

# Étude de l'ADN circulant libre dans une cohorte de patients ayant un carcinome hépatocellulaire

Valérie Dejour

► **To cite this version:**

Valérie Dejour. Étude de l'ADN circulant libre dans une cohorte de patients ayant un carcinome hépatocellulaire. Médecine humaine et pathologie. 2016. <dumas-01470716>

**HAL Id: dumas-01470716**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01470716>**

Submitted on 17 Feb 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE

FACULTE DE MEDECINE D'AMIENS

Année 2016

Thèse n° 2016 – 144

**ETUDE DE L'ADN CIRCULANT LIBRE DANS UNE COHORTE  
DE PATIENTS AYANT UN CARCINOME HEPATOCELLULAIRE**

THESE

POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE (DIPLOME D'ETAT)

SPECIALISE EN HEPATOASTROENTEROLOGIE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

LE 05 OCTOBRE 2016

PAR

Valérie DEJOUR

PRESIDENT DU JURY

MONSIEUR le Pr NGUYEN-KHAC

MEMBRES DU JURY

MONSIEUR le Pr SAMUEL

MONSIEUR le Pr CHAUFFERT

MONSIEUR le Pr REGIMBEAU

MONSIEUR le Pr DI FIORE

DIRECTEUR DE THESE

MONSIEUR le Pr NGUYEN-KHAC



*A mon maître,*

**Monsieur le Professeur Eric NGUYEN-KHAC,**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

(Hépto-gastroentérologue)

Chef du service d'Hépto-Gastroentérologie

Pôle « Médico-Chirurgical digestif, rénal, infectieux, médecine interne et endocrinologie »

(D.R.I.M.E)

Vous m'avez fait l'honneur de me confier ce travail.

Je vous remercie de vos conseils, de votre aide qui m'ont permis de le mener à bien.

Merci pour ces quatre années d'internat durant lesquelles vous m'avez apporté votre soutien et fait bénéficier de votre enseignement.

Veillez trouver dans ces quelques lignes l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

*A mon maître,*

**Monsieur le Professeur Didier SAMUEL,**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

(Hépatologue)

Chef de service du Centre Hépato-Biliaire Paul Brousse, Villejuif

Vous me faites l'honneur de juger ce travail.

Vous m'avez fait découvrir le domaine de la transplantation hépatique.

J'ai apprécié travailler dans votre service pendant ces 6 mois, ce fut une expérience très enrichissante.

Veillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma reconnaissance.

*A mon maître,*

**Monsieur le Professeur Bruno CHAUFFERT,**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Chef du service d'Oncologie médicale

CHU d'AMIENS

Merci de me faire l'honneur de juger mon travail.

Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon sincère respect.

*A mon maître,*

**Monsieur le Professeur Jean-Marc REGIMBEAU,**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

(Chirurgie digestive)

Responsable du service de chirurgie digestive

Pôle « Médico-Chirurgical digestif, rénal, infectieux, médecine interne et endocrinologie »

(D.R.I.M.E)

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon sincère respect.

*A mon maître,*

**Monsieur le Professeur Frédéric DI FIORE,**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

(Oncologue médical)

Centre Henri Becquerel-CHU Rouen

Vous me faites l'honneur de juger mon travail.

Je vous remercie sincèrement de m'avoir confié ce travail.

Merci pour votre implication, votre aide et vos conseils qui m'ont permis de le mener à bien.

Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et mon sincère respect.



*A mes parents,*

Merci pour l'éducation que vous m'avez apporté. Je suis fière et admirative d'avoir des parents aussi courageux qui ont su me transmettre des valeurs de vie. Merci pour votre soutien, votre écoute, votre dévouement, votre présence, vos sacrifices au cours de mes études de médecine car si j'ai réussi à accomplir ce parcours c'est tout simplement grâce à vous.

*A mes grands-parents maternels,*

Merci pour votre soutien, votre générosité, et vos encouragements ainsi que votre reconnaissance.

*A ma sœur Amélie et à mon frère Mathieu,*

J'ai de la chance de vous avoir. Votre reconnaissance et votre soutien m'ont toujours touché. Nous formons une fratrie remplie de complicité et d'amour. Je suis fière de vous.

*A Camille,*

Ma Cam, tu es mon rayon de soleil. Merci pour tous ces moments de joie, de rire, de pleurs passés ensemble. Merci pour ton soutien, ta joie de vivre, ton écoute et ta disponibilité malgré la distance. Nos retrouvailles sont toujours un vrai bonheur.

*A Charlotte,*

Merci ma Cha pour ces années de folie passées ensemble au collège et sur les bancs de la fac. Merci pour ta bienveillance, ton aide, tes conseils, ta gentillesse et ces heures passées au téléphone à se remonter le moral.

*A Marjorie,*

Merci ma Marjo pour toutes ces belles années lycées passées ensemble. Nos retrouvailles sont toujours formidables. Merci pour ton soutien, ta gentillesse, ta joie de vivre. Nos soirées Lachelloises, je ne les oublierai jamais.

*A Chloé et à Lucie,*

Merci pour ces moments de joie, de doutes, de larmes pendant ces années de fac. Nos soirées me manquent... Je sais que je peux compter sur vous, je suis fière de votre parcours personnel et professionnel.

*A Alice, à Marine et à Laure,*

Merci pour votre soutien, votre aide et votre gentillesse. Nos soirées amiénoises mêlées de joie, de larmes, de rires m'ont permis de garder le moral au beau fixe pendant ces années d'étude. Je suis fière de votre réussite.

*A Elodie,*

Merci pour ta folie, ta joie de vivre pendant ce stage au SAMU, après l'ECN, suivi de vacances à Majorque inoubliables.

*A Emilie,*

Merci Milie pour ces années passées ensemble au lycée et à la fac, une belle amitié en découle.

*A Anthinéa,*

Merci Anthi pour ta gentillesse et ton soutien pendant nos années lycées et à la fac.

*A Virginie,*

Merci ma Ninie adorée pour ton aide, ton soutien, ta générosité, tes capacités d'écoute, ta folie pendant ces années d'internat. Tes remplacements en A5 Sud ont permis de construire une amitié forte. Nos moments de bonheur me manquent... Je suis fière de ta réussite professionnelle et familiale.

*A Lisa,*

Merci pour ton soutien, tes conseils, ta bonne humeur, ta disponibilité. Bon vent à Nice, tu vas me manquer...

*A Déborah, « la parisienne »,*

Merci ma Debo pour ces 6 mois passés ensemble à Paul Brousse. Une amitié forte !! Merci pour tous ces moments de bonheur, de craquage, de larmes, de rires pendant ce semestre. Je ne t'oublierais pas, tu as été une très belle rencontre.

*A Clémentine,*

Merci ma Clem pour ces années d'internat remplis de moments de bonheur parsemés de moments de pleurs, de désespoir. Je sais que je peux compter sur toi... Merci pour ton soutien, ta disponibilité, et tes conseils. Ta générosité et ton émotivité me touchent.

*A Estelle, mon infirmière préférée,*

Mon petit Crohn, une belle amitié !! Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance, ta disponibilité, ton soutien et surtout ta folie, ta bonne humeur. Mon semestre en A5 sud et aux soins resteront gravés dans ma mémoire... Restes comme tu es.

*A Justine et Ruxandra, « mes co-internes de promo »,*

Je suis heureuse d'avoir fait mon internat à vos côtés et de devenir votre co-chef. Le soutien, la folie, la solidarité, la gentillesse, la persévérance, la simplicité reflètent vos qualités, d'où le plaisir de travailler avec vous.

*A mes co-internes, Marion S (la future mariée), Julien (le jeune papa), Constance, Clémentine, Clara, Aline,*

Nous formons une équipe de choc avec une entente formidable qui permet de travailler dans de conditions agréables. Un grand merci pour les soirées passées ensemble, qui resteront mémorables (notamment les journées Des) !!! Vous êtes les meilleurs.

*Aux jeunes co-internes, Julie, Neïla, Carole et Marion T,*

Merci pour votre soutien pendant ces derniers mois difficiles.

*A mes chefs, Sami, Mathurin, Henri, Adrien, Jean-Phi, Vincent, Morgane, Marthe, Justine, Marie,*

Merci pour vos conseils, votre générosité, votre disponibilité et pour votre bonne humeur. Merci de m'avoir transmis vos connaissances et pour votre aide au quotidien.

*A Justine Thomas,*

Merci pour ta base de données et pour tes conseils.

*A Jean-Louis Dupas, Jean-Paul Joly, Richard Delcenserie, Franck Brazier,*

Merci pour votre disponibilité, votre implication et votre dévouement à former les internes et à nous transmettre des bases solides.

*Aux infirmières et aux aides-soignantes des soins intensifs,*

Merci pour votre bonne humeur, votre folie et votre soutien. Grâce à vous, j'ai passé mes derniers mois d'internat dans une très bonne ambiance, ce qui m'a permis de tenir bon jusqu'au bout.

*Aux infirmier(e)s, aux aides soignant(e)s, aux ASH de l'HGE A et B, de l'HDJ gastro, des endoscopies*

Merci pour ces années passées ensemble, votre patience, vos conseils. Vous formez une belle équipe !!

*A Catherine,*

Merci pour ta générosité, ton dévouement, ton implication et ton perfectionnisme. Tu es tout simplement une personne magnifique. Je sais que je peux compter sur toi à tout moment et dans tous les domaines. C'est un vrai plaisir de travailler avec toi.

*A Régine et Louissette,*

Merci pour votre patience, votre disponibilité, votre implication et votre gentillesse.

*A l'équipe d'HGE de Compiègne Dr Duchmann, Dr Latrive, Dr Messerschmitt, Dr Sabbagh, Dr Deneux-Pricope, à toutes les infirmières, aides-soignantes, ASH et secrétaires,*

Merci pour ce semestre et pour le partage de vos connaissances

*A l'équipe du centre Hépatobiliaire de Paul Brousse Dr Antonini, Dr De Martin, Dr Sobesky, Dr Coilly, Pr Saliba, Dr Ichai, Dr Boudon et à toutes les infirmières (petit clin d'œil à Emma et Anso), aides-soignantes, secrétaires,*

Merci pour ces 6 mois d'inter-CHU passés à vos côtés. Ce fut une expérience très enrichissante sur le plan professionnel et sur le plan relationnel. Merci pour votre soutien, votre accueil, votre générosité et votre disponibilité. Vous formez une belle équipe avec des personnes en or, je ne vous oublierai pas.

## **Liste des abréviations utilisées**

**AALSD** : American Association of the Study of Liver Disease

**ADNcf** : Acide Desoxyribonucléique circulant libre

**ADNct** : Acide Desoxyribonucléique circulant tumoral

**AFP** : Alpha Foetoprotéine

**ALAT** : Alanine Transferase

**ANOVA** : Analysis Of Variance

**ASAT** : Aspartate AminoTransferase

**ARN** : Acide Ribonucléique

**BCLC** : Barcelona Clinic Liver Cancer

**BL** : Bilirubine

**CHC** : Carcinome Hépatocellulaire

**γGT** : Gamma Glutamyl Transferase

**INR** : International Normalized Ratio

**MELD** : Model for End Stage Liver Disease

**MiR** : MicroARN

**NASH** : Non Alcoolique Stéato-Hépatite

**PAL** : Phosphatases Alcalines

**TNM** : Tumor, Nodules, Metastases

**TP** : Temps de Prothrombine

## TABLE DES MATIERES

<b>I. <u>Introduction</u></b> .....	<b>16</b>
<b>II. <u>Matériel et Méthode</u></b> .....	<b>18</b>
A. Population.....	18
B. Méthode.....	19
1) Les échantillons biologiques.....	19
2) L'extraction d'ADN.....	19
3) Le dosage des échantillons.....	19
4) Analyse éthique et statistique.....	19
<b>III. <u>Résultats</u></b> .....	<b>20</b>
A. Caractéristiques cliniques et biologiques de la population étudiée.....	20
B. Caractéristiques tumorales des CHC.....	20
C. Analyse de l'expression de l'ADN circulant libre.....	23
1) Selon les deux groupes de patients.....	23
2) Selon les caractéristiques de la cirrhose.....	23
3) Selon les caractéristiques tumorales des CHC.....	24
4) Selon les scores pronostiques du CHC.....	25
5) Corrélation entre alphafoetoprotéine et ADN circulant libre.....	27
6) Analyses en sous-groupes.....	28
a. Population virale.....	28
b. Population alcool/NASH.....	28
D. Analyse de survie.....	28
<b>IV. <u>Discussion</u></b> .....	<b>30</b>
<b>V. <u>Conclusion</u></b> .....	<b>33</b>
<b>VI. <u>Références bibliographiques</u></b> .....	<b>34</b>

## Etude de l'ADN circulant libre dans une cohorte de patients ayant un carcinome hépatocellulaire

**Introduction** : L'amélioration de la prise en charge des patients ayant un carcinome hépatocellulaire (CHC) nécessite de meilleurs marqueurs biologiques. Le but de notre étude a été d'évaluer l'ADN circulant libre (ADNcf) dans une cohorte de patients avec un carcinome hépatocellulaire.

**Matériel et Méthode** : Les données clinico-biologiques et l'ADNcf de patients avec un CHC ont été comparés à ceux de patients cirrhotiques sans CHC. L'extraction de l'ADN a été réalisée par le kit Qiamp circulating Nucleid Acid de Qiagen. L'ADNcf a ensuite été dosé à l'aide du kit Quant-iT™ PicoGreen® ds DNA High Sensitivity (Molecular Probes) et de l'appareil « Twinkle LB1970 » (Berthold, Bad Wildbad, Germany). Nous avons étudié les taux d'ADNcf selon les caractéristiques tumorales des CHC et celles de la cirrhose. Une analyse de survie était réalisée avec les modèles univarié et multivarié de Cox.

**Résultats** : De 2011 à 2016, 63 patients d'âge moyen  $66.95 \pm 8.71$  ans (92% sexe M), avec 42,9% de cirrhose alcoolique CHILD PUGH  $6.77 \pm 1.91$  et des CHC de stade BCLC A/B/C/D dans respectivement 30, 31,7, 28,6 et 9,5% des cas ont été inclus, ainsi que 27 patients avec cirrhose sans CHC. Le taux sérique d'ADNcf n'était pas significativement différent dans le groupe CHC sur cirrhose (médiane : 110.36 ng/ml) que dans le groupe cirrhose sans CHC (105.64 ng/ml),  $p=0,08$ . L'ADNcf n'était pas associé à la cause de la cirrhose et la fonction hépatique, ni avec les caractéristiques tumorales (Milan, score AFP, multinodulaire, métastase). Seul l'envahissement vasculaire était associé à un taux plus élevé d'ADNcf (183.64 vs. 101.83ng/ml,  $p=0.02$ ). Dans les analyses de sous-groupe restreintes aux patients naïfs de traitement, le taux d'ADNcf était plus élevé dans le groupe CHC au-delà des critères de Milan ( $p=0.05$ ) et avec un score  $AFP > 2$  ( $p=0.05$ ). Dans la population CHC post hépatite B ou C, l'ADNcf était associé aux critères de Milan ( $p=0.05$ ). Enfin l'ADNcf n'était pas associé à la mortalité.

**Conclusion** : Dans le carcinome hépatocellulaire, l'ADNcf est plus élevée en cas d'envahissement vasculaire, et est associé à la masse tumorale chez les patients naïfs de traitement. L'ADNcf pourrait être un biomarqueur d'agressivité tumorale.

**Mots clés** : carcinome hépatocellulaire, biopsie liquide, ADN circulant libre, biomarqueur

## **Study of DNA circulating free in a cohort of patients with hepatocellular carcinoma**

**Introduction** : Improving the management of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) requires better biomarkers. The aim of our study was to evaluate the free circulating DNA (ADNcf) in a cohort of patients with hepatocellular carcinoma.

**Materials and Methods** : The clinical data and biological ADNcf of patients with HCC were compared to those of cirrhotic patients without HCC. Extraction of DNA was performed by circulating the Qiampl Nucleic Acid Kit from Qiagen. The ADNcf was then assayed using the kit Quant-iT™ PicoGreen® ds DNA High Sensitivity (Molecular Probes) and "Twinkle LB1970" device (Berthold, Bad Wildbad, Germany). We studied the rate ADNcf depending on tumor characteristics of HCC and those of cirrhosis. Survival analysis was performed with univariate and multivariate Cox model.

**Results** : From 2011 to 2016, 63 patients, mean age  $66.95 \pm 8.71$  years (92% sex M), with 42.9% of alcoholic cirrhosis Child Pugh  $6.77 \pm 1.91$  and HCC BCLC stage A / B / C / D in respectively 30, 31.7, 28.6 and 9.5% of cases were included, and 27 patients with cirrhosis without HCC. The serum ADNcf was not significantly different in HCC on cirrhosis group (median: 110.36 ng / ml) than in the group without cirrhosis CHC (105.64 ng / ml),  $p = 0.08$ . The ADNcf was not associated with the cause of cirrhosis and liver function, or with tumor characteristics (Milan score AFP, multi nodular metastasis). Only the vascular invasion was associated with a higher rate of ADNcf (183.64 vs. 101.83ng / ml,  $p = 0.02$ ). In the subgroup analysis restricted to treatment-naïve patients, the rate of ADNcf was higher in HCC group beyond the Milan criteria ( $p = 0.05$ ) and with an AFP score  $> 2$  ( $p = 0.05$ ). In the population CHC post hepatitis B or C, the ADNcf was associated with Milan criteria ( $p = 0.05$ ). Finally ADNcf was not associated with mortality.

**Conclusion** : In hepatocellular carcinoma, ADNcf is higher in case of vascular invasion, and is associated with tumor mass in treatment-naïve patients. The ADNcf could be a biomarker of tumor aggressiveness.

**Key words** : hepatocellular carcinoma, liquid biopsy, freeDNA circulating, biomarker



## **I. INTRODUCTION :**

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente plus de 90% des tumeurs primitives hépatiques [1-6]. C'est le sixième cancer en fréquence et le deuxième en termes de mortalité au niveau mondial [1-4]. Son incidence a augmenté ces dernières décades, avec 85 000 nouveaux cas diagnostiqués en 2015 [7]. Le diagnostic est basé soit sur la ponction biopsie hépatique, soit sur des critères non invasifs, reposant sur le comportement vasculaire de la tumeur à l'imagerie avec injection de produits de contraste, et le dosage de l'alphafoetoprotéine (AFP) [8]. Actuellement, seulement 46% des cas de CHC sont diagnostiqués à un stade précoce, et la plupart des cas n'ont pas accès à un traitement curatif [9]. Ce retard de diagnostic est dû au manque de performance de l'imagerie pour détecter les petits CHC [10]. De plus, la sensibilité et la spécificité de l'alphafoetoprotéine sont faibles, respectivement 39 à 64% et 76 à 91%. Certaines études ont montré que le taux d'alphafoetoprotéine pouvait être élevé dans d'autres types de cancers comme le cancer colorectal métastatique ou le cholangiocarcinome intra-hépatique [11]. L'amélioration de la prise en charge des patients ayant un carcinome hépatocellulaire nécessite donc de meilleurs marqueurs biologiques.

La biopsie liquide consiste en la recherche d'éléments issus de la tumeur comme les cellules tumorales circulantes ou l'ADN tumoral circulant. Des études ont montré qu'il y aurait une bonne concordance entre le tissu et le sang [12]. Les cibles actuelles, au niveau circulant, sont multiples avec des domaines d'application large. Ces cibles sont l'ADN circulant libre (ADNcf) relargué dans le sang qui peut être augmenté en cas de pathologies inflammatoires ou tumorales, l'ADN circulant tumoral (ADNct) porteur d'une altération présente dans la tumeur, les cellules tumorales circulantes, ou encore les micro-ARN [13] [14]. Les micro-ARN sont de petits ARN non codant impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes. Ils auraient un rôle diagnostique et pronostique dans le CHC. Tomimaru et al. ont mis en évidence que le taux de micro-ARN 21 est plus élevé dans une population asiatique suivi pour un CHC et que ce taux décroît après chirurgie [15,16]. Mais malheureusement, les micro-ARN posent problème dans la pratique clinique quotidienne.

L'ADNct et ADNcf seraient prometteurs. Ils peuvent être détectés dans le sérum ou dans le plasma. En 1977, Leon et al. mettaient en évidence de l'ADN circulant libre chez les patients atteints d'un cancer en quantité plus importante que chez des sujets sains [17]. L'origine précise de l'ADNcf est controversée, provenant des cellules tumorales apoptotiques et/ou nécrotiques [18,19]. L'ADNct et d'ADNcf auraient un rôle diagnostique mais également un rôle pronostique et dynamique, permettant de suivre l'évolution de la maladie dans le temps et de dépister des récidives ou une progression de manière précoce. Tout d'abord, ils seraient le reflet

de la masse tumorale et du stade de la maladie, ceci a été démontré dans des études chez des patients atteints de cancers digestifs divers, à différents stades de la maladie [20]. Sur le plan diagnostique, l'ADN circulant libre serait détectable chez des patients avec un CHC, ce qui n'est pas le cas chez les patients sains [20,21]. Chen et al. montrent que le taux sérique d'ADN circulant libre est significativement plus élevé chez les patients CHC sur cirrhose virale B que chez les sujets sains [22]. De plus, des analyses combinées ont permis de stipuler que l'ADNcf aurait, par ailleurs, une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité que l'AFP. L'étude combinée de ces marqueurs circulants permettrait d'améliorer la sensibilité [23].

Ce biomarqueur aurait également un intérêt pronostique. Des études ont montré que les taux d'ADNcf, chez des patients traités chirurgicalement de manière efficace pour des cancers du poumon, du colon, de l'œsophage, du rein, étaient plus faibles pendant le suivi qu'en situation pré-opératoire [24]. Parallèlement, une élévation du taux d'ADNcf, pendant le suivi de patients traités pour un cancer de l'œsophage, indiquait une rechute précoce par rapport au marqueur tumoral standard et l'imagerie [25]. Chen et al. mettent en évidence que le taux d'ADNcf serait corrélé à l'envahissement métastatique et au degré de différenciation tumorale du CHC [22]. Ainsi, il pourrait être le bon reflet de la masse tumorale active et également un bon marqueur de la récurrence précoce, de la progression tumorale ou bien encore de la réponse au traitement.

Le but de notre travail a été d'étudier l'ADNcf dans une cohorte de patients ayant un carcinome hépatocellulaire. Les objectifs ont été de comparer les taux d'ADNcf entre les groupes CHC sur cirrhose et témoins cirrhose sans CHC, d'analyser les variations du taux d'ADNcf selon les caractéristiques tumorales du CHC, les critères pronostiques du CHC, la fonction hépatique, l'étiologie de la cirrhose, la survie.

## **II. PATIENTS ET METHODE**

### **A. Population**

De décembre 2011 à juillet 2016, 63 patients ont été inclus dans l'étude. Les critères d'inclusion étaient la présence d'un carcinome hépatocellulaire, et l'obtention d'un consentement éclairé. Tous les CHC étaient développés sur une cirrhose d'étiologie alcoolique, métabolique (NASH), post-hépatite virale C ou B, ou sur une hémochromatose génétique. Le CHC était diagnostiqué par l'histologie ou par les critères non-invasifs AALSD-EORTC 2012. Le diagnostic de cirrhose était établi sur l'histologie ou sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques, radiologiques, endoscopiques ou par élastométrie impulsionnelle ultrasonore (Fibroscan). Les critères de non inclusion étaient le refus du malade, la présence d'un autre cancer évolutif hépatique ou extra-hépatique, un CHC en rémission complète, une maladie inflammatoire chronique, une maladie auto-immune, ou une grossesse. Le groupe des témoins était issu d'une population de patients cirrhotiques sans CHC (n=27), défini par un examen morphologique hépatique normal et une AFP normale.

Les paramètres répertoriés pour le groupe CHC sur cirrhose étaient l'âge et le sexe. Le bilan biologique sanguin comportait : le compte des globules blancs et des plaquettes, la créatinine, l'urée, l'aspartate aminotransférase (ASAT), l'alanine aminotransférase (ALAT), la gamma glutamyl transférase ( $\gamma$ GT), les phosphatases alcalines (PAL), la bilirubine totale (BL), le taux de prothrombine (TP), l'INR, l'albumine. La sévérité de la cirrhose était évaluée par le score de CHILD PUGH et le score de MELD. Le score de CHILD PUGH correspondait à l'allocation de 1 à 3 points selon l'importance de 5 paramètres : l'ascite, l'encéphalopathie hépatique, le TP, l'albumine et la bilirubine. Le score de MELD correspondait à  $9.57 \times \ln(0.0113 \times \text{créatinine}) + 3.78 \times \ln(0.0585 \times \text{bilirubine}) + 11.2 \times \ln(\text{INR} + 6)$ .

Les CHC étaient caractérisés par la taille tumorale selon les critères de Milan (< ou > à un nodule de 5 cm ou 3 nodules de moins de 3 cm), le nombre de nodules, la taille du plus gros nodule, la présence d'un wash out à la phase portale, le dosage sérique de l'alphafoetoprotéine (AFP), la présence d'un envahissement vasculaire, la présence de métastases à distance et les scores pronostiques BCLC et le score AFP. Le score AFP correspond à l'allocation de 0 à 4 points selon l'importance de 3 paramètres : le nombre de nodules, la taille du nodule et le taux d'AFP [26]. Enfin les différents traitements et le nombre de lignes reçues par les patients avant l'inclusion étaient notés (chirurgie, radiofréquence per cutanée, alcoolisation per cutanée, chimioembolisation, sorafenib, inclusion dans des essais thérapeutiques), ainsi que la progression.

## **B. Méthode**

### **1. Les échantillons biologiques**

Chaque échantillon de sang total prélevé sur un patient était laissé 30 minutes à température ambiante jusqu'à coagulation puis était centrifugé à 1500g à 4°C pendant quinze minutes. Le sérum obtenu était transféré dans un autre tube puis congelé à -80°C. Les tubes étaient stockés à la biobanque du CHU d'AMIENS puis ont été transportés dans du carboglace à -80°C au CHU de Rouen pour réaliser l'extraction d'ADN circulant libre. Le dosage de l'ADN circulant libre était ensuite réalisé au laboratoire du CHU de ROUEN INSERM 1079/918 par l'équipe de Recherche en Oncologie (IRON), en aveugle par rapport aux données cliniques et biologiques à partir des sérums des patients du CHU d'AMIENS.

### **2. L'extraction d'ADN**

Les ADN ont été extraits selon le protocole d'extraction fourni par le kit Qiam circulating Nucleid Acid de Qiagen dans un volume d'élution de 30µl.

### **3. Le dosage des échantillons**

Les échantillons ont ensuite été dosés à l'aide du kit Quant-iT™ PicoGreen® ds DNA High Sensitivity (Molecular Probes) et de l'appareil « Twinkle LB1970 » (Berthold, Bad Wildbad, Germany). Les dosages ont été réalisés en répliquat à partir d'un volume d'échantillon de 2µl.

### **4. Analyse éthique et statistique**

Les paramètres continus étaient exprimés en moyenne et écart type, médiane et extrêmes, puis comparés par l'analyse de variance ANOVA. L'expression de l'ADN circulant libre en fonction des différents paramètres était analysée par le test de Mann-Whitney (deux groupes à comparer) et par le test de Kruskal-Wallis (plus de deux groupes à comparer). Le taux d'ADN circulant libre était exprimé en moyenne, écart type et médiane. Nous avons calculé le log pour chaque valeur d'ADN circulant libre compte tenu de l'hétérogénéité des résultats afin d'obtenir des résultats fiables. Les corrélations de Pearson étaient effectuées pour l'analyse entre l'ADN circulant libre et les différents paramètres étudiés (AFP et taille du plus gros nodule), avec un coefficient de corrélation compris entre -1 et 1. Les valeurs étaient présentées en box plot. Pour l'analyse de survie, les modèles univarié et multivarié de Cox ont été utilisés. La valeur significative de p a été fixée à < 0.05. L'étude a obtenu l'accord du comité d'éthique Nord-Ouest II de Picardie. Tous les patients inclus étaient informés et ont signé un consentement éclairé. La conduite de l'essai était en accord avec les bonnes pratiques de la recherche clinique biomédicale et les accords d'Helsinki 2000.

### **III. RESULTATS**

#### **A. Caractéristiques cliniques et biologiques de la population étudiée**

Les caractéristiques cliniques et biologiques des populations étudiées sont décrites dans le tableau 1. Le sex ratio et la fonction hépatique (TP, INR, scores de MELD et de CHILD PUGH) étaient comparables entre le groupe CHC sur cirrhose de toute étiologie et le groupe témoin cirrhose sans CHC. Seules l'ALAT ( $p=0.05$ ), les phosphatases alcalines ( $p=0.006$ ) et l'urée ( $p=0.006$ ) étaient significativement plus élevés dans le groupe CHC.

#### **B. Caractéristiques tumorales des CHC**

Les caractéristiques biologiques et radiologiques ainsi que les scores pronostiques avec les critères de Milan, le score BCLC et le score AFP sont présentés dans le tableau 2. Concernant les caractéristiques radiologiques, la plupart des CHC étaient multinodulaires soit 68.26% avec une taille moyenne du plus gros nodule à 40 mm. La majorité des CHC avaient les caractéristiques à l'imagerie pour confirmer de manière non invasive le diagnostic avec un taux de 76.2% de wash out à la phase portale. Près de 38% des CHC étaient dans les critères de Milan et environ 2/3 étaient diagnostiqués à un stade précoce (30.15% au stade BCLC A et 31.74% au stade BCLC B). Environ 60% des CHC avaient un score AFP supérieur à 2. Globalement, nous avons constaté un taux faible de thrombose portale (26.98%) et également un taux faible de CHC métastatique (14.28%). 61.9% des patients ont un taux d'AFP élevé avec une médiane à 20.10 ng/ml. Concernant les étiologies des cirrhoses, 42.85% étaient d'origine alcoolique, 19.04% étaient dans un contexte de NASH, 17.46% étaient d'origine mixte (NASH et alcool), 15.86% étaient d'origine virale (12.69% VHC et 3.17% VHB) et 4.79% sur hémochromatose génétique. La médiane de survie dans le groupe CHC sur cirrhose était de 6.7 mois [IC95%= 5.4;13.1], avec un taux de décès estimé à 36% contre 33% dans le groupe cirrhose sans CHC.

**Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et biologiques des populations étudiées**

	<b>CHC (n=63)</b>	<b>Témoins (n=27)</b>	<b>p</b>
Age (ans) moy ± sd	66.95 ± 8.71	54.48 ± 9.66	<0.001
Sexe M, n (%)	58 (92.06)	20 (75)	0.052
Cirrhose Alcool, n (%)	27 (42.9)	27 (100)	0.0001
NASH	12 (19.1)	-	-
NASH et Alcool	11 (17.5)	-	-
Hépatite C	8 (12.7)	-	-
Hépatite B	2 (3.2)	-	-
Hémochromatose	3 (4.8)	-	-
ASAT (UI/L)	115.01 ± 167.21	76.62 ± 100.18	0.18
ALAT (UI/L)	74.77 ± 91.36	45.85 ± 48.28	0.05
γGT (UI/L)	340.04 ± 416.16	230.85 ± 180.08	0.06
Phosphatases Alcalines (UI/L)	213.76 ± 245.90	122.11 ± 56.62	0.006
Bilirubine totale (μmol/l)	57.12 ± 85.90	42.35 ± 44.01	0.28
Plaquettes (G/L)	151.1 ± 120.6	138.4 ± 59.2	0.50
TP (%)	66.61 ± 19.07	59.18 ± 21.43	0.12
INR	1.52 ± 0.62	1.87 ± 1.21	0.17
Créatinine (μmol/l)	80.84 ± 53.18	67.37 ± 20.53	0.08
Urée (mmol/l)	7.41 ± 5.31	5.1 ± 2.60	0.006
Albumine (g/l)	32.82 ± 6.95	33.10 ± 9.49	0.88
Score de Child Pugh	6.77 ± 1.91	7.70 ± 2.67	0.11
Score de MELD	14.30 ± 6.40	15.40 ± 7.69	0.51

**Tableau 2 : Caractéristiques tumorales des CHC**

	<b>CHC sur cirrhose (n = 63)</b>	
Taille du plus gros nodule (mm), moy ± SD [range]	41.30 ± 25.94 [10-136]	
Nombre de nodules n (%)	uninodulaire	21 (31.74)
	multinodulaire	42 (68.26)
AFP (ng/ml), médiane [range]	20.10 [1.1-68 820]	
Wash out en phase portale n (%)	48 (76.2)	
Critères de Milan n (%)	39 (24.5)	
Score AFP (%), médiane [range]	4 [0-9]	
	≤ 2	25 (39.68)
	> 2	38 (60.32)
Classification BCLC n (%)	A	19 (30.15)
	B	20 (31.74)
	C	18 (28.57)
	D	6 (9.54)
Envahissement vasculaire n (%)	17 (26.98)	
Métastases n (%)	9 (14.28)	
Traitements réalisés à l'inclusion, n (%)		
	Abstention/attente de traitement	46 (73.05)
	Radiofréquence	5 (7.93)
	Sorafenib	4 (6.34)
	Chimioembolisation	4 (6.34)
	Essai clinique	3 (4.76)
	Sutent	1 (1.58)
	Chirurgie	0 (0)
Numéro de ligne à l'inclusion, n (%)		
	0	36 (57.14)
	1	18 (28.57)
	2	5 (7.93)
	3	3 (6.39)
Progression après traitement, n (%)	34 (53.96)	

Les caractéristiques thérapeutiques des CHC sont présentées dans le tableau 2. Près de 57.14% des patients étaient naïfs de traitement à l'inclusion. 26.95% des patients avaient reçu un traitement curatif (7.93% pour la radiofréquence) ou un traitement palliatif (6.34% du Sorafenib, 6.34% de la chimioembolisation, 1.58% du Sutent) ou étaient inclus dans un protocole (4.76%). 73.05% des patients n'ont pas été traité lors de l'inclusion car ils étaient soit en abstention thérapeutique à cause d'une altération de l'état général ou d'une fonction hépatique altérée (34.92%), soit en attente de traitement (33.33%), soit en arrêt de traitement pour réponse thérapeutique (4.8%). Après traitement, 53.96% ont présenté une progression.

### **C. Analyse de l'expression de l'ADN circulant libre**

#### **1. Selon les deux groupes de patients**

Les concentrations moyennes sériques d'ADN circulant libre étaient de  $204.62 \pm 239.69$  ng/ml [extrêmes : 31.42-1140.22], médiane de 110.36 ng/ml dans le groupe CHC sur cirrhose versus  $109.32 \pm 68.79$  [27.72-296.70], médiane de 105.64 ng/ml dans le groupe Témoin cirrhose sans CHC, ( $p=0.08$ ). Les taux d'ADN circulant sont plus faibles dans la population CHC sur cirrhose par rapport à la population témoin cirrhose sans CHC mais les résultats ne sont pas statistiquement significatifs.

#### **2. Selon les caractéristiques de la cirrhose**

Le taux sérique d'ADN circulant libre n'était pas associé à l'étiologie de la cirrhose. Les concentrations moyennes sériques d'ADN circulant libre étaient de  $186.67 \pm 229.50$  ng/ml [34.41-902.17], médiane de 105.7 ng/ml dans le groupe CHC sur cirrhose d'origine alcoolique, versus  $360.85 \pm 366.02$  [42.39-1140.21], médiane de 237.48 ng/ml dans le groupe CHC sur cirrhose sur NASH, versus  $231.35 \pm 203.49$  [43.33-559.03], médiane de 131.12 ng/ml dans le groupe CHC sur cirrhose d'origine mixte NASH et alcool, ( $p=0.21$ ).

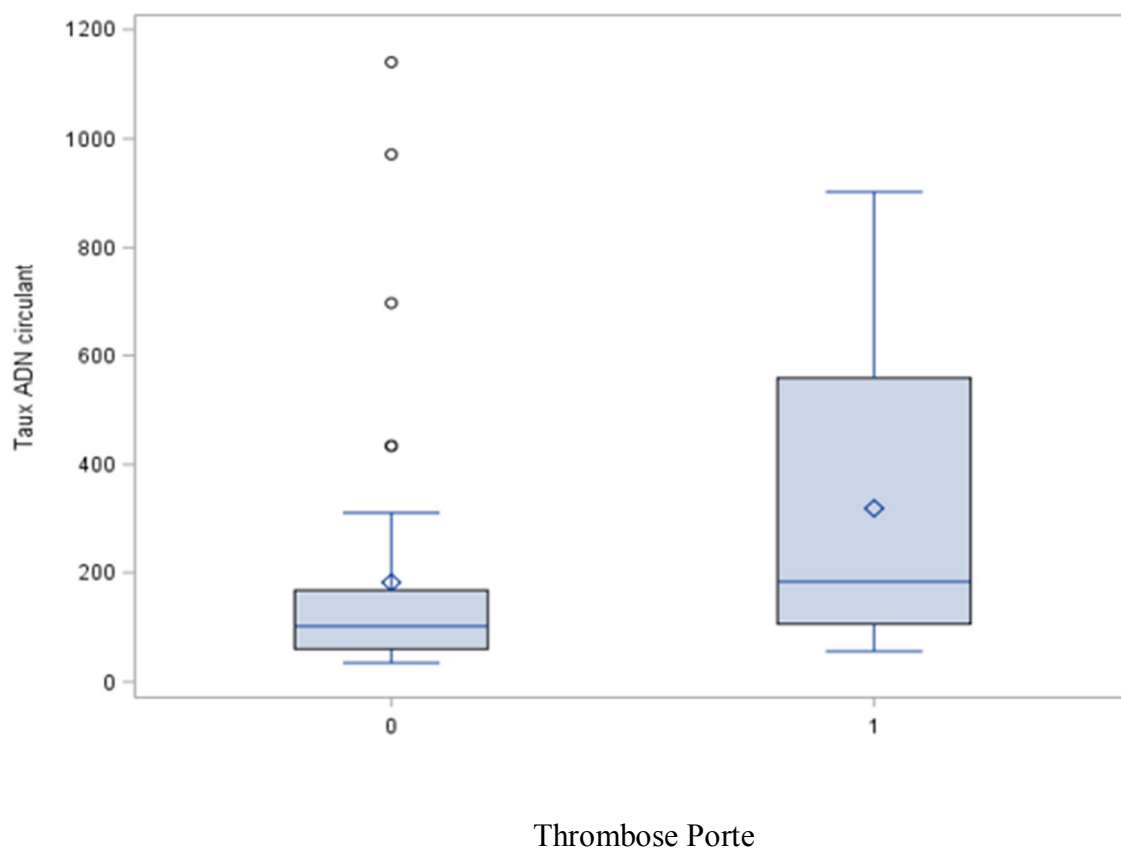
Selon le score de CHILD PUGH A, B et C, les concentrations moyennes sériques d'ADN circulant libre n'étaient pas statistiquement différentes ( $p=0.16$ ), avec respectivement  $273.82 \pm 282.81$  ng/ml [34.41-1140.21], médiane de 142.61 ng/ml, versus  $148.17 \pm 201.34$  [38.48-902.17], médiane de 104.45 ng/ml, versus  $124.86 \pm 60.01$  [54.93-224.74], médiane de 119,08 ng/ml.



### 3. Selon les caractéristiques tumorales des CHC

Parmi les différentes caractéristiques tumorales du CHC (Tableau 3), il n'y avait pas de différence statistiquement significative de concentrations moyennes sériques d'ADN circulant libre selon l'aspect uninodulaire ou multinodulaire ( $p=0.38$ ), la présence d'un wash out ( $p=0.26$ ), l'envahissement métastatique ( $p=0.93$ ) et un traitement en cours au moment du dosage ( $p=0.24$ ). Seul l'envahissement vasculaire était significativement associé à une concentration moyenne sérique plus élevée qu'en l'absence d'envahissement ( $p=0.02$ , OR= 0.59 [IC95% : -6.44;281.93]). La figure 1 montre que les patients avec une thrombose porte ont un taux d'ADN circulant libre plus élevé.

**Figure 1 : Association ADN circulant libre et thrombose porte dans la population CHC**



**Tableau 3 : Concentration d'ADN circulant selon les caractéristiques du CHC**

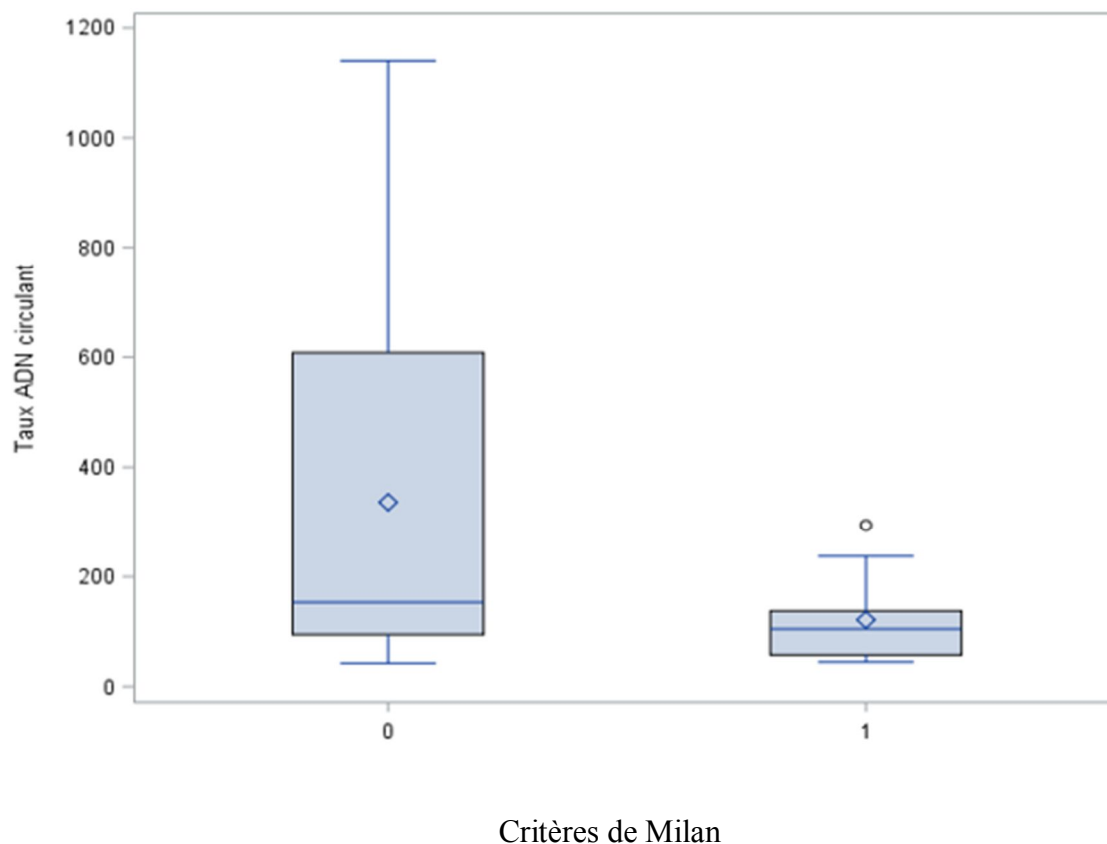
	<b>ADN circulant libre selon les caractéristiques du CHC (absence vs. présence)</b>		p
	Moy ± SD, [Extrêmes], Médianes (ng/ml)		
CHC uninodulaire vs. multinodulaire	247.50 ± 295.96 [43.33 - 1140.21] 150.44	195.93 ± 218.53 [34.41 - 902.17] 105.7	0.38
CHC dans Milan vs. hors Milan	125.16 ± 97.54 [39.24 - 434.38] 99.13	263.28 ± 291.12 [34.41 - 1140.21] 142.61	0.06
CHC sans vs. avec wash Out	274.1 ± 315.86 [38.48 - 1140.21] 154.78	191.13 ± 216.14 [34.41 - 970.94] 105.7	0.26
CHC sans vs. avec envahissement vasculaire	182.36 ± 228.06 [34.41 - 1140.21] 101.83	319.81 ± 282.96 [84.69 - 902.17] 183.64	0.02
CHC sans vs. avec métastases	219.50 ± 256.60 [34.41 - 1140.21] 113.08	169.09 ± 156.33 [39.24 - 559.03] 119.08	0.93
CHC sans (naïfs) vs. avec traitement	255.42 ± 291.84 [42.39 - 1140.21] 131.12	154.15 ± 135.96 [34.41 - 559.03] 101.46	0.24

#### **4. Selon les scores pronostiques du CHC**

Les concentrations moyennes sériques d'ADN circulant libre étaient de 125.16 ± 97.54 [39.24-434.38], médiane de 99.13 ng/ml dans le groupe CHC selon les critères de Milan, versus 263.28 ± 291.12 [34.41-1140.21], médiane de 142.61 ng/ml dans le groupe CHC au-delà des critères de Milan. Le taux sérique d'ADN circulant libre chez les patients ayant un CHC selon les critères de Milan n'était significativement pas différent de celui observé chez les patients avec un CHC au-delà des critères de Milan (p=0.06).

Dans le groupe CHC « naïf de traitement », le taux sérique d'ADN circulant était associé aux critères de Milan (p=0.05, OR= 0.35 (IC95% : 25.17;405.17) (Figure 2).

**Figure 2 : Association ADN circulant libre et critères de Milan dans la population CHC naïve de traitement**

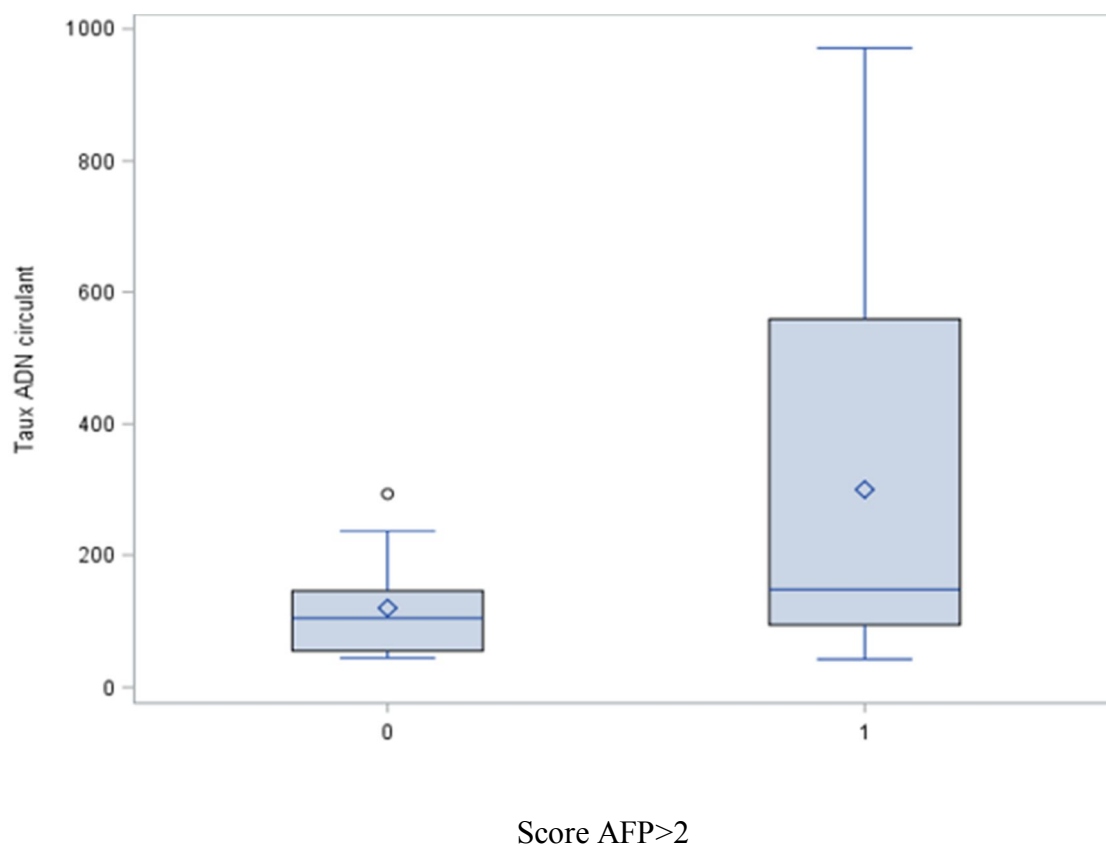


Les concentrations moyennes sériques d'ADN circulant libre étaient de  $185.70 \pm 252.26$  [43.33-1140.21] avec une médiane de 101.46 ng/ml dans le groupe CHC BCLC A, versus  $262.27 \pm 260.40$  [34.41-970.94], médiane de 148.04 ng/ml dans le groupe CHC BCLC B, versus  $213.28 \pm 269.46$  [38.48-902.17], médiane de 105.7 ng/ml dans le groupe CHC BCLC C, versus  $136.16 \pm 43.85$  [54.93-167.95] avec une médiane de 154.01 ng/ml dans le groupe CHC BCLC D. Le taux d'ADN circulant libre n'était pas associé à la classification pronostique BCLC ( $p=0.56$ ).

Les concentrations moyennes sériques d'ADN circulant libre étaient de  $240.70 \pm 257.35$  ng/ml [34.41-970.94], médiane de 130.11 ng/ml dans le groupe CHC avec un score AFP supérieur à 2, versus  $169.14 \pm 221.60$  [43.33-1140.21], médiane de 102.20 ng/ml dans le groupe CHC avec un score AFP inférieur ou égal à 2. Le taux d'ADN circulant libre n'était pas associé au score AFP ( $p=0.34$ ).

Dans le groupe CHC « naïf de traitement », le taux d'ADN circulant libre était associé au score AFP ( $p=0.05$ , OR= 0.34 [IC95% : 12.87;348.71]). La figure 3 montre que les patients avec un score AFP >2 ont des taux d'ADN circulant libre plus élevés que les patients avec un score AFP  $\leq 2$ .

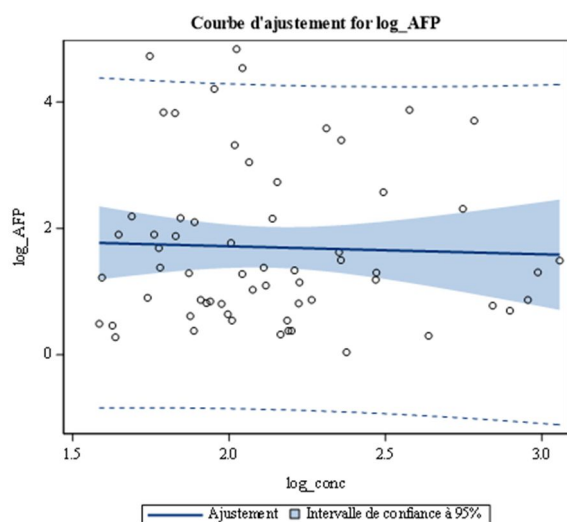
**Figure 3 : Association ADN circulant libre et score AFP chez les patients naïfs de traitement**



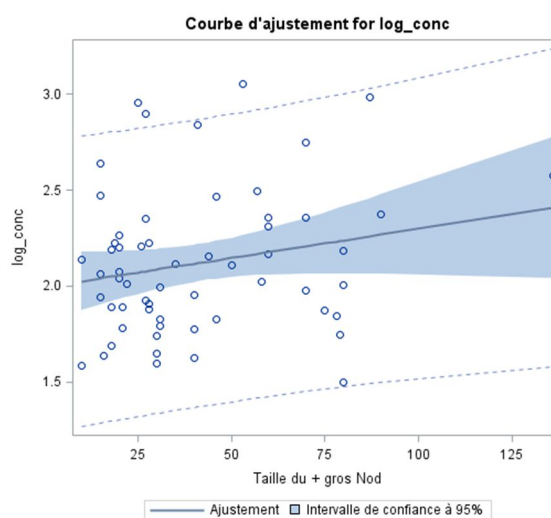
##### **5. Corrélation AFP/Taille du plus gros nodule et ADN circulant libre**

Il n'y avait pas de corrélation entre l'AFP et ADN circulant libre, avec un coefficient de corrélation rho à 0.037, ( $p=0.77$ ). De même, il n'y avait pas de corrélation entre la taille du plus gros nodule et l'ADN circulant libre avec un coefficient de corrélation rho à 0.21, ( $p=0.10$ ) (Figure 4).

**Figure 4 : Corrélation de l'ADN circulant avec le taux sérique d'AFP (Fig 4A), et la taille du plus gros nodule (Fig 4B)**



**Fig 4A :** Corrélation ADN circulant et AFP ( $r=0.037$ ,  $p=0.77$ )



**Fig 4B :** Corrélation ADN circulant et taille du plus gros nodule ( $r=0.21$ ,  $p=0.10$ )

## **6. Analyses en sous-groupes**

### **a. Population virale**

Dans notre cohorte, 10 patients ont un CHC sur cirrhose virale B ou C. Dans cette population, l'ADN circulant libre est associé aux critères de Milan ( $p=0.05$ ).

### **b. Population alcool/NASH**

Dans ce sous-groupe alcool/NASH, aucun résultat est statistiquement significatif pour les analyses en fonction des caractéristiques de la cirrhose, des caractéristiques tumorales des CHC, ni en fonction des scores pronostiques.

### **D. Analyse de survie**

Après ajustement avec le score BCLC, seuls l'urée, les phosphatases alcalines et les ASAT sont des facteurs indépendants de mortalité.

**Tableau 4 : Analyse univariée et multivariée**

	Analyse univariée		Analyse multivariée	
	RR (IC95%)	P-value	RR (IC95%)	P-value
<b>Variabiles</b>				
Age	1.00 [0.98; 1.04]	0.8880		
Sexe (F vs. H)	1.20 [0.50; 2.87]	0.6750		
Ascite	1.69 [0.87; 3.25]	0.1185		
Encéphalopathie hép.	3.80 [1.81; 7.95]	0.0004		
ASAT	1.002 [1.001; 1.004]	0.0028	1.002 [1.000; 1.004]	0.0304
ALAT	1.006 [1.003; 1.009]	0.0003		
PAL	1.001 [1.000; 1.002]	0.0028	1.001 [1.001; 1.002]	0.0016
GGT	1.000 [0.999; 1.001]	0.7138		
BLT	1.006 [1.003; 1.009]	0.0002		
Créatinine	1.012 [1.005; 1.018]	0.0003		
Urée	1.12 [1.07; 1.18]	<0.0001	1.14 [1.08; 1.21]	<0.0001
Plaquettes	1.00 [1.00; 1.00]	0.3961		
TP				
INR	0.77 [0.49; 1.22]	0.2615		
Albumine	0.97 [0.93; 1.01]	0.1306		
Log-conc ADNcf	0.70 [0.31; 1.57]	0.3858		
Score de Child Pugh	1.15 [1.01; 1.32]	0.0397		
Score de MELD	1.03 [0.99; 1.08]	0.1132		
Score AFP	1.09 [0.99; 1.20]	0.0796		
<b>BCLC</b>				
B vs. A	1.36 [0.62; 3.00]	0.4428	1.46 [0.66; 3.25]	0.3476
C vs. A	2.29 [1.08; 4.88]	0.0314	1.85 [0.82; 4.18]	0.1400
D vs. A	2.52 [0.88; 7.24]	0.0861	2.32 [0.78; 6.88]	0.1281
Nb tumeur (>1 vs.1)	0.76 [0.41; 1.39]	0.3747		
Envahissement Vascu.	2.13 [1.15; 3.92]	0.0155		
Métastases	1.13 [0.50; 2.54]	0.7748		
Critères de Milan	0.69 [0.38; 1.28]	0.2409		

#### **IV. DISCUSSION**

Plusieurs études ont rapporté la détection sérique de l'ADN circulant libre chez des patients avec des tumeurs bénignes et malignes. Il y a 30 ans, Leon et al. montraient que le taux d'ADN circulant libre était plus élevé chez les patients avec un cancer, et que ce taux baissait à la suite d'une thérapie anti-cancéreuse [17]. Depuis, plusieurs travaux ont établi un intérêt de ce biomarqueur en cancérologie, notamment pour le carcinome hépatocellulaire. Actuellement, le défi est de personnaliser et d'obtenir une prise en charge globale, optimale grâce à des biomarqueurs non invasifs comme l'ADN circulant libre.

Dans notre cohorte, l'âge moyen et le sex ratio des patients sont comparables aux données de la littérature. Cependant, notre étude comporte 80% de CHC développés sur une cirrhose d'origine alcoolique ou métabolique, alors que les données de la littérature concernent essentiellement des patients avec un CHC sur hépatopathie post virale B ou C. De même, notre groupe témoin est constitué de patients cirrhotiques sans CHC, alors que les séries de la littérature utilisaient soit une population témoin saine, soit une population non cirrhotique atteinte d'une hépatite B ou C [21,22,27]. Dans notre groupe de CHC sur cirrhose, le taux d'ADN circulant libre exprimé en moyenne était à  $204 \pm 239$  ng/ml, plus élevé que  $47 \pm 43$  ng/ml dans l'étude de Ren et al. [23] ainsi que dans deux autres études à  $116 \pm 98$  ng/ml et  $141 \pm 161$  ng/ml [21,27]. Exprimé en médiane, notre résultat était à 110,3 ng/ml, plus faible que 557 ng/ml dans un autre travail [22], montrant de grandes variations des résultats selon les études. Ceci pourrait être lié à des différences de population (hépatopathie virale versus alcoolique ou métabolique), des stades différents du carcinome hépatocellulaire, des dosages réalisés sur des patients déjà en traitement ou naïfs, la disposition de sérum ou de plasma [23], et à l'utilisation de la technique de mesure par PCR [21,27] ou kit de dosage sérique [22].

Dans notre cohorte, le taux sérique d'ADN circulant libre n'était pas significativement supérieur dans le groupe CHC sur cirrhose, que dans le groupe témoin cirrhose sans CHC, contrairement à quatre études qui ont rapporté des taux supérieurs dans leurs groupes CHC par rapport aux groupes témoins [21,22,23,27]. Il faut souligner que toutes ces études avaient comme groupes témoins des sujets sains, contrairement à notre étude qui comporte un groupe témoin de patients cirrhotiques sans CHC. Cela explique les différences de concentration trouvées dans les groupes témoins, entre  $109 \pm 68$  ng/ml dans notre série et environ  $45,8 \pm 22,6$  ng/ml en moyenne dans deux autres séries [21,27]. La normalité du taux sérique de l'ADN circulant libre n'est pas bien connue, mais les résultats de Wu et al. suggèrent une normale chez le sujet sain entre  $30 \pm 15$  et  $70 \pm 108$  ng/ml avec des variations selon l'âge et le sexe [29]. Dans une étude, la différence était significative entre le groupe CHC et le groupe sain, mais il n'y avait pas de différence si le groupe témoin était composé de cirrhotiques [23], ce qui conforte

nos résultats. La cirrhose est une maladie plus ou moins inflammatoire expliquant l'élévation de l'ADN circulant libre, comme dans d'autres maladies inflammatoires [29]. Le choix du groupe témoin est important pour la pertinence clinique qui en découle. En soins courants, 90 % des CHC surviennent sur une cirrhose et moins de 10% sur un foie totalement sain.

Nous n'avons pas trouvé de différence de taux d'ADN circulant libre en fonction du score de CHILD PUGH de la cirrhose, ni avec l'étiologie de la cirrhose, et cela a été peu étudié dans la littérature [21,22,23,27]. Nous n'avons pas trouvé d'association avec la masse tumorale en taille, ou en critères de Milan, ou par l'aspect multinodulaire et l'extension extra hépatique, ainsi que par rapport aux scores AFP et BCLC. Dans une étude, l'ADN circulant libre était un facteur de risque indépendant de récurrence métastatique [21]. Dans une autre série, le caractère histologique peu différencié du CHC était associé à un niveau plus élevé d'ADN circulant libre, avec une corrélation significative avec la taille tumorale [27]. Dans notre étude, le groupe CHC comportait 17 patients avec une thrombose porte soit 27%, ce qui est comparable aux données de la littérature. Le seul facteur associé à un taux élevé d'ADN circulant libre, dans notre étude, était l'envahissement vasculaire ( $p=0.02$ ), contrairement à la littérature.

Dans l'analyse en sous-groupes restreinte aux patients naïfs de traitement, le taux sérique d'ADN circulant libre était significativement plus élevé dans le groupe CHC classé au-delà des critères de Milan par rapport au groupe CHC classé dans les critères de Milan ( $p=0.05$ ). Il n'y avait pas de différence dans le sous-groupe de patients non naïfs de traitement. De plus, dans le groupe CHC avec un score AFP  $> 2$ , le taux d'ADN circulant libre était significativement plus élevé que dans le groupe CHC avec un score AFP  $\leq 2$ . Ces deux résultats suggèrent que ce biomarqueur est associé à la masse tumorale, et pourrait avoir un rôle dans la sélection des bons candidats à une transplantation hépatique. Il n'y a aucune donnée dans la littérature sur le lien entre le score AFP et l'ADN circulant libre, ni sur le lien entre les critères de Milan et l'ADN circulant libre.

Dans nos résultats et dans la littérature, il y avait aucune corrélation avec l'AFP. La combinaison de ces deux biomarqueurs permettrait d'améliorer la sensibilité et la spécificité pour la détection des CHC [22]. Chen et al, ont montré que la sensibilité de l'ADN circulant libre et de l'AFP était respectivement 56.4% et 53.8% ; leur spécificité respective était 95.6% et 91.1%. La combinaison des deux biomarqueurs améliorait la sensibilité à 71.8% mais pas la spécificité à 86.7%.

Sur le plan pronostic, notre population CHC était majoritairement multinodulaire (66.7%), au-delà des critères de Milan, avec un score AFP supérieur à 2, et 38% des CHC avaient un stade BCLC avancé, soit de mauvais pronostic. Dans notre analyse de survie, le taux d'ADN circulant



libre n'était un facteur prédictif indépendant. Dans la littérature, les CHC étaient majoritairement uninodulaires (76%), et plus de 50% des CHC étaient de taille inférieure à 5 cm [23]. Ces données sont également retrouvées dans les articles de Tokuhisa, de Iizuka [21, 27]. Dans deux séries, l'ADN circulant libre était un facteur de risque indépendant associé à la mortalité [21,23].

Les limites de notre étude concernaient l'effectif avec peut être un manque de puissance, une hétérogénéité de la population sur les caractéristiques du CHC, les étiologies des cirrhoses, et le statut thérapeutique naïf ou en traitement.

## **V. CONCLUSIONS**

Dans cette première série concernant une population de patients ayant un carcinome hépatocellulaire survenant majoritairement sur une cirrhose alcoolique et métabolique, nos résultats montrent une association de l'ADN circulant libre avec la masse tumorale estimée par les critères de Milan et le score AFP, ainsi qu'en présence d'un envahissement vasculaire par la tumeur. L'ADN circulant libre pourrait ainsi être un biomarqueur d'agressivité tumorale, dont la place dans la stratégie globale de prise en charge clinique reste à déterminer. Par ailleurs, il semble que l'ADN circulant libre soit augmenté par la présence de la cirrhose elle-même.

## **VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *Cancer J Clin* 2011; 61:69-90.
- [2] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362:1907-17.
- [3] Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80:827-41.
- [4] Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127:S5-S16.
- [5] Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, Danton F, Terranova A, Castagnetta LA. Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 963:13-20.
- [6] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA: A Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.
- [7] Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, Gores G. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2:16018.
- [8] Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. *J Hepatol* 2001; 35:421-30.
- [9] Singal AG, El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma from epidemiology to prevention : translating knowledge into practice. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13:2140-51.
- [10] Murakami T, Kim T, Oi H, Nakamura H, Igarashi H, Matsushita M, Okamura J, Kozuka T. Detectability of hypervascular hepatocellular carcinoma by arterial phase images of MR and spiral CT. *Acta radiologica* 1995; 36:372-6.
- [11] Lisa P Waller, Vrushak Deshpande, Nikolaos Pysopoulos. Hepatocellular carcinoma : A comprehensive review. *World J Hepatol* 2015; 7:2648-63.
- [12] Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014; 32:579-86.
- [13] Thomas J, Houchi H, Meynier M, Dreher ML, Vanelslander P, Hautefeuille V, Regimbeau JM, Chatelain D, Yzet T, Robert B, Nguyen-Khac E. Etude du Micro-ARN 21 dans le carcinome hépatocellulaire sur cirrhose d'origine alcoolique. *JFHOD* 2014. 8510. Poster.

- [14]Thésaurus national de Cancérologie Digestive <http://www.snfge.asso.fr/01-Bibliotheque/0G-Thesaurus-cancerologie/publication5/sommaire-thesaurus.asp>
- [15] Song PP, Xia J-F, Inagaki Y, Hasegawa K, Sakamoto Y, Kokudo N, Tang W. Controversies regarding and perspectives on clinical utility of biomarkers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2016; 22:262-74.
- [16] Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Tomokuni A, Takemasa I, Umeshita K, Kanto T, Doki Y, Mori M. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012; 56:167-75.
- [17] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37:646-50.
- [18] Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001; 313:139-42.
- [19] Holdenrieder S, Stieber P. Apoptotic markers in cancer. *Clin Biochem* 2004; 37:605-17.
- [20] Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N. Detection of circulating tumor DNA in early- and late- stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014; 6:224.
- [21] Tokuhisa Y, Lizuka N, Sakaida I, Moribe T, Fujita N, Miura T, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Uchida K, Terai S, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Circulating cell-free DNA as a predictive marker for distant metastasis of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2007; 97:1399-403.
- [22] Chen K, Zhang H, Zhang L, Ju S, Qi J, Huang D, Li F, Wei Q, Zhang J. Value of circulating cell-free DNA in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2013 May 28; 19:3143-3149.
- [23] Ren N, Ye Q, Qin L, Zhang B, Liu Y, Tang Z. Circulating DNA level is negatively associated with the long-term survival of hepatocellular carcinoma patients. *World J Gastroenterol* 2006 June 28; 12:3911-3914.
- [24] Sefrioui D, Sarafan-Vasseur N, Beaussire L, Baretti M, Gangloff A, Blanchard F, Clatot F, Sabourin JC, Sesboué R, Frebourg T, Michel P, Di Fiore F. Clinical value of chip-based digital-PCR platform for the detection of circulating DNA in metastatic colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2015; 47:884-90.

- [25] Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker. A critical appraisal of the literature. *Clinica Chimica Acta* 2010; 411:1611-24.
- [26] Duvoux C et al. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: A Model Including Alfa Fetoprotein Improves the Performance of Milan Criteria. *Gastroenterology* 2012; 143:986 -94.
- [27] Iizuka N, Sakaida I, Moribe T, Fujita N, Miura T, Starkus M, Tamatsukuri S, Ishitsuka H. Elevated levels of circulating cell-free DNA in the blood of patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Anticancer research* 2006; 26:4713-4720.
- [28] Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KH, Sun CF and Wu JT: Cellfree DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta* 2002 ; 321:77-87.
- [29] Galeazzi M, Morozzi G, Piccini M, Chen J, Bellisai F, Fineschi S, Marcolongo R. Dosage and characterization of circulating DNA: present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders. *Autoimmun Rev* 2003; 2:50-55.

