

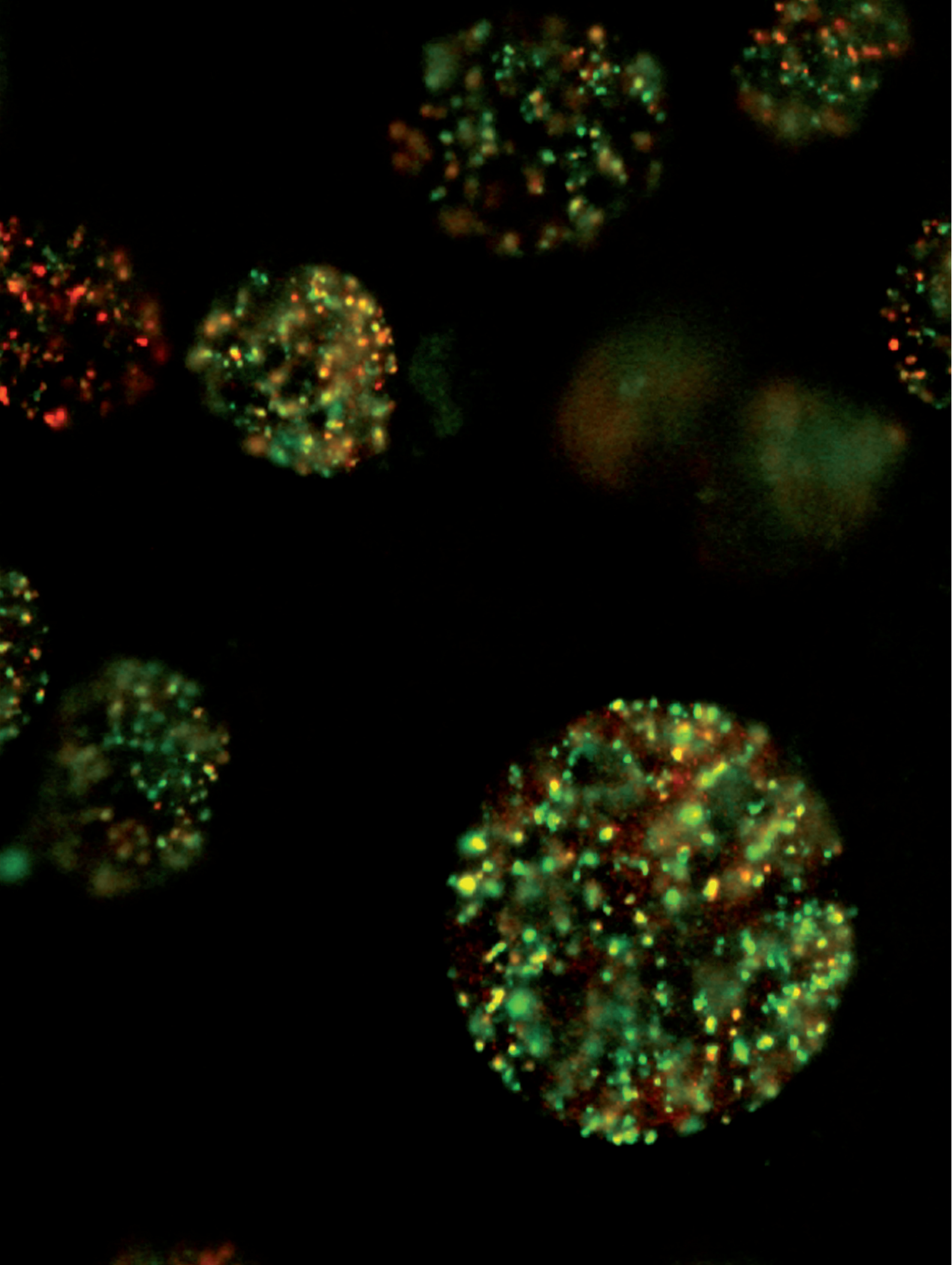
SECTION MÉCANISMES DE LA CANCÉROGENÈSE (MCA)

Chef
Dr Pierre Hainaut

L'OBJECTIF GÉNÉRAL DE LA SECTION EST DE CONTRIBUER À LA PRÉVENTION ET À LA LUTTE CONTRE LE CANCER À TRAVERS UNE MEILLEURE COMPRÉHENSION DES MÉCANISMES DE LA CANCÉROGENÈSE. CET OBJECTIF IMPLIQUE L'ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE L'ENVIRONNEMENT, LE GÉNOME ET L'ÉPIGÉNOME. UNE GRANDE PARTIE DES ACTIVITÉS DE LA SECTION CONSISTE À RÉALISER DES ÉTUDES TRANSLATIONNELLES SUR DES BIOMARQUEURS D'EFFET DES EXPOSITIONS ENVIRONNEMENTALES ET DES BIOMARQUEURS DE DÉTECTION DU CANCER À UN STADE PRÉCOCE, EN CONCENTRANT LES EFFORTS SUR LES CANCERS LES PLUS FRÉQUENTS DANS LES PAYS À FAIBLE REVENU, COMME LE CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE (CHC), LE CARCINOME ÉPIDERMOÏDE DES VOIES AÉRO-DIGESTIVES ET LE CANCER DU SEIN.

Les points forts des activités de la Section au cours de cette période biennale comprennent 1) le développement de techniques et de procédés pour permettre l'application des analyses de mutations multi-locus et de changements épigénétiques à de vastes études d'épidémiologie moléculaire et de pathologie moléculaire ; 2) de nouvelles lignes de recherche mécanistique concernant la contribution des mutations TP53 au développement de cancers spécifiques (poumon, sein, foie) et les bases moléculaires de la régulation épigénétique des cellules souches, en utilisant des systèmes élaborés de culture cellulaire *in vitro* ; 3) la mise en place et la coordination d'un Consortium international sur le cancer du foie (*International Liver Cancer Study*, <http://ilcs.iarc.fr/>); et 4) de nouvelles études sur la coordination des bases de données moléculaires, notamment de nouveaux développements pour la base de données des mutations TP53 du CIRC (<http://www-p53.iarc.fr>) et la mise en place d'un projet pilote pour la création d'une base internationale de données épigénétiques du cancer. La

Section s'est également chargée de l'établissement et de la gestion d'une importante biobanque au CIRC, qui a gagné une notoriété internationale, en particulier grâce à la publication de directives et protocoles standard (*Common Minimum Technical Standards and Protocols for Biological Resource Centres dedicated to Cancer Research*), aujourd'hui reconnues comme référence mondiale pour les biobanques.



GROUPE ÉPIGÉNÉTIQUE (EGE)

Chef

Dr Zdenko Herceg

Chercheur

Dr Vladimir Krutovskikh (depuis avril 2009)

Secrétaire

Michelle Wrisez

Chercheurs en visite

Dr Chantal Matar (janvier à juin 2008)

Boursiers post-doctoraux

Dr Karen Balassiano

Dr Anastas Gospodinov

Dr Hector Hernandez Vargas

Dr Puspinder Kaur (depuis juillet 2008)

Rabih Murr (jusqu'en juin 2008)

Dr Anupam Paliwal

Dr Haiji Sun (novembre 2007 à juillet 2008)

Etudiants

Marion Essig (depuis septembre 2009)

Virginie Fasolo (jusqu'en juillet 2008)

Fabrice Fouchard (janvier à mars 2008)

Anne-Laure Genevois (juin et juillet 2008 et de janvier à mars 2009)

Gabriel Ichim (janvier à juillet 2008 et janvier à juillet 2009)

Sheila Lima (depuis avril 2009)

Jean-Francois Mallet (juin et juillet 2008)

Marion Mola (septembre 2008 à juin 2009)

Rabih Murr (jusqu'en décembre 2007)

Carla Sawan

Nino Sincic (mai à août 2008 et septembre à novembre 2009)

Thomas Vaissière

Marie-Pierre Lambert

Maria Ouzounova

Techniciens de laboratoire

Marie-Pierre Cros (depuis juin 2009)

Cyrille Cuenin

ÉPIGÉNÉTIQUE : UN DOMAINE ÉMERGENT EN CANCÉROGÈNE MOLÉCULAIRE

Le domaine de l'épigénétique du cancer est devenu un "courant dominant", dans la mesure où il promet de faire progresser notre compréhension de l'étiologie des cancers humains et des mécanismes de la cancérogenèse, et de faciliter le développement de stratégies originales en matière de prévention, de détection et de traitement du cancer. En effet, la réversibilité intrinsèque et le caractère ubiquitaire des modifications épigénétiques, dans la quasi-totalité des types de cancer chez l'homme, rendent leur étude attractive tant du point de vue de la recherche de biomarqueurs que du développement de stratégies de prévention du cancer. Le Groupe Epigénétique (EGE) réalise à la fois des études mécanistiques et des analyses de profils épigénétiques, visant d'une part à acquérir une meilleure compréhension des mécanismes de la tumorigenèse et, d'autre part, à identifier et à valider de nouveaux biomarqueurs épigénétiques. Ce programme exploite les nouveaux concepts de l'épigénétique du cancer et les récents progrès technologiques en épigénétique et en épigénomique. Il est conduit en étroite collaboration avec les épidémiologistes et les chercheurs des laboratoires du CIRC, ainsi qu'avec des groupes de recherche extérieurs. Les activités du Groupe EGE se partagent globalement en trois grands volets : 1) études destinées à élucider le rôle des modifications épigénétiques induites par les principaux facteurs de risque pour des cancers spécifiques chez l'homme, 2) études destinées à examiner les modifications épigénétiques pour mieux comprendre les mécanismes de déve-

loppement et d'évolution du cancer, et 3) études destinées à identifier et à valider de nouveaux biomarqueurs épigénétiques.

MODIFICATIONS DU DEGRÉ DE MÉTHYLATION DE L'ADN DANS LE CANCER DU POU-MON ET LEUR ASSOCIATION AVEC DES FAC-TEURS DE RISQUE ENVIRONNEMENTAUX

Nous avons réalisé une analyse quantitative du profil de méthylation de l'ADN sur une large série de gènes associés au cancer, dans le cadre d'une étude cas-témoins du cancer du poumon. Ces analyses ont révélé une fréquence élevée d'hyperméthylation aberrante de *MTHFR*, *RASSF1A* et *CDKN2A* dans les tumeurs du poumon, par rapport aux résultats obtenus dans des prélèvements sanguins témoins. En revanche, aucune augmentation des niveaux de méthylation de *GSTP1* et *CDH1* n'a été observée dans ces tumeurs du poumon, ce qui concorde avec la notion qu'une méthylation aberrante de l'ADN est spécifique du type de gène et du type de tumeur (Vaissière et coll., 2009a). Très important, le tabagisme, le sexe et la consommation d'alcool exerçaient une forte influence sur les niveaux de méthylation de certains gènes (*RASSF1A* et *MTHFR*), tandis que la prise de folates, l'âge et les sous-types histologiques n'avaient aucun effet. Nous avons ainsi observé une forte association entre tabagisme et hyperméthylation de *MTHFR* dans les cancers du poumon, alors que les niveaux de méthylation de *CDH1*, *CDKN2A*, *GSTP1* et *RASSF1A* restaient normaux. Ces résultats indiquent que la fumée de tabac dirige l'hyperméthylation sur des gènes précis. Nous avons également observé que le sexe influençait le degré de méthylation de *RASSF1A*, mais pas des autres gènes étudiés. Les niveaux de méthylation de *RASSF1A* étaient en effet plus élevés chez les sujets masculins. Cette étude permet d'identifier des profils de méthylation aberrante de l'ADN dans les cancers du poumon, illustrant ainsi le mécanisme par lequel des facteurs environnementaux peuvent interagir avec des gènes clés impliqués dans la suppression tumorale et contribuer au développement du cancer (Vaissière et coll., 2009a).

L'ANALYSE DU MÉTHYLOME RÉVÈLE UNE DÉRÉGULATION DE VOIES PARTICULIÈRES DANS DES CELLULES SOUCHES PUTATIVES DE CANCER DU SEIN ET DES TUMEURS MAMMAIRES SPORADIQUES HUMAINES

Il existe de plus en plus d'indications de l'existence, dans les tumeurs du sein, d'une sous-population de cellules cancéreuses présentant des caractéristiques de cellules souches. Nous avons donc utilisé le modèle de la mammosphère combiné à l'analyse de la méthylation de l'ADN amplifié sur microbilles, pour caractériser les mécanismes épigénétiques impliqués dans la régulation des voies de croissance des cellules souches putatives de cancer du sein. Nos résultats ont montré que ces cellules présentaient des profils distincts de méthylation du promoteur CpG dans une série de gènes spécifiques, impliqués notamment dans les voies de signalisation Jak-STAT et du récepteur des cellules T. De façon remarquable, cette méthylation aberrante des promoteurs de gènes de la voie Jak-STAT a également été observée dans des échantillons humains de tumeur du sein et de tissu environnant correspondant. Par ailleurs, l'hyperméthylation dans les tumeurs était invariablement corrélée à une expression réduite des transcrits liés à la voie Jak-STAT. Ces résultats soutiennent le concept selon lequel l'expression des voies de régulation, la mise en place et le maintien des propriétés déterminantes des cellules souches cancéreuses sont orchestrés par des mécanismes épigénétiques (Hernandez et coll., soumis pour publication).

PROFILS DE MÉTHYLATION DE L'ADN COMME BIOMARQUEURS POTENTIELS DU CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) se caractérise par une détection tardive et une évolution rapide. Une perturbation épigénétique pourrait être à l'origine des différences moléculaires et clinico-pathologiques des sous-groupes de CHC. Pour étudier cette possibilité, nous avons caractérisé les changements de méthylation dans la région promoteur d'une série de CHC et leurs tissus environnants respectifs. En collaboration avec Florence Le Calvez-Kelm (GEN/GCS) et Sean Tavtigian (GEN/GCS), nous avons utilisé la technique des microbilles pour

analyser un large éventail de promoteurs de gènes associés au cancer (1505 sites CpG dans 807 promoteurs de gènes). Les sites CpG ont été sélectionnés en fonction de leur capacité à permettre une classification des paramètres clinico-pathologiques. Les signatures ont été validées sur une série indépendante de tumeurs de CHC et sur les tissus environnants correspondants. Nous avons ainsi identifié une signature qui permet de distinguer le CHC du tissu environnant et d'autres types de tumeur. Les voies de signalisation Wnt, TGF-beta, Hedgehog et Notch étaient en effet plus riches en promoteurs plus ou moins méthylés. Les résultats ont aussi révélé dans les CHC une série de gènes méthylés de façon aberrante, notamment des gènes soumis à empreinte. Par ailleurs, la méthylation d'un groupe indépendant de promoteurs de gène était fortement corrélée avec la survie après traitement du cancer (Hernandez Vargas et coll., 2009b, soumis pour publication).

MÉCANISMES ÉPIGÉNÉTIQUES INTERVENANT DANS LE CONTRÔLE DE PROCESSUS CELLULAIRES DÉCISIFS ET DE LA TUMORIGÈNESE

Alors qu'il est bien établi que des événements épigénétiques aberrants peuvent provoquer une mauvaise activation des gènes et un phénomène inadéquat de « gène silencing » (gène silencieux), de récentes observations indiquent qu'une dérégulation des états épigénétiques pourrait contribuer au développement du cancer en compromettant d'autres processus cellulaires fondamentaux, tels que la réparation de l'ADN, la réplication, le cycle cellulaire et les propriétés des cellules souches ("stemness"). Nous avons découvert un nouveau mécanisme d'ubiquitination de la β -Caténine, acteur central de la voie canonique Wnt, fréquemment dérégulée dans les cancers humains (Finkbeiner et coll., 2008). En effet, la voie Wnt est un régulateur clé du développement embryonnaire et de l'auto-renouvellement des cellules souches, et l'on observe une hyperactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -Caténine dans de nombreux cancers chez l'homme. Agissant au niveau de la chromatine, ce nouveau mécanisme d'ubiquitination de la β -Caténine est médié par le cofacteur TRRAP du complexe histone acétyltransférase (HAT) et le

composant invariable Skp1 du complexe ubiquitine ligase SCF (Skp-Cullin-F-box). Nos résultats montrent donc qu'il existe un mécanisme distinct qui régule l'ubiquitination/destruction de la β -Caténine dans le noyau. Ce mécanisme vient compléter le mécanisme de destruction de la β -Caténine dans le cytoplasme. Il prévient ainsi la stabilisation oncogénique de la β -Caténine et l'activation chronique de la voie canonique Wnt (Finkbeiner et coll., 2008).

Une autre étude nous a permis d'identifier le rôle des HAT dans le mécanisme qui assure l'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation des cellules souches embryonnaires et des cellules souches adultes (cellules souches hématopoïétiques). En effet, la délétion conditionnelle de TRRAP chez la souris a provoqué une différenciation non programmée de ces cellules, estimée d'après des marqueurs morphologiques, biochimiques et génétiques. Les cellules souches des souris TRRAP-déficientes présentaient une perte d'acétylation des histones, associée à une condensation de la chromatine au niveau de foyers distincts (hétérochromatisation), à une perte des propriétés hyperdynamiques de la chromatine et à l'absence de couplage entre diméthylation de H3K4 et triméthylation de H3K27, deux marqueurs jugés importants pour la formation des bivalents dans les cellules souches. Ces résultats montrent que l'acétylation des histones et les HAT participent aux mécanismes courants qui freinent la différenciation et favorisent le maintien de l'identité des cellules souches adultes et embryonnaires (auto-renouvellement et pluripotentialité). Ils soulignent également l'importance de la modification des histones et de la signature de la chromatine sur le contrôle des propriétés des cellules souches ("stemness") et de leur différenciation (Loizou et coll., Journal of Immunology, 2009, sous presse).

DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES ÉPIGÉNÉTIQUES APPLICABLES AUX ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES À GRANDE ÉCHELLE

Chez les personnes atteintes d'un cancer, on a observé dans l'ADN libre isolé du plasma des changements de méthylation associés au cancer, qui constituent donc une cible attractive dans le cadre de la recherche de biomarqueurs. Nous

avons donc développé une combinaison originale de méthodes permettant une détection quantitative et sensible des méthylation de l'ADN dans les quantités infimes d'ADN présentes dans les liquides corporels (*quantitative Methylation Analysis of Minute DNA amounts after whole Bisulfite Amplification, qMAMBA*) (Vaissière et coll., 2009b). Cette méthode consiste en une amplification de la matrice d'ADN traité au bisulfite, suivie d'une détection quantitative de la méthylation par pyro-séquençage. Elle permet ainsi l'analyse de plusieurs gènes à partir d'une petite quantité d'ADN de départ. La méthode qMAMBA est extrêmement efficace pour l'analyse des profils et des taux de

méthylation dans des échantillons de plasma contenant de très petites quantités d'ADN et de faibles concentrations d'allèles méthylés. Par conséquent, elle devrait faciliter les études de méthylation destinées à découvrir des biomarqueurs épigénétiques, et s'avérer particulièrement utile aussi bien pour établir des profils de méthylation sur de grandes séries d'échantillons de liquides corporels prélevés dans le cadre d'études d'épidémiologie moléculaire, que pour poser des diagnostics précoces de la maladie (Vaissière et coll., 2009b).

Le Groupe EGE exprime sa reconnaissance aux personnes suivantes pour leur collaboration :

Carlo Croce, Columbus, Etats-Unis ; Bruno Amati, Milan, Italie ; Laszlo Tora, Strasbourg, France ; Zhao-Qi Wang, Iéna, Allemagne ; Thomas Jenuwein, Vienne, Autriche ; Saadi Khochbin, Grenoble, France ; Claire Vourc'h, Grenoble, France ; Eric Gilson, Lyon, France ; Claude Sardet, Montpellier, France ; Eric Julien, Montpellier, France ; Christian Treppe, Lyon, France ; Isabelle Chemin, Lyon, France ; Jorg Tost, Paris, France ; Jean-Pierre Issa, Houston, Etats-Unis ; Paolo Vineis, Londres, RU ; Carlos Gonzalez, Barcelone, Espagne ; Vivek Shukla, Bethesda, Etats-Unis ; Ahmed Amine Khamilich, Toulouse, France ; Jean-Yves Scoazec, Lyon, France ; Marc Billaud, Lyon, France ; Alain Puissieux, Lyon, France ; Qing Wang, Lyon France ; Caroline Moyret-Lalle, Lyon, France ; Caroline Relton, Newcastle, RU ; Felipe Pinto, Rio de Janeiro, Brésil ; Chantal Matar, Monton, Canada ; Andreas Trumpp, Heidelberg, Allemagne ; Gabriella Oser, Bâle, Suisse ; Floriana Bulic-Jakus, Zagreb, Croatie ; Maja Vlahovic, Zagreb, Croatie ; Rafael Casellas, Bethesda, Etats-Unis

Le Groupe EGE exprime sa gratitude aux organismes suivants pour leur contribution financière :

National Institutes of Health/National Cancer Institute (NIH/NCI), Etats-Unis
Institut National du Cancer, France
Agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales, France
Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), France
Ligue Nationale (Française) Contre le Cancer, France
Commission européenne
Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité du Rhône, France
Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité de Saône-et-Loire, France
Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité de la Loire, France
European Molecular Biology Organization (EMBO)
Swiss Bridge Award

PUBLICATIONS

- Finkbeiner MG, Sawan C, Ouzounova M, Murr R, Herceg Z (2008). A chromatin-based mechanism for β -Catenin ubiquitination and regulation of the canonical Wnt pathway. *Cell Cycle*, 7(24):3908-14.
- Fucic A, Gamulin M, Katic J, Herceg Z, Markovic D, Stojkovic R, Ferencic Ž, Mildner B, Jazbec AM, Dobranic T (2008). Developmental and transplacental genotoxicology. *Mutation Research*, 657(1):43-7.
- Gospodinov A, Herceg Z (2009). Book Chapter: Chromatin – the Entry to and Exit from DNA Repair. In *PROTEIN REVIEWS SERIES: Post-translational Modifications*, ed. Cecilio Vidal, (Springer Press). Sous presse.
- Herceg Z, Hainaut P (2008). DNA damage response and DNA repair. In: *World Cancer Report*, eds Boyle P. IARC Press, Lyon, France.
- Hainaut P, Herceg Z (2008). Hallmarks of cancer. In: *World Cancer Report*, eds Boyle P. IARC Press, Lyon, France.
- Herceg Z, Hainaut P (2008). Cell cycle, telomere and cancer. In: *World Cancer Report*, eds Boyle P. et al. IARC Press, Lyon, France.
- Herceg Z, Hainaut P (2008). Cell death and cancer. In: *World Cancer Report*, eds Boyle P. et al. IARC Press, Lyon, France.
- Herceg Z, Boffetta P (2009). Book Chapter: Epigenetic changes in cancer: role of environment and nutrition. In *The Environment and Cancer: Gene-Environment Interactions and Individual Susceptibility*, ed. D. Roy, (Springer Press). Sous presse.
- Herceg Z, Paliwal A (2009). HBV protein as a double-barrel shot-gun targets epigenetic landscape in liver cancer. *J Hepatol*. 50(2):252-5.
- Herceg Z (2009). Epigenetic changes induced by environment and diet in cancer. Article in *Encyclopedia on Environmental Health* (Elsevier), sous presse.
- Hernandez-Vargas H, Ouzounova M, Matar C, Herceg Z (2009a). Epigenetic states and deregulation of developmental pathways characterize putative breast cancer stem cells. Manuscript submitted.
- Hernandez-Vargas H, Lambert MP, Le Calvez-Kelm F, Gouysse G, McKay-Chopin S, Tavtigian S, Soazec JY, Herceg Z (2009b). Hepatocellular carcinoma displays distinct DNA promoter methylation profiles with potential as clinical predictors. Manuscript submitted.
- Hernández-Vargas H, Sincic N, Ouzounova M, Herceg Z (2009). Epigenetic signatures in stem cells and cancer stem cells. *Epigenomics*. Sous presse.
- Lambert MP, Herceg Z (2008). Epigenetics and Cancer, 2nd IARC Meeting, Lyon. *Molecular Oncology*, 1:26-41.
- Loizou JI, Oser G, Shukla V, Sawan C, Murr R, Wang ZQ, Trumpp A, Herceg Z (2009). Histone acetyltransferase cofactor Trrap is essential for maintaining the hematopoietic stem/progenitor cell pool. *Journal of Immunology*. Sous presse.
- Ouzounova M, Hernández-Vargas H and Herceg Z (2009). Epigenetic identity in cancer stem cells. In: *Stem Cells & Regenerative Medicine*, Springer Science (Humana) Press. Sous presse.
- Sawan C, Vaissière T, Murr M, Herceg Z (2008). Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation Research*, 642(1-2):1-13.
- Shukla V, Vaissière T, Herceg Z (2008). Histone acetylation and chromatin signature in stem cell identity and cancer. *Mutation Research*, 637(1-2):1-15.
- Vaissière T, Sawan C, Herceg Z (2008). Epigenetic interplay between histone acetylation and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research*, 659(1-2):40-8.
- Vaissière V, Hung R, Zaridze D, Mukeria A, Cuenin C, Fasolo V, Ferro G, Hainaut P, Brennan P, Tost J, Boffetta P, Herceg Z (2009a). Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Research*, 69(1):243-52.
- Vaissière T, Cuenin C, sPaliwal A, Vineis P, the Genair-EPIC Investigators, Hainaut P and Herceg Z (2009b). Quantitative analysis of DNA methylation after whole bisulfite amplification of a minute amount of DNA from bodily fluids. *Epigenetics*, 4:4, 221-23.

GROUPE CANCÉROGENÈSE MOLÉCULAIRE (MOC)

Chef

Dr Pierre Hainaut

Secrétaire du Groupe

Michelle Wisez

Secrétariat

Dominique Bouchard

Chercheur

Dr Magali Olivier

Chercheurs en visite

Dr Behnoush Abedi-Ardekani

Dr Claude Caron de Fromentel (jusqu'en décembre 2008)

Dr Gihan Hosny

(juillet-août & novembre 2007 & juillet 2008)

Dr Maria Kustova (septembre à octobre 2008)

Dr Kirill Vladimirovich Solovyov

(septembre à octobre 2008)

Boursiers postdoctoraux

Dr Suresh Anaganti

Dr Sandra Arandelovic (jusqu'en mars 2009)

Dr Xiaoli Ma (jusqu'en octobre 2008)

Dr Amélie Plymoth (jusqu'en octobre 2009)

Dr Edenir Palmero

Etudiants

Saoussen Ben Halima (février à juin 2008)

Mélanie Bodnar (mai à septembre 2008)

Dominique Bourgeon (jusqu'en novembre 2008)

Alexis Cortot (jusqu'en octobre 2008)

Nathalia Costa

Sébastien Couraud (jusqu'en octobre 2008)

Yayun Dai

Sophie Désira (jusqu'en août 2008)

Jihen El Heni (avril à juin 2008)

Priscilla Falagan Lotsch (jusqu'en février 2008)

Amandine Fernandez (jusqu'en septembre 2008)

Lynnette Fernandez-Cuesta

Doriane Gouas

Hind Hafsi

Annette Kraiss (jusqu'en août 2009)

Jeremy Lambert (jusqu'en décembre 2008)

Myriam Lereau

Virginie Marcel (jusqu'en juin 2009)

Marit Mo (mars à juin 2008)

Mounia Mounawar (jusqu'en août 2009)

Sandra Ortiz-Cuaran

Maria Paciencia (jusqu'en septembre 2009)

Aurélia Petré (jusqu'en octobre 2008)

Charlotte Sagne

Ludmila Sarbu (mars à août 2008)

Chiara Scocciati-Goudin

Frida Sighoko Mawadzoue

Suna Sabuncuoglu

Edaise Silva (avril à juillet 2008 & juin 2009)

Vineetha Vijayakumar (août à décembre 2008)

Ke-seay Smoth

Amélie Thépot

Techniciens de laboratoire

Elodie Caboux

Brigitte Chapot

Elodie Colney

Thomas Cler

Marie-Pierre Cros (jusqu'en mai 2009)

José Garcia

Sophie Guillot

Agnès Hautefeuille

Christophe Lallemand

Ghislaine Martel-Planche

Stéphanie Villar

Béatrice Vozar

Aides de laboratoire

Marcelle Essertel

Nicole Farina

Maria Maranhao

Gertrude Tchoua

LES MUTATIONS DE GÈNES ASSOCIÉS AU CANCER REPRÉSENTENT LA PIERRE ANGULAIRE DE LA CANCÉROGÈNESE. DE NOMBREUSES MUTATIONS S'ACCUMULENT PENDANT LA PROGRESSION TUMORALE, MAIS CERTAINES D'ENTRE ELLES PEUVENT ÉGALEMENT APPARAÎTRE DANS DES CELLULES NORMALES SUITE À DES PROCESSUS ERRONÉS DE RÉPARATION DE L'ADN OU À UNE EXPOSITION À DES MUTAGÈNES ENVIRONNEMENTAUX. DANS LES CANCERS HUMAINS, TP53 EST LE GÈNE LE PLUS FRÉQUEMMENT MUTÉ ET PRÉSENTANT LA PLUS GRANDE DIVERSITÉ DE MUTATIONS. CE GÈNE CODE POUR UN SUPPESSEUR DE TUMEUR AUX FONCTIONS MULTIPLES, QUI CONTRÔLE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE, L'APOPTOSE, LA RÉPARATION DE L'ADN ET LA SÉNESCENCE (HAINAUT AND WIMAN, 2009). LE GROUPE MOC ÉTUDIE LE RÔLE DES MUTATIONS TP53 EN TANT QUE MARQUEURS D'EXPOSITION AUX MUTAGÈNES ET BIOMARQUEURS DE LA PROGRESSION TUMORALE, DU PRONOSTIC ET DE LA RÉPONSE AU TRAITEMENT. LA PLUS GRANDE PARTIE DES RECHERCHES EST AXÉE SUR DES CANCERS FRÉQUENTS (SEIN, POUMON) ET DES CANCERS PRÉSENTANT DE GRANDES VARIATIONS GÉOGRAPHIQUES EN TERME D'INCIDENCE ET DE MÉCANISMES ÉTIOLOGIQUES (FOIE, ŒSOPHAGE). NOUS RÉALISONS DES ÉTUDES EXPÉRIMENTALES EN LABORATOIRE POUR COMPRENDRE LES BASES MÉCANISTIQUES DE LA CONTRIBUTION DES MUTANTS p53 À LA CANCÉROGÈNESE ET ÉLUCIDER DE NOUVEAUX MÉCANISMES POTENTIELS DE RÉGULATION DE LA FONCTION p53.

MUTATIONS SOMATIQUES TP53 ET RÔLE DE p53 DANS LES MÉCANISMES DE CANCÉROGÈNESE

Les études des mutations TP53 ont été centrées sur les cancers du sein, du poumon, de l'œsophage et du foie. Pour ce qui est du cancer du sein, nous avons continué à étudier la valeur des mutations TP53 en tant que marqueurs pronostiques indépendants (Zalcman et coll., 2008). Grâce à l'utilisation de cultures de cellules mammaires cancéreuses, nous avons montré une altération des réponses aux œstrogènes et aux médicaments anti-œstrogéniques dans les cellules porteuses d'une mutation TP53. Ce résultat apporte une base biologique aux précédentes observations faisant état d'une interaction entre TP53 et le statut des récepteurs hormonaux (Fernandez et coll., soumis pour publication). En ce qui concerne les cancers du poumon, suite à nos précédentes études sur les corrélations entre les mutations EGFR ou HER2 et les mutations TP53 chez des personnes n'ayant jamais fumé, nous avons caractérisé plus précisément les profils moléculaires et pathologiques particuliers des cancers chez ces personnes n'ayant jamais fumé (Aranda et coll., 2007; Clement-Duchene et coll., 2009; Paris et coll., 2009). Dans le cadre de l'essai IALT (*International Adjuvant Lung Cancer Trial*), la valeur pronostique/prédictive des mutations TP53 a été étudiée chez 783 patients. Les mutations TP53 étaient prédictives de la réponse au traitement, avec un pronostic à tendance nettement positive chez les patients porteurs de TP53 sauvage, et un mauvais pronostic chez ceux porteurs d'une mutation TP53 (P d'une interaction : 0,05) (Ma et coll., soumis pour publication; Stacher et coll., soumis pour publication). En ce qui concerne le can-

cer de l'œsophage, nous avons étudié les profils de mutations TP53 en relation avec l'expression de la NO-synthétase inductible (nitric oxide synthase : NOS2) et l'accumulation de nitrotyrosine, chez des patients souffrant de reflux gastro-œsophagien, d'œsophage de Barrett ou d'adénocarcinome primitif. Nos résultats montrent une corrélation entre les niveaux élevés de marqueurs d'inflammation et les mutations TP53 aux sites CpG (83% contre 11% ; P=0,008), apportant ainsi la preuve d'un lien entre inflammation chronique et cancer de l'œsophage (Vaninetti et coll., 2008). Des études supplémentaires ont permis de découvrir une association entre l'état p53 fonctionnel et l'expression d'un gène original induit par l'interféron, *GBP2*, dans des carcinomes cellulaires épidermoïdes (Duarte et coll., 2009; Guimaraes et coll., 2009). Nous avons également étudié l'effet des acides biliaires sur l'expression des marqueurs de différenciation dans la muqueuse œsophagienne normale. Nous avons observé que ce traitement induisait une dégradation rapide par le protéasome de la p63, protéine indispensable à la formation de l'épithélium épidermoïde. Des études supplémentaires, utilisant la méthode de l'interférence ARN, ont montré que la perte de p63 entraînait un changement important des

profils d'adhérence cellulaire, proposant ainsi un mécanisme moléculaire pour les premières étapes de la métaplasie intestinale en réponse au reflux gastro-œsophagien (Thépot et coll., soumis pour publication).

Concernant le cancer du foie, en collaboration avec Gerd Pfeifer (Duarte, CA), nous avons poursuivi l'étude des mécanismes de la mutagenèse de TP53 par l'aflatoxine (Besaratina et coll., 2009) et analysé la signification de la mutation p.R249S de TP53, dans le plasma de porteurs chroniques du VHB en Egypte, au Nigeria, en Gambie et en Chine (Hosny et coll., 2008; Igetei et coll., 2008; Kuniholm et coll., 2008; Szymanska et coll., 2009). Dans une cohorte chinoise, nous avons découvert que la mutation était détectable avant tout diagnostic de cancer chez un sous-groupe d'individus (Szymanska et coll., 2009). Grâce à l'utilisation de modèles de lignée cellulaire, nous avons montré que l'agent thérapeutique candidat, PRIMA1, pouvait réactiver au moins partiellement la fonction suppressive de p.R249S, suggérant ainsi un mécanisme possible d'intervention chez les patients porteurs de cette mutation (Gouas et coll., 2009; Shi et coll., 2008). En collaboration avec Klas Wiman (Stockholm, Suède), nous avons montré que PRIMA1 agit par le biais d'un

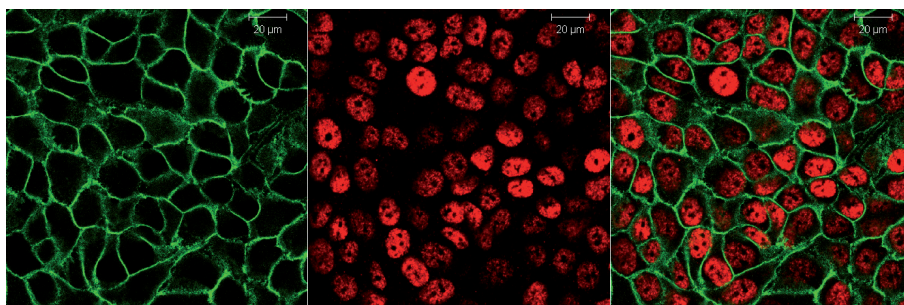


Figure 1. Coloration immunofluorescente de la molécule d'adhérence cellulaire p-Cadhérine (en vert, à gauche), de la protéine de différenciation p63 (en rouge, au centre) et de l'une et l'autre (à droite) dans des cellules de cancer œsophagien humain en culture

mécanisme rédox-dépendant (Bykov et coll., 2009 ; Lambert et coll., 2009). Dans l'ensemble, nos travaux sur le cancer du foie ont contribué à une meilleure compréhension des interactions entre facteurs de risque et infections virales, et pourraient avoir une application utile dans le cadre des interventions de prévention (Pujol et coll., 2009 ; Viviani et coll., 2008 ; Hainaut and Boyle, 2008 ; Pujol et coll., 2009).

MUTATIONS GERMINALES TP53 ET SYNDROME DE LI-FRAUMENI

Le syndrome de Li-Fraumeni est une prédisposition familiale complexe au développement précoce de multiples cancers. Nous avons constaté que ce syndrome était plus fréquent qu'on ne l'avait d'abord estimé (Palmero et coll., sous presse). En collaboration avec Maria Isabel Waddington Achatz (Sao Paulo) et Patricia Ashton Prolla (Porto Alegre, Brésil), nous avons mis sur pied des études concernant des mutations spécifiques héréditaires (germinales) de TP53, dans le sud du Brésil (Palmero et coll., 2008). Ensemble, avec Sean Tavtigian (GCS), Stephano Landi et Raphaela Gemigniani (Pise, Italie), nous avons établi une carte précise des haplotypes de TP53 que nous avons ensuite utilisée pour démontrer l'existence d'une mutation fréquemment observée, p.R337H (Garritano et coll., sous presse). Chez les personnes de 60 ans, la présence de cette mutation est associée à un risque de survenue du cancer au cours de la vie de 70%. Au Brésil, cette mutation serait responsable de 2000 à 3000 cas de cancer annuels, actuellement non identifiés comme étant des cancers familiaux. Ce pourrait être l'occasion d'une détection du risque de cancer par le biais d'un dépistage génétique des nouveau-nés dans cette région (Achatz et coll., 2009). Deux gènes modificateurs ont été identifiés : un polymorphisme déjà connu du promoteur de MDM2 (SNP309) et un polymorphisme intragénique de TP53 dans l'intron 3. Ce dernier module l'âge de survenue du cancer, en moyenne à 20 ans (Marcel et coll., 2009). Des études in vitro ont montré que ce polymorphisme modifiait la structure d'un motif secondaire dans l'ARNm de p53 et régulaient l'épissage alternatif de p53, générant ainsi différents taux d'isoformes de p53. Ces isoformes semblent agir comme des inhibiteurs po-



Figure 2. Rassemblement de membres de familles prédisposés au cancer, montrant fièrement leur arbre généalogique remontant à huit générations



Figure 3. Mutation R337H de TP53 et dépistage chez les enfants

La présence d'une mutation TP53 commune à 0,3% de la population du Sud Brésil a soulevé la question de savoir s'il était approprié de dépister les nouveau-nés porteurs de cette mutation pour mieux détecter les sujets à haut risque de cancer. Les études du CIRC et de ses collaborateurs militent contre cette approche, estimant que l'on ne dispose pas de suffisamment de données pour prédire le risque de cancer sur une vie entière. Un dépistage de masse à la recherche de R337H chez les enfants ne devrait pas être mis en œuvre, bien que cette approche puisse convenir dans le cas de certaines familles, au cas par cas et dans le cadre de stratégies de conseil et de suivi génétique qui prennent en compte la grande diversité des types de tumeurs chez les porteurs de cette mutation

Achatz et coll. 2009 *Lancet Oncology* 2009

tentiels de la fonction p53, suggérant un mécanisme génétique original de régulation de l'activité p53 (Hall et coll., 2009 ; Marcel et Hainaut, 2009).

BASE DE DONNÉES TP53

La base de données TP53 du CIRC (<http://www-p53.iarc.fr/>) est une ressource internet très prisée, entretenue

au CIRC depuis 1994. Elle constitue à la fois un outil de recherche et de formation qui contient des informations et des données relatives aux variations du gène TP53 dans les cancers humains. Elle est destinée à fournir des données et des outils pouvant être utilisés pour caractériser l'impact des mutations TP53 et leurs phénotypes dans les cancers chez l'homme. Les données disponibles et

les annotations englobent la fréquence des mutations *TP53*, leur spectre, leur phénotype et les activités biologiques des protéines mutantes. Les données sont rassemblées à partir d'autres bases de données en ligne et de la littérature soumise à comité de lecture. Ces deux dernières années, plusieurs développements ont été apportés à cette base de données, notamment avec l'addition de nouvelles annotations relatives aux effets prévisibles des mutations sur l'épissage et la production d'isoformes altérées de p53. Nous avons aussi activement promu l'utilisation de normes pour l'annotation des données, en publiant des directives destinées à améliorer le recueil, la diffusion et l'intégration des données relatives aux mutations (Olivier et coll., 2009b). Dans le cadre d'un projet collectif européen FP6 sur les mutants p53 (<http://www.mutp53.com/>), qui a financé la base de données ces cinq dernières années, nous avons organisé une série d'Ateliers de Travail internationaux sur les mutants p53, le plus récent ayant eu lieu en Israël (*4th International workshop on mutant p53*, <http://www-p53.iarc.fr/P53meeting2009/P53meeting2009.html>). Une revue des « récentes avancées de la recherche sur

p53 », s'appuyant sur de nouvelles observations présentées à l'occasion du 3^{ème} Atelier de travail, a fait l'objet d'une publication en 2008 (Olivier et coll., 2009a).

Le Groupe MOC exprime sa reconnaissance aux personnes suivantes pour leur collaboration :

Gerd Pfeifer, Duarte, CA, Etats-Unis ; Isabelle Chemin, Lyon, France ; Laura Beretta, Seattle, WA, Etats-Unis ; Gerard Zalzman, Caen, France ; Jean Charles Soria, Villejuif, France ; Christophe Paris, Nancy, France ; Elisabeth et Christian Brambilla, Grenoble, France ; Philippe Merle, Lyon, France ; Moshe Oren, Rehovot, Israël ; Varda Rotter, Rehovot, Israël ; Claude Caron de Fromentel, Lyon, France ; Maria Isabel Achatz, Sao Paulo, Brésil ; Patricia Ashton Prolla, Porte Allegre, Brésil ; Klas Wiman, Stockholm, Suède ; Alan Casson, Saskatoon, SK, Canada ; Mark Lathrop, Paris, France ; Hany Ariffin, Kuala Lumpur, Malaisie ; Gihan Hosny, Alexandrie, Egypte ; Flor Pujol, Caracas, Venezuela ; Maria Christina Navas, Medellin, Colombie ; Reza Malekzadeh, Téhéran, Iran ; Sandy Dawsey, Bethesda, MD, Etats-Unis ; Richard Cotton, Victoria, Australie

Le Groupe MOC exprime sa reconnaissance aux organismes suivants pour leur contribution financière :

Association for International Cancer Research, RU
Agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales, France
Cancéropôle-CLARA, France
Commission européenne
ECOS-Nord, France
INCA, France
Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité de Saône-et-Loire, France
Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité de Savoie, France
Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité du Rhône, France
Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité de la Drôme, France
National Cancer Institute, Etats-Unis

RÉFÉRENCES ET PUBLICATIONS

- Achatz MI, Hainaut P, Ashton-Prolla P. (2009). Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? *Lancet Oncol.* 10, 920-925.
- Aranda M, Gonzalez-Nilo F, Riadi G, et al. (2007). Loss of TP53-DNA interaction induced by p.C135R in lung cancer. *Oncol. Rep.* 18, 1213-1217.
- Ariffin H, Martel-Planche G, Daud SS, Ibrahim K, Hainaut P (2008). Li-Fraumeni syndrome in a Malaysian kindred. *Cancer Genet. Cytogenet.* 186, 49-53.
- Auxenfans C, Thepot A, Justin V, Hautefeuille A, Shahabeddin L, Damour O and Hainaut P. Characterisation of human fibroblasts as keratinocyte feeder layer using p53 isoforms status. BME, sous presse.
- Bengochea A, de Souza MM, Lefrancois L, et al. (2008). Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 99, 143-150.
- Besaratinia A, Kim SI, Hainaut P, Pfeifer GP (2009). In vitro recapitulating of TP53 mutagenesis in hepatocellular carcinoma associated with dietary aflatoxin B1 exposure. *Gastroenterology* 137, 1127-37, 1137.
- Burns DM, Dybing E, Gray N, et al. (2008). Mandated lowering of toxicants in cigarette smoke: a description of the World Health Organization TobReg proposal. *Tob. Control* 17, 132-141.
- Bykov VJ, Lambert JM, Hainaut P, Wiman KG (2009). Mutant p53 rescue and modulation of p53 redox state. *Cell Cycle* 8, 2509-2517.
- Caboux E, Hainaut P, Gormally E (2008). Biological Resource Centers in Molecular Epidemiology: collecting, storing and analysing bio-specimens. In: *Molecular Epidemiology of Chronic Diseases*, eds. Wild CP, Vineis P, Garte S, John Wiley & Sons Ltd, pp 267-279.
- Chapot B, Secretan B, Robert A, Hainaut P (2009). Exposure to hazardous substances in a standard molecular biology laboratory environment: evaluation of exposures in IARC laboratories. *Ann. Occup. Hyg.* 53, 485-490.
- Clement-Duchene C, Vignaud JM, Stoufflet A, et al. (2009). Characteristics of never smoker lung cancer including environmental and occupational risk factors. *Lung Cancer.*
- Duarte ML, de ME, Pontes E, et al. (2009). Role of p53 in the induction of cyclooxygenase-2 by cisplatin or paclitaxel in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Lett.* 279, 57-64.
- Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Human Mutation*, sous presse
- Gouas D, Shi H, Hainaut P (2009). The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): Biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer Lett.* 286, 29-37.
- Greenblatt MS, Brody LC, Foulkes WD, et al., for the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Locus-specific databases and recommendations to strengthen their contribution to the classification of variants in cancer susceptibility genes. *Hum Mutat.* 2008 Nov;29(11):1273-81.
- Guimaraes DP, Oliveira IM, de ME, et al. (2009). Interferon-inducible guanylate binding protein (GBP)-2: a novel p53-regulated tumor marker in esophageal squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer* 124, 272-279.
- Hainaut P and Boyle P (2008). Curbing the liver cancer epidemic in Africa. *Lancet* 371, 367-368.
- Hainaut P and Wiman KG (2009). 30 years and a long way into p53 research. *Lancet Oncol.* 10, 913-919.
- Hall J, Marcel V, Bolin C, Fernet M, Tartier L, Vassil L and Hainaut P (2009). The associations of sequence variants in DNA-repair and cell-cycle genes with cancer risk: genotype-phenotype correlations. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 527-533.
- Hainaut P, Hollstein M. TP53 as an example of a gene regulated at multiple levels. *J. Pathology*, sous presse.
- Hollstein M and Hainaut P. TP53: a gene regulated at multiple levels. *J. Pathology*, sous presse.
- Hosny G, Farahat N, Tayel H, Hainaut P (2008). Ser-249 TP53 and CTNNB1 mutations in circulating free DNA of Egyptian patients with hepatocellular carcinoma versus chronic liver diseases. *Cancer Lett.* 264, 201-208.
- Hosny G, Farahat N and Hainaut P. (2009) TP53 mutations in circulating free DNA from Egyptian patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Lett.* 275(2); 234-239.
- Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, et al. (2008). A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 452, 633-637.
- Igetei R, Otegbayo JA, Ndububa DA, et al. (2008). Detection of p53 codon 249 mutation in Nigerian patients with hepatocellular carcinoma using a novel evaluation of cell-free DNA. *Ann. Hepatol.* 7, 339-344.
- Kuniholm MH, Lesi OA, Mendy M, et al. (2008). Aflatoxin exposure and viral hepatitis in the etiology of liver cirrhosis in the Gambia, West Africa. *Environ. Health Perspect.* 116, 1553-1557.
- Lambert JM, Gorzov P, Veprintsev DB, et al. (2009). PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell* 15, 376-388.
- Marcel V and Hainaut P (2009). p53 isoforms - a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? *Cell Mol. Life Sci.* 66, 391-406.
- Marcel V, Palmero EI, Falagan-Lotsch P, et al. (2009). TP53PIN3 and MDM2 SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: impact on age at first diagnosis. *J. Med. Genet* 46, 766-772.
- Mendy ME, Kaye S, Le RE, et al. (2008). Application of a novel, rapid, and sensitive oligonucleotide ligation assay for detection of cancer-predicting mutations in the precore and basal core promoter of hepatitis B virus. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2723-2730.
- Nemunaitis J, Clayman G, Agarwala S, et al. Biomarkers Predict p53 Gene Therapy Efficacy in Recurrent, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clinical Cancer Research*, sous presse.
- Ognjanovic S and Hainaut P. Inflammation in carcinogenesis. Invited chapter in *Comprehensive Toxicology*, sous presse.
- Olivier M, Petitjean A, Marcel V, et al. (2009a). Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther.* 16, 1-12.
- Olivier M, Petitjean A, Teague J, et al. (2009b). Somatic mutation databases as tools for molecular epidemiology and molecular pathology of cancer: proposed guidelines for improving data collection, distribution, and integration. *Hum. Mutat.* 30, 275-282.
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences and clinical utility. *CSH Perspectives*, sous presse.

- Palmero EI, Schuler-Faccini L, Caleffi M, et al. (2008). Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett.* 261, 21-25.
- Palmero EI, Waddington Achatz MI, Ashton-Prolla P, Olivier M, Hainaut P. TP53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni Syndrome Current *Opinion in Oncology*, sous presse.
- Paris C, Clement-Duchene C, et al. (2009). Relationships between lung adenocarcinoma and gender, age, smoking and occupational risk factors: A case-case study. *Lung Cancer*.
- Petitjean A, Ruptier C, Tribollet V, et al. (2008). Properties of the six isoforms of p63: p53-like regulation in response to genotoxic stress and cross talk with DeltaNp73. *Carcinogenesis* 29, 273-281.
- Plymouth A, Chemin I, Boffetta P, Hainaut P (2009). Editorial foreword special issue «Hepatocellular Carcinoma - A Worldwide Translational Approach». *Cancer Lett.* 86, 15-21.
- Plymouth A, Viviani S, Hainaut P. Control of hepatocellular carcinoma through hepatitis B vaccination in areas of high endemicity: perspectives for global liver cancer prevention. *Cancer Letters*, sous presse.
- Pujol FH, Navas MC, Hainaut P, Chemin I (2009). Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 286, 80-88.
- Riegman PH, Morente MM, Betsou F, de BP, Geary P (2008). Biobanking for better healthcare. *Mol. Oncol.* 2, 213-222.
- Shi H, Lambert JM, Hautefeuille A, et al. (2008). In vitro and in vivo cytotoxic effects of PRIMA-1 on hepatocellular carcinoma cells expressing mutant p53ser249. *Carcinogenesis* 29, 1428-1434.
- Szymanska K, Chen JG, Cui Y, et al. (2009). TP53 R249S mutations, exposure to aflatoxin, and occurrence of hepatocellular carcinoma in a cohort of chronic hepatitis B virus carriers from Qidong, China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18, 1638-1643.
- Trinchet JC, Alperovitch A, Bedossa P, Degos F, Hainaut P, Beers BV (2009). [Epidemiology, prevention, screening and diagnosis of hepatocellular carcinoma]. *Bull. Cancer* 96, 35-43.
- Vaissiere T, Cuenin C, Paliwal A, et al. (2009a). Quantitative analysis of DNA methylation after whole bisulfite amplification of a minute amount of DNA from body fluids. *Epigenetics.* 4, 221-230.
- Vaissiere T, Hung RJ, Zaridze D, et al. (2009b). Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res.* 69, 243-252.
- Vaninetti NM, Geldenhuys L, Porter GA, et al. (2008). Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and p53 mutations in the molecular pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Mol. Carcinog.* 47, 275-285.
- Veglia F, Loft S, Matullo G, et al. (2008). DNA adducts and cancer risk in prospective studies: a pooled analysis and a meta-analysis. *Carcinogenesis* 29, 932-936.
- Viviani S, Carrieri P, Bah E, et al. (2008). 20 years into the Gambia Hepatitis Intervention Study: assessment of initial hypotheses and prospects for evaluation of protective effectiveness against liver cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17, 3216-3223.
- Zache N, Lambert JM, Rokaeus N, et al. (2008). Mutant p53 targeting by the low molecular weight compound STIMA-1. *Mol. Oncol.* 2, 70-80.
- Zalcman G, Bergot E, Hainaut P (2008). Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations. *N. Engl. J. Med.* 358, 1635-1636.