 exposed hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2001;20:5232-5238.
143. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, Monges G, et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2001;120:1763-1773.
144. Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, Herault A, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 2007;45:42-52.
145. Zhang YJ, Jiang W, Chen CJ, Lee CS, Kahn SM, Santella RM, Weinstein IB. Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196:1010-1016.

146. Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, Kita R, Sando T, Furukawa M, Amenomori M, et al. Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:3107-3110.
147. Ahn SM, Jang SJ, Shim JH, Kim D, Hong SM, Sung CO, Baek D, et al. A genomic portrait of resectable hepatocellular carcinomas: Implications of RB1 and FGF19 aberrations for patient stratification. *Hepatology* 2014.
148. Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguéz B, LeBlanc AC, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:6779-6788.
149. Renard CA, Labalette C, Armengol C, Cougot D, Wei Y, Cairo S, Pineau P, et al. Tbx3 is a downstream target of the Wnt/beta-catenin pathway and a critical mediator of beta-catenin survival functions in liver cancer. *Cancer Res* 2007;67:901-910.
150. Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C, Boyault S, Grimber G, Balabaud C, Cunha AS, et al. Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2007;26:774-780.
151. Guan B, Wang TL, Shih Ie M. ARID1A, a factor that promotes formation of SWI/SNF-mediated chromatin remodeling, is a tumor suppressor in gynecologic cancers. *Cancer Res* 2011;71:6718-6727.
152. Cho H, Kim JS, Chung H, Perry C, Lee H, Kim JH. Loss of ARID1A/BAF250a expression is linked to tumor progression and adverse prognosis in cervical cancer. *Hum Pathol* 2013;44:1365-1374.
153. Lichner Z, Scorilas A, White NM, Girgis AH, Rotstein L, Wiegand KC, Latif A, et al. The chromatin remodeling gene ARID1A is a new prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2013;182:1163-1170.
154. Wiegand KC, Sy K, Kalloger SE, Li-Chang H, Woods R, Kumar A, Streutker CJ, et al. ARID1A/BAF250a as a prognostic marker for gastric carcinoma: a study of 2 cohorts. *Hum Pathol* 2014;45:1258-1268.
155. Balbas-Martinez C, Rodriguez-Pinilla M, Casanova A, Dominguez O, Pisano DG, Gomez G, Lloreta J, et al. ARID1A alterations are associated with FGFR3-wild type, poor-prognosis, urothelial bladder tumors. *PLoS One* 2013;8:e62483.
156. Wang DD, Chen YB, Pan K, Wang W, Chen SP, Chen JG, Zhao JJ, et al. Decreased expression of the ARID1A gene is associated with poor prognosis in primary gastric cancer. *PLoS One* 2012;7:e40364.
157. Wiegand KC, Hennessy BT, Leung S, Wang Y, Ju Z, McGahren M, Kalloger SE, et al. A functional proteogenomic analysis of endometrioid and clear cell carcinomas using reverse phase protein array and mutation analysis: protein expression is histotype-specific and loss of ARID1A/BAF250a is associated with AKT phosphorylation. *BMC Cancer* 2014;14:120.
158. Bosse T, ter Haar NT, Seeber LM, v Diest PJ, Hes FJ, Vasen HF, Nout RA, et al. Loss of ARID1A expression and its relationship with PI3K-Akt pathway alterations, TP53 and microsatellite instability in endometrial cancer. *Mod Pathol* 2013;26:1525-1535.
159. Samartzis EP, Noske A, Dedes KJ, Fink D, Imesch P. ARID1A mutations and PI3K/AKT pathway alterations in endometriosis and endometriosis-associated ovarian carcinomas. *Int J Mol Sci* 2013;14:18824-18849.
160. Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, Aoki M, et al. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet* 2012;44:760-764.
161. Uruno A, Motohashi H. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. *Nitric Oxide* 2011;25:153-160.
162. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:313-322.
163. Homma S, Ishii Y, Morishima Y, Yamadori T, Matsuno Y, Haraguchi N, Kikuchi N, et al. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:3423-3432.

164. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M, et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 2012;22:66-79.
165. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, Mangal D, et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 2011;475:106-109.
166. Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, Laurent A, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun* 2013;4:2218.
167. Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2008;8:167-179.
168. Harley CB, Kim NW, Prowse KR, Weinrich SL, Hirsch KS, West MD, Bacchetti S, et al. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994;59:307-315.
169. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 2013;339:959-961.
170. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* 2013;339:957-959.
171. Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, Mikaelyan A, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med* 2006;12:410-416.
172. Villanueva A, Hoshida Y, Battiston C, Tovar V, Sia D, Alsinet C, Cornella H, et al. Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011;140:1501-1512 e1502.
173. Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M, Chan JA, Brunet JP, Chiang DY, Villanueva A, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009;69:7385-7392.
174. Kudo M. Hepatocellular adenoma in type Ia glycogen storage disease. *J Gastroenterol* 2001;36:65-66.
175. Pilati C, Letouze E, Nault JC, Imbeaud S, Boulai A, Calderaro J, Poussin K, et al. Genomic profiling of hepatocellular adenomas reveals recurrent FRK-activating mutations and the mechanisms of malignant transformation. *Cancer Cell* 2014;25:428-441.
176. Paradis V, Champault A, Ronot M, Deschamps L, Valla DC, Vidaud D, Vilgrain V, et al. Telangiectatic adenoma: an entity associated with increased body mass index and inflammation. *Hepatology* 2007;46:140-146.
177. Beyoglu D, Imbeaud S, Maurhofer O, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J, Dufour JF, Idle JR. Tissue metabolomics of hepatocellular carcinoma: tumor energy metabolism and the role of transcriptomic classification. *Hepatology* 2013;58:229-238.
178. Huang Q, Tan Y, Yin P, Ye G, Gao P, Lu X, Wang H, et al. Metabolic characterization of hepatocellular carcinoma using nontargeted tissue metabolomics. *Cancer Res* 2013;73:4992-5002.
179. Wang B, Hsu SH, Frankel W, Ghoshal K, Jacob ST. Stat3-mediated activation of microRNA-23a suppresses gluconeogenesis in hepatocellular carcinoma by down-regulating glucose-6-phosphatase and peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha. *Hepatology* 2012;56:186-197.
180. Kim K, Kim KH, Kim HH, Cheong J. Hepatitis B virus X protein induces lipogenic transcription factor SREBP1 and fatty acid synthase through the activation of nuclear receptor LXRalpha. *Biochem J* 2008;416:219-230.
181. Yin HQ, Kim M, Kim JH, Kong G, Kang KS, Kim HL, Yoon BI, et al. Differential gene expression and lipid metabolism in fatty liver induced by acute ethanol treatment in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;223:225-233.
182. Zhang H, Li H, Yang Y, Li S, Ren H, Zhang D, Hu H. Differential regulation of host genes including hepatic fatty acid synthase in HBV-transgenic mice. *J Proteome Res* 2013;12:2967-2979.

183. Calvisi DF, Wang C, Ho C, Ladu S, Lee SA, Mattu S, Destefanis G, et al. Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011;140:1071-1083.
184. Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Chou JY. A molecular link between the common phenotypes of type 1 glycogen storage disease and HNF1alpha-null mice. *J Biol Chem* 2001;276:7963-7967.
185. Lee YM, Jun HS, Pan CJ, Lin SR, Wilson LH, Mansfield BC, Chou JY. Prevention of hepatocellular adenoma and correction of metabolic abnormalities in murine glycogen storage disease type Ia by gene therapy. *Hepatology* 2012;56:1719-1729.
186. Iijima H, Moriwaki Y, Yamamoto T, Takahashi S, Nishigami T, Hada T. Spontaneous regression of hepatic adenoma in a patient with glycogen storage disease type I after hemodialysis: ultrasonographic and CT findings. *Intern Med* 2001;40:891-895.
187. Parker P, Burr I, Slonim A, Ghishan FK, Greene H. Regression of hepatic adenomas in type Ia glycogen storage disease with dietary therapy. *Gastroenterology* 1981;81:534-536.
188. Mutel E, Abdul-Wahed A, Ramamonjisoa N, Stefanutti A, Houberton I, Cavassila S, Pilleul F, et al. Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas. *J Hepatol* 2011;54:529-537.
189. Wang N, Liu T, Sofiadis A, Juhlin CC, Zedenius J, Hoog A, Larsson C, et al. TERT promoter mutation as an early genetic event activating telomerase in follicular thyroid adenoma (FTA) and atypical FTA. *Cancer* 2014.
190. Kinde I, Munari E, Faraj SF, Hruban RH, Schoenberg M, Bivalacqua T, Allaf M, et al. TERT promoter mutations occur early in urothelial neoplasia and are biomarkers of early disease and disease recurrence in urine. *Cancer Res* 2013;73:7162-7167.
191. Allory Y, Beukers W, Sagrera A, Flandez M, Marques M, Marquez M, van der Keur KA, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: high frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. *Eur Urol* 2014;65:360-366.
192. Toshikuni N, Nouse K, Higashi T, Nakatsukasa H, Onishi T, Kaneyoshi T, Kobayashi Y, et al. Expression of telomerase-associated protein 1 and telomerase reverse transcriptase in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2000;82:833-837.
193. Ferlicot S, Paradis V, Dargere D, Monges G, Bedossa P. Detection of telomerase in hepatocellular carcinomas using a PCR ELISA assay: comparison with hTR expression. *J Clin Pathol* 1999;52:725-729.
194. Takahashi S, Kitamoto M, Takaishi H, Aikata H, Kawakami Y, Nakanishi T, Shimamoto F, et al. Expression of telomerase component genes in hepatocellular carcinomas. *Eur J Cancer* 2000;36:496-502.
195. Nagao K, Tomimatsu M, Endo H, Hisatomi H, Hikiji K. Telomerase reverse transcriptase mRNA expression and telomerase activity in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 1999;34:83-87.
196. Oh BK, Kim H, Park YN, Yoo JE, Choi J, Kim KS, Lee JJ, et al. High telomerase activity and long telomeres in advanced hepatocellular carcinomas with poor prognosis. *Lab Invest* 2008;88:144-152.
197. Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik D, Mugnier C, Lagorce D, et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* 2003;22:3911-3916.
198. Chen YL, Jeng YM, Chang CN, Lee HJ, Hsu HC, Lai PL, Yuan RH. TERT promoter mutation in resectable hepatocellular carcinomas: a strong association with hepatitis C infection and absence of hepatitis B infection. *Int J Surg* 2014;12:659-665.
199. Wood LD, Heaphy CM, Daniel HD, Naini BV, Lassman CR, Arroyo MR, Kamel IR, et al. Chromophobe hepatocellular carcinoma with abrupt anaplasia: a proposal for a new subtype of hepatocellular carcinoma with unique morphological and molecular features. *Mod Pathol* 2013;26:1586-1593.
200. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, Bettgowda C, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* 2011;333:425.

201. Asai A, Oshima Y, Yamamoto Y, Uochi TA, Kusaka H, Akinaga S, Yamashita Y, et al. A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent. *Cancer Res* 2003;63:3931-3939.
202. Ruden M, Puri N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treat Rev* 2013;39:444-456.
203. Djojosebroto MW, Chin AC, Go N, Schaetzlein S, Manns MP, Gryaznov S, Harley CB, et al. Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma. *Hepatology* 2005;42:1127-1136.
204. Shay JW, Reddel RR, Wright WE. Cancer. Cancer and telomeres--an ALternative to telomerase. *Science* 2012;336:1388-1390.