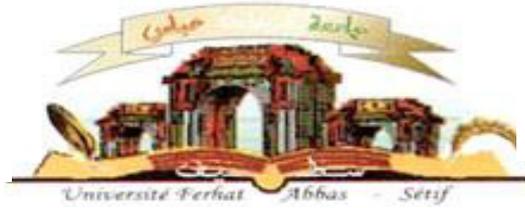


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2016

THÈSE

Présentée par

FERROUDJ Sana

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**BRCA1 et réponse aux agents anticancéreux
dans les hépatocarcinomes**

Soutenue publiquement le 02 Novembre 2017

DEVANT LE JURY

Président	BAGHIANI Abderehmane	Pr. Univ FA Sétif 1
Directeur	BOURAS Mourad	Pr. Univ Batna
Co-directeur	OZTURK Mehmet	Pr. IBG .Izmir, Turquie
Examineurs	BOURICHE Hamama	Pr. UFA Sétif 1
	SATTA Dalila	Pr. Constantine
	LAROUÏ Salah	Pr. Univ Batna

Remerciements

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au professeur **BOURAS Mourad**, qui m'a guidée, encouragée et conseillée tout au long de cette thèse. La confiance que vous m'avez accordée m'a laissé beaucoup d'autonomie qui m'a permis d'évoluer en recherche. Sans compter votre enthousiasme qui m'a permis de surmonter les moments de désespoir.*

*Comme j'ai beaucoup de mal à trouver les mots justes pour exprimer ma reconnaissance et ma grande gratitude envers le professeur **ÖZTÜRK Mehmet**, j'irai au plus simple, « merci Mr Mehmet », de m'avoir accueillie dans votre laboratoire de recherche à l'INSERM à Grenoble et de m'avoir donné l'occasion d'intégrer votre équipe de recherche au centre international de Biomédecine et génome à Izmir. Je suis consciente d'avoir eu beaucoup de chance d'avoir été encadrée par une personne comme vous. Les échanges scientifiques que nous avons pu avoir au cours de nos rencontres ainsi que les difficultés techniques rencontrées m'ont permis de « grandir » scientifiquement et de prendre confiance en moi.*

Qu'il trouve ici l'expression de tous mes respects pour sa sagesse, sa gentillesse et sa disponibilité.

*Pour l'honneur qu'ils me font, je remercie *Le Professeur BAGHIANI Abderehmane*, *Le Professeur BOURICHE Hamama*, *Le Professeur SATTI Dalila* et *Le Professeur LAROUI Salah* d'avoir consacré du temps pour juger ce travail.*

Qu'ils soient tous assurés de mon estime et de ma reconnaissance.

*Je tiens évidemment à remercier Monsieur **DIMITROV Stefan** de m'avoir accueillie au sein de son équipe à l'institut Albert Bonniot de Grenoble. Vous m'avez montré à plusieurs reprises que je pourrai toujours compter sur votre aide.*

*Je suis redevable au Dr. **Evin Iscan**, avec qui j'ai eu l'honneur de travailler, sa rigueur scientifique à la paillasse m'été très précieuse.*

*Pour leur aide technique, je remercie chaleureusement **Laetitia Vanwongerghem** pour sa bonne humeur et son aide en culture cellulaire, **PADMANABHAN Kiran** qui m'a assisté en qRT-PCR, **Mylène PEZET** dans mes expériences de cytométrie en Flux et **Bertrand FAVIER** qui m'a initié à l'expérimentation animale et qui a su m'y donner goût.*

*Je ne saurais oublier le soutien moral de **BOUSSOUAR Faïçal** et sa petite famille. Merci pour ce que vous étiez pour moi pendant mon séjour à Grenoble.*

*je remercie particulièrement **Tuba Akiinal** pour son soutien lors de mes passages en Turquie*

*Je remercie également " **ma famille**" sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour le soutien inconditionnel et sans limite. Merci de m'avoir fait confiance même dans les moments où mes choix semblaient plus qu'approximatifs et surtout merci d'avoir toléré et pardonné toutes mes sautes d'humeur, trop prolongée, au cours des dernières années.*

*Enfin, j'exprime ma reconnaissance envers le **Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique** qui m'a permis d'effectuer ce travail dans de bonnes conditions financières et m'a donné l'opportunité de collaborations fructueuses.*

ملخص

يعد سرطان الكبد وربما فتاكا استحاله علاجه بسبب مقاومة الخلايا الكبدية السرطانية عن طريق تكثيف إصلاح الحمض النووي لجميع وسائل العلاج الكيميائي. وقد أثبتت الدراسات أن الجين BRCA1 هو احد الجينات الأكثر قدرة على إصلاح الحمض النووي و عليه تم تسليط الضوء في هذه الدراسة على دور BRCA1 في مقاومة سرطان الخلايا الكبدية للعلاج الكيميائي. من أجل ذلك قمنا في المرحلة الأولى باختبار استجابة عدد من الخلايا السرطانية الكبدية لثلاث عقارات كيميائية متداولة (Mitomycine C, Cisplatine, Melphalan) كما قمنا عن طريق آلية الرحلان و النقل الكهربائي و استخدام أجسام مضادة خاصة بتقدير كمية هذا البروتين (BRCA1) في هذه الخلايا. وقد بينت نتائج هذه التجارب أن الخلايا الأكثر مقاومة هي تلك الأكثر تصنيعا مما يشير للدور المباشر الذي يلعبه هذا البروتين في هذه المقاومة و عليه قمنا في المرحلة الثانية بتثبيط إنتاج هذا البروتين باستخدام نوع من الأحماض الريبية المفككة (siRNA) في الخلايا المقاومة من جهة و تفعيل إنتاجه في الخلايا الحساسة من جهة أخرى و اختبار مفعول تراكيز متزايدة من الميتومييسين في كلتا الحالتين. وقد تبين لنا أن تثبيط بروتين (BRCA1) في الخلايا (Snu449) يحول الخلايا المقاومة إلى خلايا حساسة كما أن تفعيله في الخلايا (HepG2) يمنحها مقاومة لعقار الميتومييسين. كما اثبتت تجارب التدفق الخلوي في المرحلة الثالثة من هذه الدراسة أن تثبيط البروتين في الخلايا المقاومة ومعالجتها بالميتومييسين يوقف الدورة الخلوية لهذه الخلايا في مرحلة ما قبل الانقسام.

في ظل هذه النتائج تبين هذه الدراسة أن تثبيط فعالية الجين (BRCA1) (كفاف لجعل الخلايا السرطانية الكبدية حساسة للعقارات الكيميائية.

الكلمات المفتاحية:

الورم الكبدى, (BRCA1), إصلاح الحمض النووي,العقارات المتلفة ل ADN , تحسيس.

Résumé

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est une des tumeurs malignes la plus meurtrière et pour laquelle les options thérapeutiques se heurtent à une chimiorésistance associée aux gènes de réparation de l'ADN. Il est établi à travers nombreuses études que le gène BRCA1, impliqué dans la réparation, était surexprimé dans les CHCs. Notre attention a été focalisée sur l'étude du rôle potentiel de BRCA1 dans la chimiorésistance des CHCs. Dans la première partie de ce travail, Le profil d'expression de BRCA1 dans des lignées d'hépatocarcinomes a été évalué par SDS PAGE et western blot en présence d'anticorps spécifiques. La sensibilité de ces lignées de CHC aux agents pontant l'ADN et largement utilisés en chimiothérapie tels que le Cisplatine, la Mitomycine C (MMC), et le Melphalan a été évalué, dans un deuxième temps, par le test de viabilité cellulaire après traitement par des concentrations croissantes des différentes drogues et le calcul de la concentration inhibitrice de 50 % de survie (IC₅₀). La sur-expression de BRCA1 dans certaines lignées et leurs résistances aux drogues indique son implication dans la résistance des CHCs aux traitements. Dans la troisième partie du travail le rôle fonctionnel de BRCA1 dans la réponse à la Mitomycine C a été évalué par la manipulation de son expression. Une sur-expression de BRCA1 a été induite par la transfection à l'aide de vecteur pCMVmyc-BRCA1 dans la lignée épithéliale HepG2 sensible à la base à la Mitomycine C. D'autre part, une répression de l'expression de BRCA1 par interférence a été induite dans la lignée mésenchymateuse SNU449 hyper-résistante. La réponse des cellules transfectées à des concentrations croissantes de Mitomycine C a été évaluée par le test de viabilité. Les résultats ont démontrés que la surexpression de BRCA1 dans les cellules de la lignée HepG2 leur confère une résistance à la MMC. Par contre la répression de l'expression de BRCA1 sensibilise les cellules de la lignée SNU449 à la MMC. Afin de mieux comprendre l'origine de la sensibilisation de la lignée SNU449, le cycle cellulaire des cellules de SNU449 transfectées par siRNA-BRCA1 et traitées par 200nM de Mitomycine C a été analysé par cytométrie de flux. Les changements du cycle cellulaire indiquaient que la sensibilisation de la lignée SNU449 est due à l'arrêt du cycle cellulaire en phase 4N suite à la répression de BRCA1. De ce fait, notre étude montre que l'inactivation de BRCA1 est suffisante pour la sensibilisation des CHC à la chimiothérapie.

Mots clés :

BRCA1, Carcinome hépatocellulaire, Réparations de l'ADN, Agents pontant, Sensibilisation.

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most lethal malignant tumors for which therapeutic options are limited. The failures of conventional and targeted therapies in the treatment of HCCs are due to the highly resistance of these tumors which is associated with DNA repair genes. It is established through numerous studies that BRCA1 gene, involved in DNA repair, was overexpressed in HCCs. Our attention has been focused on studying the potential role of BRCA1 in the chemoresistance of HCCs. In the first part of this work, the BRCA1 expression profile in hepatocarcinoma lines was evaluated by SDS PAGE and western blot in the presence of specific antibodies. In a second step The sensitivity of these HCC lines to DNA inter cross-link agents widely used in chemotherapy, such as Cisplatin, Mitomycin C (MMC), and Melphalan was evaluated by the cell viability test after treatment by increasing concentrations of different drugs and measurement of the inhibitory concentration of 50% survival (IC50). The over-expression of BRCA1 in some lines and their resistance to drugs indicates its involvement in the resistance of HCCs to treatments. In the third part of the work the functional role of BRCA1 in the response to Mitomycin C was evaluated by manipulating its expression. Overexpression of BRCA1 was induced by transfection of the sensitive epithelial line HepG2 with pCMVmyc-BRCA1 vector into the base with Mitomycin C. On the other hand, repression of BRCA1 expression by interference was induced in the resistant mesenchymal line SNU449. The response of the transfected cells to increasing concentrations of Mitomycin C was evaluated by the viability test. The results demonstrated that overexpression of BRCA1 in cells of the HepG2 line confers them resistance to MMC while the repression of its expression sensitizes the SNU449 cells line to the MMC. In order to better understand the origin of the sensitization of the SNU449 line, the cell cycle of siRNA-BRCA1 transfected SNU449 cells treated with 200nM of Mitomycin C was analyzed by flow cytometry. Changes in the cell cycle indicated that the sensitization of SNU449 was due to cell cycle arrest in the 4N phase following BRCA1 repression. As a result, our study shows that inactivation of BRCA1 is sufficient for the sensitization of HCCs to chemotherapy.

Key words:

BRCA1, Hepatocellular carcinoma, DNA repair, Bridging agents, Sensitization.

ABREVIATIONS

AFB1 :	Aflatoxine B1
AFP :	Alpha-Foetoprotéine
ARID1A :	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ARID2 :	AT-rich interactive domain-containing protein 2
ARN :	Acide Ribo Nucléique
ATCC :	American Type Culture Collection
ATM :	Ataxia Telangectasia Mutated
ATR:	Ataxia Telangiectasia mutated and Rad3-related protein
BARD1:	BRCA1-Associated Ring Domain 1
BASC:	BRCA1-Associated genome Surveillance Complex
Bcl:	B-cell Leukemia/Lymphoma protein
BER:	Base Excision Repair
BRCA1:	Breast Cancer susceptibility protein 1
BRCA2:	Breast Cancer susceptibility protein 2
BRCC:	BRCA1-BRCA2-Containing Complex
BRCT:	BRCA1 C-Terminus domain
CDB:	Cassure Double-Brin de l'ADN
Cdk :	Cycline-Dependent Kinase
CHC :	Carcinome Hépatocellulaire
Chk1/Chk2:	Checkpoint Kinase 1/2
CMV :	CytoMegaloVirus
CTNNB :	Catenin (Cadherin-Associated Protein) beta 1
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
EpCAM :	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ERCC:	Excision Repair Cross-Complementing domain
FA:	Fanconi Anemia
FANC:	Gene ou Proteine Fanconi
GADD45A :	Growth arrest and DNA-damage-inducible alpha
H2AX:	variante X de la famille des histones H2A
HR :	Homologous Recombination
hTERT:	Human Telomerase Reverse Transcriptase
IGF2 :	Insulin-like Growth Factor 2
JAK :	Janus Kinase
LOH :	Loss Of Heterozygosity/perte d'hétérozygotie
LOH:	Loss of Heterozygosity
MAPK :	Mitogen-activated protein kinases
MEF:	Mouse Embryonic Fibroblast

MMC:	Mitomycine C
MMR:	Mismatch Repair
Mre11:	Meiotic Recombination protein 11
MRN:	MRE11/RAD50/NBS1 Complex
mTOR :	Mammalian Target of Rapamycin
NASH :	Non Alcoholic Steato-Hepatitis
Nbs1:	Nijmegen Breakage Syndrome protein 1
NER:	Nucleotide Excision Repair
NGS :	Next-generation sequencing
NHEJ:	Non-Homologous End Joining
PALB2 :	Partner And Localizer of BRCA2
PARP-1:	Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1
PARPi :	PARP inhibitor
PDGF :	Platelet Derived Growth Factor
PI3K :	Phosphoinositide-3-Kinase
PIKK:	Phosphatidylinositol-3-Kinase related Kinase
pRb :	proteine du retinoblastome
PTEN :	Phosphatase and Tensin Homolog
RAS :	Rat sarcoma
RB1 :	Retinoblastoma 1
RING :	Really Interesting New Gene
RPA:	Replication Protein A
SiRNA :	Small interfering RNA
STAT :	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF-β:	Transforming Growth Factor Bêta
TP53 :	Tumor Protein p53
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor
VHB :	Virus de l'Hépatite B
VHC :	Virus de l'Hépatite C
WNT :	Wingless-type MMTV Integration site family
XRCC:	X-ray Repair Cross-Complementing protein

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1. Estimation de l'incidence (a) et de la mortalité (b) des différents cancers.....	5
Figure 2. Progression histopathologique du foie sain vers le CHC.....	7
Figure 3. Schéma localisant la cellule étoilée du foie.....	8
Figure 4. Récapitulatif des effets biochimiques de TGF- β en pathologie hépatique.....	8
Figure 5. Algorithme de diagnostic des CHCs et procédure de rappel.....	11
Figure 6. Classification Barcelona Clinic Liver Cancer : stades et traitement	13
Figure 7. Principales voies de signalisation altérées par des mutations somatiques ou des délétions de gènes dans le CHC	16
Figure 8. Classification transcriptomique des CHC.....	24
Figure 9. Variants d'épissage de <i>BRCA1</i> qui codent pour une protéine fonctionnelle	27
Figure 10. Structure primaire de la protéine BRCA1.....	28
Figure 11. Fonction de la protéine BRCA1 en réponse aux dommages à l'ADN	31
Figure 12. Rôle BRCA1 dans la recombinaison homologue et le contrôle du cycle cellulaire	33
Figure 13. coopération des voies de l'Anémie de Fanconi et BRCA1 dans la réparation des pontages inter-brins	34
Figure 14 Fréquence des changements génétiques et épigénétiques impliquant des gènes de réparation par recombinaison homologue.....	39
Figure 15 : Réponse aux inhibiteurs de la PARP chez les patientes BRCA1-/-	43
Figure 16. Profil d'expression de BRCA1	55
Figure 17. Evaluation de l'efficacité de la transduction des cellules HepG2 par le vecteur pCMVmyc	57
Figure 18. Effet de la surexpression de BRCA1 dans les cellules HepG2	58

Figure 19. Evaluation de l'efficacité de la transfection des cellules de la ligné Snu44 par les siRNA	59
Figure 20. Evaluation de l'efficacité de la transfection des cellules Snu449 par les siRNA par qRT-PCR	60
Figure 21. Effet de la sous-expression de BRCA1 sur la sensibilité de la lignée Snu449 à la Mitomycine C	61
Figure 22. Effet de la Mitomycine C sur le cycle cellulaire des cellules Snu449 transfectées	62
Figure 23. Effet de la Mitomycine C sur la distribution des fractions cellulaires transfectées dans les différentes phases du cycle cellulaire	63

Tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des aberrations chromosomiques et des gènes cibles dans le CHC.....	15
Tableau 2. La séquence des amorces des amorces utilisées pour l'amplification génique	51
Tableau 3. Sensibilité des lignées du CHCs à la Mitomycine C, au Melphalan et au Cisplatine	56

LISTE DES PUBLICATIONS

1- **Ferroudj, S.**, Yildiz, G., Bouras, M., Iscan, E., Ekin, U., & Ozturk, M. (2016). Role of Fanconi anemia/BRCA pathway genes in hepatocellular carcinoma chemoresistance. *Hepatology Research*, 46(12), 1264-1274.

2- Jeannot, V., Busser, B., Vanwonderghem, L., Michallet, S., **Ferroudj, S.**, & Cokol, M. et al. (2016). Synergistic activity of vorinostat combined with gefitinib but not with sorafenib in mutant KRAS human non-small cell lung cancers and hepatocarcinoma. *Oncotargets And Therapy*, Volume 9, 6843-6855.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
CHAPITRE 1. Le carcinome hépatocellulaire(CHC)	4
1- Aspect épidémiologique et étiologie du CHC	4
1.1- Prévalence et incidence mondiales	4
1.2- Sexe	5
1.3- Facteurs de risque	6
2- Physiopathologie des carcinomes hépatocellulaires	6
2.1- Fibrose hépatique	7
2.2- Cirrhose	9
2.3- Invasion, métastase, et angiogenèse	9
3- Démarche diagnostique	11
4- Stratégie thérapeutique	12
5-Dépistage et surveillance	13
6- Aspect moléculaire des carcinomes hépatocellulaires	14
6.1- Altérations génétiques	14
6.1.1- Instabilité chromosomique	14
6.1.2- Mutations génétiques	16
6.1.2.1- la voie de réactivation de la Télomérase	17
6.1.2.2- La voie Wnt/ β -caténine	17
6.1.2.3- La voie TP53	18
6.1.2.4- La voie PI3K/AKT/mTOR	19
6.1.2.5- La voie Ras/ MAPK	19
6.1.2.6- La voie du stress oxydatif	20
6.2- Altérations épigénétiques	20
6.2.1- Profil de méthylation de l'ADN dans le CHC	20
6.2.2- Modification des histones et remodelage chromatinien	21
6.2.3- Dérégulation de l'expression des microARN	22
6.2.4- Longs ARN non codants ou lncRNA	23
7- Classification moléculaire des CHC	24
CHAPITRE 2. BRCA1 (BR_east CAncer 1, early onset)	26
1- Structure de BRCA1.....	26
1.1- Structure génique <i>BRCA1</i>	26

1.2- Structure ptotéique BRCA1.....	28
1.2.1- Domaine à doigt de zinc de type RING	28
1.2.2- Domaines BRCT	29
1.2.3- Signaux de localisation et d'exportation nucléaire	29
2- Fonctions de BRCA1	30
2.1- Réponse globale aux dommages de l'ADN	30
2.1.1- Détection et signalisation des dommages d'ADN	30
2.1.2- Réparation des lésions d'ADN	32
2.2- Contrôle du cycle cellulaire	35
2.3- Régulation transcriptionnelle	36
2.4- Remodelage de la chromatine	37
2.5-Ubiquitination.....	38
3- BRCA1 et tumorigenèse.....	39
4- BRCA1 et spécificité tissulaire.....	40
5- Rôle de BRCA1 dans la résistance aux traitements génotoxiques.....	41
6- BRCA1 et applications thérapeutiques.....	42
6-1.Concept létalité synthétique et BRCA1.....	42
II-MATERIEL ET METHODES.....	45
1- Lignées et cultures cellulaires.....	45
2- Extractions des protéines.....	45
3- SDS PAGE et Western blot.....	46
4- Test de cytotoxicité.....	47
4.1- Traitement des cellules par les drogues.....	47
4.2- Evaluation de la viabilité cellulaire au bleu de méthylène.....	48
5- Transfection cellulaire.....	48
5.1- Transfection des cellules par les siRNA.....	48
5.2- Transfection des cellules par les vecteurs pCMVmyc.....	49
6- Etude de l'expression de <i>BRCA1</i>	49
6.1- Extraction des ARN totaux par le Trizol.....	49
6.2- Transcription inverse (RT).....	50
6.3- Amplification des ADNc en temps réel.....	50
7- Analyse du Cycle cellulaire par cytométrie en flux.....	51
8- Analyses statistiques.....	52
III-RESULTATS ET DISCUSSION.....	53
III.1-Résultats.....	54
III.1.1- La surexpression de la protéine BRCA1 dans les lignées cellulaires du CHC de type mésoenchymateux.....	54

III.1.2- Résistance des cellules du CHC de type mésenchymateux aux agents pontant l'ADN.....	55
III.1.3- L'expression ectopique de BRCA1 augmente la résistance à la Mitomycine C.....	57
III.1.4- La répression de BRCA1 sensibilise les cellules Snu449.....	58
III.1.5- La répression de BRCA1 provoque l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à la MitomycineC	61
III.2-Discussion.....	64
III.2.1- La surexpression de la protéine BRCA1 dans les lignées cellulaires du CHC de type mésenchymateux.....	64
III.2.2-Résistance des cellules du CHC de type mésenchymateux aux agents pontant l'ADN.....	66
III.2.3- BRCA1 Module la réponse des lignées du CHCs à la Mitomycine C.....	68
III.2.4- La répression de BRCA1 provoque l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à la Mitomycine C.....	70
IV- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	75
V- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	78

INTRODUCTION

Le carcinome hépatocellulaire (CHC), dont l'incidence est en augmentation, est un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale. C'est l'une des tumeurs malignes humaines les plus meurtrières. Le CHC se développe le plus souvent sur une hépatopathie chronique sous-jacente, cirrhose le plus souvent (El-Serag & Rudolph, 2007). Les options thérapeutiques dépendent en grande partie du stade de la maladie au moment du diagnostic et de l'état général, qui conditionne les possibilités d'accès à des régimes thérapeutiques complexes.

Les résultats des chimiothérapies systémiques restent décevants chez les patients présentant un carcinome hépatocellulaire inopérable. Le manque de traitements efficaces et bien tolérés par les patients atteints de CHC avancés met en évidence le besoin de rechercher de nouvelles approches thérapeutiques. Les thérapies moléculaires ciblées ont changé le paysage de la prise en charge du cancer. Récemment, un inhibiteur multiples kinases, le sorafénib, s'est montré efficace en termes de bénéfice de survie chez des patients atteints d'un CHC avancé (Faivre et al., 2009). Le caractère fortement résistant des CHC envers les thérapies conventionnelles, a été en partie attribué à son insensibilité aux agents anti-tumoraux et plus particulièrement à la difficulté de ce type de tumeur à entamer un processus de mort cellulaire.

La thérapie anti-tumorale utilise couramment des agents génotoxiques qui endommagent l'ADN en agissant par divers mécanismes. Les agents alkylants altèrent la structure d'ADN par la formation des ponts inter-brins (également dénommés « adduits » ou « *Interstrand-Crosslinks* », ICL) qui consistent en un lien covalent entre les deux brins de l'ADN, générant des distorsions prononcées de la double hélice. La conséquence directe est un blocage de la réplication engendrant des cassures d'ADN double brin qui sont les lésions-clés de la létalité (Deans & West, 2011). L'apparition de résistance étant la première cause d'échec des traitements anticancéreux. Une tumeur peut être intrinsèquement résistante aux médicaments ou peut développer, au cours du traitement, différents mécanismes de résistance. Ainsi, les cellules peuvent neutraliser les lésions d'ADN et réduire la cytotoxicité provoquée par les agents génotoxiques grâce notamment à l'amplification de gènes codant pour des protéines de réparation.

BRCA1, premier gène de susceptibilité au cancer héréditaire du sein code pour une protéine exprimée de manière ubiquitaire et joue un rôle majeur dans plusieurs processus fondamentaux, parmi lesquels le maintien de l'intégrité du génome (Smith et al, 1992, Venkitaram, 2001). Son rôle de suppresseur de tumeur lui a été attribué suite à son implication dans la réparation, par recombinaison homologue, des cassures double brin d'ADN, apparues lors de la réplication (Scully et al., 1997b). Nombreuses études et essais cliniques ont démontré que sa perte de fonction conduit au développement de tumeurs du sein (Futreal et al., 1994). En outre des études précliniques ont montré que *BRCA1* entraîne une résistance à un nombre d'agents couramment utilisés en chimiothérapie, tels que mitomycin C, l'étoposide, la bléomycine et les composés du platine: cisplatine et le carboplatine (Moynahan et al., 2001; Quinn et al., 2003). Conformément à cela, un certain nombre d'études cliniques rétrospectives ont montré que les patientes dont les tumeurs expriment des niveaux faibles de *BRCA1* répondent mieux au traitement à base de platine comparé à celles dont les tumeurs expriment des niveaux modérés ou élevés de *BRCA1* (Abbott et al., 1999).

Le rôle déterminant de *BRCA1* dans la réponse aux dommages de l'ADN, permet d'admettre son implication dans la modulation de la réponse aux agents génotoxiques et nous a mené à travers ce travail à explorer son rôle dans la résistance des CHCs. Dans notre approche on a soumis dans un premier temps différentes lignées de CHC à différents traitement altérant la structure d'ADN tels que : Mitomycin C, Melphalan, Cisplatine. Ces molécules sont connues pour leurs capacités à engendrer des cassures double brin dans les cellules de mammifères. Le profil d'expression du gène *BRCA1* dans ces différentes lignées a été établi. Les résultats préliminaires ont démontrés une grande variabilité de la réponse des différentes lignées corrélée à la différence du profil d'expression de *BRCA1* d'où notre hypothèse de l'implication du gène de *BRCA1* dans la résistance de certaines lignées aux drogues. Des expériences de Knock-down et de surexpression de *BRCA1* ont été mises en place afin d'évaluer d'une part l'effet de sa répression dans la résistance et d'autre part l'effet de l'induction de son expression dans des lignées sensibles.

Revue
Bibliographique

Le carcinome hépatocellulaire(CHC)

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

1- Aspect épidémiologique et étiologie du CHC

1.1- Prévalence et incidence mondiales

Plus de 600.000 personnes meurent chaque année d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) à travers le monde. D'après les données de l'agence internationale de recherche sur le cancer, le carcinome hépatocellulaire (CHC) vient au cinquième rang des tumeurs les plus fréquentes dans le monde en nombre de cas (5,4 % de nouveaux cas de cancer) et son incidence tend à augmenter. Estimé à être responsable de près de 746 000 décès en 2012 (9.1 % du total), le cancer du foie est la deuxième cause de mortalité par cancer dans le monde. Son pronostic globalement effroyable (avec un ratio global de l'incidence/mortalité de 0.95) indique un impact significatif et des tendances géographiques similaires à la morbidité et de la mortalité (Figure 1) (GLOBOCAN 2012). Une forte incidence(>80 %) est marquée dans les pays en développement tels que l'Asie de l'Est et du Sud-est, l'Afrique Centrale et l'Afrique de l'Est (incidence supérieure à 20 cas pour 100 000 habitants par an). La Chine, à elle seule, représente plus de 50% des cas dans le monde (taux d'incidence standardisée selon l'âge: 35.2/100 000 hommes ; 13.3/100 000 femmes). L'Italie, l'Espagne, la Grèce sont considérées comme des zones à risque intermédiaire avec une incidence de 10 à 20 cas/ 100 000 habitants par an. Avec une incidence inférieure à 5 cas/ 100 000 habitants par an, l'Europe du Nord, l'Amérique du Nord et du sud sont les régions à faible risque.

On note de grandes disparités géographiques d'incidence et de mortalité, fortement liées à la répartition des étiologies. Ainsi, dans les régions à forte endémie, le CHC est principalement associé aux maladies chroniques du foie d'origine virale, en particulier le virus de l'hépatite B (VHB) dont la contamination survient à la naissance ou lors des premières années de la vie. Il est potentialisé par l'aflatoxine B1 qui est aussi un carcinogène puissant (Trinchet JC, 2009). Les hépatites virales chroniques C, la consommation excessive d'alcool et la stéatose dysmétabolique non-alcoolique (NASH) sont les facteurs de risque de CHC les plus répandus en Europe et en Amérique du Nord (El Serag & Kanwal ,2014).

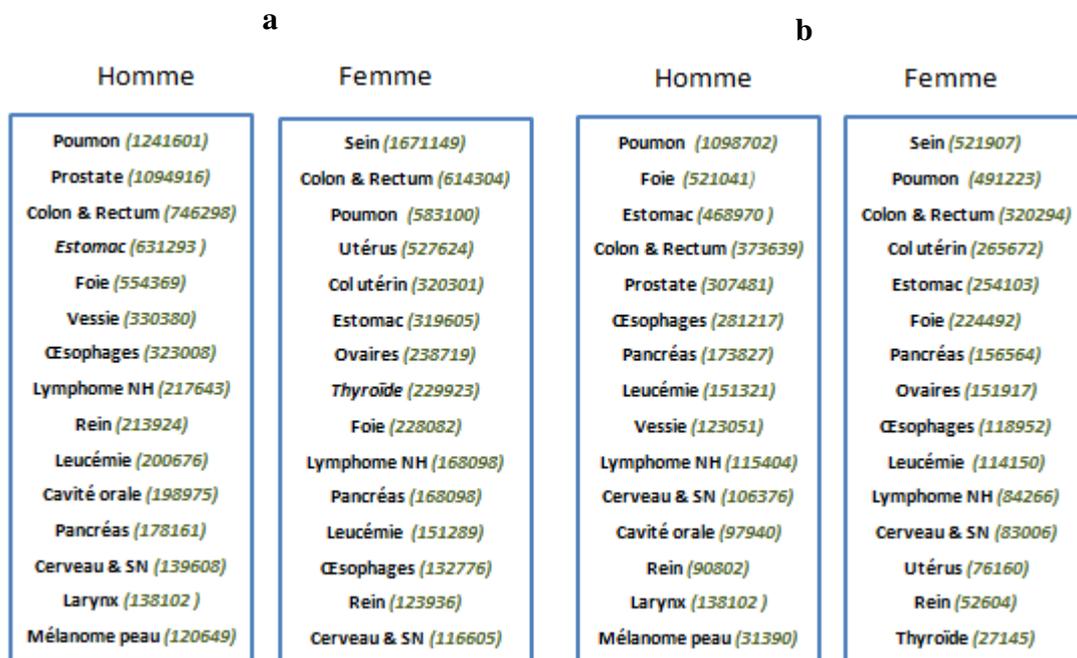


Figure1: Estimation de l'incidence (a) et de la mortalité (b) des différents cancers chez l'homme et la femme (GLOBOCAN 2012).

1.2- Sexe

En terme de fréquence, le carcinome hépatocellulaire est le cinquième cancer chez les hommes (554 000 cas, 7.5% du total) et le neuvième chez les femmes (228 000 cas, 3.4% du total) avec des ratios hommes: femmes entre 2 :1 et 4 :1(Figure 2). Cette dominance masculine suggère, outre les différences d'exposition aux facteurs de risque des deux sexes, l'implication de facteurs hormonaux (androgènes et œstrogènes). Les résultats de certaines études épidémiologiques ont montré que l'utilisation à long terme de contraceptifs oraux et de stéroïdes anabolisants androgènes peuvent induire des

tumeurs hépatocellulaires bénignes et malignes (De Maria et al., 2002). L'expression de récepteurs d'hormones sexuelles, y compris des récepteurs d'œstrogène, peuvent être détectés dans des proportions variables (entre 14 % et 52 %) dans les CHC (Ohnishi et al., 1986). En effet, tandis que les Androgènes favorisent le développement du CHC et le cancer de la prostate, de récentes découvertes montrent, qu' à l'opposé d'effet oncogénique, les œstrogènes jouent un rôle protecteur dans le CHC.

1.3- Facteurs de risque

Le CHC est un cancer hétérogène dont les facteurs varient d'une région géographique à une autre. Cette multitude de facteurs complique le diagnostic, le pronostic et le traitement. Les principaux facteurs identifiés comprennent l'infection virale par les virus de l'hépatite B (VHB) et l'hépatite C (VHC) (El-Serag HB, 2011; Chen et al., 2011), l'exposition à un carcinogène alimentaire dérivé des champignons *Apergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus* qui est l'aflatoxine B1, la consommation excessive d'alcool (Fattovich et al., 2004) et la stéato-hépatite non alcoolique (NASH) (Borie et al., 2009). D'autres causes moins communes sont identifiées telles que l'hémochromatose héréditaire, le déficit en alpha1-antitrypsine, l'hépatite auto-immune, la cirrhose biliaire primitive et la maladie de Wilson (El-Serag HB, 2011). Le tabac est actuellement considéré comme un cofacteur dans le développement du CHC.

2- Physiopathologie des carcinomes hépatocellulaires

La carcinogénèse hépatique est un processus séquentiel comportant une phase d'initiation des hépatocytes, puis de promotion tumorale et de progression (Govaere & Roskams, 2015). Dans ce schéma, suite à l'exposition répétée à un ou plusieurs facteurs de risque, les hépatocytes accumulent progressivement des altérations biologiques pouvant s'accompagner de modifications morphologiques sur le plan cytotologique et/ou architectural. À un stade relativement avancé, certaines de ces modifications peuvent avoir une traduction purement microscopique « la dysplasie hépatocytaire », et d'autres une traduction macroscopique et radiologique « les (macro-) nodules précancéreux ». Ces nodules peuvent dégénérer en CHC si les altérations génétiques sont suffisamment importantes pour entraîner la transformation et l'immortalisation de ces hépatocytes (Figure 2) (Farazi & DePinho, 2006).

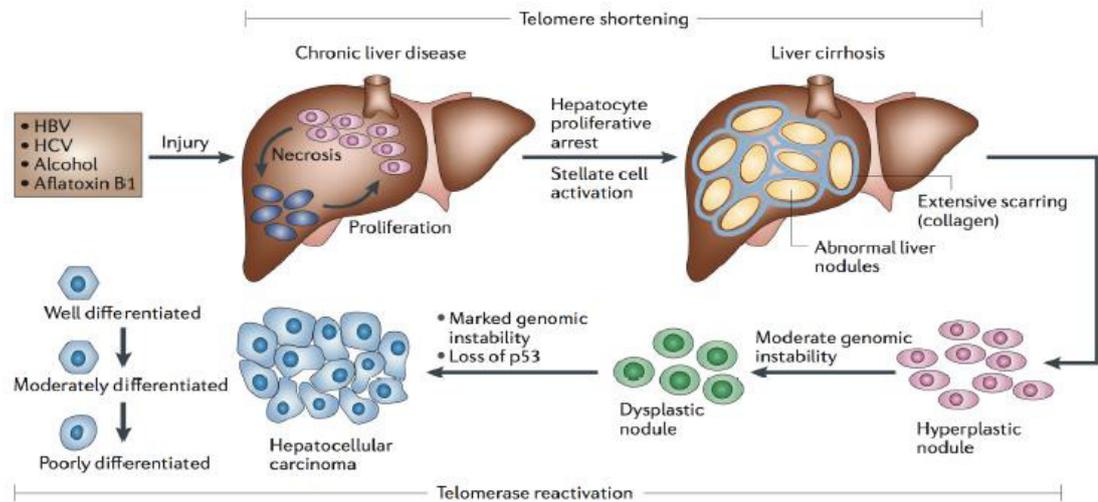


Figure 2. Progression histopathologique du foie sain vers le CHC (Farazi & DePinho, 2006)

2.1- Fibrose hépatique

La fibrose est un tissu amorphe dépourvu de cellules et constitué donc de matrice extra-cellulaire (MEC), principalement du collagène. La fibrose hépatique est la complication majeure de toutes les maladies chroniques du foie. Elle est due à un processus de cicatrisation exagérée qui se caractérise par l'accumulation progressive dans le foie d'une matrice extracellulaire de composition altérée, en réponse à une agression chronique et résulte d'un déséquilibre entre synthèse, dépôt et dégradation de ces constituants. La fibrose hépatique est principalement liée à l'activation des cellules étoilées hépatiques (CEH) qui évoluent d'un phénotype quiescent et lipocytaire vers un phénotype de type myofibroblastique (Figure 3). Cette activation est orchestrée par l'action de différentes cytokines synthétisées par les cellules inflammatoires et les cellules parenchymateuses, notamment le Transforming growth factor- β (TGF- β), principal facteur pro-fibrosant (Lee, 2014).

La transformation des CEH en myofibroblaste s'accompagne par l'acquisition d'un cytosquelette contractile caractérisé en particulier par l'expression de l'alpha-actine muscle lisse (α SMA) et par la sécrétion de la majorité des protéines de la matrice extra-cellulaire (MEC) (Arenson et al, 1988). Le TGF- β est un médiateur majeur de la fibrose. En effet le TGF- β provoque d'une part, l'activation des cellules étoilées qui évoluent en myofibroblastes, et d'autre part, l'expression des protéines de la MEC et l'expression des inhibiteurs des métallo-protéases afin de réduire la dégradation de la MEC (Arthur, 2000).

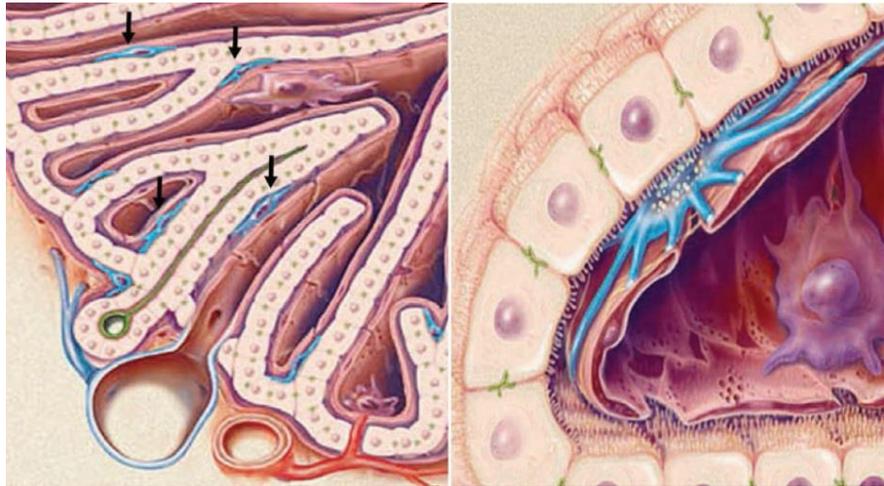


Figure 3. Schéma localisant la cellule étoilée du foie. (Lee et al., 2014)
La cellule étoilée du foie, représentée en bleu, est située dans l'espace de Disse entre les hépatocytes, en beige, et les cellules endothéliales sinusoidales, en rouge.

L'activation des CEH dépend de la signalisation TGF- β médiée par la voie des Smad3 (Liu et al., 20013). Le TGF- β contribue avec d'autres cytokines comme le PDGF (platelet-derived growth factor) à l'activation des CEH. Ces coopérations induisent la phosphorylation des R-Smads dans la région charnière ce qui favorise les réponses biologiques au TGF- β pour le développement de la fibrose (Figure 4) (Yoshida & Matsuzaki, 2012) .

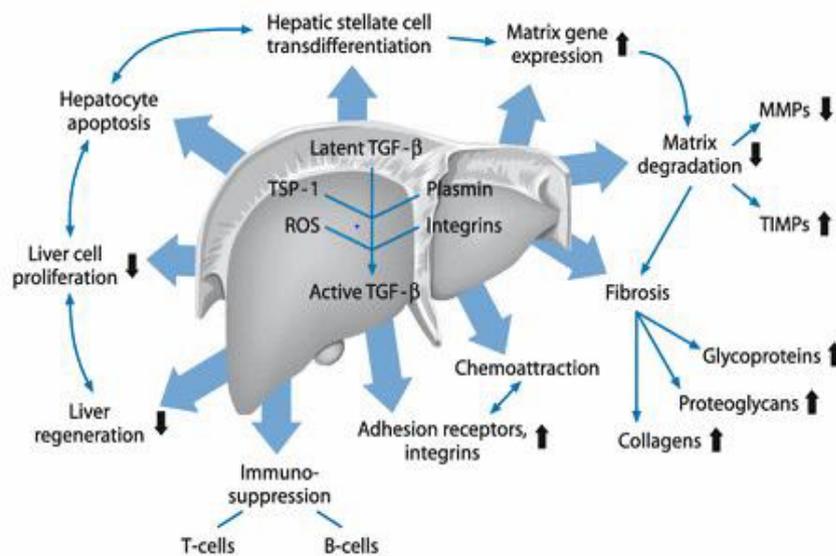


Figure 4. Récapitulatif des effets biochimiques de TGF- β en pathologie hépatique.
 (Yoshida & Matsuzaki, 2012)

2.2- Cirrhose

La cirrhose est la complication terminale de la fibrose hépatique. Le délai de développement de la cirrhose est très variable, de 10 à 40 ans après l'infection par le virus (Fattovich et al., 1997). Récemment, des études génétiques ont mis en évidence chez l'hôte des polymorphismes génétiques susceptibles d'influencer l'évolution de la fibrose. Par exemple le polymorphisme de TGFβ1 est associé à une fibrose au développement plus rapide et à un risque de développement plus important de cirrhose .

Au sein des nodules cirrhotiques, les hépatocytes sont soumis en permanence à des agressions inflammatoires et/ou ischémiques et certains meurent par nécrose ou apoptose, enclenchant un mécanisme compensateur de réplication cellulaire, la « régénération hépatique ». Cette augmentation du taux de réplication hépatocytaire, couplée à l'exposition à divers agents carcinogènes, favorise l'accumulation des altérations génétiques pouvant aboutir à un phénotype "malin" des hépatocytes. Dans la cirrhose, le processus de transformation cancéreuse est donc très souvent multifocal, et il n'est pas rare d'observer dans un même foie cirrhotique des lésions à différents stades de la carcinogénèse. Ce sont les cirrhoses de type macro-nodulaire et mixte, liées à des mécanismes post-nécrotiques comme les infections virales, qui présentent le plus fort risque, puisqu'un CHC se développe dans 13 % à 24 % d'entre elles. Ce risque serait moindre dans les cirrhoses d'origine alcoolique. En cas d'infection virale C, une forte proportion (jusqu'à 40 %) des nodules cirrhotiques "ordinaires" serait déjà d'origine monoclonale, soulignant la précocité du processus tumoral (Aihara et al., 1994).

2.3- Invasion, métastase, et angiogenèse

Durant le processus métastatique les cellules néoplasiques acquièrent des capacités invasives, permettant leur dissémination dans un site secondaire (ou de plus grand ordre) non contigu et distant, au sein duquel ces cellules prolifèrent pour former une masse extravasculaire de cellules incomplètement différenciées (Welch, 2006).

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un processus dynamique et réversible, au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales et acquièrent des propriétés mésenchymateuses. Ceci requiert des modifications architecturales et fonctionnelles complexes. Dans les tissus épithéliaux, des molécules d'adhésion assurent la cohésion intercellulaire. Cependant, dans les tumeurs métastatiques, l'expression des molécules d'adhésion telles que l'E-cadhérine est altérée

(Cavallaro & Christofori, 2004). D'autre part, les molécules d'adhésion associées à la migration cellulaire telles que la N-cadhérine, sont surexprimées dans les cellules cancéreuses agressives. Les cellules ayant subi la TEM acquièrent de nouvelles capacités plastiques, comme la motilité et un phénotype fibroblastoïde apolaire typique de cellules mésenchymateuses ; elles deviennent résistantes à l'apoptose (Voulgari & Pintzas, 2009).

Dans le CHC, la TEM est un événement prédominant dans la progression tumorale du CHC associée à l'invasion locale d'hépatocytes malins, à l'intravasation dans le système vasculaire et à l'extravasation et la colonisation métastatique. Le processus de TEM a été lié à la capacité des cellules tumorales hépatiques à envahir la capsule ou la veine porte (Firincieli et al., 2010). Dans les hépatocytes néoplasiques, la TEM est une étape cruciale du développement du CHC associé à un mauvais pronostic.

La dégradation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéinases (MMPs) permet aux cellules tumorales de franchir la membrane basale et de migrer vers le stroma. Ce dernier va alors être activé par les cellules tumorales. En retour, cette activation concourt à la croissance et l'invasion tumorale (Stamenkovic, 2000).

Une augmentation de l'expression et ou de l'activité des MMPs telles que MMP2 et MMP9 fréquemment observée dans les CHC est associée à une invasion tumorale locale accrue et un pronostic défavorable (Arii, 1996 ; Giannelli et al., 2002).

Il est aujourd'hui établi que la fibrogénèse hépatique s'accompagne d'un processus d'angiogenèse, aboutissant à la formation de la cirrhose et à l'hypertension portale. L'angiogenèse consiste en la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Elle fait partie de la réponse à l'inflammation et du processus de cicatrisation qui est déclenché en cas de lésion chronique du foie et elle est stimulée par l'hypoxie associée à la fibrose. En effet, d'une part les cellules inflammatoires (cellules de Kupffer ou lymphocytes), stimulées en réponse aux lésions hépatocytaires vont sécréter des facteurs pro-angiogéniques favorisant la formation de nouveaux vaisseaux afin d'apporter par le flux sanguin de nouveaux facteurs de croissance nécessaires à la réparation tissulaire. D'autre part, la progression de la fibrose constitue une barrière physique faisant obstacle au flux sanguin et à l'apport d'oxygène dans le parenchyme hépatique et surtout d'anomalies précoces de microcirculation associées à la fibrose.

Ainsi, une augmentation de la densité vasculaire intrahépatique est stimulée par l'expression du VEGF, l'angiopoïétine-1 et le PDGF par les hépatocytes en hypoxie et les CEF myofibroblastes dans le foie fibreux. D'autres facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance hépatocytaire (HGF), le facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) et l'angiopoïétine-2 (Ang2) sont également surexprimés dans le plasma des malades atteints de CHC et contribuent considérablement à la néo-angiogenèse dans les CHCs (Zhu et al., 2011; Muto et al., 2014).

3- Démarche diagnostique

Le diagnostic précis des petits nodules hépatiques est d'une importance capitale. Jusqu'en 2000, il reposait sur la biopsie. Cette approche avait certaines limites liées aux conditions locales de la faisabilité et au risque de complications, telles que des hémorragies ou desensemencements sur le trajet de l'aiguille (Stigliano et al., 2007). En outre, l'obtention d'une précision suffisante pour distinguer les nodules dysplastiques de haut grade des CHC précoces était complexe, puisque l'invasion stromale, le critère le plus pertinent, est difficile à reconnaître (Roskams & Kojiro, 2010). Par la suite, des critères non invasifs pour le diagnostic du CHC, basés sur une combinaison d'imagerie (tomodensitométrie et/ou d'IRM de dernière génération) et d'examens de laboratoire ont été recommandés (Bruix et al., 2001) (Figure 5).

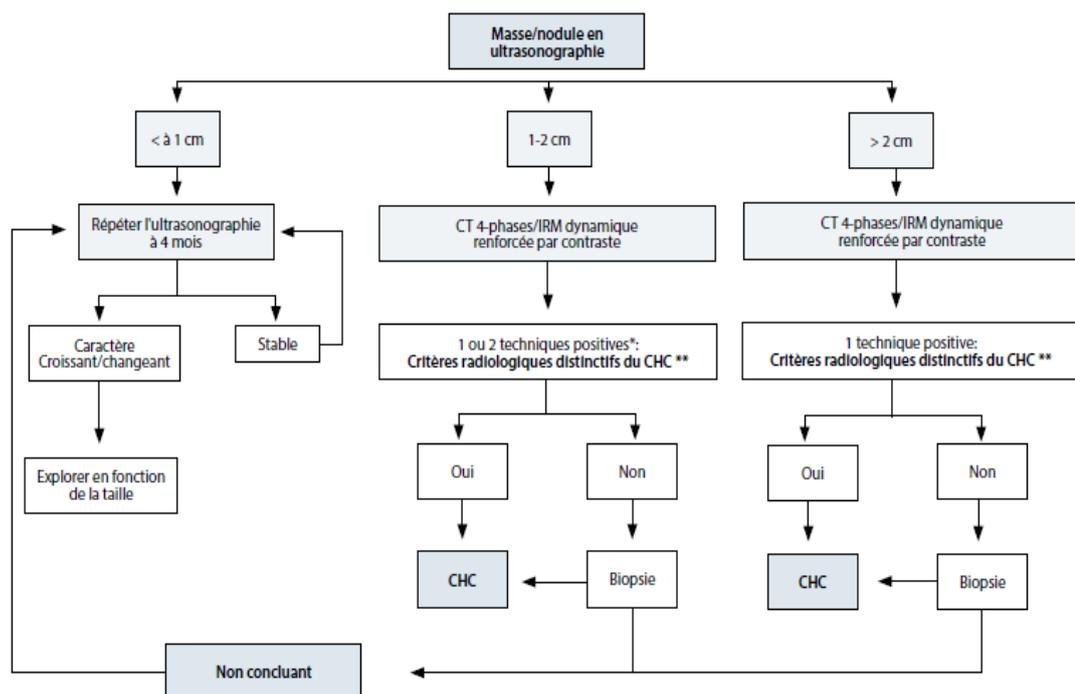


Figure 5. Algorithme de diagnostic des CHCs et procédure de rappel.

Ainsi, les critères non invasifs repose sur des signes distinctifs radiologiques du CHC basés sur la performance dynamique vasculaire tumorale et la diffusion du contraste dans la phase artérielle et le lavage dans la phase veineuse/tardive (Bruix & Sherman, 2005).

4- Stratégie thérapeutique

Une caractéristique importante de CHC est qu'il survient dans le contexte d'un foie cirrhotique et une maladie chronique du foie (El-Serag & Rudolph, 2007). Ceci explique pourquoi le pronostic global reste mauvais, que la survie peut dépendre de la fonction hépatique altérée plutôt que la progression tumorale chez certains patients et les options thérapeutiques sont souvent limités par une potentielle hépatotoxicité .

La classification (BCLC) Barcelona ClinicLiver Cancer prend en compte le stade de la tumeur, la fonction hépatique, le status physique et les symptômes en relation avec le cancer et établit un lien avec les options thérapeutiques et l'espérance de vie. Ainsi, sur la base de cette classification , les patients atteints d'un CHC sont répartis en 4 groupes : BCLC 0/A ; BCLC B ; BCLC C ; BCLC D (Figure 6) (Forner et al., 2014).

Le terme « petit carcinome hépatocellulaire » regroupe les patients des stades 0 et A, à savoir, stade très précoce et stade précoce. Il s'agit de patients dont la maladie hépatique est compensée, avec un état général parfait, et soit un nodule unique de moins de 2 cm, soit un nodule unique de moins de 5 cm ou 3 nodules tous inférieurs à 3 cm. Pour ces patients, un des 3 traitements curatifs disponibles pourra être proposé : transplantation hépatique, résection chirurgicale, destruction percutanée sous contrôle radiologique (Mazzaferro et al.,1996; Llovet et al., 2005; Lencioni R.,2010). A un stade intermédiaire, Les patients classés BCLC B ont une fonction hépatique préservée mais un CHC de plus grande taille et/ou multifocal. Le traitement recommandé est palliatif (chimio-embolisation transartérielle). Le stade avancé caractérisé par une invasion portale néoplasique BCLC C fait recoursà un traitement palliatif avec une administration d'un inhibiteur de tyrosines kinases (Sorafénib).

Les patients de niveau BCLC D présentent une fonction hépatique et un état général fortement altéré. Ce stade final fait appel un traitement symptomatique lorsque c'est nécessaire et faisable.

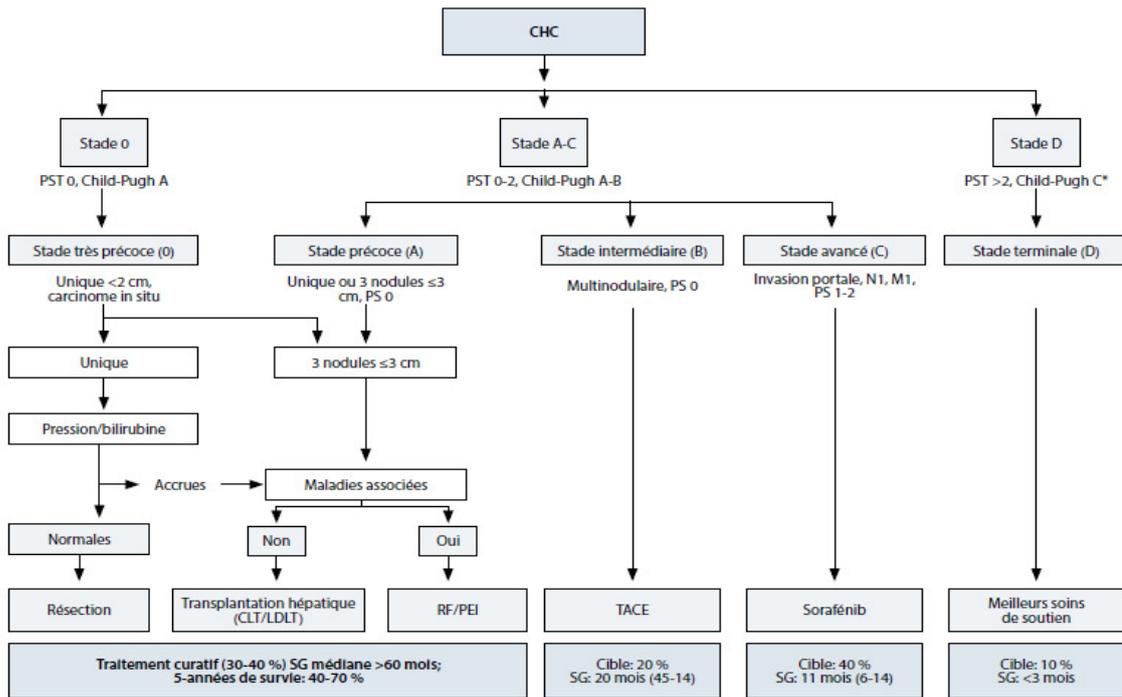


Figure 6. Classification Barcelona Clinic Liver Cancer : stades et traitement (Forner et al., 2014).

5- Dépistage et surveillance

Le CHC est un état pathologique qui se prête bien à la surveillance parce que les individus à risque peuvent être facilement identifiés en raison de la présence sous-jacente d'une hépatite virale ou d'autres maladies du foie. Le but de cette surveillance est la diminution de la mortalité associée à la maladie. Habituellement, ce but est atteint grâce au diagnostic précoce de la maladie (migration des stades pathologiques) qui, en retour, améliore l'applicabilité et le rapport coût-efficacité du traitement curatif. Les tests pouvant être utilisés pour la surveillance du CHC comprennent les examens sérologiques et les techniques d'imagerie. La popularité de la technique d'ultrasonographie se fonde sur l'absence de risques, le caractère non-invasif, la bonne acceptation par les patients et le coût relativement modéré de son utilisation. Néanmoins, la détection par ultrasonographie du CHC dans un contexte cirrhotique représente un défi. Le dosage sérique comprend l'alpha-foetoprotéine (AFP). Il est établi que des niveaux d'AFP constamment élevés sont un facteur de risque pour le développement du CHC et peuvent être utilisés pour la définition des populations à risque. La surveillance concerne les patients cirrhotiques (Sarasin et al., 1996), indépendamment de l'étiologie du CHC et les personnes non-cirrhotiques atteints d'une

infection chronique par le VHB (Fattovich et al., 2004). Selon les données disponibles sur le temps moyen de doublement du volume du CHC (Barbara et al., 1992), un intervalle de 6 mois représente un choix raisonnable pour la surveillance.

6- Aspect moléculaire des carcinomes hépatocellulaires

L'hépatocarcinogénèse est un processus multi-étapes complexe se développant, dans la majorité des cas, après des décennies d'hépatopathie chronique. L'hépatite chronique et la cirrhose sont de véritables étapes prénéoplasiques (Sakamoto et al., 2010) , susceptibles d'induire des anomalies moléculaires, indépendamment des facteurs étiologiques qui en sont responsables. En effet, ces lésions traduisent un mécanisme inflammatoire chronique associée à une régénération hépatocytaire excessive et à un stress oxydatif, événements qui précipitent la sénescence répllicative et l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques dans les hépatocytes. De plus , les nodules cirrhotiques dysplasiques de haut grade sont de véritables lésions prénéoplasiques fréquemment monoclonales, présentant des aberrations chromosomiques multiples et une réexpression de la télomérase, mécanismes participant à l'immortalisation des hépatocytes (Oh et al., 2007).

Une caractérisation distinctive du développement des carcinomes hépatocellulaires associant les évènements moléculaires qui peuvent se dérouler à chaque étape de son progression permettrait d'envisager des approches diagnostiques et thérapeutiques des CHC.

6.1- Altérations génétiques

Le génome des carcinomes hépatocellulaires est le siège d'une grande instabilité due à de nombreuses altérations génétiques. Cette instabilité est observée dès les lésions pré-néoplasiques du foie cirrhotique, ce qui laisse penser qu'elle est à la base du déclenchement du processus tumorigène de l'hépatocarcinogénèse. Les anomalies génétiques irréversibles s'accumulent dans les hépatocytes, ce qui entraîne une perturbation de l'expression des gènes et entraîne finalement une transformation maligne.

6.1.1- Instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique est le changement génétique le plus répandu dans le CHC. Il pourrait être induit soit par mitose imparfaite, soit par une perturbation de la

réplication et de la réparation de l'ADN. Les aberrations chromosomiques pourraient se manifester par le gain ou la perte de bras chromosomiques entiers, ou juste par l'amplification ou la délétion de petits fragments. Les études cytogénétiques utilisant la CGH (Comparative Genomic Hybridization) ont démontré que les bras chromosomiques 17p, 8p, 16q, 16p, 4q, 9p, 13q, 1p, et 6q sont les plus fréquemment perdus tandis que les bras chromosomiques 1q, 7q, 8q et 17q sont fréquemment amplifiés (Tableau 1) (Marchio et al., 1997; Balsara et al., 2001).

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

Chromosome	Type of aberration	Frequent aberration region and candidate target genes (Location)
1q	Gain	<i>CKS1B</i> (1q21.2), <i>CHD1L</i> (1q21.1), <i>JTB</i> (1q21), <i>MDM4</i> (1q32.1)
1p	Loss	<i>p18</i> (1p32), <i>14-3-3σ</i> (1p35), <i>p73</i> (1p36.3), <i>RIZ</i> (1p36.13-p36.23)
3q	Gain	<i>Gankyrin</i> (3q28)
3p	LOH, CpG methylation	<i>RASSF1A</i> (3p21.3), <i>CTNNB1</i> (3p21), <i>TGF-1βR11</i> (3q22)
4q	LOH	
6p	Gain	
6q	LOH	<i>M6P/IGF2R</i> (6q26-q27)
8q	Gain	<i>c-Myc</i> (8q24.21), <i>PTK2</i> (8q24.3), <i>EIF3S3</i> (8q23.3), <i>SGK3</i> (8q13.1)
8p	LOH, CpG methylation	<i>DLC-1</i> (8p21.3-22), <i>LPTS</i> (8p23), <i>CSMD1</i> (8p23.2)
9p	LOH, CpG methylation	<i>CDKN2A</i> (9p21), <i>CDKN2B</i> (9q21),
10q	LOH	<i>PTEN/IMMAC1</i> (10q23.3)
11q	Gain	<i>cyclinD1</i> (11q13)
11p	LOH, CpG methylation	<i>KAI1</i> (11p11.2), <i>IGF-2</i> (11p15), <i>TSLC1</i> (11q23.2)
13q	LOH	<i>Rb1</i> (13q14.2), <i>BRCA2</i> (13q12.3), <i>Tg737</i> (13q12.1), <i>TFDP1</i> (13q34), <i>CUL4A</i> (13q34), <i>CDC1</i> (13q34)
16q	LOH, CpG methylation	<i>CDH1</i> (16q22.1)
16p	CpG methylation	<i>Axin1</i> (16p13.3), <i>SOCS-1</i> (16p13.3)
17p	LOH	<i>p53</i> (17p13.1), <i>HIC-1</i> (17p13.3), <i>HCCS1</i> (17p13.3)

Ces altérations chromosomiques sont trouvées dans les tissus hépatiques pré-néoplasiques ce qui indique que l'instabilité chromosomique peut se produire au stade

précoce du CHC et s'accumule pendant la progression tumorale (Kondo et al., 2000). Ainsi, l'instabilité chromosomique peut entraîner l'activation ou la perte de fonction de certains oncogènes importants ou de gènes suppresseurs de tumeurs, qui régissent la croissance cellulaire et la prolifération. Nombreuses études ont montrés que les segments amplifiés étaient le siège d'un nombre d'oncogène impliqués dans l'inhibition de l'apoptose, la régulation des mitoses et la promotion de la transition épithélio-mésenchymateuse (Liu et al., 2013) à l'opposé les segments perdus hébergeaient un nombre de gènes suppresseurs de tumeurs (Bressac et al., 1990, Satoh et al., 2000).

6.1.2- Mutations génétiques

Pendant ces 20 dernières années, différentes stratégies ont été utilisées pour identifier des mutations somatiques dans les CHC. Récemment, le développement des technologies innovantes dans le domaine du séquençage de nouvelle génération (NGS), a permis à deux équipes de séquencer le génome entier de plusieurs tissus tumoraux de CHC (Fujimoto et al., 2012; Guichard et al.,2012). Les mutations somatiques les plus récurrentes touchent des gènes régulant des voies de signalisation majeures impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose ou de la sénescence (Figure 7) .

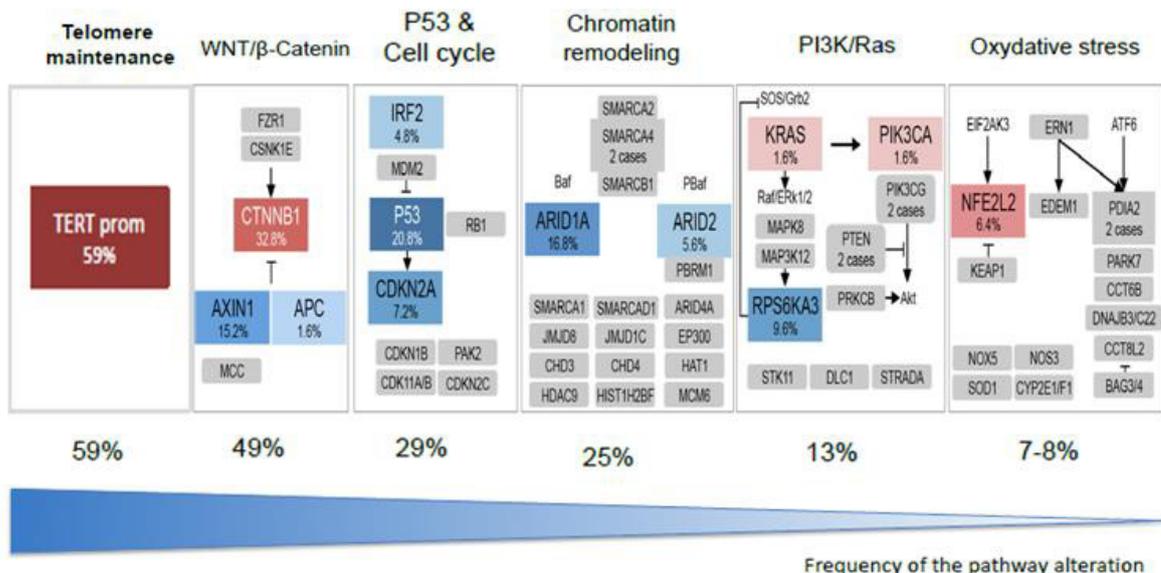


Figure 7. Principales voies de signalisation altérées par des mutations somatiques ou des délétions de gènes dans le CHC. (Guichard et al., 2012).

6.1.2.1- La voie de réactivation de la Télomérase

Dans les cellules eucaryotes les extrémités chromosomiques sont protégées de la dégradation, des fusions et de la recombinaison illégitime par un complexe nucléoprotéique appelé le télomère. Après chaque division cellulaire, les télomères des cellules somatiques humaines normales se raccourcissent de 50 à 150 paires de base. Ce raccourcissement limite la capacité de prolifération, du fait qu'en dessous d'une longueur critique de télomères, la cellule sort de manière permanente du cycle cellulaire par un processus de sénescence répllicative (Hayflick & Moorhead, 1961). La sénescence répllicative présente une barrière essentielle contre la tumorigenèse (Wright & Shay, 2001). Cette barrière est rompue dans plus de 85% des tumeurs humaines par l'expression d'une enzyme, la télomérase, qui synthétise un nouvel ADN télomérique pour remplacer les séquences perdues au cours des divisions cellulaires (Shay & Bacchetti, 1997). Cette expression est due à des mutations touchant le promoteur du gène TERT - Télomérase reverse-transcriptase- codant pour la télomérase. Dans les CHC, des mutations somatiques du promoteur de TERT ont été identifiées dans 59 % de tumeurs hépatocellulaires et dans 25% des macro-nodules cirrhotiques avec ou sans dysplasie (Nault et al., 2013). L'apparition de mutations dans les lésions cirrhotiques pré-néoplasiques suggère que la réactivation de la télomérase est un événement initiateur de la cancérogenèse hépatique sur cirrhose. Par ailleurs, ces mutations peuvent coopérer avec les mutations activatrices du gène CTNNB1 de la β -caténine pour promouvoir la transformation maligne (Pinyol et al., 2014).

6.1.2.2- La voie Wnt/ β -caténine

La voie Wnt/ β -caténine est une voie intracellulaire, jouant un rôle clef dans la physiologie hépatique, en termes de différenciation, de renouvellement des cellules souches, de transition épithélio-mésenchymateuse, de zonation, de prolifération, d'adhésion cellulaire et de régénération du foie (Pez et al., 2013). L'activation de cette voie par la fixation de la glycoprotéine Wnt sur son récepteur Frizzled permet la phosphorylation de Dishevelled (Dvl) qui va inhiber un complexe protéique comprenant notamment la glycogène synthase kinase 3-bêta (GSK3 β), l'axine, et l'APC (Adenomatous Polyposis Coli). L'inhibition de ce complexe, inhibe la phosphorylation de la β -caténine par la GSK3 β . L'inhibition de la phosphorylation de β -caténine empêche sa dégradation et permet sa translocation dans le noyau, où elle se lie aux

facteurs de transcription « Lymphoidenhancer factor » (LEF) et « T-cell factor » (TCF), ce qui induit la transcription de ses gènes cibles, tels que la Cycline D1 (Shtutman et al., 1999).

Outre son rôle dans la transduction du signal, la β -caténine est un composant des jonctions cellule-cellule. Dans le cytoplasme, elle est associée à la E-cadhérine et à l' α -caténine, elle-même liée au cytosquelette d'actine, ce qui permet la formation d'un complexe d'adhérence intercellulaire (Reya & Clevers, 2005). La voie Wnt/ β -caténine est fréquemment la voie la plus dérégulée dans les CHC (Zucman-Rossi, 2010). Des mutations activatrices de l'oncogène CTNNB1 codant la β -caténine sont observées dans 32.8% des CHC. Ces mutations surviennent majoritairement à l'extrémité 5' du gène (exon 3) et touchent généralement une sérine/thréonine cible de la GSK- β , empêchant ainsi la dégradation de la β -caténine, ce qui provoque son accumulation nucléaire et une activation constitutive du signal β -caténine (Morin, 1997). Par ailleurs, des mutations inactivatrices dans les gènes AXIN 1 et APC sont observées dans 15.2% et 1.6% des CHC respectivement (Guichard et al., 2012, Taniguchi et al., 2002).

6.1.2.3- La voie TP53

P53 a été nommé le gardien du génome ou le gardien de l'organisme, du fait de ses deux fonctions principales, l'arrêt du cycle cellulaire et l'initiation du suicide cellulaire apoptotique en cas d'altérations importantes de l'ADN. Ces fonctions sont activées à l'occasion de stress, notamment lors d'exposition aux agents génotoxiques. Le gène TP53 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers humains (Olivier et al., 2010). Dans la majorité des cas, les mutations sont des mutations faux sens localisées dans les exons 5 à 8, c'est-à-dire dans une région hautement conservée au cours de l'évolution, et correspondant au site de liaison spécifique de p53 à l'ADN. Le spectre de mutations de TP53 est très particulier dans les CHC (Zucman-Rossi, 2010). Dans plus de 50% des CHC développés chez les sujets exposés à l'aflatoxine B1 (AB1), une transversion G/T au niveau du codon 249 du gène TP53 est détectée. Cette mutation a pour conséquence l'expression d'une protéine p53 mutée R249S (Ozturk, 1991; Hussain et al., 2007). Chez les patients non exposés à l'AB1, la fréquence des mutations TP53 est de 20% à 30% et le codon 249 est exceptionnellement muté. Par ailleurs p53 peut être inactivée par la surexpression de

son inhibiteur MDM2 ou par l'inactivation de p19ARF, qui l'active (Jablkowski et al., 2005).

6.1.2.4- La voie PI3K/AKT/mTOR

La voie PI3K / AKT / mTOR est une voie de signalisation intracellulaire jouant un rôle-clé dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse. Elle est fréquemment dérégulée dans les cellules cancéreuses. Dans les CHC cette voie est activée dans 30% - 50% des cas. Dans le tissu normal, cette voie est régulée négativement par le gène suppresseur de tumeur Phosphatase and TENsin homolog (PTEN) qui déphosphoryle les intermédiaires lipidiques de PI3K. Une perte de fonction de PTEN (les mutations de PTEN conférant un phénotype de résistance aux inhibiteurs de l'EGFR) est à l'origine d'une activation constitutive de la voie PI3K / AKT / mTOR trouvée dans près de la moitié des CHC (Zhou et al., 2011).

6.1.2.5- La voie Ras/ MAPK

La famille des proto-oncogènes *RAS* comprend trois gènes bien caractérisés *HRAS*, *NRAS* et *KRAS*. Les protéines *RAS* font partie de la famille des GTPases, et jouent un rôle important dans la transmission de signaux extracellulaires provenant des récepteurs membranaires vers le noyau, aboutissant à la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse.

Cette voie s'est révélée comme étant activée dans la moitié des CHC précoces et dans presque tous les cas avancés (Calvisi et al., 2006; Villanueva et al., 2007). L'activation de cette voie de signalisation est dépendante de la surexpression de ligands et de l'hyperméthylation des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs introduisant la transcription des gènes de la famille AP-1, tels que c-Fos et c-Jun, impliqués dans la prolifération et la différenciation (Robinson et al., 2000). Les mutations des 3 principaux gènes *ras* ont été observées dans moins de 10 % des cas. Ces altérations ont été décrites comme des indicateurs de mauvais pronostic (Qin & Tang, 2002).

6.1.2.7- La voie du stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène, fortes de leur potentiel oxydant, peuvent altérer tous les composants cellulaires et contribueraient à la prolifération des cellules tumorales et à l'acquisition d'un phénotype plus invasif et agressif via l'activation des voies de signalisation et de transcription de gènes. Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid-derived-2-Like 2) est un facteur de transcription intervenant dans la réponse anti-oxydante. Une activation de la voie NRF2/KEAP1 était observé dans les CHC (Guichard *et al.*, 2012). Lorsqu'il est activé, NRF2 se dissocie de KEAP1, migre vers le noyau et active la transcription de gènes antioxydants ; ces derniers donnent une survie avantageuse aux cellules tumorales.

6.2- Altérations épigénétiques

Au cours de leur transformation, les cellules tumorales accumulent des anomalies génétiques mais également épigénétiques. Les dérégulations épigénétiques, en général réversibles, sont définies comme des changements héréditaires de l'expression des gènes sans modification de la structure primaire de l'ADN lui même. Ces modifications épigénétiques incluent la méthylation de l'ADN, les modifications des protéines histones et l'expression dérégulée des ARNs non codant.

6.2.1- Profil de méthylation de l'ADN dans le CHC

Le niveau de méthylation de l'ADN au niveau des cytosines des ilots CpG (Cytosine-phosphate-Guanine), situés dans la région promotrice de certains gènes, est un régulateur important de l'expression dans le génome humain. Dans les cancers, en particulier dans les CHC, une hypométhylation globale de l'ADN est généralement observée (Lin et al., 2001). Cette hypométhylation, à l'origine d'une instabilité génomique, a été corrélée au grade histologique et à la taille des tumeurs mais n'est pas retrouvée dans les tissus adjacents à la tumeur et les tissus précancéreux comme le foie cirrhotique (Lin et al., 2001). En réalité, si l'ADN apparaît globalement hypométhylé, certaines régions génomiques, en particulier les promoteurs de certains gènes suppresseurs de tumeurs, apparaissent hyperméthylés. C'est le cas notamment du gène SOCS-1 (Suppressor Of Cytokine Signalling 1), régulateur négatif de la voie de signalisation JAK/STAT , réprimé dans plus de 60% des CHC (Yoshikawa et al., 2001). Les promoteurs des gènes APC et E-cadherine sont hyperméthylés, respectivement,

dans 53% et 49% de CHC (Yang et al., 2003). De plus de la méthylation des gènes suppresseurs de tumeurs p14, p15, p16-INK4, RASSF1a, CASP8.

Un des mécanismes proposé responsable des modifications du profil de méthylation dans les cancers est l'expression aberrante de certaines DNA méthyltransférases (DNMT). Ainsi, il a été démontré que la DNMT1 « méthylase de maintenance », responsable de la transmission du profil de méthylation de la cellule mère aux cellules filles au cours de la réplication de l'ADN, DNMT3A et DNMT3B (capable de méthyler de novo l'ADN) sont significativement surexprimé dans des échantillons de CHC comparés à des échantillon du foie non tumoraux (Saito et al., 2003; Oh et al., 2007).

6.2.2- Modification des histones et remodelage chromatinien

Les extrémités N-terminales non structurées des histones pointent à l'extérieur de la particule nucléosomale cœur et sont la cible d'enzymes qui les modifient. Les modifications des histones permettent de passer d'une chromatine transcriptionnellement active à une chromatine réprimée, d'abord de façon réversible (acétylation/dés-acétylation), puis d'une façon plus stable (méthylation) (Jenuwein, 2001). Une altération dans une des modifications des histones peut faire pencher la balance de la régulation de l'expression des gènes vers des défauts de transcription, prolifération, apoptose, réparation de l'ADN puis en fin de compte à une transformation cellulaire et une croissance maligne.

La surexpression de l'histone méthyltransférase EZH2, membre du complexe Polycomb PRC2 responsable de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27Me3), corrélée à une répression transcriptionnelle, contribue à la transformation maligne et au mauvais pronostic dans le CHC (Sudo et al., 2005; Chen et al., 2007). D'autre part, la répression des régulateurs négatifs de la voie Wnt par EZH2 induit l'activation constitutive Wnt/b-catenin et par conséquent une prolifération cellulaire dans le CHC (Cheng et al., 2011).

La structure chromatinienne est modulée par plusieurs facteurs induisant des changements conformationnels au sein du nucléosome mais aussi au niveau de larges domaines de la chromatine. Ces facteurs s'organisent en complexes de remodelage ATP-dépendants. Ils sont capables de modifier la structure nucléosomale, en partie grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, ils favorisent un espacement

régulier des nucléosomes pendant l'assemblage de la chromatine et sont capables de faire "glisser" des nucléosomes sur de l'ADN dans les régions transcrites ou lors de la réplication.

Des études ont montrés, d'une part, la surexpression de certain complexe de remodelage tel que l'helicase RuvB-like 2 (RUVBL2) qui contribue à la transformation maligne des cellules dans les CHC (Rousseau et al.,2007). D'autre part la sous-expression des sous unités catalytiques BRG et BRM du complexe SWI/SNF (Switching defective/sucrose non-fermenting) est fréquemment observée dans les CHCs (Endo et al.,2013).

De plus, des analyses de séquençage ont identifié des modifications fréquentes dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. En particulier, les mutations somatiques récurrente inactivatrices d'*ARID1A*, d'*ARID2* et *SMARCA4* ont été observées dans environ 10% des CHC (Li et al., 2011; Fujimoto *et al.*, 2012; Guichard *et al.*, 2012). Les mutations récurrentes dans les gènes *MLL* (Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia, 2%), *MLL2* (4,5%), *MLL3* (1%) et *MLL4* (7%) ont également été identifiés (Cleary et al., 2013). Ces gènes codent la méthyltransférase H3K4 (histone H3 lysine 4) qui est impliquée dans la méthylation, l'acétylation et le remodelage des nucléosomes. La fréquence des mutations inactivatrices implique le rôle principal des complexes de remodelage dans le développement des CHCs.

6.2.3- Dérégulation de l'expression des microARN

Les microARN(miR) constituent une famille d'ARN endogènes de petite taille (environ 22 nucléotides), fonctionnels et non codants. Les miRNA sont exprimés de façon tissu-spécifique, ils régulent l'expression génique en agissant sur la traduction et la dégradation des mRNA (Saito et al., 2013). Suite à leur découverte, les études ont montrées l'implication des miRs dans un grand nombre de fonctions physiologiques essentielles telles que le développement, la croissance, la prolifération, l'apoptose, la différenciation cellulaire et la régulation du cycle cellulaire (Ambros, 2004; Bartel 2004; Lenkala et al., 2014). A l'heure actuelle, l'implication de miARN dans les différentes étapes de la cancérogénèse est unanimement admise. Dans une étude menée par Murakami et al, le profil d'expression de gènes miRNA dans 25 cas de CHC, en étudiant en parallèle le tissu non tumoral, et dans 9 cas d'hépatites chroniques ont

montrés que les gènes de 3 miRNA (miR-224, miR-18, et pre-miR-P18) sont apparus surexprimés dans les échantillons de CHC par rapport aux tissus non tumoraux et les gènes de 5 autres miRNA (miR-199a*, miR-199a, miR-200a, miR-125a, miR-195) sont apparus sous-exprimés dans ces mêmes échantillons par rapport aux tissus non tumoraux. Avec ces 8 miRNA, Murakami et al. obtiennent une précision de la prédiction de CHC de 97,8 % (Murakami et al., 2006) .

Certains miARNs peuvent agir comme des gènes suppresseurs de tumeur ou comme des oncogènes en fonction des cibles géniques qu'ils contrôlent. Par exemple, dans les CHC, la sous-expression des gènes miR16, miR29, miR101, miR-122, miR125b, et miR193b ciblant des régulateurs positifs du cycle cellulaire et des effecteurs anti-apoptotique contribue à la transformation maligne ainsi qu'à la progression tumorale. A l'inverse, la sur-expression d'autres gènes miRNA qualifiés d'oncomiRs tels que miR-221 et miR-423-3p, ciblant des régulateur négatifs et des facteurs pro-apoptotiques favorise une perte de contrôle du cycle cellulaire (Chu et al., 2014).

En outre, EZH2 exerce son effet pro-métastatique par la répression de multiple microRNAs tels que miR-101, miR-125b, miR-139-5p et miR-200b (Au et al., 2012) .

6.2.4-Longs ARN non codants ou lncRNA

Les lncRNA sont des transcrits de plus de 200 nucléotides qui ne codent pas pour des protéines. Ils sont retrouvés dans l'ensemble des tissus, certains étant exprimés de façon tissu spécifique (Mercer et al.,2008). Ils constituent un groupe de taille très hétérogène, certains pouvant s'étendre sur plusieurs dizaines de kilobases (kb). Étant donné leurs contributions aux processus qui régulent l'expression des gènes, une altération du niveau d'expression des lncRNA est impliquée dans le processus tumorigène. En effet, de nombreuses études démontrant une dérégulation des lncRNA dans divers types de cellules cancéreuses suggèrent que les lncRNA peuvent agir comme des suppresseurs de tumeurs ou des oncogènes potentiels (Shi et al., 2013). Dans les CHCs une surexpression de lncRNA HEIH (High Expression In Hepatocellular carcinoma) est significativement associée à la progression tumorale et un mauvais pronostic. Une surexpression de HOTAIR (HOX Transcript AntisenseIntergenic RNA) et MALAT1 (Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma

Transcript 1) est associée à l'état métastatique dans les CHCs et peut servir comme marqueur pronostique.

7- Classification moléculaire des CHCs

Les CHCs constituent un groupe de tumeurs hétérogènes, qui diffèrent par les facteurs de risque et les altérations génétiques. Afin d'établir des corrélations génotype/phénotype et d'identifier des voies biologiques dérégulées dans les CHCs, une étude globale aux niveaux transcriptomique sur une grande série de tumeurs, a permis de définir 6 sous-groupes de CHC (notés G1 à G6), qui sont corrélés aux données cliniques et génétiques. Les principaux déterminants de cette classification des CHC sont l'instabilité chromosomique, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) et les altérations génétiques (Figure 8).

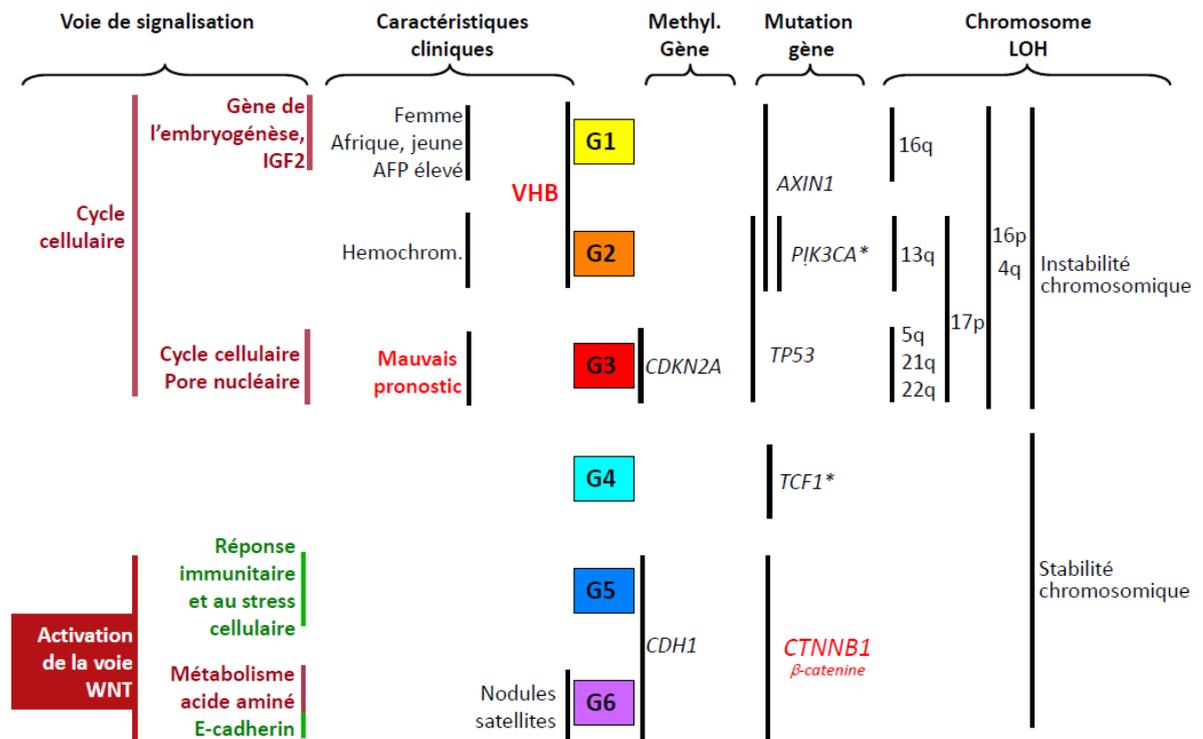


Figure 8. Classification transcriptomique des CHC (Boyault et al., 2007)

Ainsi, Les CHCs du sous-groupe G1 sont associés à une infection par le VHB avec un faible nombre de copie d'ADN viral et une surexpression de gènes exprimés normalement à l'état fœtal et de gènes soumis à empreinte parentale. IGF2 et IGF1R

sont aussi surexprimés. Le sous-groupe G2 inclut des tumeurs infectées par le VHB avec un nombre de copie élevée d'ADN viral, mutées TP53 et PIK3CA.

Une activation de la voie Akt est commune aux deux sous-groupes G1 et G2. Les tumeurs du sous-groupe G3 sont mutés TP53, non-infectées par le VHB et surexpriment des gènes contrôlant le cycle cellulaire. Le sous-groupe G4 constitue un groupe de tumeurs hétérogènes parmi lesquelles on trouve les adénomes et les carcinomes mutés TCF1. Les tumeurs des sous-groupes G5 et G6 sont fortement corrélées aux mutations CTNNB1. De plus, une activation plus importante de la voie Wnt ainsi que la présence de nodules satellites et une sous-expression de la E-cadhérine est observée dans les tumeurs du sous-groupe G6 (Boyault et al., 2007).

2000), au facteur de transcription ETS-2 (Baker et al., 2003), possède un site CREB (Atlas et al., 2001) et peut être méthylé (Magdinier, 2000; Mueller & Roskelley, 2002).

Différents variants dus à des phénomènes d'épissage alternatif de l'ARN pré-messager de *BRCA1* ont été décrits (Figure 9). Certains d'entre eux seraient non fonctionnels et représenteraient le produit d'un phénomène d'épissage aberrant suite à une instabilité génomique dans les tumeurs où ils ont été identifiés (Palagyi et al., 2010 ; Xu et al., 1997) . Ainsi, les variants ayant une terminaison prématurée, résulteraient d'une régulation cellulaire subtile survenant devant un changement du mode d'épissage alternatif engendrant des variants qui seraient dégradés par la voie de dégradation des ARNm portant un codon stop précoce. Les ARNm pleine longueur de *BRCA1*, les variants $\Delta(9,10)$, $\Delta(11q)$ et $\Delta(9,10,11q)$ représentent les variants d'épissage de *BRCA1* prédominants parce qu'ils ont été rapportés par plusieurs études dans une variété de tissus, dans des conditions différentes (Palagyi et al., 2010).

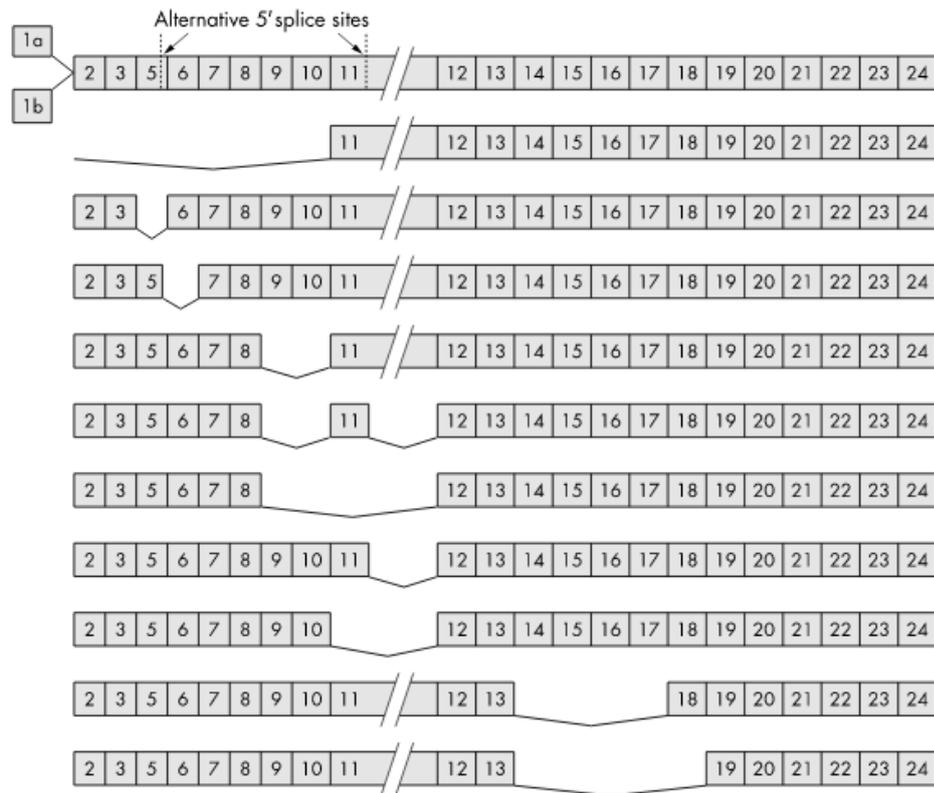


Figure 9 . Variants d'épissage de *BRCA1* qui codent pour une protéine fonctionnelle (Palagyi et al., 2010).

copie sauvage de la protéine p53. Bien que BRCA1 ne possède pas de fonction spécifique dans le cytoplasme, son élimination du noyau, en réponse aux lésions de l'ADN, serait requise lors de l'arrêt du cycle cellulaire afin de prévenir un conflit entre la réponse aux lésions de l'ADN dépendante de BRCA1 et celle dépendante de p53. Un échec de l'exportation de BRCA1 dans le cytoplasme durant l'arrêt du cycle cellulaire pourrait créer des signaux contradictoires générant ainsi une cellule instable (Feng et al., 2004).

2- Fonctions de BRCA1

Depuis son clonage, la fonction précise de BRCA1 demeure mal élucidée et présente un paradoxe fonctionnel et plusieurs énigmes. La protéine BRCA1 est exprimée de manière ubiquitaire et elle a la capacité d'interagir avec de nombreuses protéines impliquées dans des fonctions biologiques très variées comme l'ubiquitination, la transcription, le remodelage de la chromatine, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la signalisation/réparation des dommages à l'ADN (Deng & Brodie, 2000 ; Venkitaram, 2001).

2.1- Réponse globale aux dommages de l'ADN

En réponse aux lésions de l'ADN, la cascade de signalisation est organisée en différents niveaux : les protéines sentinelles, qui permettent la détection des lésions ; les transmetteurs du signal et les protéines effectrices, qui permettent d'orienter la réponse cellulaire vers la mort cellulaire ou vers la réparation.

2.1.1- Détection et signalisation des dommages d'ADN

Les tumeurs, qui se développent chez les individus porteurs d'une mutation germinale de *BRCA1*, présentent une fonction nulle de ce gène, car l'allèle sauvage y est systématiquement invalidé par perte de l'hétérozygotie (Smith et al, 1992). Cette observation constitue un argument très fort en faveur d'une activité de gène suppresseur de tumeur de *BRCA1*. Scully *et al.* ont évoqué, pour la première fois en 1977, la possibilité que le gène *BRCA1* pourrait faire partie d'une famille fonctionnelle de gènes récemment appelés *caretakers*. Ces gènes assurent un contrôle qualitatif de l'intégrité du génome, car ils sont capable d'informer la cellule sur l'existence de lésions dans son ADN et, éventuellement, de participer aux processus de réparation (Kinzler & Vogelstein, 1997). Cette hypothèse est fondée sur l'interaction de BRCA1 avec de multiples partenaires protéiques et sur le fait que la localisation et l'état de phosphorylation de la protéine

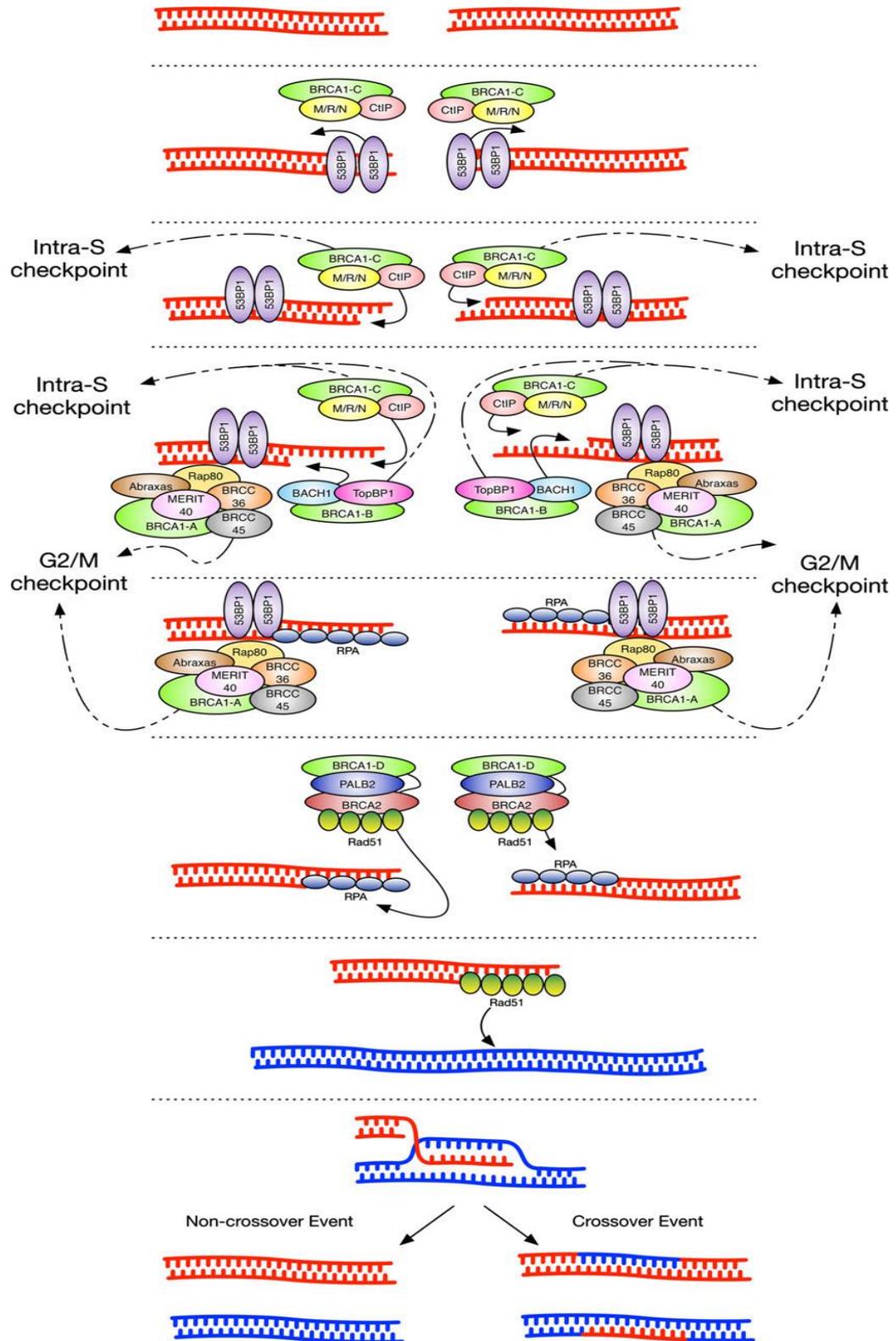


Figure 12. Rôle de BRCA1 dans la recombinaison homologue et le contrôle du cycle cellulaire. (Savage et Harkin 2014)

D'autres interaction avec les protéines FANC responsables de l'Anémie de Fanconi, (FANCD1, FANCN, FANCI), impliquent BRCA1 dans la réparation, par excision de nucléotides, des pontages interbrins engendrés par certaines drogues telles que la Mitomycine C et le cisplatine (Figure 13) (Venkitaraman, 2004, D'Andrea, 2013). Les protéines FANC sont mutées dans l'anémie de Fanconi, une maladie autosomique récessive où on retrouve une augmentation de l'instabilité chromosomique, une diminution progressive de tous les éléments cellulaires du sang et une susceptibilité aux cancers (Taniguchi, 2002).

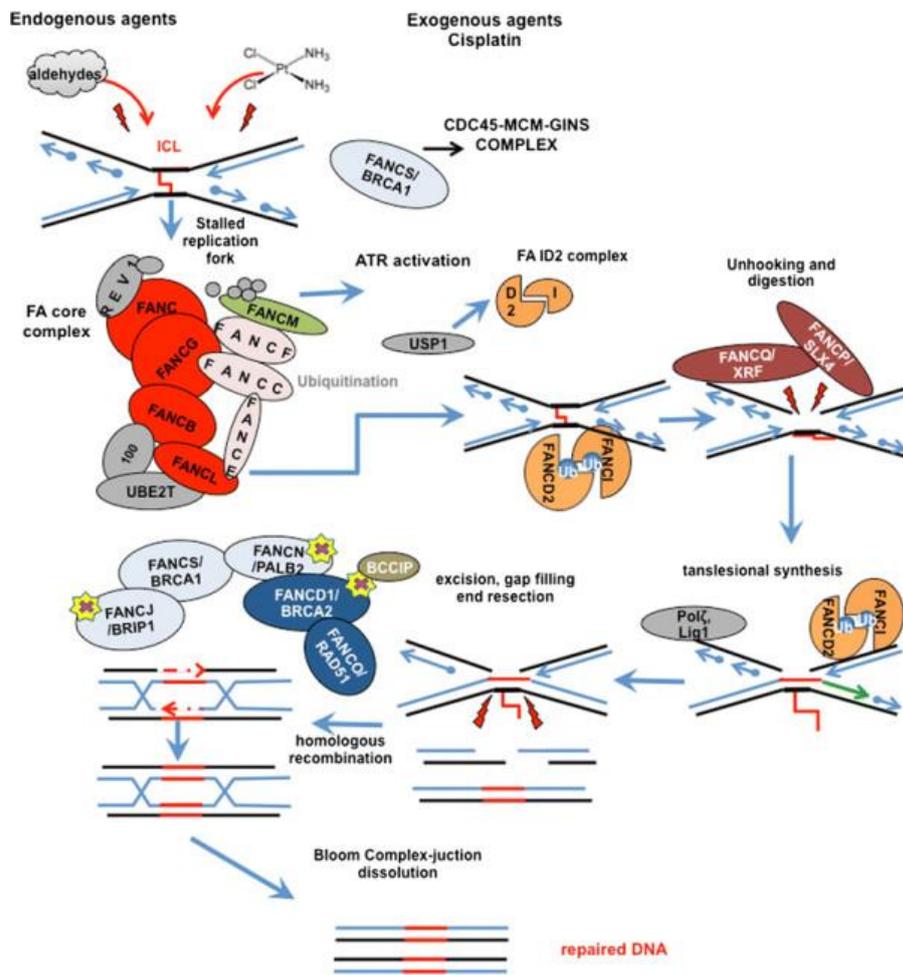


Figure 13. coopération des voies de l'Anémie de Fanconi et BRCA1 dans la réparation des pontages inter-brins (D'Andrea, 2013).

En plus BRCA1 par son interaction avec hMSH2, hMSH3 et hMSH6 intervient dans la réparation de mauvais appariements de l'ADN. Ces protéines font partie d'un complexe de surveillance du génome associé à BRCA1 appelé BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex) (Aprelikova et al., 2001).

BRCA1 interagit avec nombreux facteurs de transcription tels que p53, CtIP, c-myc, ZBRK1, ATF, E2F et STAT1 (transducteur de signal) et module leurs activités (Zheng et al., 2000) soit par activation ou répression de leurs transcription (Figure 18). Ainsi, il a été démontré que la surexpression d'un BRCA1 sauvage, et non d'un mutant associé au cancer, induit l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 WAF1/Cip1, de façon p53-indépendante (Somasundaram et al., 1997). Cette induction est vraisemblablement due à l'interaction de BRCA1 et de STAT1 (Ouchi et al., 2000). Il a aussi été démontré que BRCA1 interagit avec p53 et stimule la transactivation p53-dépendante, incluant la transactivation de p21 et de Bax (Ouchi et al., 1998, MacLachlan et al., 2002). De plus, BRCA1 stabilise p53 via la régulation du niveau d'expression de p14 ARF (Somasundaram et al., 1997) et via la régulation de la phosphorylation de p53 (Fabbro et al., 2004). Enfin, BRCA1 réprime la transcription induite par c-MYC, ce qui inhibe la transcription de hTERT (transcriptase inverse de la télomérase humaine) et renverse l'activité transformante de c-MYC (Wang et al., 1998, Li et al., 2002).

2.4- Remodelage de la chromatine

BRCA1 joue un rôle critique dans la réponse aux cassures double brins d'ADN. Dans les minutes qui suivent l'apparition d'un dommage, l'histone H2AX devient phosphorylée et forme des foci aux sites de cassures (Paull et al., 2000). BRCA1 est recruté à ces foci quelques heures avant d'autres facteurs tel que RAD50 et RAD51, ce qui suggère que BRCA1 et H2AX initient la réparation par une modification locale de la structure de la chromatine de façon localisée permettant l'accès des protéines de réparation aux sites endommagés. Cette hypothèse est supportée par la démonstration que BRCA1 est un composant du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF et qu'il s'agit d'une des formes prédominantes de BRCA1 cellulaire (Bochar et al., 2001). Les enzymes du complexe SWI/SNF sont recrutées entre autre aux sites actifs de la transcription et les domaines d'interaction à l'ADN de certaines protéines sont connus pour cibler le complexe à des sites précis. Comme le domaine BRCT de BRCA1 lie les CDB, certains ont émis l'hypothèse que BRCA1 recrute le complexe SWI/SNF à ces sites en particulier (Cantor et al., 2001).

processus inclus la dégradation de RAD51 pour une régulation adéquate de la RH (Bennett & Knight, 2005). Il est donc possible, compte tenu de ces différentes observations, que l'ubiquitination médiée par BRCA 1 aux sites de dommages à l'ADN puisse faire partie du processus de signalisation/réparation des lésions essentiel au maintien de la stabilité du génome.

3- BRCA1 et tumorigenèse

L'existence en pathologie humaine de syndromes héréditaires rares prédisposant à la survenue de cancers a permis d'établir le lien entre les mutations des gènes impliqués dans la réparation et le cancer. Des mutations dans la presque totalité des gènes codant pour les protéines impliquées dans des mécanismes de réparation de l'ADN sont retrouvées au niveau somatique ou prédisposent notamment aux cancers du sein et de l'ovaire. Les mutations des gènes BRCA1 ont un potentiel carcinogénique important et y sont responsable de presque 50% des cancers impliquant un défaut de réparation des cassures double brin par recombinaison homologue. les cellules tumorales présentant des altérations dans le gène sont sensibles aux molécules bloquant la réplication de l'ADN ainsi qu'aux agents alkylants (Figure 14) (Konstantinopoulos et al.,2015).

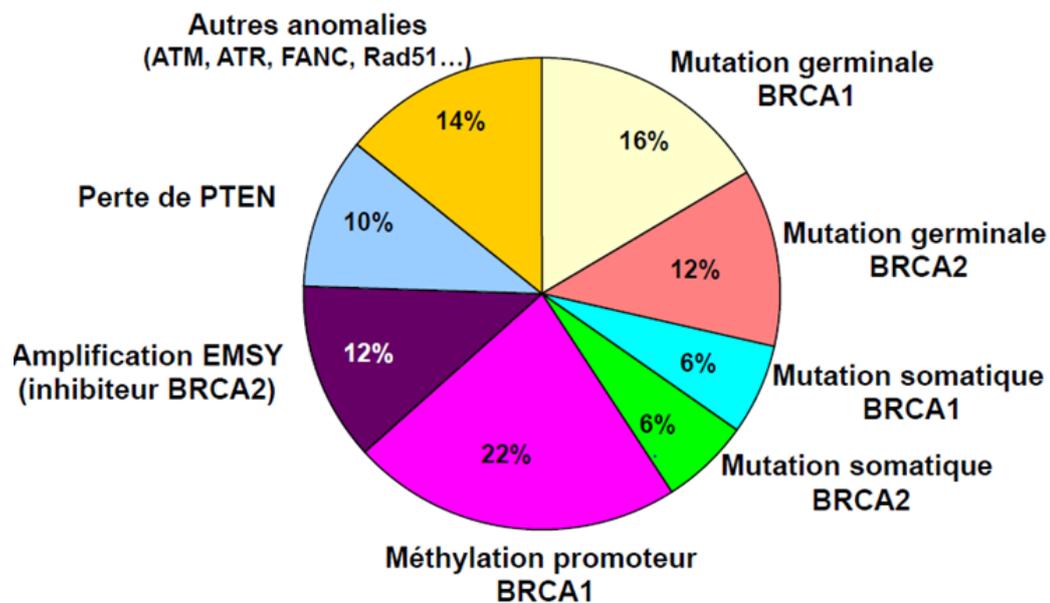


Figure 14: Fréquence des changements génétiques et épigénétiques impliquant des gènes de réparation par recombinaison homologue (Konstantinopoulos et al.,2015).

La prédisposition des femmes au cancer du sein est due à la présence dans les cellules épithéliales mammaires d'une mutation germinale inactivatrice de l'un des deux allèles du gène *BRCA1*. Ces femmes ont donc plus de risques de perdre leur seul allèle fonctionnel restant comparativement à une personne non porteuse chez qui deux évènements génétiques sporadiques devraient survenir dans une même cellule pour altérer les deux allèles d'un gène essentiel au bon fonctionnement cellulaire (Knudson et al., 2003). En effet, au cours de la puberté, en réponse aux oestrogènes, ces cellules prolifèrent rapidement (Hilakivi-Clarke, 2000) et ce haut taux de réplication cellulaire, et donc le besoin important de vérification et réparation de l'ADN nouvellement répliqué, pourrait forcer la capacité de réparation de l'ADN (Beger et al., 2001). Il a été démontré que les altérations génomiques somatiques les plus fréquentes surviennent dans les éléments répétitifs des gènes *BRCA1* causant ensuite une perte d'hétérozygotie (LOH) (Lasko, 1991).

La diminution d'expression de *BRCA1* associée au statut hétérozygote et due à la présence d'un seul allèle sauvage est également observée dans une certaine proportion de cancers sporadiques. Effectivement, jusqu'à 70% de ces cancers auraient perdu complètement l'expression d'un allèle de *BRCA1* (Futreal et al., 1994). La réduction de la présence de la protéine *BRCA1* dans les cellules cancéreuses d'origine sporadique pourrait s'expliquer par l'inhibition de sa transcription par un mécanisme connu d'hyperméthylation du promoteur (Mancini et al., 1998; Rice, 2000; Satterwhite et al., 2000) ou par l'altération des protéines régulant sa transcription (Beger et al., 2001). Finalement, des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation et l'ubiquitination, pourraient être inhibées et laisser *BRCA1* et *BRCA2* inactifs (Arizti et al., 2000; Tibbetts, 2000).

4- *BRCA1* et spécificité tissulaire

Comment un gène ubiquitaire et jouant un rôle central dans la réparation de l'ADN, comme *BRCA1*, prédispose quasi uniquement au développement du cancer du sein et de l'ovaire? Plusieurs hypothèses ont été élaborées pour expliquer cette spécificité tissulaire.

Les effets de *BRCA1* ont été catégorisés en deux classes d'évènements; l'effet dit proximal (primaire) et l'effet dit distal (secondaire) (Monteiro, 2003). L'évènement proximal qui distingue le cancer du sein et de l'ovaire des autres cancers serait une

différence dans les taux de perte d'hétérozygotie dérivée de la recombinaison mitotique au locus de *BRCA1*. Les événements dits distaux seraient ceux qui régulent le sort d'une cellule devenue *BRCA1*^{-/-} : deviendra-t-elle une cellule néoplasique ou entrera-t-elle en apoptose. Le phénomène de perte d'hétérozygotie est beaucoup plus fréquent dans les tissus mammaire et ovarien contrairement à d'autres tissus et pourrait expliquer cette pénétrance si élevée. Plusieurs facteurs sont déterminants dans le phénomène de LOH tel que le taux de recombinaison mitotique et méiotique (plus élevé chez la femme (Holt et al., 1999) ainsi que l'environnement en chromatine (l'expression de *BRCA1* et donc son environnement en chromatine varie lors de plusieurs étapes du développement de la glande mammaire (Marquis et al., 1995; Mueller & Roskelley, 2002). La présence d'éléments répétitifs dans l'ADN est aussi un facteur déterminant dans le LOH : environ 41 % de la séquence du gène *BRCA1* est composé de séquences Alu *versus* environ 10% pour tout le génome (Smith et al., 1996). Les œstrogènes auraient aussi un rôle important à jouer dans cette spécificité tissulaire. L'inhibition de la production d'estrogène par les inhibiteurs d'aromatases ou l'inhibition du récepteur par des anti-estrogènes diminuent la carcinogénèse (Powles, 1999; Goss, 2003) . Chez la femme porteuse d'une mutation dans *BRCA1/2*, une ovariectomie pratiquée avant l'âge de 35 ans réduit les risques de cancer du sein de près de 75% (Johannsson et al., 1998). De plus, des facteurs cliniques qui reflètent une exposition accrue à l'estrogène comme des menstruations précoces, une ménopause tardive ou une thérapie hormonale augmentent les risques de développer le cancer, ce qui suggère un rôle clé de l'estrogène dans le développement tumoral (Beral et al., 1999).

5- Rôle de BRCA1 dans la résistance aux traitements génotoxiques

Dans une cellule normale les dommages liés à l'ADN induisent un arrêt de prolifération et une mort cellulaire par sénescence ou par apoptose. Quant à la cellule cancéreuse, elle évolue en continuant à se répliquer, surmontant l'arrêt de la prolifération induit par les dommages à l'ADN sans nécessairement diminuer la cause de ces dommages.

Nombreuse études ont démontré l'implication de *BRCA1* dans la résistance à nombreux agents couramment utilisés en chimiothérapie, tels que la mitomycin C, l'étoposide, la bléomycine et les composés du platine cisplatine et le carboplatine (Bhattacharyya et al.,2000; Moynahan et al., 2001; Quinn et al.,2003). En outre, une

cassure simple brin se transforme en cassure double brin. Ce type de cassure est réparé par recombinaison homologue. En effet dans les cellules déficientes en BRCA1, le défaut de réparation par recombinaison homologue associée à l'inhibition de PARP1 induit de façon sélective et massive la mort cellulaire selon un mécanisme de synergie létale qui est la létalité synthétique (Bryant et al., 2005; Ruscito, 2016).

Une approche thérapeutique complémentaire a été d'exploiter cette faiblesse de la cellule tumorale que constitue la perte des 2 allèles des gènes BRCA1 ou BRCA2. En inhibant dans ces cellules l'enzyme PARP1, impliquée dans la réparation des cassures simple-brin, les molécules de thérapie ciblée (olaparib, véliparib) permettent le maintien de cassures simple-brin, entraînant l'arrêt des fourches de réplication et l'induction de cassures double-brin, une instabilité génomique sévère et une cytotoxicité (Figure 15). Les essais de phases I et II ont démontré une efficacité remarquable en termes de réponse pathologique chez les patientes atteintes de tumeurs du sein ou de l'ovaire mutées pour BRCA1 et/ou BRCA2 au niveau constitutionnel (Caestecker et al., 2013).

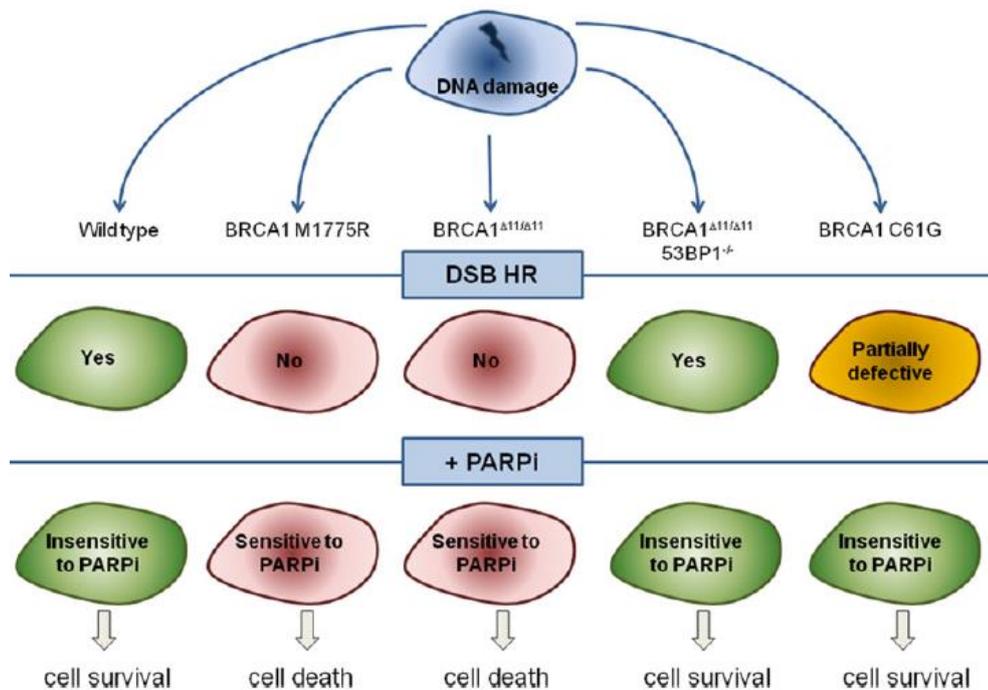


Figure 15. Réponse aux inhibiteurs de la PARP chez les patientes BRCA1-/- (Caestecker et al., 2013)

MATERIEL
ET
METHODES

II. Matériel et méthodes

1- Lignées et cultures cellulaires

Neufs lignées d'hépatocarcinomes: HepG2, Hep3B, Huh7, FOCUS, Mahlavu, PLC/PRF5, SNU398, SNU449 et SNU475 et une lignée de fibroblastes MRC5 disponibles et stockées d'une manière régulière dans de l'azote liquide, par le personnel de notre équipe, ont fait l'objet de notre étude. Ces lignées cellulaires sont toutes commercialisées chez American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Les cellules sont cultivées sur des flasks, boîtes de pétri ou plaques provenant de Corning Life Sciences Inc (USA). Les milieux de culture Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, Opti-MEM medium, penicillin/streptomycin, trypsin-EDTA, fetal calf serum (FCS), PBS (Phosphate Buffered Saline) sont commercialisés par GIBCO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Les réactifs utilisés pour les SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) et les Western Blots sont produits par Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Les anticorps spécifiques et les kits ECL utilisés sont commercialisés par Santa Cruz (USA).

Les cellules des lignées HepG2, Hep3B, Huh7, Focus, Mahlavou, PLC et MRC5 sont cultivées dans le milieu DMEM Hight Glucose, 4,5g/l. Les cellules des lignées Snu398, Snu449 et Snu475 sont cultivées dans le milieu RPMI 1640. Les milieux sont supplémentés de 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 1 % d'acides aminés non essentiels et 1 % d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine). Les cellules de toutes les lignées sont cultivées sur plastique à 37°C dans une étuve saturée en humidité sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Toutes les lignées cellulaires étaient régulièrement testées pour la contamination par les mycoplasmes (Invitrogen, Toulouse, la France).

2- Extractions des protéines

Les cellules cultivées en phase exponentielle sur boîtes de 10 cm sont rincées au PBS (1x) froid, et sont décollées par grattage dans 1ml de PBS, puis centrifugées à 15 000 rpm. Le culot cellulaire est repris dans un double volume de tampon de lyse RIPA

(RadioImmunoPrecipitationAssay): Tris-Hcl pH 7,4 50 mM ; sodium desoxycholate 0,25% ; NaCl 150 mM contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (tablette « *complete mini EDTA-free* », Roche). La suspension est maintenue dans la glace pendant 30 min afin d'obtenir la lyse complète des cellules. Le lysat est ensuite centrifugé à 13000 rpm, 30 min à 4°C pour sédimenter les débris cellulaires. Les extraits de protéines nucléaires ont été obtenus en utilisant le kit NE-PER extraction kit (Pierce) suivant les instruction du fournisseur.

Un petit aliquote de lysats cellulaires et nucléaires a servi pour le dosage des protéines par Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™) utilisant la méthode de Lowry 1951. Les échantillons à doser sont comparés à une gamme de concentrations d'Albumine de sérum bovin (BSA) (comprenant les concentrations 0 ; 1 ; 2 ; 8; et 16 µg/µL). La densité optique du produit de la réaction colorimétrique est mesurée au bout de 15 min à 562 nm avec un spectrophotomètre en plaque 96 puits. Les échantillons sont utilisés immédiatement ou conservés à -80 °C.

3- SDS PAGE et Western blot

Les protéines sont d'abords séparées en présence d'un marqueur de taille (sigma-Aldrich) par électrophorèse en condition dénaturante SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). L'équivalent de 50 µg de protéines par échantillon , préalablement additionné de tampon de charge 5x (Tris-Hcl pH6.8 ; SDS 10% ; glycerol ; β-mercaptoéthanol; bleu de bromophénol), puis dénaturé 10 min à 95°C dans un bloc chauffant, sont séparés sur un gel de polyacrylamide de 6 % 2 heures à 100V. Après séparation électrophorétique les protéines sont alors électrotransférées vers une membrane de PVDF (PolyvinylideneDiFluoride) (Bio-Rad,Hercules, CA, USA) une heure à 200mA. Afin de prévenir toute fixation aspécifique de l'anticorps primaire les sites de liaisons aspécifiques de la membrane contenant les protéines transférées sont saturés pendant 1 h à température ambiante sous agitation dans du TBS-T (Tris-HCl 25mM pH7.5, NaCl 150mM, tween20 0.1%) contenant 5 % de lait écrémé en poudre. Ainsi, les membrane saturées sont incubé sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-BRCA1 (Santa Cruz, USA), dilué au 1/500.

Après trois lavages successifs, la détection de l'interaction protéine-anticorps primaire est permise par l'incubation, à température ambiante pendant 1 heure, de la membrane avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin marqué à la peroxydase (Goat anti-rabbit Horse Radish Peroxydase) dilué au 1/1000. Le complexe [protéine-anticorps primaire-anticorps secondaire] est révélé par le kit ECL (Enhanced Chemiluminescence) et les protéines d'intérêt sont visualisées par le système d'acquisition d'image Fusion FX7. Le contrôle de dépôt protéique est réalisé par la détection de la calnexine dans les mêmes conditions.

4- Test de cytotoxicité

4.1- Traitement des cellules par les drogues

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

La toxicité cellulaires de trois drogues largement utilisées en chimiothérapie, commercialisées par sigma, et affectent la structure de l'ADN telles la Mitomycine C, le Cis-platine et le Melphalan a été évaluée par le test de cytotoxicité. Ces trois molécules qualifiées d'agents intercalant forment des ponts inter-brins (également dénommés « adduits » ou « *Interstrand-Crosslinks* », ICL) qui consistent en un lien covalent entre les 2 brins de l'ADN, générant des distorsions prononcées de la double hélice. La conséquence directe est que la réplication est rendue impossible : le « réplisome » ne peut plus progresser, car les brins ne peuvent plus être séparés, ce qui engendre un blocage de la fourche et des cassures d'ADN double brin (McHugh et al., 2000, Tercero et al., 2001, Deans & West, 2011).

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à des densités relatives au pouvoir prolifératif de chaque lignée. Après 24h d'incubation à 37°C (5 % de CO₂) les cellules de chacune des lignées ont été traitées à des concentrations croissantes, obtenues

par des dilutions en cascade, par les différentes drogues. Les plaques sont ensuite mises en culture à 37°C pendant 96h.

Pour chaque lignée un ensemble de trois expérience indépendante et des triplicats de chaque concentration ont été réalisées.

4.2- Evaluation de la viabilité cellulaire au bleu de méthylène

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

une valeur de 100% a été affectée aux puits témoin sans traitement et la concentration de drogue qui réduit le nombre de cellules de 50% après 96h de traitement (IC50) a été calculée par le GraphPadPrism.

5- Transfection cellulaire

5.1- Transfection des cellules par les siRNA

Deux siRNA ON-TARGETplus SMARTpool siRNA (L003461-00-0020) et Four Single ON-TARGETplus siRNA (L003461-00-00-20) ciblant le messenger BRCA1 et un siRNA ON-TARGETplus siCONTROL Nontargeting pool (D-001810-10-20) ne ciblant aucun gène en particulier ont été utilisés dans la transfection transitoire des cellules de la lignée Snu449. Tous les siRNA proviennent de DharmaconResearch (Lafayette, CO, USA).

Les cellules de la lignées Snu449 ont été directement transfectées en plaques 6 puits à raison de 100.000 cellules par puits dans le milieu d'Optimem dépourvu de sérum et d'antibiotiques. Cette quantité de cellules assure que les puits contrôles non traités

n'atteignent pas la confluence en fin d'expérience. Les siRNAs sont dilués à une concentration finale de 50nM et transfectés dans les cellules en utilisant un vecteur lipidique, Hiperfect (Qiagen, Hilden, Germany), suivant les recommandations du fournisseur. Après 6h d'incubation le milieu de transfection a été complété avec du SVF à une concentration finale de 10% et remplacé après 24h de transfection avec du milieu complet. Après 72h de transfection les cellules ont été trypsiné, comptées et ensemencées sur des plaques 96 puits et traitées à des concentrations croissantes de Mitomycine C. Après 96h d'incubation la viabilité cellulaire des cellules transfectées a été évaluée comme démontré précédemment . Un nombre de cellules transfectées a servi pour l'évaluation du Knockdown au niveau transcriptionnel par RTqPCR et au niveau traductionnel par western blot.

5.2- Transfection des cellules par les vecteurs pCMVmyc

Les vecteurs plasmidiques pCMVmycBRCA1 contenant l'ADNc du BRCA1 humain sous le contrôle du promoteur de cytomégalo virus (CMV) et le plasmide pCMVmyc contrôle nous ont été généreusement fournis par le Dr İsik Yulug de l'Université de Bilkent (Ankara, Turquie).

Après 24 heures de culture sur boîte de 10 cm, les cellules de la lignée HepG2 ont été transitoirement transfectées par 5µg de plasmide en utilisant la lipofectamine 3000 (Invitrogen) comme agent transfectant selon les recommandations du fournisseurs. Après 24 heures les cellules transfectées sont soumises à un test de cytotoxicité à la Mitomycine C. L'expression de pCMVmycBRCA1 a été évaluée par western blot après 48h et 96h de transfection.

6- Etude de l'expression de BRCA1

6.1- Extraction des ARN totaux par le Trizol

Les ARNs totaux des cellules Snu449 transfectées, sont extrais par le trizol en accord avec les recommandations du fournisseur. Brièvement les cellules sont lysées, par l'ajout de 1 ml de trizol, directement dans la boîte en faisant des aller-retour avec la pipette. Après 5 minutes d'incubation, 200µL de chloroforme sont ajoutés et le tube est vortexé

afin de mélanger les deux phases. Le tube est centrifugés 15 minutes à 12 000g à 4°C et la phase translucide contenant les ARN est transférée dans un nouveau tube. Les ARNs sont alors précipités par l'ajout de 0.5ml d'isopropanol 100 % et une centrifugation 10 minutes à 18 000g à 4°C. le culot d'ARN est lavé avec de l'éthanol 75° avant d'être séché et solubilisé dans de l'eau dépourvue de RNase.

Les ARN sont dosés par la mesure de la densité optique (DO) à 260 nm (1 unité DO = 40 µg d'ARN/ml) à l'aide d'un Nanodrop. La pureté des échantillons est vérifiée par le rapport des DO 260nm / DO 280nm qui doit être compris entre 1,7 et 2,2.

6.2- Transcription inverse (RT)

Dans un premier temps les ARNm sont rétro-transcrits en ADN complémentaires en utilisant des Oligo (dt)₂₀ et la transcriptase inverse Super Script II (Invitrogen) selon le protocole du fabricant. La RT a été réalisée à partir de 500ng d'ARN totaux dans un volume de 20µl contenant un mélange d'oligo dT, 500 µM de dNTP, 4 µl du tampon de RT (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂) et 50 unités de transcriptase inverse (Prime ScriptTM Reverse Transcriptase). Le mélange réactionnel est incubé à 42°C pendant 1h. La réaction enzymatique est arrêtée par chauffage à 70°C pendant 15min. Les ARN sont dégradés à la fin de la réaction par l'ajout de l'ARNase H et incubation à 37°C pendant 15 min.

6.3- Amplification des ADNc en temps réel

Dans un deuxième temps les transcrits (ADNc) obtenus sont amplifier par PCR quantitative en temps réel avec le système LightCycler® 2.0 (Roche) en utilisant la technologie SybrGreen . La technologie SybrGreen utilise des oligonucléotides spécifiques et le SybrGreen (SYBR Qpcr premix EX Taq, Ozyme), intercalant de l'ADN double brin, permettant la détection d'un signal à chaque cycle d'amplification. Pour cela, 1 µL du produit d'amplification est ajouté à un mélange réactionnel contenant 5 µL de tampon 5X, 1,5 µL d'une solution de chlorure de magnésium à 25 mM, 1 µL de dNTPs à 5mM, 1,5 µL de chacune des amorces spécifiques *BRCA1* (Tableau 2) à 10 µM, 0.5 µL de l'enzyme Taq polymérase, 5µl Syber green et de l'eau Eau ultra pure qsp 25 µL. L'amplification en parallèle d'un gène de ménage l'ARN 18S (ARN ribosomal 18S) dont l'expression est en théorie constante a servie pour quantifier le gène d'intérêt (*BRCA1*).

La réaction de quantification en temps réel comprend 30 cycles de dénaturation à 95°C pendant 25 s, hybridation des amorces à 60°C pendant 20s et élongation des amorces à 72°C pendant 20 s.

Chaque condition expérimentale a été réalisée en triplicat (nommés RT+) et un tube supplémentaire ne contenant pas d'enzyme nous a permis de détecter d'éventuelles contaminations par l'ADN génomique (nommé RT-).

La quantification relative du niveau d'expression du gène d'intérêt a été calculée par la normalisation par rapport au gène de ménage ($\Delta Ct = Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ gène de ménage}$) puis la variance entre les 2 échantillons ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon 1} - \Delta Ct \text{ échantillon 2}$). La détermination de la variation du nombre de copie du gène d'intérêt entre les échantillons comparés ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) permet de connaître la variation du nombre de copie de l'ARNm d'intérêt entre les conditions comparées. Ainsi, le retard d'un seul cycle de Ct, donnant une différence de $2^1 = 2$, pour la condition siRNA ciblant l'ARNm d'intérêt démontre qu'il y avait deux fois moins d'ARNm codant la protéine d'intérêt dans l'échantillon.

Tableau 2. La séquence des amorces des amorces utilisées pour l'amplification génique

amorces	Sens	Anti-sens
BRCA1	5'GGAAGAAACCACCAAGGTCCAAA3' (localisation exon 20)	5' TGGGGGATCTGGGGTATCAGG 3' (localisation exon 24)
ARN18S	5'CTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAG3'	5'CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTC3'

7- Analyse du Cycle cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules de la lignée Snu449 transfectées et traitées par la MitomycineC (200nM) sont récupérées à 24h, 48h et 72h après incubation et fixées sur la nuit dans du PBS 70% éthanol à 4°C. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes, lavées une fois puis reprises dans du PBS contenant 50 mg/mL d'iodure de propidium et 100 mg/ml de RNaseA. Après 30 mn d'incubation dans l'obscurité à 37°C, la mesure du contenu en ADN des cellules est réalisée puis l'analyse de la distribution des

cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire sont effectuées par un cymomètres de type laser Accuri C6 (Becton Dickinson).

8- Analyses statistiques

Les données expérimentales sont exprimées en moyenne arithmétique (M) des n valeurs obtenues \pm la déviation standard (SD). Le test t de Student a été utilisé pour comparer les données entre les groupes. La différence est considérée statistiquement significative au risque de 5% ($p < 0.05$).

**RESULTATS
ET
DISCUSSION**

III.1- Résultats

III.1.1- La surexpression de la protéine BRCA1 dans les lignées cellulaires du CHC de type mésenchymateux

Dans une étude menée par notre équipe, l'analyse d'enrichissement des jeux de gènes (GSEA) comparée dans des tissus cirrhotiques et des tissus de CHC a révélée un enrichissement pour 13 groupes de gènes dans les tissus du CHC. Parmi ces groupes de gènes; les gènes de réparation de l'ADN, à l'opposé des tissus cirrhotiques, sont surexprimés dans les tissus du CHC. Ainsi cette signature moléculaire présente un intérêt particulier. BRCA1 est impliqué dans la réparation des cassures doubles brin de l'ADN par la reconnaissance et la signalisation des cassures et participe à leur réparation par son interaction avec de nombreux cofacteurs. Au vue de ces données, on s'est intéressé particulièrement au rôle de BRCA1 dans notre étude.

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

Ainsi, l'analyse du Western Blot montre que , de plus de son expression majoritairement nucléaire (Figure 16-a), BRCA1 est surexprimé dans 80 % des lignées de type mésenchymateux à savoir FOCUS, Mahlavu, SNU449 et SNU475. A l'opposée, BRCA1 montre une faible expression dans les lignées de type épithélial à savoir HepG2, Hep3B, Huh7 et PLC/PRF5 (Figure 16-b).

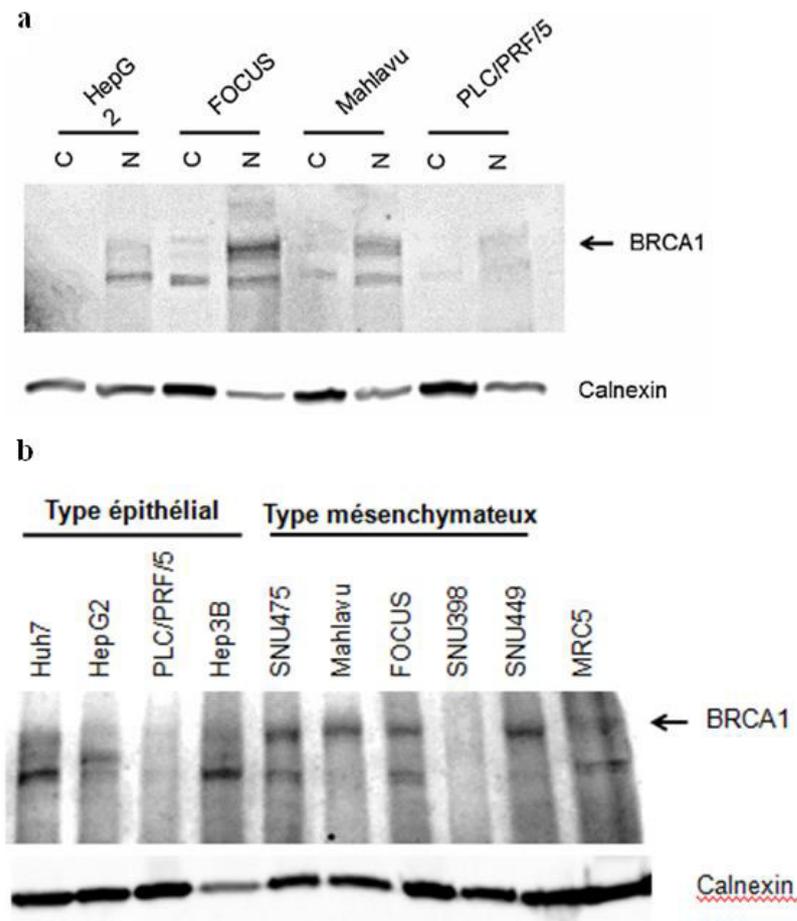


Figure 16. Profil d'expression de BRCA1. **(a)** comparaison de l'expression de BRCA1 dans les extraits cytoplasmiques et nucléaires de quatre lignées de CHC. **(b)** comparaison de l'expression de BRCA1 dans les extraits totaux des lignées de CHCs et la lignée normale de fibroblaste. 50 µg de protéines par échantillon, préalablement, dénaturé sont analysés par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant les anticorps anti-BRCA1 et anti-calnexine (comme contrôle de dépôt).

III.1.2. Résistance des cellules du CHC de type mésenchymateux aux agents pontant l'ADN

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

Les effets des agents étudiés sur la croissance globale des différentes lignées étudiées (HepG2, Hep3B, Huh7, FOCUS, Mahlavu, PLC/PRF5, SNU398, SNU449 et SNU475) ont été évalués par le test de cytotoxicité. Dans nos conditions expérimentales, on a sélectionné la lignée Huh7 comme référence pour l'évaluation de la résistance des autres lignées cellulaires de CHCs testées. En effet, la lignée Huh7 est déficiente dans la réparation des pontages interbrins à cause d'une mutation dans l'un des groupes de complémentation (FANCC) des gènes responsables de l'Anémie de Fanconi et démontre une hypersensible aux traitements testés (Palagyi et al., 2010).

Chaque test de cytotoxicité a été réalisé au moins trois fois en triplicats et la concentration pour laquelle 50 % des cellules sont vivantes après traitement (IC50) a été déterminée. Les IC50 ont été moyennées sur les 9 lignées du CHC. Le tableau 3 résume les valeurs des IC50 et la résistance relative des deux phénotypes des lignées cellulaires d'hépatocarcinomes testées et comparées à Huh7.

Tableau 3. Sensibilité des lignées du CHCs à la Mitomycine C, au Melphalan et au Cis-platine

Lignées cellulaires du CHCs	<u>Mitomycin C</u>		<u>Melphalan</u>		<u>Cisplatin</u>	
	IC ₅₀ (nM)	RR*	IC ₅₀ (μM)	RR*	IC ₅₀ (μM)	RR*
<i>Phénotype épithélial</i>						
Huh7(déficiente en AF)	16	1	3	1	0,4	1
HepG2	72	4	14	5	2,3	5
PLC/PRF/5	141	9	17	6	2,4	5
Hep3B	212	13	8	3	0,7	2
<i>Phénotype mésenchymateux</i>						
Focus	122	8	10	4	1,4	3
Snu475	155	10	24	9	1,1	2
<u>Mahlavu</u>	215	13	6	2	0,4	1
Snu398	572	36	12	4	0,6	1
Snu449	1579	99	44	17	9,9	22

* Résistance Relative comparée à la lignée cellulaire Huh7 hypersensible. AF, Anémie de Fanconi

Toutes les lignées cellulaires présentent une augmentation dans la résistance à la Mitomycine C (MMC) et au Melphalan. La résistance au Cisplatine est moins consistante. D'autre part, les lignées cellulaires de type mésenchymateux présentent une résistance relative plus élevée que les lignées cellulaires de type épithéliale. Une hyper-résistance est marquée dans la lignée cellulaire de type mésenchymateux Snu449. Comme le montre le tableau, les cellules de cette lignée présentent une résistance relative à la Mitomycine C (MMC), au Cisplatine et au Melphalan 99, 22 et 17 fois, respectivement, plus élevées comparée à Huh7.

III.1.3 L'expression ectopique de BRCA1 augmente la résistance à la MitomycineC

La sur-expression de BRCA1 dans les lignées cellulaires de type mésenchymateux du CHC et leurs résistances aux agents pontant l'ADN suggèrent son implication dans la chimio-résistance des CHCs aux traitements. Dans le but de tester cette hypothèse on a analysé l'effet de la sur-expression de la protéine BRCA1 sur la résistance dans une lignée épithéliale de CHC sensible à la Mitomycine C.

L'expression ectopique de BRCA1 dans les cellules de HepG2 sous le contrôle du promoteur CMV (CytoMégaloVirus) qui est un puissant promoteur pour l'expression de BRCA1 dans les cellules de mammifères (Atalay et al., 2002) évaluée par Western Blot après 48 h de transfection montre une sur-expression spécifique et notable de la protéine BRCA1 au niveau cytoplasmique et nucléaire comparée au contrôle (Figure 17).

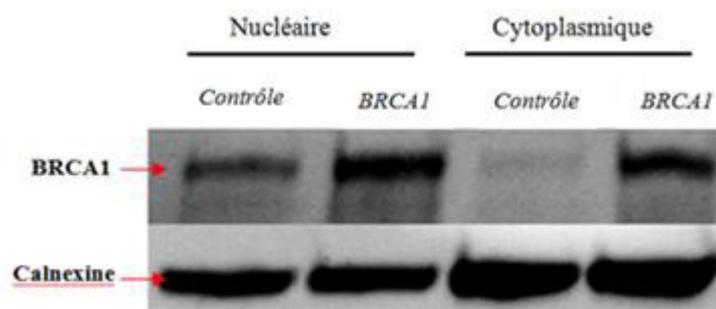


Figure 17. Evaluation de l'efficacité de la transduction des cellules HepG2 par le vecteur pCMVmyc. Après 24 de culture, les cellules HepG2 ont été transfectées par 50µg de plasmide en utilisant la lipofectamine 3000. Les extraits nucléaires et cytoplasmiques sont analysés après 48h par Western Blot en utilisant les anticorps anti-BRCA1 et anti-Calnexine.

Après 48 h de transduction par le vecteur plasmidique pCMVmycBRCA1, les cellules de la lignée HepG2 soumises à des concentrations croissantes de Mitomycine C pendant 96 h montrent une différence notable dans le taux de survie cellulaire par rapport aux cellules transduites avec un vecteur contrôle et traitées dans les mêmes conditions. La surexpression ectopique de BRCA1 permet une augmentation significative ($P < 0.01$) de la résistance de HepG2 à la Mitomycine C d'une moyenne de 23% (Figure 18). Ces résultats indiquent bien que les cellules de la lignée HepG2 de CHC acquièrent une résistance à la Mitomycine C suite à la surexpression de BRCA1.

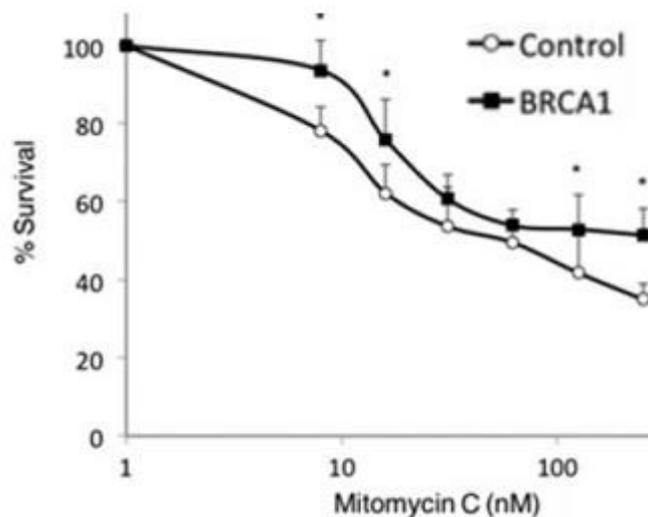


Figure 18. Effet de la surexpression de BRCA1 dans les cellules HepG2. Les cellules transduites 48h par le vecteur pCMVmyc-BRCA1 sont soumises pendant 96h à un des concentration croissantes de Mitomycine C. Chaque point représente la moyenne de 3 essais indépendants \pm SD. $P < 0.01$.

III-1.4. La répression de BRCA1 sensibilise les cellules Snu449

Pour évaluer le rôle d'une protéine dans un mécanisme particulier, il est possible d'inhiber son expression. L'interférence d'ARN représente un outil de choix pour étudier la fonction des gènes. Elle est une des méthodes les plus efficaces d'extinction spécifique des gènes. Il faut cependant se rappeler que l'extinction des gènes obtenue n'est pas totale.

Considérant leur extrême résistance aux agents alkylants, les cellules de la lignée Snu449 ont été choisies pour tester les conséquences de l'inactivation de BRCA1 sur

leur réponse au traitement par la Mitomycine C. Les cellules de la lignée Snu449 ont été transfectées par deux différents siRNA ciblant BRCA1 (siBRCA1-1 et siBRCA1-2) et un siRNA contrôle, en utilisant le hiperfect comme vecteur. Cette méthode induit beaucoup moins de mort cellulaire que l'électroporation. Les quantités de hiperfect et de siRNA ont été optimisées afin d'obtenir un taux protéique au plus bas et un taux de survie au plus haut avant traitement par la Mitomycine C.

Pour chaque expérience de cytotoxicité, nous avons mesuré la diminution de la quantité d'ARNm et de la protéine BRCA1 comparée à celle de la condition contrôle, afin de vérifier que les différences observées étaient bien liées à une réduction du niveau d'expression du gène ciblé.

Les résultats de qRT-PCR et de Western blot utilisés pour la vérification de l'efficacité de la transfection transitoire confirment que dans chaque cas la transfection des cellules par les siBRCA1 ait bien entraîné une réduction significative du niveau de protéine cible par rapport aux cellules transfectées par le siRNA contrôle: entre 60 % et 100 % de réduction pour BRCA1-2 BRCA1-1 respectivement (Figures 19-20).

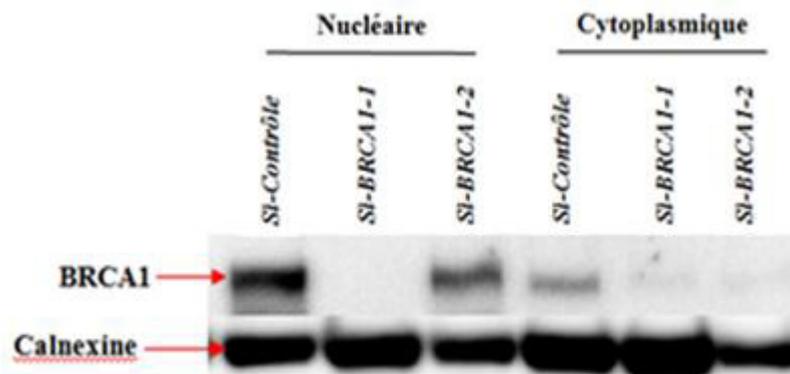


Figure 19. Evaluation de l'efficacité de la transfection des cellules de la lignée Snu44 par les siRNA. 10^5 cellules de Snu449 ont été transfectées par siRNA-BRCA1 et Contrôle à une concentration finale de 50nM. Après 72h les extraits nucléaires et protéiques ont été analysés par Western Blot en utilisant les anticorps anti-BRCA1 et anti-Calnexine.

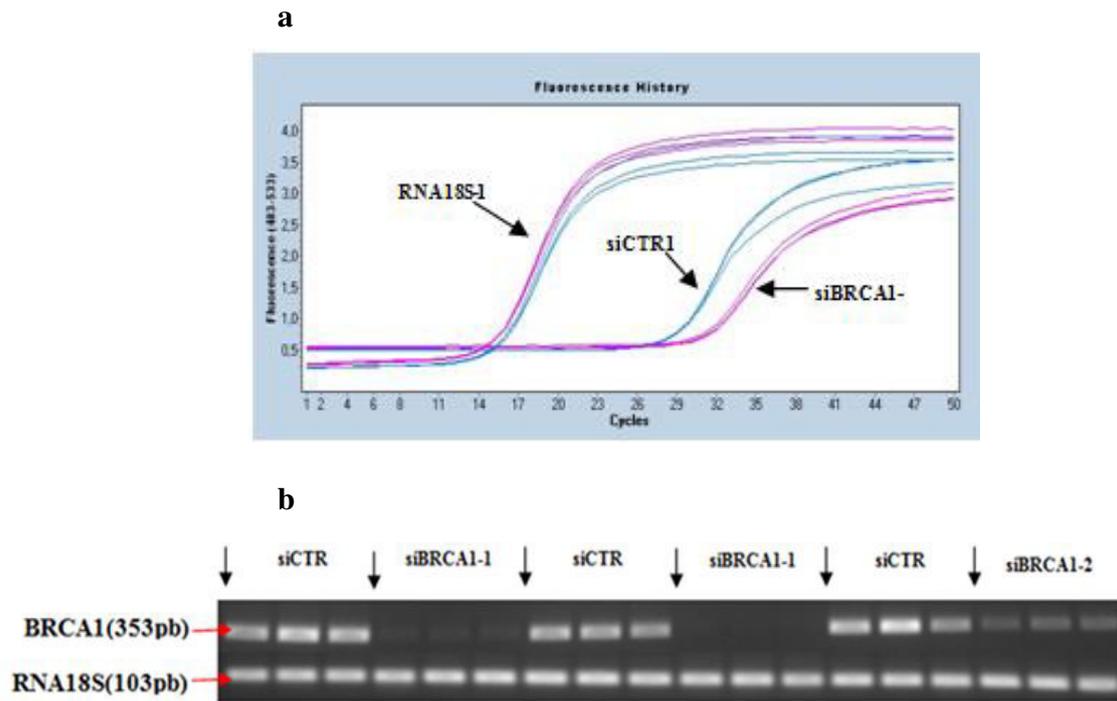


Figure 20. Evaluation de l'efficacité de la transfection des cellules Snu449 par les siRNA par qRT-PCR. **(a)** Profil d'amplification en temps réel de l'ADNC-BRCA-1. **(b)** Migration des produits de qPCR sur un gel d'agorose 1%.

L'implication fonctionnelle de BRCA1 dans la résistance des cellules de la lignée Snu449 a été mesurée par le taux de survie des cellules transfectées avec un siRNA dirigé contre BRCA1 puis traitées ou non par des concentrations croissantes, allant de 50nM à 1 μ M de Mitomycine C pendant 96 heures (Figure 21) .

Les résultats du Knock-down de BRCA1 montrent que l'inactivation de BRCA1 sensibilise, d'une manière significative, les cellules de la lignée Snu449. Ainsi, on observe une diminution de la viabilité cellulaire à toutes les doses testées ($p < 0.0001$) avec une réduction de l'IC50 d'un facteur 2. L'effet dramatique de cette sensibilisation est observé à la plus petite concentration testée (50nM) où la survie cellulaire de presque 100 % des cellules Snu449 non transfectées par si-BRCA1 est réduite à plus de 50 % dans les cellules Snu449 transfectées par si-BRCA1.

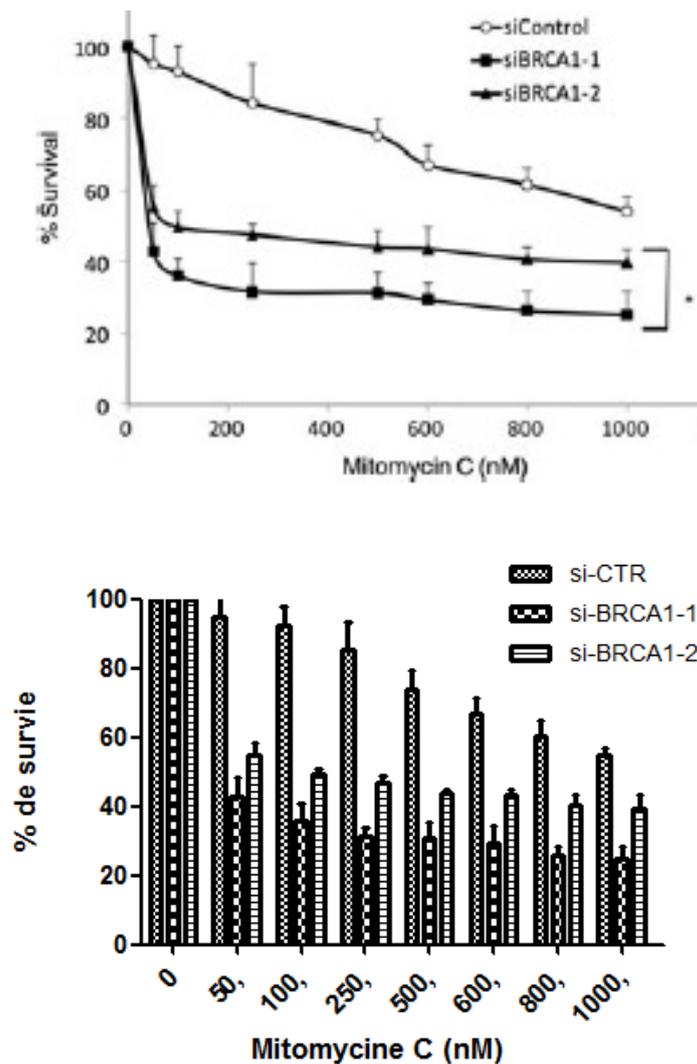


Figure 21. Effet de la sous-expression de BRCA1 sur la sensibilité de la lignée Snu449 à la Mitomycine C. Les cellules transfectées par siRNA-BRCA1 et contrôle ont été soumises pendant 96h à des concentrations croissantes de Mitomycine C. Chaque point correspond à la moyenne de 3 essais indépendants (en triplats) \pm SD. $P < 0.0001$.

Ces résultats montrent qu'il existe bien un lien fonctionnel entre le niveau d'expression de BRCA1 et la résistance des cellules de la lignée Snu449 à la Mitomycine C et renforcent notre hypothèse de modulation de la cytotoxicité de la Mitomycine C par BRCA1 dans les CHCs.

III-1.5 La répression de BRCA1 provoque l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à la Mitomycine C

Afin d'explorer d'avantage le rôle de la sur-expression de BRCA1 dans la survie et la chimiorésistance des CHCs aux agents pontant l'ADN, on a analysé les

changement du cycle cellulaire suite au traitement de la lignée Snu449, transfectée ou non par les siRNA-BRCA1 et -Contrôle, par une dose de 200nM de Mitomycine C (Figure 22).

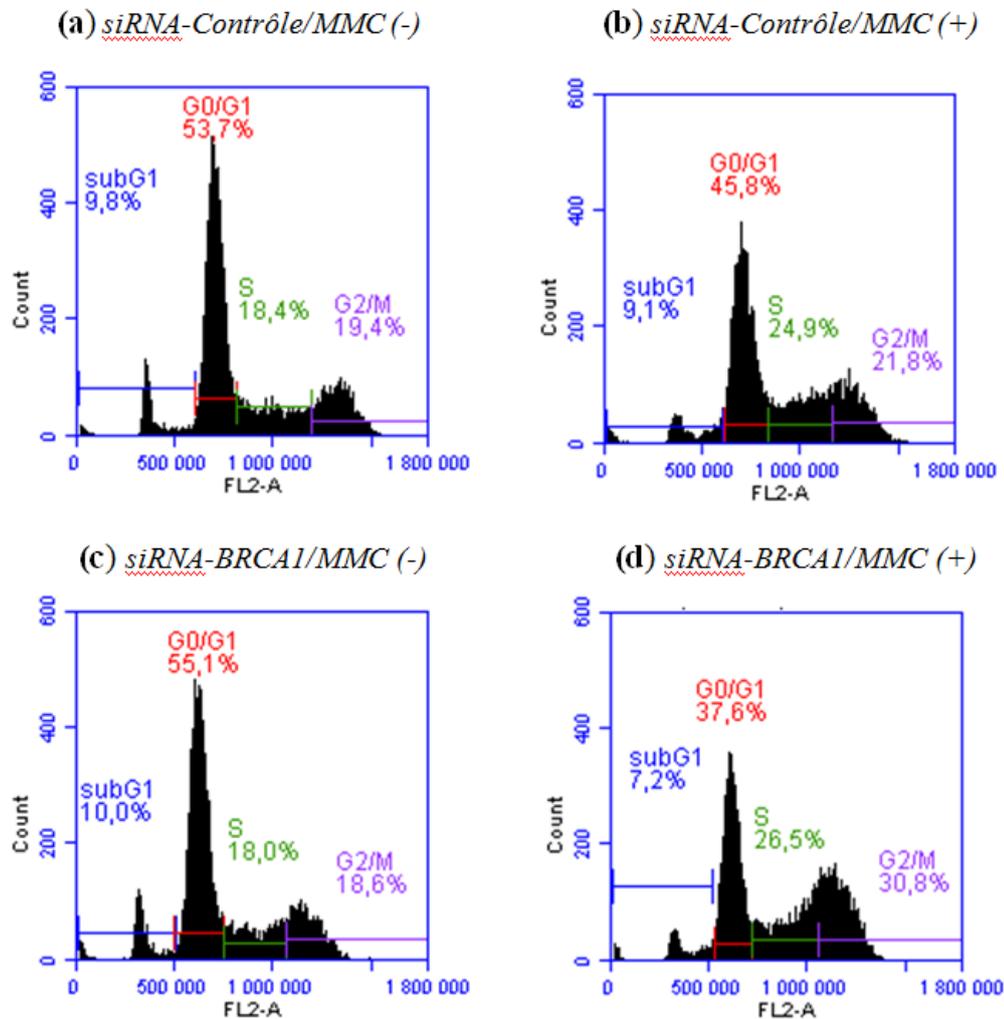


Figure 22. Effet de la Mitomycine C sur le cycle cellulaire des cellules Snu449 transfectées. Après 24h de transfection par les siRNA-BRCA1 et Contrôle, les cellules Snu449 sont traitées par 200nM de Mitomycine C pendant 24h. Les cellules traitées ou non sont soumises à une analyse par cytométrie en flux.

Le traitement des cellules de la lignée Snu449 transfectées par le siRNA-Contrôle par la Mitomycine C engendre une augmentation de la fraction cellulaire en phase S et G2/M accompagnée d'une diminution de nombre de cellule en phase G1 comparé aux même cellules non traitées par la Mitomycine C. Les cellules Snu449 transfectées par des siRNA-BRCA1 et traitées par la Mitomycine C s'accroissent d'une manière accrue en G2/M avec une réduction de leur nombre en G1 par rapport aux même cellules non traitées par la Mitomycine C. Une analyse approfondie des profils de

distribution du cycle cellulaire après traitement par la Mitomycine C indique que les cellules traitées s'accumulent entre la phase S et G2/M, ce qui nous permet de suggérer que la Mitomycine C provoque l'arrêt du cycle cellulaire en fin de la phase S et en phase G2/M.

Afin de vérifier si la répression par siRNA-BRCA1 module la réponse à la Mitomycine C d'une manière statistiquement significative, une analyse du cycle cellulaire, en triplicat, de cellules traitées dans les mêmes conditions a été effectuée indépendamment et la distribution des fractions cellulaires dans les différentes phases du cycle cellulaire a été comparée (Figure 23).

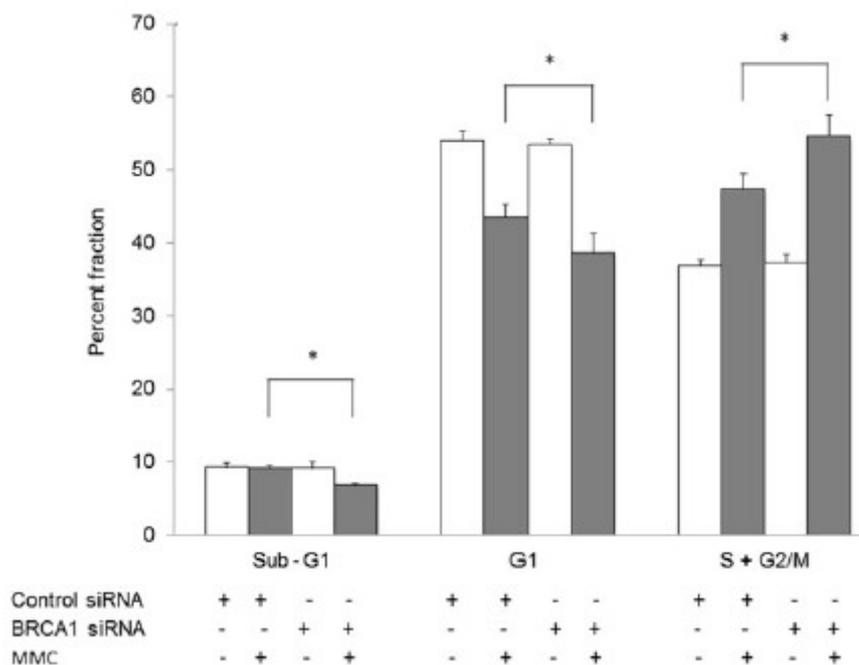


Figure 23. Effet de la Mitomycine C sur la distribution des fractions cellulaires transfectées dans les différentes phases du cycle cellulaire. Les traitements des cellules Snu449 et l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux dans les différentes conditions ont été effectués en trois expériences indépendantes. Les résultats ont été analysés pour tester la significativité de l'effet de la répression de BRCA1. $P < 0.05$.

L'analyse de la distribution des cellules transfectées par siRNA-BRCA1 et siRNA-Contrôle et non traitées par la Mitomycine C dans les phases SubG1, G1 et S+G2/M ne présente aucun changement au niveau du cycle cellulaire ($P > 0.05$). Par contre, l'analyse du cycle cellulaire des cellules transfectées par siRNA-BRCA1 et traitées par la Mitomycine C montre une augmentation significative ($P < 0.05$) de la

fraction cellulaire en phase S+G2/M ensemble, et une diminution de la fraction cellulaire en G1 et sub G1 (Figure 23). On conclue donc, qu'une meilleure inhibition de la croissance par la Mitomycine C sous l'effet de la répression de BRCA1 est due à l'accumulation accrue des cellules en fin de la phase S et en G2/M.

III.2- Discussion

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

III.2.1- La sur-expression de la protéine BRCA1 dans les lignées cellulaires du CHC de type mésenchymateux.

Des analyses de modifications transcriptionnelles associées à la transition du phénotype sénescence vers le phénotype immortel durant l'hépatocarcinogénèse ont été menées au préalable par notre équipe. Les résultats de ces analyses ont démontré que parmi les gènes positivement régulés dans les échantillons immortels ainsi que dans les CHCs figuraient les gènes de réparation de l'ADN en tête de liste. L'augmentation de la régulation des gènes de réparation de l'ADN peut être à l'origine de l'échappement à la sénescence induite par un dommage d'ADN, en augmentant la capacité de réparation de l'ADN dans les CHCs. Une analyse encore plus minutieuse de ce groupe de gènes a révélé un enrichissement pour les gènes de l'anémie de Fanconi (AF) et les gènes de réparation des cassures double brin BRCA1 et BRCA2 qui, sont systématiquement sur-exprimés dans les CHCs (Yildiz et al., 2013). Une relation fonctionnelle très étroite entre ces gènes a été déjà établie. L'anémie de Fanconi ou maladie de Fanconi est une affection génétique rare liée à un désordre héréditaire de la réparation de l'ADN. Dès les années 1990, des mutations bialléliques dans 19 gènes codant les protéines FANC (Fanconi anemia proteins) ont été identifiées.

Le modèle actuel statue que ces protéines FANC sont impliquées dans une même voie moléculaire nommée FA-BRCA (Fanconi anemia/ breast cancer). Elle a pour fonction de réparer un type particulier de dommages à l'ADN, à savoir les pontages interbrins de l'ADN (ou ICL pour interstrand crosslink).

De plus, il a été démontré que cette voie est responsable de l'acquisition de la résistance aux drogues (Yarde et al., 2009; Dai et al., 2015). De ce fait, la régulation positivement sélective de certains gènes de réparation dans les CHCs pourrait rendre compte de leur implication dans la résistance, de ces tumeurs, à la mort cellulaire et par conséquent, leur attribution au processus tomorigène.

La classification des lignées cellulaires des CHCs, récemment établie, en types "épithélial" et "mésenchymateux" est basée sur des critères morphologiques et sur l'expression différentielle de certains marqueurs tels que l'E-cadhérine et la vimentine (Fuchs et al., 2008; Yuzugullu et al., 2009). Sur CHC, la Vimentine est utilisée comme marqueur du sérum pour discriminer les petites tumeurs (Sun et al., 2010) et les stades avancés métastatiques (Hu et al., 2004). Ainsi, à l'opposé des cellules de type épithélial, qui présentent une grande adhérence intercellulaire, les cellules mésenchymateuses s'individualisent et acquièrent des capacités de migration et d'invasion à l'origine de l'apparition des métastases. L'acquisition de ces capacités est due à l'activation transcriptionnelle de gènes spécifiques qui contrôlent l'expression de gènes impliqués dans le contrôle des interactions cellules-cellules, de la différenciation et de la motilité cellulaire. Ces facteurs de transcription incluent les protéines bHLH de la famille Twist (Twist1, Twist2) et des facteurs de transcription à doigts de zinc de la famille Snail (Snail1/Snail, Snail2/Slug) et de la famille Zeb (Zeb1, Zeb2/Sip1), véritables chefs d'orchestre du processus de trans-différenciation. Ainsi, l'acquisition du phénotype mésenchymateux est associée à la dédifférenciation des tumeurs et correspond au caractère peu différencié des stades avancés des CHCs.

La sur-expression de BRCA1 dans 80 % des cellules d'hépatocarcinomes de phénotype mésenchymateux confirme les résultats obtenus par microarray (Data non présentés) et indique son implication dans la progression des CHCs dans le contexte d'une transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM). La perte des marqueurs épithéliaux et le gain de marqueurs mésenchymateux confèrent à la cellule des propriétés importantes pour la progression tumorale, en particulier des capacités de migration et d'invasion. Afin de déterminer une relation entre la sur-expression de BRCA1 et le phénotype mésenchymateux on a analysé la relation entre un groupe de gènes de réparation d'ADN lié à BRCA1 et un groupe de signatures liées à la TEM.

L'Analyse des réseaux d'interactions des groupes de gènes par les méthodes informatique a démontré que la signalisation via le récepteur TGF- β (Transforming growth factor β) dans le jeu de gènes TEM a été intégré avec succès au réseau " BRCA". Ainsi, le réseau BRCA était effectivement associé à la TEM.

Le TGF- β est une cytokine multifonctionnelle qui régule le développement et l'homéostasie cellulaire (Ikushima & Miyazono, 2011). La dérégulation de l'activité du TGF- β est associée à de très nombreuses pathologies comme la fibrose et le cancer (Tian et al., 2011). Nombreuses études sur le TGF β soulignent la pléiotropie fonctionnelle de cette cytokine, capable de promouvoir et d'inhiber une même fonction biologique selon le contexte cellulaire. Ainsi, le TGF- β inhibe la prolifération des cellules épithéliales mais induit celle des cellules mésenchymateuses; il favorise la différenciation mais augmente la pluripotence des cellules souches; il inhibe la croissance des cellules tumorales mais favorise leur invasion. Dans ce contexte, Il est clairement admis que le type cellulaire mais aussi le contexte cellulaire dans lequel agit le TGF- β va déterminer la réponse de la cellule (Massagué, 2012). Comprendre comment le TGF- β régule toutes ces fonctions constitue aujourd'hui un enjeu majeur pour le développement de thérapies spécifiques.

III.2.2- Résistance des cellules du CHC de type mésenchymateux aux agents pontant l'ADN

L'émergence de la résistance aux drogues utilisées en thérapie conventionnelle présente un obstacle majeur dans le traitement des carcinomes hépatocellulaires (Wong et al., 2009). Dans notre étude, l'évaluation de la réponse des lignées cellulaires d'hépatocarcinomes a montré une résistance remarquable de la lignée cellulaire Snu449 de type mésenchymateux aux trois agents induisant des pontages interbrins de l'ADN. Les cellules Snu449 présentaient une résistance relative à la Mitomycine C , au Cis-platine et au Melphalan 99, 22 et 17 fois, respectivement, plus élevées comparée aux cellules de la lignée Huh7. Cette résistance peut être due à la sur-expression de BRCA1 dans la lignée mésenchymateuse Snu449 et son implication dans la réparation des ICL.

Les pontages inter-brins de l'ADN sont des lésions extrêmement cytotoxiques qui, par la création de liaison covalente entre les brins Watson et Crick de l'ADN, bloquent la réplication et la transcription de l'ADN. Les agents pontant l'ADN sont largement utilisés dans la chimiothérapie, mais leur efficacité est souvent limitée par l'activation fréquente

des mécanismes de réparation au sein des tumeurs et par conséquent, l'acquisition de résistance. La résistance cellulaire aux ICL dépend des protéines FANC et BRCA, qui agissent dans une voie commune de réparation de l'ADN impliquant une réparation par excision de nucléotides, une synthèse translésionnelle et en fin une réparation par recombinaison homologue (Roy & Schärer, 2016). Cependant, le rôle exact de ces protéines dans la réparation des pontages interbrins, ainsi que leur interaction fonctionnelle, reste sombre.

La réparation des ICL se produit en phase S lorsque une ou deux fourches de réplication d'ADN entrent en collision avec la lésion. Le blocage de la fourche de réplication déclenche une réponse aux dommages à l'ADN qui fait intervenir des protéines de point de contrôle, des ADN polymérases translésionnelles, des endonucléases, des recombinases et des protéines FANC / BRCA.

L'étape clé dans la réparation des ICLs est la mono-ubiquitinylation du complexe FANCI-FANCD2, stimulant son recrutement à la chromatine. En absence de BRCA1, D2 n'est pas mono-ubiquitinylée et les foyers D2-L induits par les dommages de l'ADN ne sont pas formés. BRCA1 jouerait donc un rôle important dans la régulation de la modification post-traductionnelle de D2. Sachant que BRCA1, en association avec BARD1 (BRCA1 associated ring domain 1), a une activité E3 ubiquitine ligase, il a été suggéré que D2 servirait de substrat à l'hétérodimère BRCA1/BARD1 (Bhattacharjee & Nandi, 2017).

Un progrès remarquable dans la compréhension de la biologie de BRCA1 a fait l'objet de nombreuses études. Il a été démontré chez des souris doubles mutantes BRCA1/P53 une inversion des défauts associés à la perte de BRCA1. Ainsi, contrairement aux mutants BRCA1, les mutants doubles BRCA1 /P53 sont résistants à l'inhibiteur de PARP, et deviennent aptes pour la recombinaison homologue. P53, un régulateur important de la NHEJ, module la structure de la chromatine au niveau des sites de cassure. Ces résultats démontrent que BRCA1 favorise la résection dans la réparation des CDB en antagonisant P53. En outre, bien que la mutation P53 ait inversé la sensibilité des cellules déficientes en BRCA1 à l'inhibiteur de PARP, elle n'a pas réversé leur sensibilité aux agents inducteurs de ICLs (Bunting et al., 2012). Une interprétation de ces résultats indique que la réparation des ICL est plus vulnérable à la défaillance de la recombinaison homologue que la réparation des CDB. Cependant, ces auteurs ont également montré que,

en l'absence de BRCA1, la formation des foyers FANCD2 a été supprimée (même si FANCD2 était normalement ubiquitynée) et que ce défaut n'a pas été corrigé par une perte de P53. Ces résultats appuient un modèle dans lequel BRCA1 est nécessaire pour la réparation des ICLs, indépendamment de la recombinaison homologue, tout en favorisant le recrutement de FANCD2 sur des sites de dommages à l'ADN.

Une observation supplémentaire a été obtenue suite à la répression de la protéine Ku70, facteur de réparation par NHEJ, dans des cellules déficientes en BRCA1. Contrairement à P53 muté, la perte de Ku70 restaure la formation des foyers FANCD2 et la sensibilité aux ICLs dans les cellules déficientes en BRCA1. Par conséquent, lors de la réparation des ICLs, BRCA1 favorise non seulement la recombinaison homologue, mais aussi réprime l'effet inhibiteur de Ku 70 sur la formation des foyers FANCD2 (Knipscheer et al., 2009). De même, la corrélation claire entre la sensibilité aux ICLs et la formation défectueuse des foyers FANCD2 dans les cellules déficientes en BRCA1 pointe le point sur BRCA1 comme régulateur important de la localisation de FANCD2. Notamment, cette fonction est très importante en présence de Ku 70.

L'ensemble de ces données indiquent que BRCA1 favorise la réparation des ICLs indépendamment de la recombinaison homologue tout en activant la voie de l'anémie de Fanconi. De cette manière la sur-expression de BRCA1 favorise la survie des cellules de la lignée Snu449.

III.2.3- BRCA1 module la réponse des lignées du CHC à la Mitomycine C

Le rôle fonctionnel de BRCA1 dans la modulation de la réponse des cellules de CHCs aux traitements pontants l'ADN telle que la Mitomycine C a été investigué par la manipulation du niveau de son expression. L'expression ectopique de BRCA1 dans les cellules de la lignée HepG2 qui expriment un taux bas de BRCA1 endogène permet une acquisition de résistance de ces cellules. Par contre, la déplétion de BRCA1 dans les cellules de la lignée Snu449 qui expriment un taux endogène élevé de BRCA1 sensibilise ces cellules à la Mitomycine C.

La déficience en BRCA1 semble sensibiliser les cellules aux agents pontant l'ADN, par la formation de liaisons covalentes intra et interbrins. Phénomène associé au rôle de BRCA1 dans la recombinaison homologue (Moynahan et al., 2001; Sgagias et al., 2004).

Des progrès majeurs ont été réalisés au cours des dernières années dans la caractérisation de mutations génétiques importantes de BRCA1. Une radiosensibilité a été observée dans les lignées portant le gène BRCA1 muté. La perte complète de BRCA1 conduit à une radiosensibilité cellulaire liée à une réduction des capacités de réparation des cassures doubles brins. Cette radiosensibilité semble par ailleurs être corrélée avec le statut génétique de BRCA1. En effet, les cellules avec deux copies sauvages de BRCA1 sont plus résistantes que les cellules avec une seule copie fonctionnelle, elles-mêmes plus résistantes que les cellules sans BRCA1 (Abbott et al., 1999).

Aujourd'hui, les changements d'ordre épigénétique peuvent également être à l'origine des dérégulations de l'expression de BRCA1 dans des cancers spontanés. Par les altérations épigénétiques, nous entendons la méthylation des cytosines qui altère durablement la transcription du gène.

La suppression de l'expression de BRCA1 par l'hyper-méthylation de son promoteur a été détectée dans certaines tumeurs spontanées du sein, de l'ovaire, du pancréas ou du poumon (Scardocci et al., 2006; Jacinto & Esteller 2007). La conséquence de l'altération de BRCA1 par voie génétique ou épigénétique est l'hypersensibilité aux traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie produisant des adduits ou des cassures double-brins tels que les sels platinés, la Mitomycine C ou les inhibiteurs de PARP (Turner et al., 2004; McCabe et al., 2006).

L'hypersensibilité des cellules déficientes en BRCA1 aux agents pontant l'ADN renforce le rôle important de BRCA1 dans la réparation de ce type de lésions (Yun et al., 2005; Bartz et al., 2006). Le traitement des cellules déficientes en BRCA1 par la Mitomycine C, n'aboutit pas à la formation des foyers RAD51, nécessaires pour la réparation des CDB par recombinaison homologue. Il a été démontré qu'en réponse aux dommages, BRCA1 co-localise dans des foyers nucléaires avec RAD51 pendant la phase S, démontrant un rôle pour BRCA1 dans la réparation des cassures double brin (Scully et al., 1997). BRCA1 et BRCA2 interagissent avec la protéine Rad51, une composante centrale de la voie de réparation par recombinaison homologue. Cette interaction justifie le fait que les cellules déficientes en BRCA1 et BRCA2 sont défectueuses dans la réparation des CDB par recombinaison homologue. En outre, il a été observé dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) déficientes en BRCA1 et traitées par la Mitomycine C

l'absence de la formation des foyers Rad51 et que la reconstitution de l'expression de BRCA1 restaure la formation des foyers Rad51 (Yun et al., 2005; Moynahan et al., 2001) .

Après traitements aux rayons X, UV ou par différentes drogues de chimiothérapie, la protéine BRCA1 subit une hyper-phosphorylation. Cette forme phosphorylée de BRCA1 est nécessaire pour son import nucléaire et pour son recrutement sur les sites des cassures de l'ADN. Ces sites de BRCA1 recrutent ensuite plusieurs protéines de réparation impliquées dans la réparation des dommages de l'ADN. Ce mécanisme de phosphorylation de BRCA1 est essentiel pour ses fonctions au cours de la prolifération cellulaire et de la réparation de l'ADN (Scully et al., 1997).

De manière générale BRCA1 fonctionne globalement comme une protéine d'échafaudage, facilitant ainsi l'assemblage de plusieurs complexes multiprotéiques distincts, intervenant dans le processus de réponse aux dommages affectant l'ADN (DDR :DNA Damage Response). La formation et la fonction de ces complexes sont pensées être régulées par la phosphorylation de BRCA1 par les kinases ATM, ATR, et Chk2 en réponse aux dommages d'ADN.

Enfin, la synthèse de ces données met en lumière l'importance de la réparation par recombinaison BRCA1-dépendante dans la résistance aux traitement pontant l'ADN.

III.2.4- La répression de BRCA1 provoque l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à la Mitomycine C

Les mécanismes d'arrêt transitoire du cycle cellulaire sont des voies de signalisation par lesquelles la cellule ralentit la progression du cycle cellulaire en réponse à une lésion génotoxique, de manière à permettre sa réparation, ou de déclencher un programme d'apoptose pour éviter que la lésion soit transmise à la génération cellulaire suivante. On parle de point de contrôle G1/S lorsque l'entrée en phase S est bloquée jusqu'à la réparation de l'ADN endommagé et du point de contrôle G2/M lorsque l'arrêt a lieu à l'entrée en mitose. La cellule ne peut entrer en mitose, si la réplication de l'ADN n'est pas correctement terminée. La transition de la phase G2/M nécessite ainsi une réplication correcte de l'ADN non lésé. Cette surveillance permet le maintien de l'intégrité du génome et la qualité de réplication de l'ADN. Nos résultats montrent que le knock-down de BRCA1 dans les cellules Snu449 provoque une accumulation excessive dans la phase G2 / M suite au traitement à la Mitomycine C.

L'Anémie de Fanconi (AF) est une maladie génétique rare appartenant à un groupe de pathologies appelées maladies cassantes. Ces pathologies se caractérisent par l'observation de cassures chromosomiques spontanées ou induites par des agents susceptibles d'endommager l'ADN. Une des caractéristiques principales de AF, servant pour le diagnostic, est l'accumulation de cellules AF en phase G2/M du cycle cellulaire. Cette accumulation peut être accentuée par un traitement à la moutarde azotée (Kubbies et al., 1985; Seyschab et al., 1995).

Dans les lignées cellulaires Fanconi, des défauts de recombinaison homologue et de stabilisation de la fourche de réplication sont rapportés (Lomonosov et al., 2003). Ces procédés impliquent la formation de jonctions Holladays (Gari et al., 2008) et concourent à identifier la voie Fanconi comme essentielle à la réparation des dommages à l'ADN (Meetei et al., 2003). Dès lors, il devient aisément compréhensible que le phénotype des cellules de patients inclut de façon systématique une sensibilité aux dommages causés par les agents « cassants », un stress oxydatif et une élévation du processus apoptotique. Dans les cellules Fanconi, le point de contrôle G2 est intact contrairement à la phase S, justifiant qu'après l'exposition à un stress génotoxique, une accumulation de lésions secondaires, telles que les cassures simple et double brin impose une prolongation de la phase G2, observée dans les cellules FA, pour permettre l'élimination des lésions accumulées pendant la phase S (Nalepa & Clapp, 2014).

Si la fonction précise des gènes FANC est encore mal connue, celles de certains de leurs partenaires, en particulier ATM et NBS1 (Andreassen et al., 2004), sont mieux documentées. De nombreux travaux suggèrent que le complexe M/R/N contribue à la détection et/ou à la signalisation des CDB, participe à la machinerie de réparation des CDB (par recombinaison homologue et par la voie end-joining) et a une fonction importante dans la régulation du cycle cellulaire (Shiloh Y, 2003).

Un nombre croissant de données révèle que BRCA1 est impliqué aussi à la fois dans la réparation des CDB et dans le contrôle du cycle cellulaire en réponse aux radiations ionisantes. L'association de FANC avec ATM, NBS1 et BRCA1 suggère que les gènes FANC seraient aussi impliqués dans la gestion de lésions bloquant la réplication de l'ADN, telles que les CDB ou les pontages interbrins. Cela est en accord avec les données précédemment rapportées sur la réparation inefficace ou infidèle des pontages interbrins

[D'Amours & Jackson, 2002; Papadopoulo et al., 2002) ou des CDB (Lambert et al., 1992; Escarceller et al., 1998), l'arrêt inefficace de la progression de la phase S (Lundberg et al., 2001, Centurion et al., 2000) et l'allongement de la phase G2 du cycle cellulaire dans les cellules AF [Sala-Trepat et al., 2000). Les produits des gènes *FANC* participeraient donc à la détection ou à la signalisation des lésions à la machinerie de contrôle du cycle cellulaire et de la réparation.

L'ensemble de protéines FA connues fonctionne en concertation en réponse aux dommages d'ADN. La chromatine altérée active un réseau de kinases (y compris ATR et CHK1) impliquées dans la signalisation des dommages et l'arrêt du cycle cellulaire jusqu'à réparation fidèle des lésions (Ciccia & Elledge, 2010). Quelques protéines FA sont impliquées dans cette étape précoce de transduction de signal, en effet, FANCM active ATR (Collis et al., 2008) et CHK1 (Schwab et al., 2010) et FANCI favorise l'activation de point de contrôle du cycle cellulaire via ATR (Gong et al., 2010). En retour, ATR et CHK1 phosphorylent FANCA, FANCE et FANCM (Andreassen et al., 2004; Singh et al., 2013). Cette boucle de phosphorylation positif permet l'assemblage du complexe multiprotéique FA ainsi que plusieurs protéines accessoires (Singh et al., 2010; Yan et al., 2010). De suite, le complexe FA va permettre l'activation et la monoubiquitination du complexe FANCD2 / FANCI (Meetei et al., 2003).

Le complexe core associé à la protéine FANCI est nécessaire à la monoubiquitination de FANCD2 (Howlett et al., 2002; Levitus et al., 2004) qui devient alors capable de s'associer à la chromatine et de s'accumuler dans les foci nucléaires. Cette migration facilite sa colocalisation avec des facteurs impliqués dans la recombinaison homologue, tels que BRCA1 (Garci et al., 2001), RAD51 (Taniguchi et al., 2002), ATM, et FANCD1 (Wang et al., 2004; Hussain et al., 2003) qui maintiennent l'intégrité du génome. Ces foyers sont les sites préférentiels de réparation des ICL, la réplication y est restaurée et assurant la progression dans le cycle cellulaire (Matsushita et al., 2005).

Des études ont proposé que l'arrêt des cellules FA à la fin de la phase S soit dus à un échec de réparation des pontages interbrins (ICLs) (Kennedy et al., 2005; Akkari et al., 2001). D'autres ont démontré que l'augmentation des cellules G2 / M dans les MEFs de type sauvage, après traitement par la Mitomycine C, soit attribué à l'activation du point de contrôle G2 / M (Yun et al., 2001).

De nombreux chercheurs ont spéculé que l'accumulation en G2/M observées dans les cellules FA après traitement par la Mitomycine C est due à l'inactivation du point de contrôle S et que les gènes FA peuvent réguler directement un ou plusieurs points de contrôle (Janget al., 2016). Ainsi, une étude a révélé que l'arrêt G2 / M dans les cellules FA reflète une réponse secondaire à l'augmentation de l'ADN endommagé suite à une exposition aux agents ICLs (Yun et al., 2001; Heinrich et al., 1998). En effet, il a été proposé que, dans les cellules de mammifères, le processus de réparation des ICLs engendre des CDB qui seront prises en charge par le système de réparation via HR (Rothfuss et al., 2004). Conformément à ce modèle, les cellules déficientes en Rad51 ou d'autres protéines paralogues impliquées dans la réparation des CDBs médiée par RH tel que BRCA1 sont sensibles aux dommages causés par l'ADN induite par les agents ICLs (Akkari et al., 2000; Dronkert et al., 2001).

Le rôle déterminant de BRCA1 dans la réparation des pontages interbrins causés à l'ADN suite au traitement par la Mitomycine C à été déjà discuté.

L'ensemble de ses données nous permettent d'établir une corrélation entre l'accumulation des cellules de Snu449 à la fin de la phase S et G2/M et le Knockdown de BRCA1 dans ces cellules. Par conséquent, l'arrêt de la progression du cycle cellulaire, est probablement le résultat d'une réparation inefficace des pontages inter-brins induits par la Mitomycine C dans les cellules transfectées par les siRNA-BRCA1, ce qui pourrait activer le point de contrôle du cycle cellulaire G2 / M via une voie indépendante de BRCA.

En fin, nos résultats suggèrent fortement que la résistance des cellules de la lignées Snu449 à la Mitomycine C est due à une augmentation de la capacité de réparation des pontages interbrins conjuguée à la régulation positive de l'expression des principaux gène de la voie de réparation FA/CDB tel que BRCA1. De plus BRCA1 semble jouer un rôle suffisant et important dans cette voie, donc sa seule répression est suffisante pour altérer le système de réparation.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le carcinome hépatocellulaire (CHC), cancer primitif du foie le plus fréquent, constitue la seconde cause de décès par cancer dans le monde. Généralement développé dans un contexte d'hépatopathie chronique, le plus souvent cirrhotique, il présente un mauvais pronostic, en partie du fait de sa forte résistance aux agents chimiothérapeutiques. L'un des challenges actuels de la recherche sur les CHCs est d'enrayer ou du moins de diminuer ces phénomènes de résistance et l'amélioration de la réponse à la chimiothérapie.

Dans notre travail, on a mis le point sur la réponse, aux agents chimiothérapeutiques, induisant les systèmes de réparation de l'ADN.

Nos résultats suggèrent fortement que la résistance des CHCs à la Mitomycine C est due à une augmentation de la capacité à réparer les pontages interbrins induits, suite à la régulation positive de l'expression de BRCA1. Conséquemment, une régulation négative de l'expression de BRCA1 est suffisante pour nuire aux systèmes de réparation dans les cellules tumorales et contourner leur résistance aux traitements.

Ces résultats peuvent expliquer l'échec de traitement des CHCs intermédiaires par chimio-embolisation qui est sensée offrir un meilleur taux de réussite. Cette technique consiste à combiner l'injection d'un agent de chimiothérapie (en général anthracycline ou sel de platine) suivie d'une obstruction artérielle ayant pour but de ralentir le flux artériel (et donc d'efflux de chimiothérapie de la tumeur) et d'entraîner une nécrose tumorale. Ces traitements entraînent une nécrose tumorale chez la majorité des patients (60 % de réponses objectives). Cependant, le bénéfice sur la survie globale reste controversé. En effet, malgré l'efficacité initiale, une reprise tumorale est souvent rapidement observée. D'autre part, la morbidité de ce traitement est non négligeable chez le patient cirrhotique ce qui peut retentir sur la survie.

En effet, considérant nos observations, les patients atteints de CHC sur cirrhose (80 % de CHC cas) peuvent montrer un déséquilibre dans leur capacité à répondre aux drogues chimiothérapeutiques telle que la Mitomycine C en raison de la sur-expression des gènes qui réparent les dégâts dans leurs cellules tumorales par rapport à leurs cellules cirrhotiques non tumorales. Dans ces conditions, la chimiothérapie systémique peut être hépatotoxique et sans beaucoup d'effets sur la tumeur. La diminution de la

dose de chimiothérapie peut limiter l'hépatotoxicité, mais entraînera une résistance tumorale alors qu'une augmentation de la dose peut tuer plus de cellules non tumorales que des cellules tumorales, offrant ainsi un avantage de survie à la tumeur. Pour surmonter ce handicap chez les patients atteints de CHCs et augmenter l'efficacité d'une telle approche thérapeutique, comme on l'a démontrée expérimentalement, une chimiothérapie combinée avec l'inhibition de BRCA1, impliqué dans la réparation, peut être utile.

Finalement, une des clés de la compréhension des mécanismes de la carcinogenèse réside dans l'étude des voies de signalisation cellulaires activées au cours de la réparation des lésions de l'ADN (DNA Damage Response, DDR).

A notre connaissance, notre étude est la première à démontrer que l'augmentation de l'expression de la voie FA / BRCA est un mécanisme important impliqué dans la chimiorésistance des CHCs. De plus, nous avons démontré que la résistance peut être surmontée, au moins partiellement, par la répression de BRCA1.

Nous envisageons donc, qu'il vaut la peine d'explorer davantage les modalités d'inhibition de la voie FA / BRCA pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie dans les CHCs.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abbott, D., Thompson, M., Robinson-Benion, C., Tomlinson, G., Jensen, R., & Holt, J. (1999). BRCA1 Expression Restores Radiation Resistance in BRCA1-defective Cancer Cells through Enhancement of Transcription-coupled DNA Repair. *Journal Of Biological Chemistry*, 274(26), 18808-18812.
- Aihara, T., Noguchi, S., Sasaki, Y., Nakano, H., & Imaoka, S. (1994). Clonal analysis of regenerative nodules in hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Gastroenterology*, 107(6), 1805-1811.
- Akkari, Y., Bateman, R., Reifsteck, C., D'Andrea, A., Olson, S., & Grompe, M. (2001). The 4N Cell Cycle Delay in Fanconi Anemia Reflects Growth Arrest in Late S Phase. *Molecular Genetics And Metabolism*, 74(4), 403-412.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350-355.
- Andreassen, P. (2004). ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes & Development*, 18(16), 1958-1963.
- Antoniou, A., Pharoah, P., Narod, S., Risch, H., Eyfjord, J., & Hopper, J. et al. (2003). Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *The American Journal Of Human Genetics*, 72(5), 1117-1130.
- Aprelikova, O., Fang, B., Meissner, E., Cotter, S., Campbell, M., & Kuthiala, A. et al. (1999). BRCA1-associated growth arrest is RB-dependent. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 96(21), 11866-11871.
- Aprelikova, O., Pace, A., Fang, B., Koller, B., & Liu, E. (2001). BRCA1 Is a Selective Co-activator of 14-3-3 Gene Transcription in Mouse Embryonic Stem Cells. *Journal Of Biological Chemistry*, 276(28), 25647-25650.
- Arenson, D., Friedman, S., & Bissell, D. (1988). Formation of extracellular matrix in normal rat liver: Lipocytes as a major source of proteoglycan. *Gastroenterology*, 95(2), 441-447.
- Arii, S. (1996). Overexpression of matrix metalloproteinase 9 gene in hepatocellular carcinoma with invasive potential. *Hepatology*, 24(2), 316-322.
- Arizti, P., Fang, L., Park, I., Yin, Y., Solomon, E., & Ouchi, T. et al. (2000). Tumor Suppressor p53 Is Required To Modulate BRCA1 Expression. *Molecular And Cellular Biology*, 20(20), 7450-7459.
- Arthur, M.J. (2000). Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 279: G245-249.
- Atalay, A., Crook, T., Ozturk, M., & Yulug, I. (2002). Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 299(5), 839-846.

- Atlas, E., Stramwasser, M., & Mueller, C. (2001). A CREB site in the BRCA1 proximal promoter acts as a constitutive transcriptional element. *Oncogene*, 20(48), 7110-7114.
- Atlas, E., Stramwasser, M., Whiskin, K., & Mueller, C. (2000). GA-binding protein α/β is a critical regulator of the BRCA1 promoter. *Oncogene*, 19(15), 1933-1940.
- Au, S., Wong, C., Lee, J., Fan, D., Tsang, F., Ng, I., & Wong, C. (2012). Enhancer of zeste homolog 2 epigenetically silences multiple tumor suppressor microRNAs to promote liver cancer metastasis. *Hepatology*, 56(2), 622-631.
- Audeh, M., Carmichael, J., Penson, R., Friedlander, M., Powell, B., & Bell-McGuinn, K. et al. (2010). Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *The Lancet*, 376(9737), 245-251.
- Baker, K., Wei, G., Schaffner, A., & Ostrowski, M. (2003). Ets-2 and Components of Mammalian SWI/SNF Form a Repressor Complex That Negatively Regulates the BRCA1 Promoter. *Journal Of Biological Chemistry*, 278(20), 17876-17884.
- Balsara, B., Pei, J., De Rienzo, A., Simon, D., Tosolini, A., & Lu, Y. et al. (2001). Human hepatocellular carcinoma is characterized by a highly consistent pattern of genomic imbalances, including frequent loss of 16q23.1-24.1. *Genes, Chromosomes And Cancer*, 30(3), 245-253.
- Barbara, L., Benzi, G., Gaiani, S., Fusconi, F., Zironi, G., & Siringo, S. et al. (1992). Natural history of small untreated hepatocellular carcinoma in cirrhosis: A multivariate analysis of prognostic factors of tumor growth rate and patient survival. *Hepatology*, 16(1), 132-137.
- Bartel, DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, Jan 23;116(2):281-97.
- Bartz, S., Zhang, Z., Burchard, J., Imakura, M., Martin, M., & Palmieri, A. et al. (2006). Small Interfering RNA Screens Reveal Enhanced Cisplatin Cytotoxicity in Tumor Cells Having both BRCA Network and TP53 Disruptions. *Molecular And Cellular Biology*, 26(24), 9377-9386.
- Beger, C., Pierce, L., Kruger, M., Marcusson, E., Robbins, J., & Welch, P. et al. (2001). Identification of Id4 as a regulator of BRCA1 expression by using a ribozyme-library-based inverse genomics approach. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 98(1), 130-135.
- Bennett, B., & Knight, K. (2005). Cellular localization of human Rad51C and regulation of ubiquitin-mediated proteolysis of Rad51. *Journal Of Cellular Biochemistry*, 96(6), 1095-1109.
- Beral, V., E. Banks, G. Reeves, and P. Appleby. 1999. Use of HRT and the subsequent risk of cancer. *Journal of Epidemiology and Biostatistics*. 4:191-210; 210-5.

- Bhattacharjee, S., & Nandi, S. (2017). DNA damage response and cancer therapeutics through the lens of the Fanconi Anemia DNA repair pathway. *Cell Communication And Signaling*, 15(1).
- Bhattacharyya, A., Ear, U., Koller, B., Weichselbaum, R., & Bishop, D. (2000). The Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA1 Is Required for Subnuclear Assembly of Rad51 and Survival following Treatment with the DNA Cross-linking Agent Cisplatin. *Journal Of Biological Chemistry*, 275(31), 23899-23903.
- Bochar, D. A., L. Wang, H. Beniya, A. Kinev, Y. Xue, W. S. Lane, W. Wang, F. Kashanchi, and R. Shiekhattar. 2000. BRCA1 is associated with a human SWIISNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 102:257-65.
- Borie, F., Tretarre, B., Bouvier, A. M., Faivre, J., Binder, F., Launoy, G., et al. (2009). Primitive liver cancers: epidemiology and geographical study in France. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 21(9), 984-989.
- Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB Journal*. 1997;11:68-76.
- Boutros, R., Lobjois, V., & Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nature Reviews Cancer*, 7(7), 495-507.
- Boyault, S., Rickman, D., de Reyniès, A., Balabaud, C., Rebouissou, S., & Jeannot, E. et al. (2007). Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*, 45(1), 42-52.
- Bressac, B., Galvin, K., Liang, T., Isselbacher, K., Wands, J., & Ozturk, M. (1990). Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 87(5), 1973-1977.
- Bruix, J., & Sherman, M. (2005). Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 42(5), 1208-1236.
- Bruix, J., Sherman, M., Llovet, J., Beaugrand, M., Lencioni, R., & Burroughs, A. et al. (2001). Clinical Management of Hepatocellular Carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. *Journal Of Hepatology*, 35(3), 421-430.
- Bryant, H., Schultz, N., Thomas, H., Parker, K., Flower, D., & Lopez, E. et al. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434(7035), 913-917.
- Brzovic, P., Keefe, J., Nishikawa, H., Miyamoto, K., Fox, D., & Fukuda, M. et al. (2003). Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 100(10), 5646-5651.
- Bunting, S. F., Callen, E., Kozak, M. L., Kim, J.-M., Wong, N., Lopez-Contreras, A. J., Nussenzweig, A. (2012). BRCA1 functions independently of homologous

- recombination in DNA interstrand cross-link repair. *Molecular Cell*, 46(2), 125–135.
- Cable, P.L., et al., Novel consensus DNA-binding sequence for BRCA1 protein complexes. *Molecular Carcinogenesis*, 2003. 38(2): p. 85-96.
- Caestecker, K., & Van de Walle, G. (2013). The role of BRCA1 in DNA double-strand repair: Past and present. *Experimental Cell Research*, 319(5), 575-587.
- Calvisi, D., Ladu, S., Gorden, A., Farina, M., Conner, E., & Lee, J. et al. (2006). Ubiquitous Activation of Ras and Jak/Stat Pathways in Human HCC. *Gastroenterology*, 130(4), 1117-1128.
- Cantor, S., Bell, D., Ganesan, S., Kass, E., Drapkin, R., & Grossman, S. et al. (2001). BACH1, a Novel Helicase-like Protein, Interacts Directly with BRCA1 and Contributes to Its DNA Repair Function. *Cell*, 105(1), 149-160.
- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 118-132.
- Centurion, SA., Kuo, HR., Lambert WC. (2000). Damage-resistant DNA synthesis in Fanconi anemia cells treated with a DNA cross-linking agent. *Experimental Cell Research*; 260 ; 216-21.
- Chen, J. G., & Zhang, S. W. (2011). Liver cancer epidemic in China: past, present and future. *Seminars in Cancer Biology*, 21(1), 59-69.
- Chen, Y., Lin, M., Yao, H., Wang, H., Zhang, A., & Yu, J. et al. (2007). Lentivirus-mediated RNA interference targeting enhancer of zeste homolog 2 inhibits hepatocellular carcinoma growth through down-regulation of stathmin. *Hepatology*, 46(1), 200-208.
- Cheng, A., Lau, S., Chen, Y., Kondo, Y., Li, M., & Feng, H. et al. (2011). EZH2-Mediated Concordant Repression of Wnt Antagonists Promotes - Catenin-Dependent Hepatocarcinogenesis. *Cancer Research*, 71(11), 4028-4039.
- Chu, R., Mo, G., Duan, Z., Huang, M., Chang, J., Li, X. and Liu, P. (2014). miRNAs affect the development of hepatocellularcarcinoma via dysregulation of their biogenesis and expression. *Cell Communication and Signaling*, 12(1).
- Clark, S., Rodriguez, A., Snyder, R., Hankins, G., & Boehning, D. (2012). Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. *Computational And Structural Biotechnology Journal*, 1(1), e201204005.
- Ciccia A, Elledge SJ: The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell*, 2010, 40:179-204.
- Collis SJ, Ciccia A, Deans AJ, Horejsí Z, Martin JS, Maslen SL, Skehel JM, Elledge SJ, West SC, Boulton SJ: FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex. *Molecular Cell*, 2008, 32:313-24.

- D'Amours, D., Jackson, SP. (2002). The Mre11 complex : at the crossroads of DNA repair and checkpoint signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5 : 317-27.
- Dai, C., Li, J., Chen, P., Jiang, H., Wu, M., & Chen, Y. (2015). RNA interferences targeting the Fanconi anemia/BRCA pathway upstream genes reverse cisplatin resistance in drug-resistant lung cancer cells. *Journal Of Biomedical Science*, 22(1).
- D'Andrea, A. (2013). BRCA1: A Missing Link in the Fanconi Anemia/BRCA Pathway. *Cancer Discovery*, 3(4), 376-378.
- De Maria, N., Manno, M., & Villa, E. (2002). Sex hormones and liver cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193(1-2), 59-63.
- Deng, C., & Brodie, S. (2000). Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *Bioessays*, 22(8), 728-737.
- Deans, A., & West, S. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(7), 467-480.
- Dronkert ML, Kanaar R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation Research*,486:217-47
- El-Serag, H., & Rudolph, K. (2007). Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557-2576.
- El-Serag, H. B. (2011). Hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 365(12), 1118-1127.
- El-Serag, H. B., & Kanwal, F. (2014). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in the United States: Where Are We? Where Do We Go? *Hepatology*, 60(5), 1767–1775.
- Endo, M., Yasui, K., Zen, Y., Gen, Y., Zen, K., & Tsuji, K. et al. (2013). Alterations of the SWI/SNF chromatin remodelling subunit-BRG1 and BRM in hepatocellular carcinoma. *Liver International*, 33(1), 105-117.
- Escarceller, M., Buchwald, M., Singleton, BK., et al. (1998). Fanconi anemia C gene product plays a role in the fidelity of blunt DNA end-joining. *Journal of Molecular Biology*, 279 : 375-85.
- Fabbro, M., S. Schuechner, W. W. Au, and B. R. Henderson. (2004). BARD1 regulates BRCA 1 apoptotic function by a mechanism involving nuclear retention. *Experimental Cell Research*,298:661-73.
- Faivre, S., Raymond, E., Boucher, E., Douillard, J., Lim, H., & Kim, J. et al. (2009). Safety and efficacy of sunitinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: an open-label, multicentre, phase II study. *The Lancet Oncology*, 10(8), 794-800.
- Farazi, P., DePinho, R. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews Cancer*, 6(9):674-687.

- Fattovich, G., Giustina, G., Degos, F., Tremolada, F., Diodati, G., & Almasio, P. et al. (1997). Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: A retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology*, 112(2), 463-472.
- Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., & Donato, F. (2004). Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 127(5), S35-S50.
- Feng, Z., Kachnic, L., Zhang, J., Powell, S., & Xia, F. (2004). DNA Damage Induces p53-dependent BRCA1. *Nuclear Export Journal Of Biological Chemistry*, 279(27), 28574-28584.
- Firincieli D, Boissan M, Chignard N (2010) Epithelial-mesenchymal transition in the liver. *Gastroenterologie clinique et biologique*, 34: 523-528
- Fong, PC., Boss, DS., Yap, TA, et al. (2009). Inhibition of Poly (ADP-Ribose) Polymerase in BRCA Mutation Carriers. *New England Journal Of Medicine*, 361(17), 1707-1708.
- Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A.M., Perricaudet, M., et al. (2003). A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *European Molecular Biology Organization Journal*, 22, 2860-2871.
- Forner, A., Gilibert, M., Bruix, J., & Raoul, J. (2014). Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11(9), 525-535.
- Fuchs, B., Fujii, T., Dorfman, J., Goodwin, J., Zhu, A., Lanuti, M., & Tanabe, K. (2008). Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Integrin-Linked Kinase Mediate Sensitivity to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition in Human Hepatoma Cells. *Cancer Research*, 68(7), 2391-2399.
- Fujimoto, A., Totoki, Y., Abe, T., Boroevich, K., Hosoda, F., & Nguyen, H. et al. (2012). Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nature Genetics*, 44(7), 760-764.
- Futreal, P., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., & Tavtigian, S. et al. (1994). BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, 266(5182), 120-122.
- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, et al. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Molecular Cell*,7:249-262.
- Gari, K., Decaillet, C., Stasiak, AZ., Stasiak, A., Constantinou, A.(2008). The Fanconi anemia protein FANCM can promote branch migration of Holliday junctions and replication forks. *Molecular Cell*, 29:141-148.
- Giannelli, G., Bergamini, C., Marinosci, F., Fransvea, E., Quaranta, M., & Lupo, L. et al. (2002). Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma. *International Journal Of Cancer*, 97(4), 425-431.

- Gong, Z., Kim, J., Leung, C., Glover, J., & Chen, J. (2010). BACH1/FANCI Acts with TopBP1 and Participates Early in DNA Replication Checkpoint Control. *Molecular Cell*, 37(3), 438-446.
- Goss, P. (2003). Breast cancer prevention-clinical trials strategies involving aromatase inhibitors. *The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology*, 86(3-5), 487-493.
- Govaere, O., & Roskams, T. (2015). Pathogenesis and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma at the Cellular and Molecular Levels. *Clinics In Liver Disease*, 19(2), 261-276.
- Gudmundsdottir, K., & Ashworth, A. (2006). The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*, 25(43), 5864-5874.
- Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I. B., Zucman-Rossi, J. (2012). Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics*, 44(6), 694–698.
- Hall, J., Lee, M., Newman, B., Morrow, J., Anderson, L., Huey, B., & King, M. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250(4988), 1684-1689.
- Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., & Yabuki, Y. et al. (2001). The RING Heterodimer BRCA1-BARD1 Is a Ubiquitin Ligase Inactivated by a Breast Cancer-derived Mutation. *Journal Of Biological Chemistry*, 276(18), 14537-14540.
- Hayflick, L. & Moorhead, P. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585-621.
- Heinrich, MC., Hoatlin, ME., Zigler, AJ., Silvey, KV., Bakke, AC., Keeble, WW., Zhi, Y., Reifsteck, CA., Grompe, M., Brown, MG., Magenis, RE., Olson, SB., Bagby, GC. (1998). DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood*;91:275-87.
- Henderson, B. (2012). The BRCA1 Breast Cancer Suppressor: Regulation of Transport, Dynamics, and Function at Multiple Subcellular Locations. *Scientifica*, 1-15.
- Hilakivi-Clarke, L. (2000). Estrogens, BRCA1, and breast cancer. *Cancer Research*, 60, 4993- 5001.
- Holt, D., Dreimanis, M., Pfeiffer, M., Fargira, F., Morley, A., & Turner, D. (1999). Interindividual Variation in Mitotic Recombination. *The American Journal Of Human Genetics*, 65(5), 1423-1427.
- Horwitz, A., Affar, E., Heine, G., Shi, Y., & Parvin, J. (2007). A mechanism for transcriptional repression dependent on the BRCA1 E3 ubiquitin ligase. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 104(16), 6614-6619.
- Howlett NG, Taniguchi T, Oison S, et al. (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*, 297:606-609.

- Hu, L., Lau, S., Tzang, C., Wen, J., Wang, W., & Xie, D. et al. (2004). Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene*.
- Hussain S, Witt E, Huber PA, Medhurst AL, Ashworth A, Mathew CG. (2003). Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1. *Human Molecular Genetics*,12:2503-2510.
- Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC.(2007). TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 26:2166–2176.
- Ikushima, H., and Miyazono, K. (2011). Biology of Transforming Growth Factor- β ; Signaling. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12, 2099–2107.
- Jablkowski M, Bocian A , Bialkowska J , Bartkowiak J. (2005). A Comparative Study of P53/Mdm2 Genes Alterations and P53/Mdm2 Proteins Immunoreactivity in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 24 (1), 117-125. 3
- Jacinto, F., & Esteller, M. (2007). Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer. *Mutagenesis*, 22(4), 247-253.
- Jacquemont, C., & Taniguchi, T. (2007). Proteasome Function Is Required for DNA Damage Response and Fanconi Anemia Pathway Activation. *Cancer Research*, 67(15), 7395-7405.
- Jenuwein, T. (2001). Translating the Histone Code. *Science*, 293(5532), 1074-1080.
- Jiang, G., Plo, I., Wang, T., Rahman, M., Cho, J., & Yang, E. et al. (2013). BRCA1-Ku80 Protein Interaction Enhances End-joining Fidelity of Chromosomal Double-strand Breaks in the G1 Phase of the Cell Cycle. *Journal Of Biological Chemistry*, 288(13), 8966-8976.
- Johannsson, O., Loman, N., Borg, A., & Olsson, H. (1998). Pregnancy-associated breast cancer in BRCA1 and BRCA2 germline mutation carriers. *The Lancet*, 352(9137), 1359-1360.
- Joukov, V., Groen, A., Prokhorova, T., Gerson, R., White, E., & Rodriguez, A. et al. (2006). The BRCA1/BARD1 Heterodimer Modulates Ran-Dependent Mitotic Spindle Assembly. *Cell*, 127(3), 539-552.
- Kawabe, T. (2004). G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3:513-519.
- Kennedy, RD., D'Andrea, AD. (2005). The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes & Development*; 19: 2925–2940.
- Kinzler, K., & Vogelstein, B. (1997). Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386(6627), 761-763.
- Kleiman, F. (2005). BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II. *Genes & Development*, 19(10), 1227-1237.

- Knipscheer, P., Raschle, M., Smogorzewska, A., Enoiu, M., Ho, T., & Scharer, O. et al. (2009). The Fanconi Anemia Pathway Promotes Replication-Dependent DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Science*, 326(5960), 1698-1701.
- Knudson, A. G. (2003). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 157-62.
- Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Mizokami M, Ueda R, Hirohashi S (2000) Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis - A comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 32:970–979.
- Koonin, E., Altschul, S., & Bork, P. (1996). BRCA1 protein products and functional motifs. *Nature Genetics*, 13(3), 266-268.
- Konstantinopoulos P, Ceccaldi R, Shapiro G, D'Andrea A. Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discovery*. 2015;5(11):1137-1154.
- Kruyt FA, Dijkmans LM, Arwert F, Joenje H. (1997). Involvement of the Fanconi's anemia protein FAC in a pathway that signals to the cyclin B/cdc2 kinase. *Cancer Research*, 57:2244-51.
- Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Schinzel A, Rabinovitch PS. (1985). Endogenous Blockage and Delay of the Chromosome Cycle Despite Normal Recruitment and Growth Phase Explain Poor Proliferation and Frequent Edomitosis in Fanconi Anemia Cells. *American Journal of Human Genetics*, 37:1022-1030.
- Kupfer GM, D'Andrea AD. (1996). The effect of the Fanconi anemia polypeptide, FAC, upon p53 induction and G2 checkpoint regulation. *Blood*, 88:1019-25.
- Lambert MW, Tsongalis GJ, Lambert WC, et al. (1992). Defective DNA endonuclease activities in Fanconi's anemia cells, complementation groups A and B. *Mutation Research*; 273 : 57-71.
- Lasko, D. (1991). Loss Of Constitutional Heterozygosity In Human Cancer. *Annual Review Of Genetics*, 25(1), 281-314.
- Lee, K., Wang, D., Lippard, S., & Sharp, P. (2002). Transcription-coupled and DNA damage-dependent ubiquitination of RNA polymerase II in vitro. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 99(7), 4239-4244.
- Lee, S. (2014). Mechanisms of fibrogenesis in liver cirrhosis: The molecular aspects of epithelial-mesenchymal transition. *World Journal Of Hepatology*, 6(4), 207.
- Lenkala, D., LaCroix, B., Gamazon, E. R., Gleeher, P., Im, H. K., & Huang, R. S. (2014). The impact of microRNA expression on cellular proliferation. *Human Genetics*, 133(7), 931-938.
- Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, et al. (. 2004). Heterogeneity in Fanconi anémia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood*, 103:2498-2503.

- Li, H., T. H. Lee, and H. Avraham. 2002. A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer. *Journal of Biological Chemistry* 277:20965-73.
- Li, M., Zhao, H., Zhang, X., Wood, L., Anders, R., & Choti, M. et al. (2011). Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics*, 43(9), 828-829.
- Lin CH, Hsieh SY, Sheen IS, et al. (2001). Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Research*, 61 : 4238-43.
- Liu L, Dai Y, Chen J, Zeng T, Li Y, Chen L, Zhu YH, Li J, Xie D, Yuan YF et al (2013) Maelstrom promotes hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial–mesenchymal transition via Akt/GSK-3beta/snail signaling. *Hepatology*, 59(2):531–543.
- Liu, M., Jiang, L., & Guan, X. (2014). The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. *Protein Cell*, 5(9), 673-691.
- Lomonosov M, Anand S, Sangrithi M, Davies R, Venkitaraman AR. Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes & Development*, 2003;17:3017-3022.
- Lorick, K., Jensen, J., Fang, S., Ong, A., Hatakeyama, S., & Weissman, A. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 96(20), 11364-11369.
- Lotti, L., Ottini, L., D'Amico, C., Gradini, R., Cama, A., & Belleudi, F. et al. (2002). Subcellular localization of the BRCA1 gene product in mitotic cells. *Genes, Chromosomes And Cancer*, 35(3), 193-203.
- Lovering, R., Hanson, I. M., Borden, K. L. B., Martin, S., O'Reilly, N. J., Evan, G. I., Rahman, D., Pappin, D. J. C., Trowsdale, J., and Freemont, P. S. (1993). Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 2112- 2116.
- Lu, K. (2005). 3–14 The Risk of Ovarian Cancer After Breast Cancer in BRCA1 and BRCA2 Carriers. *Breast Diseases: A Year Book Quarterly*, 16(3), 252-253.
- Lundberg R, Mavinakere M, Campbell C. (2001). Deficient DNA end joining activity in extracts from Fanconi anemia fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 276 : 9543-9.
- MacLachlan, T. K., R. Takimoto, and W. S. El-Deiry. (2002). BRCA1 directs a selective p53-dependent transcriptional response towards growth arrest and DNA repair targets. *Molecular and Cellular Biology*, 22:4280-92.
- Magdinier, F. (2000). Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells. *The FASEB Journal*, 14(11), 1585-1594.

- Mancini, D., Rodenhiser, D., Ainsworth, P., O'Malley, F., Singh, S., Xing, W., & Archer, T. (1998). CpG methylation within the 5' regulatory region of the BRCA1 gene is tumor specific and includes a putative CREB binding site. *Oncogene*, 16(9), 1161-1169.
- Marchio, A., Meddeb, M., Pineau, P., Danglot, G., Tiollais, P., Bernheim, A., & Dejean, A. (1997). Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Hepatology Research*, 7(1), 73-73.
- Marquis, S., Rajan, J., Wynshaw-Boris, A., Xu, J., Yin, G., & Abel, K. et al. (1995). The developmental pattern of Brca1 expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues. *Nature Genetics*, 11(1), 17-26.
- Massagué, J. (2012). TGF β signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 616– 630.
- Matsushita N, Kitao H, Ishiai M, et al. (2005). A FancD2-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair. *Molecular Cell*, 19:841-847.
- McCabe, N., N. C. Turner, et al. (2006). "Deficiency in the Repair of DNA Damage by Homologous Recombination and Sensitivity to Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition. *Cancer Research*, 66(16): 8109-15.
- McHugh, P., Sones, W., & Hartley, J. (2000). Repair of Intermediate Structures Produced at DNA Interstrand Cross-Links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And Cellular Biology*, 20(10), 3425-3433.
- Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, et al. (2003). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nature Genetics*.;35:165-170.
- Meetei AR, Winter JP de, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, Hoatlin ME, Joenje H, Wang W.(2003). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nature Genetics*, 35:165-70.
- Mercer, T., Dinger, M., Sunkin, S., Mehler, M., & Mattick, J. (2008). Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 105(2), 716-721.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P., Harshman, K., & Tavtigian, S. et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266(5182), 66-71.
- Monteiro, A. (2003). BRCA1: the enigma of tissue-specific tumor development. *Trends In Genetics*, 19(6), 312-315.
- Monteiro, A. N., A. August, and H. Hanafusa. (1996). Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:13595-9.
- Morin, P. (1997). Activation of beta -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in beta -Catenin or APC. *Science*, 275(5307), 1787-1790.

- Moynahan ME, Cui TY, Jasin M. (2001). Homology-directed DNA repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Cancer Research*, 61:4842–50.
- Mueller, C., & Roskelley, C. (2002). Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. *Breast Cancer Research*, 5(1).
- Mullan, P., Quinn, J., & Harkin, D. (2006). The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene*, 25(43), 5854-5863.
- Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., Urashima, T., Toyoda, H., Okanoue, T. and Shimotohno, K. (2006). Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, 25(17), pp.2537-2545.
- Murakawa, Y., Sonoda, E., Barber, L., Zeng, W., Yokomori, K., & Kimura, H. et al. (2007). Inhibitors of the Proteasome Suppress Homologous DNA Recombination in Mammalian Cells. *Cancer Research*, 67(18), 8536-8543.
- Muto, J., Shirabe, K., Sugimachi, K., & Maehara, Y. (2014). Review of angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*, 45(1), 1-9.
- Nalepa, G., & Clapp, W. (2014). Fanconi anemia and the cell cycle: new perspectives on aneuploidy. *F1000prime Reports*, 6.
- Narod, S., & Foulkes, W. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 4(9), 665-676.
- Narod, S., Goldgar, D., Cannon-Albright, L., Weber, B., Moslehi, R., & Ives, E. et al. (1995). Risk modifiers in carriers of brca1 mutations. *International Journal Of Cancer*, 64(6), 394-398.
- Nault, J., Mallet, M., Pilati, C., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., & Laurent, C. et al. (2013). High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nature Communications*, 4.
- Noll, D., McGregor Mason, T., & Miller, P. (2006). Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. *Cheminform*, 37(20).
- Oh, B., Kim, H., Park, H., Shim, Y., Choi, J., Park, C., & Park, Y. (2007). DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *International Journal Of Molecular Medicine*.
- Ohnishi, S., Murakami, T., Moriyama, T., Mitamura, K., & Imawari, M. (1986). Androgen and estrogen receptors in hepatocellular carcinoma and in the surrounding on cancerous liver tissue. *Hepatology*, 6(3), 440-443.
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(1): a001008
- Ouchi, T., A. N. Monteiro, A. August, S. A. Aaronson, and H. Hanafusa. 1998.

- BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:2302-6.
- Ouchi, T., S. W. Lee, M. Ouchi, S. A. Aaronson, and C. M. Horvath. (2000). Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97:5208-13.
- Ozturk M (1991) P53 mutation in hepatocellular-carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet*, 338:1356–1359.
- Pal, A., & Donato, N. (2014). Ubiquitin-specific proteases as therapeutic targets for the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 16(5).
- Palagyi, A., Neveling, K., Plinninger, U., Ziesch, A., Targosz, B., & Denk, G. et al. (2010). Genetic inactivation of the Fanconi anemia gene FANCC identified in the hepatocellular carcinoma cell line HuH-7 confers sensitivity towards DNA-interstrand crosslinking agents. *Molecular Cancer*, 9(1), 127.
- Papadopoulo D, Guillouf C, Mohrenweiser H, Moustacchi E. Hypomutability in Fanconi anemia cells is associated with increased deletion frequency at the HPRT locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990 ; 87 : 8383-7.
- Paull, T., Rogakou, E., Yamazaki, V., Kirchgessner, C., Gellert, M., & Bonner, W. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, 10(15), 886-895.
- Pez, F., Lopez, A., Kim, M., Wands, J., Caron de Fromental, C., & Merle, P. (2013). Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: Molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *Journal Of Hepatology*, 59(5), 1107-1117.
- Pinyol, R., Tovar, V., & Llovet, J. (2014). TERT promoter mutations: Gatekeeper and driver of hepatocellular carcinoma. *Journal Of Hepatology*, 61(3), 685-687.
- Powles, T. (1999). Re: Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *JNCI Journal Of The National Cancer Institute*, 91(8), 730-730.
- Qin, L. (2002). The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World Journal Of Gastroenterology*, 8(3), 385.
- Quinn, J., Kennedy, R., Mullan, P., Johnston, P., & Harkin, D. (2003). 211 BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy induced apoptosis. *European Journal Of Cancer Supplements*, 2(8), 65.
- Rebbeck, T., & Domchek, S. (2008). Variation in breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Research*, 10(4).
- Reya, T. & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), 843-850.

- Rice, J. (2000). Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis*, 21(9), 1761-1765.
- Robinson, D., Wu, Y., & Lin, S. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19(49), 5548-5557.
- Rodríguez, J., & Henderson, B. (2000). Identification of a Functional Nuclear Export Sequence in BRCA1. *Journal Of Biological Chemistry*, 275(49), 38589-38596.
- Roos, W., & Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters*, 332(2), 237-248.
- Roskams, T., & Kojiro, M. (2010). Pathology of Early Hepatocellular Carcinoma: Conventional and Molecular Diagnosis. *Seminars In Liver Disease*, 30(01), 017-025.
- Rothfuss A, Grompe M. (2004). Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol*; 24: 123-34
- Rousseau, B., Ménard, L., Haurie, V., Taras, D., Blanc, J., & Moreau-Gaudry, F. et al. (2007). Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 46(4), 1108-1118.
- Roy, U., & Schärer, O. (2016). Involvement of translesion synthesis DNA polymerases in DNA interstrand crosslink repair. *DNA Repair*, 44, 33-41.
- Ruscito, I. (2016). Homologous recombination deficiency in ovarian cancer and beyond. *Cancer Breaking News*, 4(2), 17-22.
- Saito, Y., Hibino, S. and Saito, H. (2013). Alterations of epigenetics and microRNA in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*, 44(1), pp.31-42
- Saito, Y., Kanai, Y., Nakagawa, T., Sakamoto, M., Saito, H., Ishii, H., & Hirohashi, S. (2003). Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *International Journal Of Cancer*, 105(4), 527-532.
- Sakamoto, M. (2010). Reduced transforming growth factor-beta receptor II expression in hepatocellular carcinoma correlates with intrahepatic metastasis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 90: 1339-1345.
- Sala-Trepat M, Rouillard D, Escarceller M, et al. (2000). The arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi anemia cells. *Experimental Cell Research*, 260 : 208-15.
- Sarasin, F., Giostra, E., & Hadengue, A. (1996). Cost-effectiveness of screening for detection of small hepatocellular carcinoma in western patients with Child-Pugh class A cirrhosis. *The American Journal Of Medicine*, 101(4), 422-434.

- Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., & Nishiwaki, T. et al. (2000). AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nature Genetics*, 24(3), 245-250.
- Satterwhite, D., Matsunami, N., & White, R. (2000). TGF- β 1 Inhibits BRCA1 Expression through a Pathway That Requires pRb. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 276(2), 686-692.
- Savage, K., & Harkin, D. (2014). BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. *The FEBS Journal*, 282(4), 630-646.
- Scardocci, A., F. Guidi, et al. (2006). "Reduced BRCA1 expression due to promoter hypermethylation in therapy-related acute myeloid leukaemia. *British Journal of Cancer*, 95(8): 1108-13.
- Schwab, R., Blackford, A., & Niedzwiedz, W. (2010). ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells. *The EMBO Journal*, 29(4), 806-818.
- Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM. (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell*, 88: 265-275.
- Scully, R., Chen, J., Ochs, R., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J., & Livingston, D. (1997). Dynamic Changes of BRCA1 Subnuclear Location and Phosphorylation State Are Initiated by DNA Damage. *Cell*, 90(3), 425-435.
- Seyschab H, et al. (1995) Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood*, 85(8):2233-2237.
- Sgagias MK, Wagner KU, Hamik B, Stoeger S, Spieker R, Huber LJ, Chodosh LA, Cowan KH. (2004). Brca1-deficient murine mammary epithelial cells have increased sensitivity to CDDP and MMS. *Cell Cycle*,3: 1451- 6.
- Shay, J. & Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal Of Cancer*, 33(5), 787-791.
- Shi, X., Sun, M., Liu, H., Yao, Y., & Song, Y. (2013). Long non-coding RNAs: A new frontier in the study of human diseases. *Cancer Letters*, 339(2), 159-166.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer*, 3(3), 155-168.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., & Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the -catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 96(10), 5522-5527.
- Singh, T., Ali, A., Paramasivam, M., Pradhan, A., Wahengbam, K., Seidman, M., & Meetei, A. (2013). ATR-Dependent Phosphorylation of FANCM at Serine 1045 Is Essential for FANCM Functions. *Cancer Research*, 73(14), 4300-4310.

- Singh, T., Saro, D., Ali, A., Zheng, X., Du, C., & Killen, M. et al. (2010). MHF1-MHF2, a Histone-Fold-Containing Protein Complex, Participates in the Fanconi Anemia Pathway via FANCM. *Molecular Cell*, 37(6), 879-886.
- Smith, S., Easton, D., Evans, D., & Ponder, B. (1992). Allele losses in the region 17q12–21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome. *Nature Genetics*, 2(2), 128-131.
- Smith, T., Lee, M., Szabo, C., Jerome, N., McEuen, M., & Taylor, M. et al. (1996). Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Research*, 6(11), 1029-1049.
- Somasundaram, K., H. Zhang, Y. X. Zeng, Y. Houvras, Y. Peng, G. S. Wu, J. D. Licht, B. L. Weber, and W. S. El-Deiry. (1997). Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21 *WAF1/CiPl*. *Nature*, 389:187 -90.
- Stamenkovic, I. (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Seminars In Cancer Biology*, 10(6), 415-433.
- Starita, L. (2005). BRCA1/BARD1 Ubiquitinate Phosphorylated RNA Polymerase II. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(26), 24498-24505.
- Stefansson, O., Villanueva, A., Vidal, A., Martí, L., & Esteller, M. (2012). BRCA1 epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemotherapy in breast and ovarian cancer. *Epigenetics*, 7(11), 1225-1229.
- Stewart, M., Duncan, E., Coronado, E., DaRosa, P., Pruneda, J., Brzovic, P., & Klevit, R. (2017). Tuning BRCA1 and BARD1 activity to investigate RING ubiquitin ligase mechanisms. *Protein Science*, 26(3), 475-483.
- Stigliano, R., Marelli, L., Yu, D., Davies, N., Patch, D., & Burroughs, A. (2007). Seeding following percutaneous diagnostic and therapeutic approaches for hepatocellular carcinoma. What is the risk and the outcome?. *Cancer Treatment Reviews*, 33(5), 437-447.
- Sudo, T., Utsunomiya, T., Mimori, K., Nagahara, H., Ogawa, K., & Inoue, H. et al. (2005). Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. *British Journal Of Cancer*, 92(9), 1754-1758.
- Sun, S., Poon, R., Lee, N., Yeung, C., Chan, K., & Ng, I. et al. (2010). Proteomics of Hepatocellular Carcinoma: Serum Vimentin As a Surrogate Marker for Small Tumors (≤ 2 cm). *Journal Of Proteome Research*, 9(4), 1923-1930.
- Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, et al. (2002) Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell*; 109:459-472.
- Taniguchi, K., Roberts, L., Aderca, I., Dong, X., Qian, C., & Murphy, L. et al. (2002). Mutational spectrum of β -catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*, 21(31), 4863-4871.
- Taniguchi, T. (2002). S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood*, 100(7), 2414-2420.

- Tercero, J., & Diffley, J. (2001). Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature*, 412(6846), 553-557.
- Tian, J., Huang, H., Hoffman, B., Liebermann, D. A., Ledda-Columbano, G. M., Columbano, A., & Locker, J. (2011). Gadd45 β is an inducible coactivator of transcription that facilitates rapid liver growth in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(11), 4491–4502.
- Tibbetts, R. (2000). Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes & Development*, 14(23), 2989-3002.
- Tonin, PN. (2006). The limited spectrum of pathogenic BRCA1 and BRCA2 mutations in the French Canadian breast and breast-ovarian cancer families, a founder population of Quebec, Canada. *Bulletin du Cancer*, 93(9):841-6.
- Trinchet JC. (2009) Hepatocellular carcinoma: increasing incidence and optimized management. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 33(8-9):830-9
- Turner, N., Tutt, A., & Ashworth, A. (2004). Opinion: Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 814-819.
- Venkitaraman, A. (2001). Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108(2), 171-182.
- Venkitaraman, A. (2004). Tracing the network connecting brca and fanconi anaemia proteins. *Nature Reviews Cancer*, 4(4), 266-276.
- Villanueva, A., Newell, P., Chiang, D., Friedman, S., & Llovet, J. (2007). Genomics and Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma. *Seminars In Liver Disease*, 27(1), 055-076.
- Vollebergh, M., Lips, E., Nederlof, P., Wessels, L., Schmidt, M., & van Beers, E. et al. (2010). An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients. *Annals Of Oncology*, 22(7), 1561-1570.
- Voulgari, A., & Pintzas, A. (2009). Epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA).Reviews On Cancer*, 1796(2), 75-90.
- Walsh, C. (2015). Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. *Gynecologic Oncology*, 137(2), 343-350.
- Wang, Q., H. Zhang, K. Kajino, and M. J. Greene. 1998. BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells. *Oncogene* 17: 1939-48.

- Wang, X., Zhan, Q., Coursen, J., Khan, M., Kontny, H., & Yu, L. et al. (1999). GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 96(7), 3706-3711.
- Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J. and Qin, J. 2000b. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes & Development*, 14:927-39.
- Welch, D. (2006). Do We Need to Redefine a Cancer Metastasis and Staging Definitions?. *Breast Disease*, 26(1), 3-12.
- Wong, N., Yeo, W., Wong, W., Wong, N., Chan, K., & Mo, F. et al. (2009). TOP2A overexpression in hepatocellular carcinoma correlates with early age onset, shorter patients survival and chemoresistance. *International Journal Of Cancer*, 124(3), 644-652.
- Wright, W. & Shay, J. (2001). Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Current Opinion In Genetics & Development*, 11(1), 98-103.
- Xu, B., A. H. O'Donnell, S. T. Kim, and M. B. Kastan. (2002). Phosphorylation of serine 1387 in Brcal is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Research*, 62:4588-91.
- Xu, B., Kim, S., & Kastan, M. (2001). Involvement of Brcal in S-Phase and G2-Phase Checkpoints after Ionizing Irradiation. *Molecular And Cellular Biology*, 21(10), 3445-3450.
- Xu, C., Chambers, J., & Solomon, E. (1997). Complex Regulation of the BRCA1 Gene. *Journal Of Biological Chemistry*, 272(34), 20994-20997.
- Xu, C., Chambers, J., Nicolai, H., Brown, M., Hujeirat, Y., & Mohammed, S. et al. (1997). Mutations and alternative splicing of the BRCA1 gene in UK breast/ovarian cancer families. *Genes, Chromosomes And Cancer*, 18(2), 102-110.
- Yang, B., Guo, M., Herman, J., Clark, D. (2003). Aberrant Promoter Methylation Profiles of Tumor Suppressor Genes in Hepatocellular Carcinoma. *American Journal of Pathology*, 163:1101-1107.
- Yarde, D., Oliveira, V., Mathews, L., Wang, X., Villagra, A., & Boulware, D. et al. (2009). Targeting the Fanconi Anemia/BRCA Pathway Circumvents Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Cancer Research*, 69(24), 9367-9375.
- Yarden, R., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K., & Brody, L. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nature Genetics*, 30(3), 285-289.
- Yildiz, G., Arslan-Ergul, A., Bagislar, S., Konu, O., Yuzugullu, H., & Gursoy-Yuzugullu, O. et al. (2013). Genome-Wide Transcriptional Reorganization Associated with Senescence-to-Immortality Switch during Human Hepatocellular Carcinogenesis. *Plos ONE*, 8(5), e64016.

- Yoshida K, Matsuzaki K (2012) Differential Regulation of TGF-beta/Smad Signaling in Hepatic Stellate Cells between Acute and Chronic Liver Injuries. *Frontiers in physiology*, 3: 53
- Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G., Jackson, P., Groopman, J., & Manning, J. et al. (2001). SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nature Genetics*, 28(1), 29-35.
- Yun J, Zhong Q, Kwak JY, Lee WH. (2005). Hypersensitivity of Brca1-deficient MEF to the DNA interstrand crosslinking agent mitomycin C is associated with defect in homologous recombination repair and aberrant S-phase arrest. *Oncogene*; 24: 4009–4016.
- Yuzugullu, H., Benhaj, K., Ozturk, N., Senturk, S., Celik, E., & Toyly, A. et al. (2009). Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Cancer*, 8(1), 90.
- Zhang, J., Willers, H., Feng, Z., Ghosh, J., Kim, S., & Weaver, D. et al. (2003). Chk2 Phosphorylation of BRCA1 Regulates DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular And Cellular Biology*, 24(2), 708-718.
- Zheng, L., Pan, H., Li, S., Flesken-Nikitin, A., Chen, P.L., Boyer, T.G. and Lee, W.H. 2000. Sequence-specific transcriptional corepressor function for BRCA1 through a novel zinc finger protein, ZBRK1. *Mol Cell*. 6:757-68.
- Zhou Q, Lui VW, Yeo W. (2011). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Future Oncology*, 7: 1149-1167
- Zhu, A., Duda, D., Sahani, D., & Jain, R. (2011). HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(5), 292-301.
- Zucman-Rossi, J. (2010). Molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Digestive And Liver Disease*, 42, S235-S241.

Original Article

Role of Fanconi anemia/BRCA pathway genes in hepatocellular carcinoma chemoresistance

Sana Ferroudj,^{1,2,3} Gokhan Yildiz,^{1,4} Mourad Bouras,^{1,5} Evin Iscan,³ Umut Ekin³ and Mehmet Ozturk^{1,3}

¹CRI INSERM/UJF U823, Grenoble, France; ²Biochemistry Department, Faculty of Natural and Life Sciences University of Sétif ⁵Biochemistry and Molecular Biology, Department of Pharmacy, School of Medicine, Algeria; ³Izmir International Biomedicine and Genome Institute, Dokuz Eylul University, Izmir and ⁴Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Erzincan University, Erzincan, Turkey

Aim: To investigate the expression of DNA repair genes and the impact of the breast cancer 1, early onset (BRCA1) protein on chemoresistance of hepatocellular carcinoma (HCC).

Methods: Microarray gene expression datasets were analyzed using the gene set enrichment analysis method. BRCA1 protein was tested by Western blotting. Response of HCC cells to interstrand cross-links was investigated by cell viability assay following exposure to mitomycin C, cisplatin, and melphalan. Effects of BRCA1 ectopic expression were studied in HepG2 cells with BRCA1-expression plasmids. Effects of BRCA1 downregulation were studied in SNU449 cells with BRCA1-specific siRNAs. Response of transfected SNU449 cells to mitomycin C was analyzed by cell viability tests and cell cycle analysis using flow cytometry.

Results: Expression of Fanconi anemia and double-stranded DNA break repair genes was significantly upregulated in HCC tumors. This upregulation displayed a gradual amplification during tumor progression. BRCA1 and BRCA2 genes were among

consistently upregulated genes. Epithelial-like HCC cells had low BRCA1 expression and low chemoresistance, whereas mesenchymal-like HCC cells had high BRCA1 expression and increased chemoresistance. Ectopic expression of BRCA1 increased the chemoresistance of epithelial-like HepG2 cells. Conversely, BRCA1 knockdown chemosensitized mesenchymal-like SNU449 cells. Chemosensitization of SNU449 cells was due to cell cycle arrest at 4N stage.

Conclusion: Increased expression of Fanconi anemia and double-stranded DNA repair genes such as BRCA1 is a novel mechanism of HCC chemoresistance. However, functional inactivation of BRCA1 expression is sufficient to reverse such chemoresistance.

Key words: BRCA1, chemosensitization, DSB DNA repair, Fanconi anemia, hepatocellular cancer, interstrand cross-linker drugs

INTRODUCTION

HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC) is one of the deadliest cancers due to late diagnosis, natural chemoresistance and underlying liver disease.¹ Intrinsic resistance of HCC cells to chemotherapeutic drugs was reported almost 40 years ago.^{2,3} Clinical studies since then have largely confirmed this observation. Attempts for systematic treatment of HCC tumors with different types of chemotherapeutic drugs have all failed. Consequently,

the attention of the clinical and scientific community has now shifted to the development of targeted therapies. However, despite the much acclaimed but moderate success of sorafenib therapy, newly tested targeted therapies did not provide any better results.⁴ Thus, the consistent resistance of HCC to both conventional and targeted therapies remains one of the major and enigmatic issues.

Most chemotherapeutic drugs act by inducing DNA damage that triggers a response leading to cell cycle arrest, senescence or apoptosis, unless the damage is repaired. The mechanisms of resistance of HCC cells to DNA damage-inducing drugs are poorly understood. One of the best-understood mechanisms is multidrug resistance mediated by the MDR1 gene, encoding an efflux pump that counteracts the accumulation of chemotherapeutic drugs within target cells.⁵ The overexpression of MDR1 in HCC and some preneoplastic lesions provides

Correspondence: Mehmet Ozturk, Dokuz Eylul University Izmir Biomedicine and Genome Center, 35340 Balçova, Izmir, Turkey.

Email: mehmet.ozturk@deu.edu.tr

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest.

Received 25 August 2015; revision 26 January 2016; accepted 12 February 2016.

some evidence for the relevance of multidrug resistance to these tumors.⁶ However, this mechanism alone cannot explain the chemoresistance of HCC cells. As reported many years ago, multidrug-resistant HCC cells display little expression of *MDR1*. Moreover, neither verapamil nor quinidine, inhibitors of the drug efflux pump, were able to overcome multidrug resistance in HCC cells.⁷ Thus, the most critical mechanisms of HCC chemoresistance remain unknown.

Here, we hypothesize that increased expression of DNA repair genes may play an essential role in HCC chemoresistance. The potential role of DNA repair genes for tumor survival has not been a major interest in HCC. However, an early warning made nearly 40 years ago suggested that HCC chemoresistance may be due, at least partially, to increased DNA repair activity.² Since then, only a few studies have addressed this issue. For example, overexpression of nucleotide excision repair genes *ERCC1* and *XPC* in HCC was reported.⁸ Small molecule inhibitors of ATM kinase activity were reported to significantly enhance the cytotoxicity of Taxol and sorafenib.^{9,10} Recently, we published genome-wide gene expression profiles of cirrhosis and HCC tissues, in comparison with senescence- and immortality-associated genes.¹¹ Among gene sets that are enriched in HCC, 13 were related to DNA repair, suggesting that a large set of genes involved in DNA repair are overexpressed in HCC.¹¹

In this report, we carried out a comprehensive survey of the expression of DNA repair genes in HCC. This led us to focus on Fanconi anemia (FA) and double-strand break (DSB) repair pathway genes and to explore the potential roles of *BRCA1* gene overexpression in chemoresistance of HCC cells.

METHODS

Human HCC microarrays

THREE PUBLICLY AVAILABLE human HCC gene expression microarray datasets in the Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>), namely GSE17546,¹¹ GSE17548,¹¹ and GSE6764,¹² were used in this study. All three datasets were normalized separately using the RMA normalization method and BRB-ArrayTools developed by Dr. Richard Simon and BRB-ArrayTools Development Team (<http://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>, v4.5.0 Beta 2). Gene Set Expression Analysis (GSEA) was carried out on normalized microarray data using the “C2_cp” curated all canonical pathways gene sets list of the Molecular Signature Database (MSigDB) version 5.0 (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/>), and the GSEA desktop application

version 2.2.0. Signal intensities of the individual probe sets corresponding to the same gene were collapsed during analyses. Heatmaps of the selected significantly enriched gene sets are presented here.

Enrichment Map analysis

The Enrichment Map¹³ plug-in (version 2.0.1) of Cytoscape¹⁴ (version 3.2.1) was used for network construction. The plug-in was used as described¹³ with default parameters. The GSEA results of an *in vivo* patient microarray dataset (GSE17548) were used as input for network creation. Epithelial–mesenchymal transition (EMT) related gene sets ANASTASSIOU_CANCER_MESENCHYMAL_TRANSITION_SIGNATURE and REACTOME_TGF_BETA_RECEPTOR_SIGNALING_IN_EMT_EPITHELIAL_TO_MESENCHYMAL_TRANSITION were determined at MSigDB version 5.0 (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb>) and integrated to the network as signature gene sets.

Cell culture and treatment

Nine HCC cell lines, HepG2, Hep3B, Huh7, PLC/PRF5, FOCUS, Mahlavu, SNU398, SNU449, and SNU475 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), and fetal lung fibroblast cell line MRC5¹⁵ were used. Hep3B, HepG2, PLC, Huh7, Mahlavu, FOCUS, and MRC5 were cultured in a humidified atmosphere with 5 % CO₂ in high-glucose DMEM (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% non-essential amino acids, and 1% penicillin/streptomycin. SNU449, SNU398, and SNU475 were cultured under the same conditions with RPMI-1640 (Gibco, Cergy Pontoise, France) medium. All cell lines were routinely tested against mycoplasma contamination (Invitrogen, Toulouse, France).

Western blot analysis

Total cell lysates were obtained with lysis buffer (Tris–HCl [10 mM], NaCl [100 mM], EDTA [5 mM], Triton X-100 [5%]) containing complete protease inhibitor (Indianapolis, IN, USA), sodium fluoride (50 mM), and sodium-o-vanadate (1 mM) and separated in a 7.5–12.5% SDS-PAGE and blotted on polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Incubations were carried out with primary antibodies to the BRCA1 protein (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or calnexin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich). Bands were visualized with detection substrate ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and Fusion Fx7 equipment (PeqLab, Erlangen, Germany).

Transfection with short interfering RNA targeting BRCA1

Four single ON-TARGETplus short interfering RNAs (siRNAs), BRCA1-2 (LU-003 461-00-0002; hereafter called siBRCA1-1) and siRNA ON-TARGETplus SMARTpool Human BRCA1 (L003461-00-0020; hereafter called siBRCA1-2), and non-targeting pool (D-001 810-10-20; hereafter called siControl) were purchased from Dharmacon Research (Lafayette, CO, USA). The siRNAs targeting BRCA1 were transfected into SNU449 cells at a concentration of 50 nM using HiPerfect transfection reagent (Qiagen, Hilden, Germany) following the protocol recommended by the manufacturer. Cells were harvested 72 h after transfection. Control siRNA was used in parallel to BRCA1 siRNA transfections.

Ectopic expression of BRCA1

The pCMVmycBRCA1 plasmid containing human BRCA1 cDNA under the control of cytomegalovirus (CMV) promoter¹⁶ and corresponding empty pCMVmyc plasmid were kindly provided by Dr. İsik Yulug from Bilkent University (Ankara, Turkey).¹⁶ HepG2 cells were seeded in 10-cm dishes (10⁶ cells/dish) and transiently transfected 24 h later with 5 µg plasmid using Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were subjected to cytotoxicity tests for 96 h. BRCA1 protein levels were tested by Western blotting at 48 and 96 h, with similar results obtained.

Cell treatment and analysis of cell viability

Mitomycin C (MMC), cisplatin, and melphalan were purchased from Sigma-Aldrich. All single-drug *in vitro* experiments were carried out in 96-well plates. Briefly, cells were plated in 96-well plates. At 24 h after the initial seeding of the cells, various drug treatments were carried out in the presence of increasing concentrations of antitumor drugs. At 96 h, cell proliferation analysis was undertaken using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with absolute ethanol and incubated with 50 µL MTT. Absorbance was measured at a wavelength of 620 nm using an EnVision plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA 02451, USA). The concentration of drug that reduced the number of viable cells to 50% after 96 h of exposure (IC₅₀) was derived by an interpolate logarithmic concentration curve. Results were derived from at least two independent sets of triplicate experiments. The IC₅₀ values of MMC, cisplatin, and melphalan were calculated using GraphPad Prism 5 (version 5.01; GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Cell cycle analysis

Cells were harvested, pooled, and fixed with 70% ethanol at 4°C over-night. Fixed cells were stained with propidium iodide solution (50 mg/mL propidium iodide and 100 mg/mL RNase A in PBS) and then incubated in PBS at 37°C for 30 min. The percentages of cells in specific cell cycle phases (G₀/G₁, S, and G₂/M) were determined using a flow cytometer equipped with a 488-nm argon laser Accuri C6 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Apoptotic cells with hypodiploid DNA staining were counted in the “sub-G₁” peak.

Statistical analysis

Results are expressed as means ± SD. The statistical significance of differences between groups was determined by Student's *t*-test. All data were analyzed using two-tailed tests unless otherwise specified and *P* < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Overexpression of Fanconi anemia and DSB repair pathway genes in HCC

WE REPORTED RECENTLY that GSEA of genes expressed in HCC as compared to cirrhosis tissues revealed 13 DNA repair-related gene sets to be enriched in HCC.¹¹ Here, we further analyzed FA and DSB repair gene sets. Both gene sets were overexpressed in HCC, compared to cirrhosis (Fig. 1a). The analysis of another tissue dataset¹² showed that FA and DSB repair genes display a gradual increase in parallel to tumor progression from very early HCCs to very advanced stages (Fig. 1b). Among FA and DSB repair gene sets, *BRCA1*, *BRCA2*, and *ATM* are of particular interest, because they are involved in both repair pathways. Interestingly, all three genes were consistently upregulated in immortal clones as well as in HCC (Fig. 1).

Overexpression of BRCA1 protein in mesenchymal-like HCC cell lines

BRCA1 appeared as a critical DNA repair gene involved in HCC malignancy based on its consistent overexpression in HCC as compared to cirrhosis (Fig. 1a), as well as the correlation of its expression with tumor progression (Fig. 1b). Therefore, we decided to focus on the role of *BRCA1* more specifically in this study. We used a panel of nine HCC cell lines for experimental work. Western blot analysis showed the overexpression of BRCA1 protein in four out of five (80%) mesenchymal-like HCC cell lines. In four epithelial-like cell lines, BRCA1 was weakly expressed (Huh7, HepG2, Hep3B) or undetected (PLC/PRF/5), as shown in Figure 2.

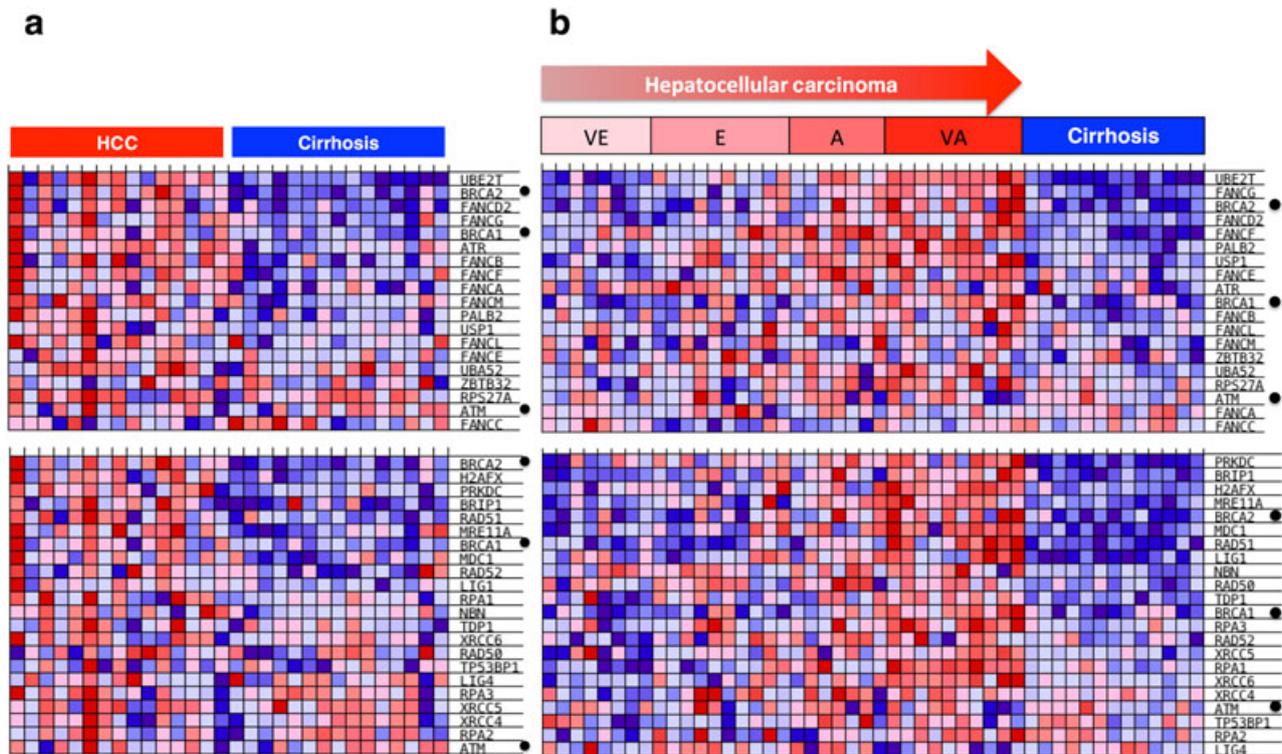


Figure 1 Overexpression and gradual upregulation of Fanconi anemia (FA) and DNA double-strand break (DSB) repair pathway genes in hepatocellular carcinoma (HCC). (a) Microarray gene expression profile data generated from HCC and cirrhosis tissue samples were subjected to Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).¹¹ GSEA revealed that both pathways are enriched in HCC samples compared to cirrhosis samples. The heatmap figure shows results of FA (top panel) and DSB repair (bottom panel) pathways. Commonly deregulated genes in both gene sets are indicated with closed circles. (b) Microarray gene expression dataset of Wurbach *et al.*¹² was subjected to GSEA. GSEA revealed that FA pathway (top panel) and DSB repair pathway (bottom panel) genes are least expressed in cirrhosis samples and gradually upregulated during tumor progression. Commonly deregulated genes in both gene sets are indicated with closed circles. Blue, downregulated gene expression; red, upregulated. A, advanced; E, early; VA, very advanced; VE, very early. Genes common to both pathways are indicated with a closed circle.

As reported previously by us¹⁷ and others,¹⁸ human HCC cell lines form epithelial-like and mesenchymal-like groups based on their *in vitro* morphology and differential expression of proteins such as E-cadherin and vimentin. Epithelial cells, including hepatocytes, show low motility, in contrast to mesenchymal cells, which display high motility and invasive behavior. A quantitative analysis of wound-healing assay confirmed that poorly differentiated cell lines show higher motility. In addition, these poorly differentiated cell lines shared many features with mesenchymal cells, including the expression of mesenchymal markers (vimentin, slug, snail, twist-1, and twist-2), high motility, and invasiveness.^{17,18} These expression and migratory features are associated with tumor dedifferentiation and are confined to poorly differentiated HCCs.¹⁷ The overexpression of BRCA1 protein in 80% of mesenchymal-like HCC cells, as opposed to its weak

expression in epithelial-like HCC cells, confirmed microarray data shown in Figure 1(b), further indicating its involvement in HCC progression.^{17,18}

Our observations reported here suggested that BRCA1-related DNA repair gene sets are upregulated in association with EMT. In order to determine a possible correlation between BRCA1-related DNA repair gene sets and mesenchymal phenotype-related gene sets, we first constructed a network based on the number of shared genes among our BRCA1-related DNA repair gene sets using the Enrichment Map application.¹³ After construction of this network (called here the “BRCA1 network”) we checked mesenchymal phenotype-related gene sets in the MSigDB. There were only two mesenchymal cell signature-related gene sets in the C2 all-curated gene sets list of the database, namely “ANASTASSIOU_CANCER_MESENCHYMAL_TRANSITION_SIGNATURE” (Anastassiou D. *et al.*, 2011)¹⁹ and

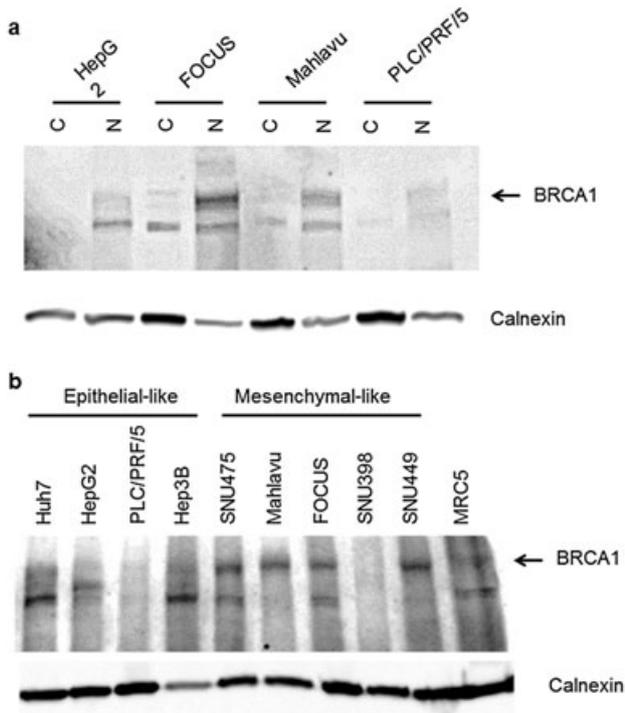


Figure 2 Overexpression of BRCA1 protein in mesenchymal-like hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines. (a) Comparative analysis of nuclear (N) and cytoplasmic (C) fractions of four different HCC cell lines identified nuclear accumulation of BRCA1 protein. (b) Compared to the normal fibroblast cell line (MRC5), high expression of BRCA1 was observed in mesenchymal-like ($n = 4/5$) HCC cells. Endoplasmic reticulum protein calnexin was used as a loading control.

“REACTOME_TGF_BETA_RECEPTOR_SIGNALING_IN_EMT_EPITHELIAL_TO_MESENCHYMAL_TRANSITION” (<http://www.reactome.org>). The integration ability of the two EMT gene sets to the BRCA1 network was tested using the Enrichment Map (EM) application. As shown in Figure 3, our analyses showed that “TGF- β receptor signaling in EMT gene set” was successfully integrated into the “BRCA network”. Thus, the BRCA network was indeed associated with EMT.

Increased resistance of mesenchymal-like HCC cells to interstrand cross-link-inducing drugs

Next, we compared two classes of HCC cell lines for their response to drugs that are known to induce interstrand cross-link (ICL) lesions. We selected MMC, melphalan, and cisplatin,²⁰ poor substrates for multidrug-resistance gene *MDR7* which might have confounding effect on DNA repair response in HCC cells. Therefore, we tried to create a specific ICL effect, independent of *MDR1*-

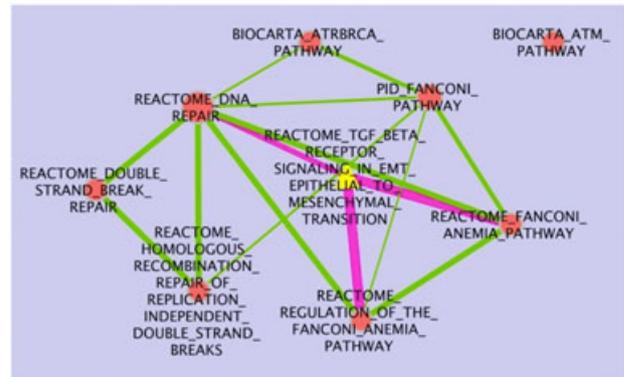


Figure 3 Association of the “BRCA1 network” with transforming growth factor- β (TGF- β) receptor-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT). The BRCA1 network was constructed, based on the number of shared genes among our BRCA1-related DNA repair gene sets using the Enrichment Map application. Mesenchymal phenotype-related gene sets available at the Molecular Signature Database were then tested for their integration ability into the BRCA1 network. The BRCA network (shown as orange hubs at the periphery) was composed of six out of seven BRCA1-related gene sets. The TGF- β receptor signaling in EMT gene set (shown as yellow hub at the center) was successfully integrated into the BRCA1 network.

mediated drug efflux, under our experimental conditions. We selected Huh7 as an ICL-hypersensitive cell line due to a homozygous Fanconi Anemia, Complementation Group C (FANCC) nonsense mutation²¹ to test the resistance of other HCC cell lines.¹⁸ Table 1 summarizes the IC_{50} values and relative resistance of epithelial-like and mesenchymal-like HCC cell lines to tested drugs. Compared to Huh7, all other HCC cell lines showed increased resistance to MMC and melphalan, the resistance to cisplatin being less consistent. Overall, IC_{50} and relative resistance values were higher for mesenchymal cell lines, as compared to epithelial-like cell lines, although this difference was not significant due to the small number of samples (data not shown). The most striking resistance was observed with “mesenchymal-like” SNU449 cells. As shown in Table 1, IC_{50} values of MMC, cisplatin, and melphalan were 99-, 22-, and 17-fold higher in SNU449 as compared to Huh7 cells, respectively.

Ectopic expression of BRCA1 results in increased resistance to MMC

The triple association between BRCA1 overexpression, mesenchymal-like phenotype and resistance to interstrand cross-link-inducing drugs strongly suggested that BRCA1 is involved in HCC chemoresistance. To test this hypothesis, we analyzed the response of HCC cell lines to MMC

Table 1 Sensitivity of hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines to mitomycin C, melphalan, and cisplatin

Cell lines	Mitomycin C		Melphalan		Cisplatin	
	IC ₅₀ , nM	RR†	IC ₅₀ , μM	RR†	IC ₅₀ , μM	RR†
<i>Epithelial-like HCC cell lines</i>						
Huh7 (FA-deficient)	16	1	3	1	0.4	1
HepG2	72	4	14	5	2.3	5
PLC/PRE/5	141	9	17	6	2.4	5
Hep3B	212	13	8	3	0.7	2
<i>Mesenchymal-like HCC cell lines</i>						
FOCUS	122	8	10	4	1.4	3
SNU475	155	10	24	9	1.1	2
Mahlavu	215	13	6	2	0.4	1
SNU398	572	36	12	4	0.6	1
SNU449	1579	99	44	17	9.9	22

†Relative resistance compared to hypersensitive Huh7 cell line. FA, Fanconi anemia.

following experimental manipulation of BRCA1 protein levels. The upregulation of BRCA1 levels was obtained by transient transfection of epithelial-like HepG2 cells with pCMVmycBRCA1 plasmid allowing strong expression of BRCA1 protein under the control of CMV promoter.¹⁶ The empty pCMVmyc plasmid was used as a negative control. BRCA1 upregulation was examined by Western blotting at 48 and 96 h following transfection. Data shown in Figure 4(a) indicated that pCMVmycBRCA1 plasmid allowed a noticeable increase in BRCA1 levels in both nuclear and cytoplasmic fractions of HepG2 cells, as compared to control plasmid. HepG2 cells were exposed to MMC for 96 h following 48-h plasmid transfections. Cells with ectopic BRCA1 expression showed an average of 23% increased resistance (varying between 9% and 47% depending on MMC dose). This increase in resistance was statistically significant ($P < 0.01$) in 4 out of 6 doses tested (Fig. 4b). These observations suggested that BRCA1 overexpression is able to increase the chemoresistance of HepG2 to MMC, even though this effect appeared to be limited, probably because of suboptimal induction of BRCA1 levels under transient transfection conditions.

Chemosensitization of HCC cells by downregulation of BRCA1 expression

The siRNA-mediated knockdown is an effective means for experimental inactivation of target genes. Based on their extreme resistance to ICL-inducing drugs, we selected SNU449 cells to test the effect of BRCA1 knockdown on their response to MMC. Cells were transfected with two different BRCA1-directed siRNAs, siBRCA1-1 and siBRCA1-2, and control siRNAs and tested for BRCA1

expression. The siBRCA1-1 completely abolished BRCA1 protein expression, whereas siBRCA1-2 caused a milder effect at both nuclear and cytoplasmic pools, as indicated by Western blotting (Fig. 5a). Following transfection with respective siRNAs, cells were incubated for 24 h and then left untreated (MMC 0), or treated with MMC at increasing doses between 50 nM and 1 μM for 96 h. BRCA1 knockdown caused significant chemosensitization (Fig. 5b) by decreasing cell viability in all doses tested ($P < 0.0001$). The chemosensitization effect was most dramatic at low levels of MMC. For example, control siRNA-treated SNU449 cells were almost totally resistant to 100 nM MMC, but BRCA1 siRNA treated cells showed 50% or more growth inhibition (Fig. 5b).

Downregulation of BRCA1 expression enhanced cell cycle arrest in response to MMC

In order to further explore the role of BRCA1 overexpression in HCC chemoresistance, we compared cell cycle changes following MMC treatment of SNU449 cells with or without knockdown of BRCA1 expression. Mitomycin C treatment of SNU449 cells after control siRNA transfection caused an increase in S and G₂/M phase cells accompanied with a decrease in G₁ phase cells compared to untreated cells (Fig. 6a,b). Mitomycin C treatment of SNU449 cells after BRCA1 siRNA transfection caused enhanced accumulation of cells at the G₂/M phase concomitant with a further decrease in G₁ phase cells compared to untreated cells (Fig. 6c,d). A closer examination of cell cycle distribution profiles after MMC treatment indicated that cells were accumulating at the S to G₂/M border, suggesting that MMC treatment may cause an arrest in late S and G₂/M phases.

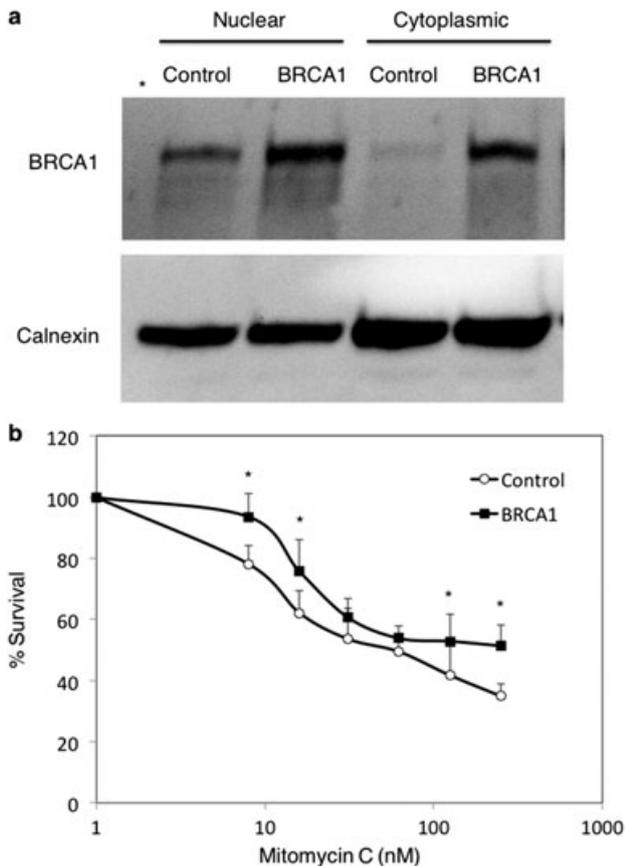


Figure 4 Ectopic expression of BRCA1 in HepG2 cells caused increased resistance to mitomycin C. (a) Western blot analysis showed a specific increase in nuclear and cytoplasmic fractions of BRCA1 protein, following transient transfection with a BRCA1 expression plasmid. Endoplasmic reticulum protein calnexin was used as a loading control. (b) Under the same conditions, HepG2 cells became more resistant to mitomycin C treatment. * $P < 0.01$. Experiments in triplicate were repeated three times.

In order to test whether BRCA1 siRNA-induced enhanced response was statistically significant, we undertook a triplicate analysis of cell cycle changes under the same conditions and compared the distribution of sub- G_1 , G_1 , and S + G_2/M cells. When compared to untreated but control siRNA-transfected cells, untreated BRCA1 siRNA-transfected cells did not show any significant change ($P > 0.05$). In sharp contrast, MMC-treated and BRCA1 siRNA-transfected cells showed a significant increase in S + G_2/M phase cells, together with a significant decrease in G_1 and sub- G_1 phase cells ($P < 0.05$), as shown in Figure 6(e). We concluded that better growth inhibition by MMC under BRCA1-deficient conditions (Fig. 5) is due to an enhanced accumulation of cells at late S and G_2/M phases (4N stage).

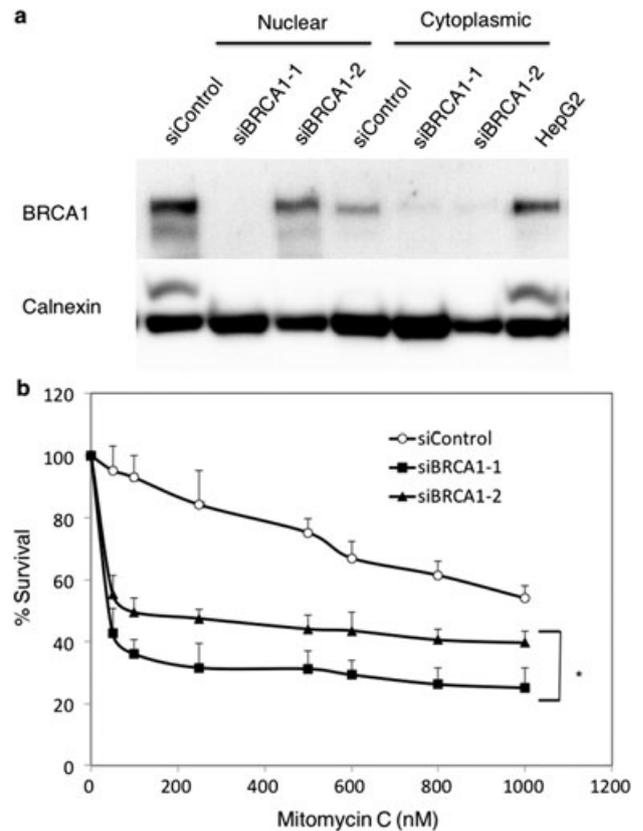


Figure 5 Downregulation of BRCA1 in SNU449 cells caused increased sensitivity to mitomycin C. (a) Western blot analysis showed a specific and strong decrease in BRCA1 protein levels following transfection with two different types of BRCA1 siRNAs (siBRCA1-1 and siBRCA1-2). (b) Under the same conditions, cell survival was decreased with mitomycin C treatment.

DISCUSSION

WE REPORTED PREVIOUSLY that DNA repair genes are overexpressed in HCC compared to cirrhotic tissues.¹¹ Here, we report that FA and DSB repair gene sets are significantly enriched in HCC. BRCA1 and BRCA2 genes involved in both FA and DSB repair pathways were systematically upregulated in HCC. The link between the FA pathway and the BRCA pathway is well established as FANCD1 is identical to BRCA2 and several FA pathway proteins interact directly with BRCA1 or BRCA2.²² The key event in the activation of this pathway is the interdependent monoubiquitination of FANCD2 and FANCI. Following that, the FANCD2/I complex is targeted to sites of chromatin damage.²³ Although the exact molecular function of the FA/BRCA pathway is poorly defined, its activation culminates in repair of ICLs.²³ Furthermore, this pathway has been shown to play an important role in

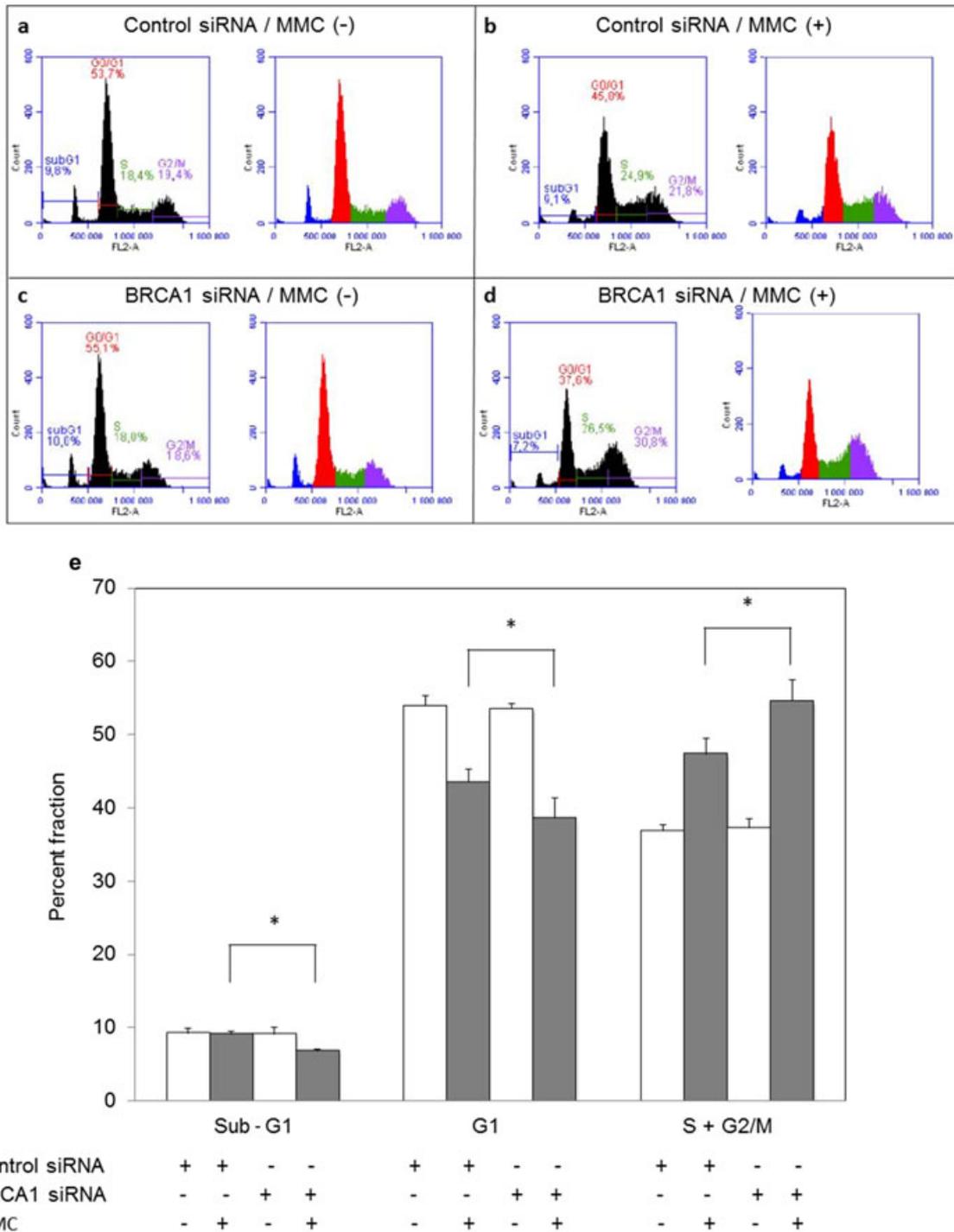


Figure 6 Modulation of mitomycin C (MMC)-induced cell cycle arrest in SNU449 cells by downregulation of BRCA1 expression. Cells were transfected with siRNAs, left for 24 h, and then exposed to MMC (200 nM) for 24 h. Treated and untreated cells were subjected to cycle analysis by flow cytometry. (a) Untreated cells after transfection with control siRNAs. (b) MMC-treated cells after transfection with control siRNAs. (c) Untreated cells after transfection with BRCA1 siRNA. (d) MMC-treated cells after transfection with BRCA1 siRNAs. (e) BRCA1 knockdown significantly enhances cell cycle alterations induced by MMC in SNU449 cells. Cell treatments and cell cycle analysis were carried out in triplicate and data was analyzed to test the significance of the effects of BRCA1 knockdown. **P* < 0.05.

the acquisition of drug resistance.²³ In our study, the gradual increase in the overexpression of FA and DSB repair genes during HCC progression was of particular interest. In this report, we focused on *BRCA1*. In confirmation of tumor data, *BRCA1* protein showed increased expression in mesenchymal-like HCC cell lines, considered to represent an advanced stage in HCC, as opposed to epithelial-like HCC cell lines, which are likely to represent early HCCs. Indeed, tumor cells convert from low- to high-grade malignancy partly through EMT.²⁴ This transition endows metastatic properties to cancer cells to promote invasion, migration, and subsequent dissemination.^{25,26} Here, we show that mesenchymal-like HCC cell lines are highly resistant to drugs including MMC, cisplatin, and melphalan. This phenotype correlated with overexpression of *BRCA1* protein in the same set of cell lines. Indeed, our results showed that the mesenchymal-like SNU449 cell line was extremely resistant to all three ICL-inducing drugs. Previous studies reported that the upregulation of *BRCA1* expression leads to increased cisplatin resistance in a human ovarian cancer cell line.²⁷ *BRCA1* loss is significantly associated with increased FA/BRCA pathway gene expression in myeloma cell lines and it was found that many FA/BRCA genes are overexpressed in melphalan-resistant myeloma cells when compared with drug-sensitive parental cells.²³ It has also been reported that there was a causal relationship between levels of FANCF and melphalan response.²³ Our findings show that *BRCA1* is similarly involved in HCC cells. Thus, the transcriptional activation of the FA/BRCA pathway in HCC might allow for enhanced ICL repair, tumor progression, and emergence of acquired drug resistance. Moreover, we showed that the increase in both *BRCA1* expression and chemoresistance is associated with the acquisition of a mesenchymal-like phenotype in HCC.

To investigate further involvement of *BRCA1* in chemoresistance of HCC cells, we measured the chemotherapeutic response of HCC cell lines following experimental manipulation of *BRCA1* protein levels. Ectopic expression of *BRCA1* in HepG2 cells that display low levels of endogenous *BRCA1* resulted in increased chemoresistance. Conversely, the knockdown of *BRCA1* in SNU449 cells with high levels of endogenous *BRCA1* caused chemosensitization. Using two different types of siRNAs, we achieved either complete or partial loss of expression. Both reagents markedly enhanced MMC chemosensitivity. Using a dose of 100 nM MMC, *BRCA1* knocked-down SNU449 cells lost their chemoresistance by more than 50%. Thus, the increased *BRCA1* expression in HCC cells seems to play a significant role in their chemoresistance to ICL-inducing drugs.

In the present study, we also analyzed the cell cycle response to ICL agent MMC using SNU449 cells with or without *BRCA1* knockdown. We observed that, after exposure to MMC, *BRCA1* knockdown in SNU449 cells responded with enhanced accumulation in 4N stage, represented by late S and G₂/M phase cells. SNU449 cells without *BRCA1* knockdown responded similarly, but to a significantly lesser degree. Thus, enhanced growth inhibition induced by MMC in *BRCA1*-knockdown SNU449 cells is likely to be a direct consequence of enhanced growth arrest at 4N stage. The G₂/M arrest in FA cells was linked to a secondary response to the increase in the damaged DNA following exposure to ICL agents.^{28,29}

Taken together, our findings strongly suggest that the resistance of SNU449 cells to MMC is due to an increased capacity to repair ICL-induced DNA damage due to upregulation of major FA/DSB repair pathway genes such as *BRCA1*. Indeed, *BRCA1* appears to play a unique and essential role in this pathway so that its downregulation alone may be sufficient to impair the whole repair system.

Our findings may have critical implications for a better understanding of problems associated with systemic chemotherapy in HCC patients, whereas loco-regional chemoembolization of small tumors appears to offer better success rates. For example, intra-arterial infusion of a drug such as cisplatin or doxorubicin, followed by embolization of the blood vessel, results in a strong cytotoxic effect in HCC.³⁰ Based on observations presented here, HCC patients with a cirrhotic background (80% of HCC cases) may show an imbalance in their capacity to respond to chemotherapeutic drugs such as MMC, because of increased expression of FA and DAB repair genes in their tumor cells compared to their non-tumor cirrhotic cells. Under these conditions, systemic chemotherapy in these patients may be hepatotoxic without much effect on tumor cells. Decreasing the chemotherapy dose may limit the hepatotoxicity but will result in tumor resistance, whereas a dose increase may kill more non-tumor cells than tumor cells, providing a survival advantage to tumor cells. As shown here experimentally, a chemotherapy combined with the inhibition of a gene (i.e. *BRCA1*) involved in the FA and/or DSB repair pathway may be helpful to overcome this handicap in HCC patients.

In summary, to our knowledge, our study is the first to show that enhanced expression of the FA/BRCA pathway genes is an important mechanism involved in HCC chemoresistance. Moreover, we demonstrated that such chemoresistance can be overcome, at least partially, by downregulating just one FA/BRCA pathway gene, such as

BRCA1. We believe it is worthwhile to further explore the inhibition of the FA/BRCA pathway to enhance the efficacy of chemotherapy in HCC.

ACKNOWLEDGMENTS

THIS WORK WAS supported by La Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labélisée) and Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Project No: 113S389 with additional support from the Turkish Academy of Sciences. Sana Ferroudj was supported by a Fellowship of the Ministry of Higher Education and Scientific Research (Algeria). Gokhan Yildiz was supported by TUBITAK (BIDEB-2214) and European Molecular Biology Organization short-term fellowships. We thank Dr. Isik Yulug for providing pCMVmycBRCA1 plasmid.

REFERENCES

- 1 El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; **132**: 2557–76.
- 2 Inaba M, Sakurai Y. Role of DNA repair in natural resistance of rat ascites hepatomas to nitrogen mustard. *Gann* 1977; **68**: 15–9.
- 3 Barranco SC, Haenelt BR, Gee EL. Differential sensitivities of five rat hepatoma cell lines to anticancer drugs. *Cancer Res* 1978; **38**: 656–60.
- 4 Shin JW, Chung YH. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: current and future. *World J Gastroenterol* 2013; **19**: 6144–55.
- 5 Breier A, Gibalova L, Seres M, Barancik M, Sulova Z. New insight into p-glycoprotein as a drug target. *Anticancer Agents Med Chem* 2013; **13**: 159–70.
- 6 Chenivresse X, Franco D, Bréchet C. *MDR1* (multidrug resistance) gene expression in human primary liver cancer and cirrhosis. *J Hepatol* 1993; **18**: 168–72.
- 7 Shen DW, Lu YG, Chin KV, Pastan I, Gottesman MM. Human hepatocellular carcinoma cell lines exhibit multidrug resistance unrelated to *MRD1* gene expression. *J Cell Sci* 1991; **98**: 317–22.
- 8 Fautrel A, Andrieux L, Musso O, Boudjema K, Guillouzo A, Langouet S. Overexpression of the two nucleotide excision repair genes *ERCC1* and *XPC* in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; **43**: 288–93.
- 9 Wang H, Zuo B, Wang H *et al.* CGK733 enhances multinucleated cell formation and cytotoxicity induced by taxol in Chk1-deficient HBV-positive hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **422**: 103–8.
- 10 Fujimaki S, Matsuda Y, Wakai T *et al.* Blockade of ataxia telangiectasia mutated sensitizes hepatoma cell lines to sorafenib by interfering with Akt signaling. *Cancer Lett* 2012; **319**: 98–108.
- 11 Yildiz G, Arslan-Ergul A, Bagislar S *et al.* Genome-wide transcriptional reorganization associated with senescence-to-immortality switch during human hepatocellular carcinogenesis. *PLoS One* 2013; **8**: e64016.
- 12 Wurmbach E, Chen YB, Khitrov G *et al.* Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007; **45**: 938–47.
- 13 Merico D, Isserlin R, Stueker O, Emili A, Bader GD. Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PLoS One* 2010; **5**: e13984.
- 14 Shannon P, Markiel A, Ozier O *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; **13**: 2498–504.
- 15 Sayan BS, Ince G, Sayan AE, Ozturk M. NAPO as a novel marker for apoptosis. *J Cell Biol* 2001; **155**: 719–24.
- 16 Atalay A, Crook T, Ozturk M, Yulug IG. Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **299**: 839–46.
- 17 Yuzugullu H, Benhaj K, Ozturk N *et al.* Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer* 2009; **8**: 90.
- 18 Fuchs BC, Fuji T, Dorfman JD *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res* 2008; **68**: 2391–9.
- 19 Anastassiou D, Rumjantseva V, Cheng W *et al.* Human cancer cells express Slug-based epithelial-mesenchymal transition gene expression signature obtained in vivo. *BMC Cancer* 2011; **11**: 529.
- 20 Moynahan ME, Cui TY, Jasin M. Homology-directed DNA repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a *Brc1* mutation. *Cancer Res* 2001; **61**: 4842–50.
- 21 Palagyi A, Neveling K, Plinninger U *et al.* Genetic inactivation of the Fanconi anemia gene *FANCC* identified in the hepatocellular carcinoma cell line HuH-7 confers sensitivity towards DNA-interstrand crosslinking agents. *Mol Cancer* 2010; **9**: 127.
- 22 Wang CL, Gautier J. The Fanconi anemia pathway and ICL repair: implications for cancer therapy. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010; **45**: 424–39.
- 23 Yarde ND, Oliveira V, Mathews L *et al.* Targeting the Fanconi anemia/BRCA pathway circumvents drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Res* 2009; **69**: 9367–75.
- 24 Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**: 740–6.
- 25 Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 265–73.
- 26 Dave B, Mittal V, Tan MN, Chang CJ. Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. *Breast Cancer Res* 2012; **14**: 202.1–5.

- 27 Taron M, Rosell R, Felip E *et al.* BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2443–9.
- 28 Heinrich MC, Hoatlin ME, Zigler AJ *et al.* DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood* 1998; 91: 275–87.
- 29 Yun J, Zhong Q, Kwak JY, Lee WH. Hypersensitivity of Brca1-deficient MEF to the DNA interstrand crosslinking agent mitomycin C is associated with defect in homologous recombination repair and aberrant S-phase arrest. *Oncogene* 2005; 24: 4009–16.
- 30 Lencioni R. Loco-regional treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; 52: 762–73.

ملخص: يعد سرطان الكبد ورما فتاكا استحال علاجه بسبب مقاومة الخلايا الكبدية السرطانية عن طريق تكثيف إصلاح الحمض النووي لجميع وسائل العلاج الكيميائي. وقد أثبتت الدراسات أن الجين BRCA1 هو احد الجينات الأكثر قدرة على إصلاح الحمض النووي و عليه تم تسليط الضوء في هذه الدراسة على دور BRCA1 في مقاومة سرطان الخلايا الكبدية للعلاج الكيميائي. من أجل ذلك قمنا في المرحلة الأولى باختبار استجابة عدد من الخلايا السرطانية الكبدية لثلاث عقارات كيميائية متداولة (Mitomycine C, Cisplatin, Melphalan) كما قمنا عن طريق آلية الرحلان و النقل الكهربائي و استخدام أجسام مضادة خاصة بتقدير كمية هذا البروتين (BRCA1) في هذه الخلايا. وقد بينت نتائج هذه التجارب أن الخلايا الأكثر مقاومة هي تلك الأكثر تصنيعا مما يشير للدور المباشر الذي يلعبه هذا البروتين في هذه المقاومة و عليه قمنا في المرحلة الثانية بتثبيط إنتاج هذا البروتين باستخدام نوع من الأحماض الريبية المفككة (siRNA) في الخلايا المقاومة من جهة و تفعيل إنتاجه في الخلايا الحساسة من جهة أخرى و اختبار الاستجابة في كلتا الحالتين لتركيزات متزايدة من الميتموميسين. وقد تبين لنا أن تثبيط بروتين (BRCA1) في الخلايا (Snu449) يحول الخلايا المقاومة إلى خلايا حساسة كما أن تفعيله في الخلايا (HepG2) يمنحها مقاومة لعقار الميتموميسين. كما أثبتت تجارب التدفق الخلوي في المرحلة الثالثة من هذه الدراسة أن تثبيط البروتين في الخلايا المقاومة و معالجتها بالميتوميسين يوقف الدورة الخلوية لهذه الخلايا في مرحلة ما قبل الانقسام. في ظل هذه النتائج تبين هذه الدراسة أن تثبيط فعالية (BRCA1) كإف لتحسيس الخلايا السرطانية الكبدية للعقارات الكيميائية.

الكلمات المفتاحية: الورم الكبدي, (BRCA1), إصلاح الحمض النووي, العقارات المتلفة, تحسيس.

Résumé : Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est une des tumeurs malignes la plus meurtrière et pour laquelle les options thérapeutiques se heurtent à une chimiorésistance associée aux gènes de réparation de l'ADN. Il est établi à travers nombreuses études que le gène BRCA1, impliqué dans la réparation, était surexprimé dans les CHCs. Notre attention a été focalisée sur l'étude du rôle potentiel de BRCA1 dans la chimiorésistance des CHCs. Dans la première partie de ce travail, Le profil d'expression de BRCA1 dans des lignées d'hépatocarcinomes a été évalué par SDS PAGE et western blot en présence d'anticorps spécifiques. La sensibilité de ces lignées de CHC aux agents pontant l'ADN et largement utilisés en chimiothérapie tels que le Cisplatine, la Mitomycine C (MMC), et le Melphalan a été évalué, dans un deuxième temps, par le test de viabilité cellulaire après traitement par des concentrations croissantes des différentes drogues et le calcul de la concentration inhibitrice de 50 % de survie (IC₅₀). La sur-expression de BRCA1 dans certaines lignées et leurs résistances aux drogues indique son implication dans la résistance des CHCs aux traitements. Dans la troisième partie du travail le rôle fonctionnel de BRCA1 dans la réponse à la Mitomycine C a été évalué par la manipulation de son expression. Une sur-expression de BRCA1 a été induite par la transfection à l'aide de vecteur pCMVmyc-BRCA1 dans la lignée épithéliale HepG2 sensible à la base à la Mitomycine C. D'autre part, une répression de l'expression de BRCA1 par interférence a été induite dans la lignée mésenchymateuse SNU449 hyper-résistante. La réponse des cellules transfectées à des concentrations croissantes de Mitomycine C a été évaluée par le test de viabilité. Les résultats ont démontrés que la surexpression de BRCA1 dans les cellules de la lignée HepG2 leur confère une résistance à la MMC. Par contre la répression de l'expression de BRCA1 sensibilise les cellules de la lignée SNU449 à la MMC. Afin de mieux comprendre l'origine de la sensibilisation de la lignée SNU449, le cycle cellulaire des cellules de SNU449 transfectées par siRNA-BRCA1 et traitées par 200nM de Mitomycine C a été analysé par cytométrie de flux. Les changements du cycle cellulaire indiquaient que la sensibilisation de la lignée SNU449 est due à l'arrêt du cycle cellulaire en phase 4N suite à la répression de BRCA1. De ce fait, notre étude montre que l'inactivation de BRCA1 est suffisante pour la sensibilisation des CHC à la chimiothérapie.

Mots clés : BRCA1, Carcinome hépatocellulaire, Réparations de l'ADN , Agents pontant, Sensibilisation.

Abstract : Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most lethal malignant tumors for which therapeutic options are limited. The failures of conventional and targeted therapies in the treatment of CHCs are due to the highly resistance of these tumors which is associated with DNA repair genes. It is established through numerous studies that BRCA1 gene, involved in DNA repair, was overexpressed in HCCs. Our attention has been focused on studying the potential role of BRCA1 in the chemoresistance of CHCs. In the first part of this work, the BRCA1 expression profile in hepatocarcinoma lines was evaluated by SDS PAGE and western blot in the presence of specific antibodies. In a second step The sensitivity of these HCC lines to DNA inter cross-link agents widely used in chemotherapy, such as Cisplatin, Mitomycin C (MMC), and Melphalan was evaluated by the cell viability test after treatment by increasing concentrations of different drugs and measurement of the inhibitory concentration of **50% survival (IC50)**. The over-expression of BRCA1 in some lines and their resistance to drugs indicates its involvement in the resistance of HCCs to treatments. In the third part of the work the functional role of BRCA1 in the response to Mitomycine C was evaluated by manipulating its expression. Overexpression of BRCA1 was induced by transfection of the sensitive epithelial line HepG2 with pCMVmyc-BRCA1 vector into the base with Mitomycine C. On the other hand, repression of BRCA1 expression by interference was induced in the resistant mesenchymal line SNU449. The response of the transfected cells to increasing concentrations of Mitomycin C was evaluated by the viability test. The results demonstrated that overexpression of BRCA1 in cells of the HepG2 line confers them resistance to MMC while the repression of its expression sensitizes the SNU449 cells line to the MMC. In order to better understand the origin of the sensitization of the SNU449 line, the cell cycle of siRNA-BRCA1 transfected SNU449 cells treated with 200nM of Mitomycin C was analyzed by flow cytometry. Changes in the cell cycle indicated that the sensitization of SNU449 was due to cell cycle arrest in the 4N phase following BRCA1 repression. As a result, our study shows that inactivation of BRCA1 is sufficient for the sensitization of HCCs to chemotherapy.

Key words: BRCA1, hepatocellular carcinoma, DNA repair, inter cross-link agents, chemosensitization.