

Cancers du foie et virus des hépatites B et C

De nombreuses études épidémiologiques ont montré une association claire entre une infection par le virus de l'hépatite B et le cancer primitif du foie. La découverte récente du virus de l'hépatite C a permis également de montrer une association entre l'infection virale chronique et le développement des tumeurs. D'autres facteurs étiologiques sont importants dans la carcinogénèse hépatique. La cirrhose hépatique elle-même, quelle qu'en soit l'étiologie, est un facteur de risque pour le développement des tumeurs. De plus le rôle de carcinogènes chimiques comme l'aflatoxine B1 est bien connu. Dans ce chapitre nous envisagerons les mécanismes qui pourraient intervenir dans la carcinogénèse hépatique liée aux infections par les virus des hépatites B et C.

Cancers du foie et virus de l'hépatite B

Cancers du foie chez des sujets antigène HBs positif

Une infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB) est un des facteurs de risque essentiel pour le développement d'un cancer primitif du foie chez l'homme. Plusieurs mécanismes pourraient expliquer cette observation.

Rôle de la protéine X

La phase ouverte de lecture, appelée X, code pour une protéine de 154 acides aminés. Son analyse montre une utilisation des codons semblable à celle utilisée dans des cellules eucaryotes, suggérant une analogie entre le gène X et des gènes cellulaires transduits par des rétrovirus. Le gène paraît aussi avoir un rôle important dans la réplication virale.

L'utilisation de différents vecteurs d'expression a permis de synthétiser la protéine et de mettre au point des tests sérologiques pour détecter des anticorps anti X chez des sujets infectés. Bien que des études initiales aient suggéré une association préférentielle entre anticorps anti X et tumeurs, il est clair actuellement que des anticorps anti X sont

détectés aussi bien au stade d'infection aiguë qu'au stade d'infection chronique bien avant le développement éventuel d'un cancer. En fait certains arguments suggèrent une relation entre la fréquence de détection des anticorps anti X et l'existence d'une multiplication virale B persistante.

Plusieurs arguments suggèrent l'implication de la protéine X dans la transformation hépatocytaire

– Des souris transgéniques ont été réalisées contenant le seul gène X du VHB sous le contrôle de son propre promoteur. Dans cette étude, des hépatocarcinomes ont été observés qui n'étaient pas associés à des lésions d'hépatite chronique. Ce résultat suggère fortement l'implication directe de la protéine dans la genèse des tumeurs mais il faut noter que, pour l'instant, plusieurs autres groupes n'ont pas réussi à reproduire ce type de résultat. Une explication partielle est l'utilisation du propre promoteur du gène X par rapport à d'autres études où des promoteurs hétérologues avaient été utilisés, conduisant possiblement à un niveau d'expression trop fort de la protéine

– Une deuxième série d'expériences est intéressante à discuter : chez des souris transgénisées avec l'antigène T de SV40 on peut observer le développement d'hépatocarcinomes. La mise en culture des hépatocytes de souris au moment de la naissance a permis d'obtenir dans ce modèle des lignées hépatocytaires immortalisées et non transformées (FMH202). La transfection de l'ADN du virus B dans ces lignées conduit à l'apparition de foyers de cellules transformées. L'analyse des expressions dans ces cellules des ARN et des protéines VHB montrent que c'est la protéine X qui est majoritairement exprimée au stade de transformation.

De plus la transfection de plasmides contenant la région X permet également d'obtenir une transformation dans certaines expériences.

Des expériences semblables ont été réalisées dans les cellules NIH 3T3 où la transfection de plasmides conduisant à un taux d'expression élevé de X peut induire des phénomènes de transformation cellulaire.

Des résultats récents mais non publiés suggèrent enfin une coopération entre X et l'oncogène c-ha-ras dans la transformation.

– Un argument *in vivo* a été rapporté récemment : des études en immunohistochimie suggèrent que la protéine X est détectée dans les cellules tumorales de 80% des cancers du foie survenant chez des sujets antigène HBs positif. Ce chiffre est largement supérieur à ceux observés pour l'antigène HBs (20% environ) et l'antigène HBc (qui n'est que très

rarement détecté). Ces résultats reposent cependant essentiellement sur la spécificité des anticorps X et devront être reproduits avant de pouvoir être définitivement acceptés.

La localisation de la protéine X dans une cellule infectée reste discutée : cytoplasmique dans certaines études, elle est au contraire mise en évidence dans les noyaux dans d'autres travaux. En fait la protéine X n'a clairement été détectée dans le noyau que dans certaines lignées transfectées avec l'ADN viral.

Mécanismes d'action de la protéine X

Un grand nombre d'expériences *in vitro* ont montré que la protéine X peut jouer un rôle de transactivation sur de nombreux promoteurs hétérologues ou homologues.

Parmi les promoteurs hétérologues on peut citer des ADN viraux (LTR du HIV1, promoteurs du SV40), des promoteurs cellulaires (gènes codant pour l'interféron β , les gènes HLA DR), les oncogènes *c-fos* et *c-myc*.

La protéine X agit également en stimulant la transcription des promoteurs viraux du VHB, en association aux séquences enhancer.

La protéine X n'a pas de séquence de liaison à l'ADN et semble agir essentiellement indirectement par son effet sur des activateurs transcriptionnels comme API, APII, CREB, ATF2, NF-K13.

D'autres auteurs ont proposé que la protéine X aurait une activité sérine thréonine kinase (activité qui pourrait intervenir dans la phosphorylation de certains activateurs transcriptionnels). Mais ces expériences n'ont pas actuellement été confirmées.

Enfin certains auteurs ont suggéré, en se basant sur des comparaisons de séquences, que la protéine X se rapprocherait en fait d'inhibiteurs de sérine protéase.

Il n'est pas actuellement démontré que ces phénomènes de transactivation ou ces éventuelles activités enzymatiques rendent compte des effets observés *in vivo* et *in vitro* pour la protéine X.

Au total, un certain nombre d'arguments sont compatibles avec le rôle de la protéine X dans la transformation cellulaire. L'analyse des séquences intégrées montre fréquemment des structures compatibles avec l'expression de protéines X tronquées en C terminal et fusionnées aux séquences cellulaires adjacentes, gardant potentiellement leur activité de transactivation. Enfin la protéine X est exprimée dès les stades précoces de l'infection virale à partir de séquences d'ADN libres. Il est donc

possible que cette protéine représente un des mécanismes fréquemment mis en cause dans la transformation hépatocytaire liée à l'infection par le virus B.

Analyse des séquences d'ADN du virus de l'hépatite B identifiées dans les tissus tumoraux ou non tumoraux de sujets infectés

Etat de l'ADN du virus de l'hépatite B dans les hépatocytes infectés

L'utilisation de la technique de Southern blot avec différents enzymes de restriction, ne coupant pas dans la majorité des génomes viraux ou ne coupant que dans un ou deux sites, a permis de définir plusieurs situations différentes.

Intégration de l'ADN viral dans l'ADN chromosomique

Cette situation a été initialement détectée dans le tissu tumoral de sujets avec cancer du foie. Les profils observés sont compatibles avec une prolifération mono ou oligoclonale des cellules contenant ces séquences d'ADN du virus B. Suivant les cas il existe un ou, plus souvent, plusieurs sites d'intégration. L'intégration peut précéder le développement apparent de la tumeur et des séquences intégrées ont été clairement détectées chez des sujets avec infection chronique sans tumeur évidente (incluant des enfants). De plus, dans notre expérience, des séquences d'ADN viral intégrées peuvent être détectées au stade aigu de l'infection chez des sujets ayant une hépatite aiguë sévère ou fulminante B. L'intégration de l'ADN du virus B peut également être observée après infection de cultures primaires d'hépatocytes foetaux humains. Il est possible que l'intégration ne se produise qu'en cas de régénération importante telle qu'on la voit surtout dans les nécroses hépatiques sévères et dans certaines hépatites aiguës chez l'homme.

La comparaison des profils obtenus en utilisant des enzymes ne coupant pas dans le génome viral (comme Hind III) ou coupant une ou deux fois dans le génome viral (comme Eco R1 ou Bam H1) permet de montrer deux types d'intégrations : intégration "clonale" que l'on vient de décrire dans les tumeurs et intégration apparemment à de nombreux sites sans que l'on puisse clairement distinguer l'émergence d'un clone contenant les séquences d'ADN viral intégrées. Cette situation est plus généralement observée chez des sujets avec hépatites chroniques sans cirrhose.

L'ensemble des résultats fait donc suggérer l'hypothèse suivante : l'intégration pourrait se faire soit au stade aigu de l'infection virale soit au début du portage chronique dans un petit nombre d'hépatocytes comme une conséquence de la régénération et donc de la réplication de l'ADN cellulaire. La nécrose liée au développement d'une hépatite chronique active et/ou d'autres cofacteurs peuvent assurer une promotion de la carcinogénèse en favorisant la prolifération de certains clones contenant les séquences d'ADN virales.

Ce schéma a donc amené à tester l'hypothèse suivant laquelle l'intégration de l'ADN viral pourrait conférer un avantage sélectif aux cellules qui les contiennent.

Séquences d'ADN du virus B libres

Elles sont fréquemment observées, surtout à la phase de début de l'infection virale. Là encore les études en Southern blot permettent de distinguer trois situations différentes :

- Réplication complète de l'ADN viral : le southern blot détecte l'ensemble des intermédiaires de réplication.

- Présence d'une bande unique correspondant à un ADN viral de taille complète, monomérique, présent soit sous une forme circulaire ouverte, soit sous une forme linéaire : cette forme d'ADN viral est généralement détectée à la phase de fin de réplication virale (fin d'une hépatite aiguë ou hépatite chronique à un stade d'arrêt de la multiplication virale).

- Formes de haut poids moléculaire correspondant à des structures oligomériques libres dont les implications ne sont pas claires. De telles structures ont également été décrites chez des marmottes chroniquement infectées. Chez l'homme elles ont été observées dans notre laboratoire essentiellement chez des sujets atteints d'hépatite aiguë .

Chez certains patients on peut détecter l'association de formes libres et de formes intégrées dans le même échantillon, bien que techniquement cette association rende plus difficile la détection des séquences intégrées (surtout en l'absence de prolifération clonale des cellules infectées).

Au stade de cancer du foie, la multiplication virale a généralement cessé dans les tumeurs observées en Afrique, en Europe et en Amérique. En Asie du Sud-Est, on peut observer une persistance de la multiplication virale au stade de cancer.

Des études combinant immunohistochimie et hybridation in situ ont permis de montrer que, avant le développement de la tumeur, il semble exister deux populations d'hépatocytes infectés : certains expriment

l'antigène de surface du virus et n'ont pas de multiplication virale détectable ; d'autres expriment l'antigène de capsid HBC (localisé dans les noyaux des hépatocytes) et présentent une accumulation d'ARN compatibles avec une multiplication virale. Les cellules exprimant seulement l'antigène HBs correspondent aux cellules dites en "verre dépoli" décrites chez des porteurs chroniques du virus B et dont l'aspect morphologique particulier correspond à une accumulation importante d'antigène HBs dans le réticulum endoplasmique granuleux ; ces cellules pourraient échapper à la nécrose immunitaire (l'antigène HBC étant une cible particulièrement importante). La prolifération du réticulum endoplasmique pourrait également être associée à une modification des activités du cytochrome P450 et donc du métabolisme de certains toxiques et carcinogènes chimiques.

Structure des séquences d'ADN viral (VHB) intégrées

Séquences d'ADN viral

Les structures observées diffèrent d'une tumeur à l'autre mais on peut retrouver certaines structures semblables : il existe en effet une zone du génome viral qui semble préférentiellement utilisée pour l'intégration : la région des extrémités cohésives de l'ADN viral et des séquences directement répétées DR1 et DR2 (également impliquées dans l'initiation de synthèse de l'ADN). Dans une étude portant rétrospectivement sur la structure de 17 clones la moitié des intégrations ont été en effet identifiées dans la région des extrémités cohésives à proximité des séquences DR1 et DR2. Quand une duplication de l'ADN viral est observée les jonctions "virus-virus" sont également fréquemment identifiées dans cette région des extrémités cohésives.

Des formes complètes, sans délétion d'ADN viral, ont été décrites dans seulement 3 sur les 23 tumeurs ou lignées cellulaires rétrospectivement analysées ; c'est donc un événement rare. Le plus souvent des réarrangements complexes sont identifiés : délétions, insertions, duplications. Ces réarrangements ne sont pas seulement identifiés dans des tissus tumoraux mais également dans le foie de sujet avec hépatite chronique sans cancer apparent. La région codant pour l'antigène de surface (gène S) est cependant fréquemment conservée et dans quelques cas son intégrité a été confirmée par l'expression de l'antigène HBs obtenu après transfection des clones contenant les séquences d'ADN viral intégrées. Au contraire le gène codant pour la nucléocapside (gène PrC/C) est fréquemment délété. Enfin la phase ouverte de lecture X est

également fréquemment partiellement délétée du fait de l'insertion du génome viral dans les extrémités cohésives. Une structure fréquemment détectée comportera donc une insertion dans la régions des extrémités cohésives d'un côté, l'autre jonction étant située entre le gène C et le gène PrÉS.

Une autre situation relativement fréquente est la conservation d'une phase ouverte de lecture PrÉS2/S, délétée dans sa région 3'. Comme on le reverra, des protéines PrÉS2/S tronquées en C-terminal pourraient avoir un rôle de transactivation important dans la transformation cellulaire. Une récente communication personnelle de Caselman indique que de telles séquences (PrÉS2/S tronquée en 3') sont détectables dans 12 sur 53 clones analysés.

De différentes études, il ressort que les séquences situées dans les régions 5' des gènes PrÉS pourraient permettre une recombinaison assez fréquente avec le génome cellulaire. Il est également frappant qu'aucune des structures d'ADN VHB rapportées ne permette une transcription de l'ARN pré-génome, nécessaire pour la réplication de l'ADN viral.

Structures des séquences cellulaires situées à la jonction avec l'ADN du virus B

Là encore il n'y a pas de profil commun à différentes tumeurs. La plupart des résultats sont compatibles avec des recombinaisons illégitimes entre ADN viral et ADN cellulaire, fréquemment associées à une courte délétion de l'ADN cellulaire au site d'intégration. Dans certains intégrants on retrouve des homologies partielles de séquences entre l'ADN cellulaire délété et le génome viral à proximité du site d'intégration.

Dans une tumeur cependant, l'intégration d'un ADN viral linéaire sans délétion est associé à une duplication de 12 paires de base de l'ADN cellulaire au site d'intégration, un résultat semblable à ceux décrits pour l'intégration de certains rétrovirus ; ce cas est cependant resté isolé.

L'ensemble des études n'a pas permis de mettre en évidence une séquence cellulaire unique comme cible de l'intégration de l'ADN viral. Dans plusieurs cas cependant l'intégration se produit dans des séquences répétées (séquence Alu ou séquence Satellite de type III) ; ces séquences pourraient être impliquées dans une recombinaison non homologue.

L'intégration de l'ADN viral est parfois associée à une duplication et à une inversion des séquences d'ADN cellulaire adjacentes. De plus une amplification et une translocation de séquences incluant les séquences

d'ADN du virus B associées aux séquences cellulaires adjacentes a été démontré dans la lignée PLC/PRF5 (dérivée d'un hépatocarcinome humain).

Mécanismes potentiels impliqués dans l'intégration de l'ADN VHB

Les résultats sont compatibles avec différents mécanismes. Dans certaines tumeurs, où la région des extrémités cohésives est située à une extrémité de l'intégrant on peut formuler l'hypothèse que l'une des jonctions est générée par l'insertion d'un intermédiaire de réplication (extrémité 5' du brin moins linéaire) dans le génome cellulaire tandis que l'autre jonction ne montre, soit pas de localisation précise dans le génome viral soit une insertion préférentielle dans la région PréS/S. Cette seconde jonction pourrait être créée par un évènement de recombinaison secondaire. D'autres hypothèses font appel comme substrat pour l'intégration à la forme circulaire ouverte de l'ADN viral. Il est enfin possible que dans certains cas des structures oligomériques aient été réalisées avant l'intégration, ces oligomères venant secondairement s'intégrer dans l'ADN génomique.

Des observations récentes montrent que, quel que soit le substrat pour l'intégration, les phénomènes de recombinaison non homologues font vraisemblablement intervenir la topoisomérase I pour laquelle des sites de clivage ont été mis en évidence au voisinage de la région DR1 du VHB et du WHB. Certains auteurs ont proposé que, après intégration, la région du génome viral dans les extrémités cohésives pourraient être "réactivée" par des protéines comme la protéine terminale, cette réactivation pouvant créer des réarrangements des séquences du virus B ainsi que des phénomènes de recombinaison entre des génomes du virus B situés sur différents chromosomes, conduisant éventuellement à des translocations chromosomiques.

Si ces hypothèses sont correctes, l'encapsidation immédiate de la polymérase virale telle qu'elle se réalise dans un cycle normal devrait prévenir ces phénomènes de "réactivation" de recombinaison du virus B. Certains auteurs ont cependant suggéré que, au stade de tumeurs, une encapsidation anormale pourrait se produire (peut-être du fait de mutations sur le gène C ?) qui favoriserait, d'une part de nouvelles intégrations, et d'autre part ces phénomènes de réactivation. Aucune démonstration directe de ces différentes hypothèses n'a été actuellement apportée.

Conséquences de l'intégration de l'ADN du virus B

Instabilité de l'ADN chromosomique

Les sites d'intégration ont été localisés sur différents chromosomes. Il semble cependant que les insertions sur les chromosomes 11 et 17 seraient plus fréquentes. L'intégration peut conduire à des délétions limitées de l'ADN cellulaire mais dans plusieurs cas des délétions chromosomiques importantes ont été identifiées sur le bras court du chromosome 11, bras long du chromosome 4 et bras long du chromosome 11, en particulier. Des translocations chromosomiques ont été également décrites au site d'intégration. Enfin dans une tumeur, les séquences d'ADN viral intégrées ont été trouvées co-amplifiées avec l'oncogène *hst-I*. L'ensemble de ces résultats suggère que l'intégration de l'ADN du virus B pourrait intervenir en augmentant le risque de réarrangements chromosomiques. Il faut souligner cependant qu'aucun gène n'a été actuellement identifié au niveau d'une délétion ou d'un point de cassure dans une translocation chromosomique.

Synthèse des protéines X et PréS2/S délétées en C-terminal

La protéine X peut être synthétisée à partir des formes virales libres comme à partir de certaines séquences intégrées. On met fréquemment en évidence une intégration dans la région des extrémités cohésives qui entraîne une délétion en 3' du gène X. Plusieurs travaux ont montré cependant que des séquences X délétées en 3' et fusionnées à l'ADN cellulaire adjacent gardaient une activité de transactivation, mise en évidence en particulier sur le promoteur des gènes *c-fos* et *c-myc*. En fait, la substitution de la région C terminale de la protéine X par des acides aminés codés par des séquences cellulaires pourrait même augmenter l'activité de transactivation de la protéine virale.

Comme on l'a vu, l'intégration de l'ADN viral conduit fréquemment à des séquences PréS2/S délétées dans la région 3'. Une revue récente de la littérature a montré l'existence de telles séquences dans 12 sur 53 clones testés (7 sur 23 tumeurs ou lignées cellulaires). Il a été démontré que de telles protéines peuvent avoir une activité de transactivation *in vitro* sur les promoteurs de gènes comme *c-fos* et *c-myc*. Des études récentes non publiées suggèrent que la protéine X d'une part et les protéines PréS2/S d'autre part pourraient agir de façon synergique dans la transformation cellulaire. Il a également été récemment suggéré que le transactivateur PréS2/S pourrait participer, via son interaction avec le facteur de

transcription NF-kB, interaction en partie au moins médiée par la génération de radicaux libres.

Mutagenèse insertionnelle

La mise en évidence de séquences d'ADN du virus B intégrées dans l'ADN génomique a fait formuler dans les années 80 l'hypothèse suivant laquelle un des mécanismes essentiels d'action de l'ADN viral serait la mutagenèse insertionnelle. Cette hypothèse de travail s'est en grande partie confirmée dans le modèle des tumeurs observées chez les marmottes ; par contre, la mutagenèse insertionnelle n'a été actuellement mise en évidence que dans de très rares cas de tumeurs humaines.

Dans les cancers du foie des marmottes infectées par le virus de l'hépatite de la marmotte, Fourel et coll. ont montré que, dans environ 50% des tumeurs, on pouvait observer une intégration de l'ADN viral dans les gènes c-myc ou N-myc. De façon tout à fait remarquable, les sites cellulaires utilisés pour l'intégration sont semblables à ceux qui avaient été précédemment décrits pour certains rétrovirus murins. Ces observations ont considérablement renforcé les analogies entre VHB et rétrovirus. Il a été possible de montrer, par ailleurs, que l'intégration conduit à une modification d'expression significative de ces gènes myc ; de plus, des souris transgéniques contenant les séquences génomiques d'ADN viral intégré développent des hépatocarcinomes. On peut donc considérer que le phénomène de mutagenèse insertionnelle est bien établi et avec une forte prévalence dans ce modèle.

Au contraire dans les tumeurs humaines l'intégration de l'ADN du virus B dans un gène cellulaire n'a été décrit que dans trois cas :

– Récepteur beta pour l'acide rétinoïque

Dejean et coll. ont décrit l'intégration de l'ADN du virus de l'hépatite B dans un gène secondairement identifié comme le gène du récepteur beta de l'acide 19 rétinoïque. Dans cette tumeur les séquences d'ADN viral sont intégrées au niveau du gène PréS1. Vingt-neuf acides aminés du gène PréS1 sont fusionnés au domaine de liaison à l'ADN et de liaison à l'hormone du récepteur pour l'acide rétinoïque. Le rôle majeur de l'acide rétinoïque et des rétinoïdes sur les phénomènes de prolifération et de différenciation est bien connu et il est probable que l'insertion virale a modifié la fonction de ce récepteur.

Parallèlement une famille de récepteur pour l'acide rétinoïque a été identifiée ; en particulier, le récepteur alpha pour l'acide rétinoïque a

été localisé au niveau d'une translocation chromosomique fréquemment observée dans les leucémies aiguës à promyélocytes.

– Cycline A

Une tumeur (HEN) a pu être analysée dans notre laboratoire. Il s'agissait d'une tumeur très particulière : une femme jeune, sous contraception orale, avait été opérée pour ce qui était considéré comme un adénome probablement bénin du foie. Après exérèse, il est apparu qu'il existait un foyer d'hépatocarcinome débutant dans cette tumeur. Parallèlement, des prélèvements sériques ont permis de mettre en évidence la présence de l'antigène HBs.

L'analyse en Southern blot montrait la prolifération clonale de cellules contenant un seul site d'intégration de l'ADN du virus B dans la tumeur mais pas dans la zone non tumorale. La réalisation d'une banque d'ADN génomique à partir du tissu tumoral a permis de démontrer l'insertion de l'ADN viral dans un gène identifié comme celui étant de la cycline A humaine. A cette époque, seuls les gènes codants pour la cycline A chez les invertébrés avaient été identifiés. Ce travail a permis d'analyser de façon concomitante plusieurs aspects de ce problème :

- . caractérisation des séquences d'ARN présentes dans la tumeur HEN ;
- . analyse du rôle de la cycline A dans un cycle cellulaire normal en se centrant en particulier sur son rôle à la transition G1/S ;
- . clonage et analyse de la régulation d'expression du gène cycline A normal humain
- . analyse de l'expression de l'ARN et de la protéine cycline A dans différentes formes de tumeurs humaines.

Ces différentes approches ont permis de démontrer que l'ADN du virus B était inséré dans le deuxième intron du gène cycline A. L'ADN viral n'est délété que sur une centaine de nucléotides (au niveau de la région des extrémités cohésives).

L'analyse en Northern blot a permis de montrer une accumulation importante dans la zone tumorale d'ARN qui hybridaient à la fois avec la sonde cycline A et la sonde VHB. La synthèse d'une banque d'ADN complémentaire à partir de la tumeur HEN a permis de préciser ces observations et de montrer l'organisation génétique des deux transcrits principaux trouvés dans la tumeur. Il s'agit de transcrits hybrides, initiés au niveau du promoteur viral PréS2/S et, après épissage, fusionnés avec les séquences normales de la cycline A (exons 3 à 8). La phase ouverte de lecture était conservée et ces deux ARN hybrides codent donc

potentiellement pour une protéine chimérique pour laquelle les 152 acides aminés de la région N- terminal de la cycline A sont remplacés par 150 acides aminés d'une protéine Prés2/S délétée en C-terminal de l'enveloppe du virus B. La "boite" cycline et la région C-terminale de la cycline A sont intactes.

Tenant compte du rôle de la cycline A à la transition G1/S on peut formuler les hypothèses suivantes sur le rôle de cette protéine hybride dans la transformation hépatocytaire :

- . synthèse constitutive d'une protéine qui a perdu les signaux de dégradation et est donc stabilisée, protéine qui pourrait stimuler de façon non contrôlée la synthèse d'ADN cellulaire ;

- . localisation anormale de la cycline A du fait de la présence en N-terminale de séquences d'enveloppe du virus B transmembranaires ;

- . liaison anormale de la protéine hybride à un certain nombre de molécules normalement liées à la cycline A : cdk2, protéine p107, facteur de transcription E2F.

Ces différentes observations sont actuellement testées sur des modèles de culture *in vitro* et *in vivo* par la réalisation de souris transgéniques. Par ailleurs l'étude de la régulation d'expression du gène cycline A normal devrait permettre de préciser l'existence ou non d'une régulation transcriptionnelle du gène dans des cellules normales ou des cellules tumorales.

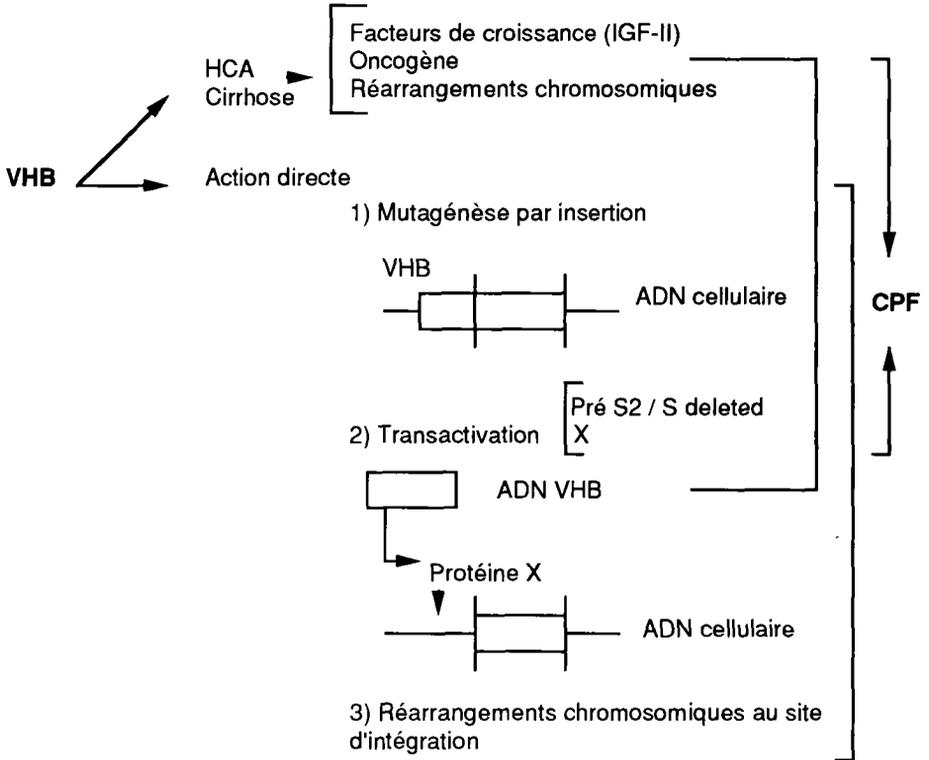
– Mévalonate kinase

Très récemment (résultats non publiés) il a été montré dans la lignée PLC/PRF5 que, à un des sites d'intégration, l'ADN viral est inséré dans un gène codant pour la mévalonate kinase humaine (qui n'était précédemment connue que chez le rat). Comme pour le cas décrit dans la cycline A, l'intégration conduit à la synthèse de transcrits hybrides, initiés à partir du promoteur Prés2/S et fusionnés aux séquences de la mévalonate kinase.

Au total, des cas indiscutables d'activation *in cis* ont été décrits dans les tumeurs humaines mais sont encore rares. On peut faire à ce sujet deux remarques générales :

- Dans les deux tumeurs décrites *in vivo* (ayant conduit à l'identification des gènes récepteurs bêta à l'acide rétinolique et cycline A), le cancer s'est développé en l'absence de lésions de cirrhose associée. Ce sous-groupe de tumeurs, développées sur un foie histologiquement

Figure 12 : Virus de l'hépatite B et cancer primitif du foie



pratiquement normal, et associées à une infection chronique par le virus B est extrêmement rare. Cependant l'étude de telles tumeurs pourraient permettre d'objectiver plus facilement un effet direct de l'intégration dans la mesure où un cofacteur majeur (la cirrhose) n'est pas présente. On peut cependant remarquer que le troisième cas (insertion dans le gène codant pour la mévalonate kinase) a été décrit dans une lignée cellulaire dérivée à partir d'une tumeur qui était associée à une cirrhose.

- Bien que de gros efforts aient été entrepris par de nombreux laboratoires pour l'étude détaillée des séquences d'ADN du virus B, on constate, d'après les revues de littérature, qu'environ seulement 25 à 30 tumeurs ou lignées cellulaires, correspondant à environ 50 à 60 clones, ont été analysées en tout. Ce point illustre la nécessité évidente d'analyser, avec des méthodes plus rapides et mieux adaptées à un criblage plus large, un plus grand nombre de tumeurs si l'on veut réellement pouvoir définir la prévalence réelle de ces phénomènes d'activation en cis par rapport aux activations en trans décrites dans les chapitres suivants.

En résumé, le virus de l'hépatite B peut intervenir dans la carcinogénèse hépatique par plusieurs mécanismes qui ne sont pas exclusifs et qui sont probablement associés chez des mêmes malades (Figure 12) :

- la cirrhose hépatique, secondaire au développement d'une hépatite chronique active est un facteur de risque majeur et est associée dans 80 à 90% des cas à la tumeur ;

- le VHB peut cependant avoir un effet "direct" :

. intégration avec réarrangement chromosomique,

. intégration avec mutagénèse insertionnelle,

. transactivation par des protéines virales générées à partir d'ADN VHB libre en cours de multiplication, ou intégré dans l'ADN cellulaire.

Cancer primitif du foie chez des sujets antigène AgHBs négatif

La prévalence d'un test positif pour l'AgHBs, chez des malades avec cancer primitif du foie, varie considérablement dans le monde. En Asie et en Afrique noire, 60 à 80% des sujets sont Ag HBs positif. Par contre, en Europe et aux USA la prévalence est beaucoup plus faible. En France, par exemple, seulement 20 à 30% des malades sont Ag HBs positif. Les facteurs étiologiques impliqués dans le développement des cancers primitifs du foie chez des malades AgHBs négatif (70 à 80% des cas) restent mal connus.

Des études, utilisant la technique d'hybridation sur réplique, ont montré dans environ 80% des tumeurs associées à une cirrhose, la présence d'ADN VHB. Des séquences virales ont, par contre, été plus rarement détectées dans des tumeurs se développant sur un foie non cirrhotique. Les profils de restriction observés sont compatibles avec la présence, soit de séquences virales intégrées dans le génome cellulaire, soit de formes libres, mais le plus souvent sans intermédiaires de réplifications. Contrairement aux tumeurs AgHBs positif, le nombre de copies d'ADN viral par cellule est faible (environ 0,01 à 0,1 copie par cellule). Des résultats contradictoires ont cependant été rapportés : des études réalisées au Japon, aux USA et en Allemagne n'ont pas montré la détection de séquences d'ADN VHB chez des sujets AgHBs négatif. Ces résultats divergents peuvent être liés au faible nombre de génomes viraux par cellule (et donc, à des différences de sensibilité et de spécificité) ; des variations épidémiologiques dans la fréquence d'exposition au virus doivent également être considérées.

Polymerase chain reaction

La Polymerase chain reaction (PCR) nous a récemment permis de confirmer la présence de séquences d'ADN VHB dans 17 sur 28 tumeurs de patients AgHBs négatifs. Ces tumeurs proviennent de régions avec une prévalence variable d'infection par le VHB (Afrique, Italie, Japon et France). La PCR a également permis de mettre en évidence l'existence de transcrits viraux dans ces tumeurs.

Ces résultats indiquent que la persistance de l'ADN et des ARN viraux pourraient représenter un facteur de risque pour le développement des cancers primitifs du foie. L'infection virale doit donc être prise en compte dans la discussion des facteurs pathogéniques d'apparition de ces tumeurs. Il est intéressant de noter que ces observations concordent avec celles décrites chez la marmotte après infection par le virus de l'hépatite de la marmotte (WHV). Certains animaux développent en effet une tumeur après inoculation du virus malgré la négativation du sérum pour l'antigène de surface. Alors que les tumeurs provenant d'animaux WHV-Ags positif contiennent environ 100 à 1000 copies d'ADN viral par cellule, un faible nombre de copies d'ADN viral intégré (0,1 à 0,01 copie par cellule) a été détecté dans des tumeurs se développant chez des animaux après séronégativation.

Chez l'homme, l'hypothèse selon laquelle la persistance de séquences d'ADN viral après la disparition de l'Ag HBs dans le sérum constitue un

facteur de risque pour le développement de cancers primitifs du foie, peut rendre compte des données épidémiologiques actuellement disponibles. En effet, alors que dans les premières études prospectives le développement du cancer du foie n'avait été observé que chez des sujets AgHBs positif, des données récentes ont montré l'apparition de tumeurs chez certains sujets AgHBs négatif, mais avec des signes d'une exposition antérieure au virus (anti-HBc et anti HBs positif).

En France, la forte prévalence de maladies chroniques du foie liées à l'alcoolisme chronique a permis d'analyser, dans ce groupe, les conséquences d'une infection par le VHB. Les alcooliques chroniques sont fréquemment exposés à la fois au virus B et au virus C. La forte prévalence des séquences d'ADN VHB détectées chez des sujets avec cirrhose alcoolique et cancer primitif du foie contraste avec le faible taux (10%) de résultats chez des alcooliques chroniques avec des hépatopathies mais sans cancer. Le rôle précis du VHB dans la genèse des tumeurs reste cependant méconnu. Le virus pourrait essentiellement intervenir en induisant une cirrhose qui représente un état pré-tumoral ; cependant, l'ADN VHB peut aussi être détecté dans des tumeurs se développant sur un foie non cirrhotique. L'infection virale pourrait intervenir dans l'initiation de la transformation cellulaire, le VHB n'étant plus nécessaire pour les étapes suivantes de la carcinogénèse. Enfin les virus VHB et VHC pourraient interagir dans la genèse de ces tumeurs.

Cancer primitif du foie et virus de l'hépatite C

Une infection par le virus C (hépatite post-transfusionnelle ou sporadique) entraîne fréquemment (50 à 60 % des cas) un portage chronique du virus. Cette infection chronique est fréquemment associée à une hépatite chronique active qui elle-même peut induire l'apparition d'une cirrhose dans 20 % des cas. Enfin un cancer primitif du foie peut compliquer l'évolution de cette cirrhose.

L'infection par le virus C semble également associée au cancer primitif du foie. Au Japon, en Italie et en Espagne, respectivement 80, 60 et 60 % des sujets ayant un hépatocarcinome ont des anticorps anti-VHC.

En France nous avons récemment montré une prévalence de 55 % chez des sujets avec cancer du foie. Nous avons observé un taux de 15 à 20 % de séropositivité chez les sujets alcooliques chroniques, qui semblent constituer également un groupe à risque pour l'infection VHC. De plus la prévalence de l'anti-VHC est plus forte chez les sujets avec cirrhose que chez ceux ayant des maladies moins sévères du foie, suggérant un rôle du virus dans le développement de la cirrhose elle-même. Cette observation contraste avec celle récemment réalisée en Afrique du Sud et au Mozambique où seulement 10 à 30 % des sujets, avec cancer du foie ont été identifiés comme anti-VHC positif.

Au total, ces études indiquent une association entre le développement de la tumeur et la séropositivité VHC, cependant que des profils épidémiologiques différents existent suivant la zone géographique.

L'utilisation de la PCR nous a permis d'apporter des informations nouvelles sur ce sujet : nous avons pu montrer en effet la persistance d'une multiplication du virus de l'hépatite C au moment du développement de la tumeur. En effet parmi 22 sujets analysés (dans le sérum et dans le foie) 11 étaient anti-VHC positif. Ces 11 sujets anti-VHC positif avaient tous également de l'ARN du virus de l'hépatite C détectable dans le sérum. De plus, dans le même travail nous avons pu montrer la persistance de séquences d'ARN du virus de l'hépatite C à la fois dans les zones tumorales et non tumorales du foie des malades avec cancer du foie. L'utilisation de la variabilité génétique des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite C a permis d'analyser de façon comparative les séquences en nucléotides des molécules d'ARN provenant des zones tumorales et non tumorales d'un même sujet. Nous avons pu montrer ainsi l'existence de mutations significatives entre ces deux types de molécules, indiquant un

taux de mutation différent dans les cellules tumorales et non tumorales.

De nombreux travaux seront nécessaires pour aller plus loin sur la relation entre virus de l'hépatite C et cancer du foie. Encore une fois il est possible que l'effet soit en grande partie expliqué par le développement de l'hépatite chronique active et de la cirrhose. Des expériences visant à reconstruire des ADN complémentaires de taille complètes sont en cours qui permettraient alors par les expériences de transfection dans différents types cellulaires d'analyser la réplication du virus C, de rechercher un effet cytopathogène et éventuellement des effets de transformation cellulaire.

Virus de l'hépatite C, virus de l'hépatite B : interactions potentielles

Les infections par les virus de l'hépatite B et les virus de l'hépatite C apparaissent donc toutes deux être associées au cancer primitif du foie bien que les études concernant le virus de l'hépatite C demandent des approfondissements supplémentaires. Au moins dans certaines zones, de nombreux individus vont être infectés par les deux virus, une situation qui pourrait conduire à une diminution de la réplication de virus B. Chez les sujets avec cancer primitif du foie des études récentes, réalisées en France et en Italie, indiquent une association entre la présence de marqueurs sérologiques VHB et VHC. Il paraît donc logique de discuter l'importance des interactions entre les deux virus dans la carcinogénèse hépatique, ce point n'ayant pas été exploré actuellement.

En conclusion, le cancer primitif du foie chez l'homme est une des tumeurs les plus associées à des infections virales. En ce qui concerne le virus de l'hépatite B, de nombreux travaux moléculaires ont permis de dégager des mécanismes potentiellement impliqués dans la carcinogénèse hépatique. En ce qui concerne le virus de l'hépatite C, il existe une association certaine mais les mécanismes impliqués sont encore très mal connus. Le rôle des facteurs viraux ne doit pas faire oublier que d'autres facteurs sont en cause. En particulier des progrès récents ont été obtenus sur les mécanismes d'action d'un carcinogène chimique (l'aflatoxine B1). Il a en effet été montré que l'aflatoxine B1 pourrait provoquer l'apparition d'une mutation ponctuelle au niveau d'un gène à effet "anti oncogène" : la P53, cette mutation étant fréquemment identifiée dans des cancers du foie dans des zones avec une exposition forte à l'aflatoxine B1.

Enfin et d'une façon plus générale, l'étude des sites d'intégration de l'ADN du virus de l'hépatite B peut permettre, indépendamment même du rôle du virus dans la tumeur, d'identifier de nouveaux gènes (comme le récepteur à l'acide rétinolique ou la cycline A) dont la fonction est essentielle pour les contrôles de différenciation et prolifération cellulaire.

L'ensemble de ces travaux est bien sur motivé par l'existence dès à présent d'une vaccination efficace contre le virus de l'hépatite B et probablement, mais à plus long terme, d'une vaccination contre le virus de l'hépatite C.

Références

1. BEASLEY RP, HWANG LY. Hepatocellular Carcinoma And Hepatitis B Virus. *Semin Liver Dis* 1984.
2. BRECHOT C, DEGOS F, LUGASSY C, et al. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1985;312:270-6.
3. BRECHOT C, HOUSSET C. Traitements antiviraux des hépatites chroniques. *Encyclopédie Médico-chirurgicale*, 1990;11.
4. BRECHOT C, KREMSDORF D. Structure et organisation génétique du virus de l'hépatite C. *Immunoanal Biol Spéc* 1991;26:51-5.
5. BRECHOT C, POL S, BERTHELOT P. Les hépatites chroniques Non-A, Non-B. Monographie Schering 1992.
6. BRECHOT C. Hepatitis B virus (HBV) and hepatocellular carcinoma. HBV DNA status and its implications. *J Hepatol* 1987;4:269-79.
7. BRECHOT C. Interferon alpha et hépatites B chroniques. *Hepat Imm* 1991;1:1-4.
8. BRECHOT C. Polymerase chain reaction. A new tool for the study of viral infections in hepatology. *J Hepatol* 1990;11:124-9.
9. BRUIX J, BARRERA JM, CALVET X, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 1989;2:1004-6.
10. COLOMBO M, CHOO QL, DEL NINNO E, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1989;2:1006-8.
11. GERKEN G, PATERLINI P, MANNS M, et al. Assay of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction and its relationship to pre-S and S-encoded viral surface antigens. *Hepatology* 1991;13:158-66.
12. HOUGHTON M., WEINER A, HAN J, et al. Molecular biology of the hepatitis C viruses : implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991;4:381-8.

13. KEW M, POPPER H. Relationship Between Hepatocellular Carcinoma And Cirrhosis. *Sem Liver Dis.*1984;4:136-46.
14. KIM CM, KOIKE K, SAITO I, et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991;351:317-20.
15. KORBA BE, WELLS FV, BALDWIN B, et al. Hepatocellular carcinoma in woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks : presence of viral DNA in tumor tissue from chronic carriers and animals serologically recovered from acute infections. *Hepatology* 1989;9:461-470.
16. KREMSDORF D, THIERS V, GARREAU F, et al. Nucleotide sequence analysis of hepatitis B virus genomes isolated from serologically negative patients. In : *Viral hepatitis and liver disease.* Hollinger FB, Lemon SM,
17. KREMSDORF D, THIERS V, GARREAU F, et al. Variabilité génétique du virus de l'hépatite B et son expression sérologique. *Médecine-Sciences* 1990;6:108-16.
18. LIANG TJ, BLUM HE, WANDS JR. Characterization and Biological Properties of a Hepatitis B Virus Isolated from a Patient without Hepatitis B Virus Serologic Markers. *Hepatol* 1990;12;204-12.
19. NALPAS B, DRISS F, POL S, et al. Association between HCV and HBV infection in hepatocellular carcinoma and alcoholic liver disease. *J Hepatol* 1991;12:70-4.
20. NALPAS B, THIERS V, POL S. Hepatitis C viremia and anti-HCV antibodies in alcoholics. *J Hepatol* 1992;14:381-4.
21. OKUDA K, FUJIMOTO I, HANAI A, URANO Y. Changing incidence of hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer Res* 1987;47:4967-72.
22. OZTURK M, et al. P53 mutations in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 1991;338:1356.
23. PATERLINI P, FRANCO D, DRISS F, et al. Primary liver cancer in hepatitis B surface antigen-negative patients is associated with the persistence of hepatitis B and hepatitis C viral genomes in serum and tumorous tissue. 1992. *Soumis.*
24. PATERLINI P, GERKEN G, NAKAJIMA E, et al. Polymerase chain reaction to detect hepatitis SB virus DNA and RNA sequences in primary liver cancers from patients negative for hepatitis SB surface antigen. *N Engl J Med* 1990;323:80-5.
25. WANG J, et al. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990;343:555-7.
26. WU JY, et al. The hepatitis B virus-encoded transcriptional trans-activator HBx appears to be a novel protein serine/threonine kinase. *Cell* 1990;63:687-95.
27. YONEYAMA T, TAKEUCHI K, WATANABE Y, et al. Detection of hepatitis C virus cDNA sequence by the polymerase chain reaction in hepatocellular carcinoma tissues. *Jpn J Med Scu Biol* 1990;43:89-94.