

Académie d'Orléans –Tours
Université François-Rabelais

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2013

N°

MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

conformément à l'arrêté du 10 Septembre 1990, tient lieu de

THÈSE pour le DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Par

Charline CAUMONT
Née le 6 Août 1984, à Villeneuve sur Lot (47)

Présentée et soutenue publiquement le 3 Mai 2013

**CARACTÉRISATION DE NOUVEAUX MARQUEURS MOLÉCULAIRES DES TUMEURS
COLORECTALES : ÉTUDE DE LA RELATION ENTRE INFILTRATION LYMPHOCYTAIRE
INTRATUMORALE, RÉTROVIRUS ENDOGÈNES, DÉLÉTION DANS LE LOCUS APOBEC3,
ET CARACTÉRISTIQUES MSI, CIN ET CIMP POUR UNE COHORTE DE 135 TUMEURS**

Jury

Président de Jury : Professeur Serge GUYÉTANT, PU-PH, UFR Médecine, Université de Tours

Directeur de Thèse : Professeur Jean-Christophe PAGÈS, PU-PH, UFR Médecine, Université de Tours

Membres du Jury : Professeur Stéphane CHEVALIER, PU-PH, UFR Pharmacie, Université de Tours
Professeur Thierry LECOMTE, PU-PH, UFR Médecine, Université de Tours
Madame Christine COLLIN, Ingénieur, CHRU Tours

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Professeur Dominique PERROTIN

VICE-DOYEN

Professeur Daniel ALISON

ASSESEURS

Professeur Daniel ALISON, Moyens
Professeur Christian ANDRES, Recherche
Professeur Christian BINET, Formation Médicale Continue
Professeur Laurent BRUNEREAU, Pédagogie
Professeur Patrice DIOT, Recherche clinique

SECRETAIRE GENERALE

Madame Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Professeur Georges DESBUQUOIS (†) - 1966-1972
Professeur André GOUAZÉ - 1972-1994
Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET
Professeur Jean-Claude BESNARD
Professeur Patrick CHOUTET
Professeur Guy GINIES
Professeur Olivier LE FLOCH
Professeur Chantal MAURAGE
Professeur Léandre POURCELOT
Professeur Michel ROBERT
Professeur Jean-Claude ROLLAND

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Ph. ANTHONIOZ - A. AUDURIER – Ph. BAGROS - G. BALLON – P.BARDOS - J. BARSOTTI
A. BENATRE - Ch. BERGER –J. BRIZON - Mme M. BROCHIER - Ph. BURDIN - L. CASTELLANI
J.P. FAUCHIER - B. GRENIER – M. JAN –P. JOBARD - J.-P. LAMAGNERE - F. LAMISSE – J. LANSAC
J. LAUGIER - G. LELORD - G. LEROY - Y. LHUINTE - M. MAILLET - Mlle C. MERCIER - E/H. METMAN
J. MOLINE - Cl. MORAINÉ - H. MOURAY - J.P. MUH - J. MURAT - Mme T. PLANIOL - Ph. RAYNAUD
Ch. ROSSAZZA - Ph. ROULEAU - A. SAINDELLE - J.J. SANTINI - D. SAUVAGE - M.J. THARANNE
J. THOUVENOT - B. TOUMIEUX - J. WEILL.

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | | |
|-----|--------------------------------|--|
| MM. | ALISON Daniel | Radiologie et Imagerie médicale |
| | ANDRES Christian | Biochimie et Biologie moléculaire |
| | ANGOULVANT Denis | Cardiologie |
| | ARBEILLE Philippe | Biophysique et Médecine nucléaire |
| | AUPART Michel | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire |
| | BABUTY Dominique | Cardiologie |
| Mme | BARILLOT Isabelle | Cancérologie ; Radiothérapie |
| M. | BARON Christophe | Immunologie |
| Mme | BARTHELEMY Catherine | Pédopsychiatrie |
| MM. | BAULIEU Jean-Louis | Biophysique et Médecine nucléaire |
| | BERNARD Louis | Maladies infectieuses ; maladies tropicales |
| | BEUTTER Patrice | Oto-Rhino-Laryngologie |
| | BINET Christian | Hématologie ; Transfusion |
| | BODY Gilles | Gynécologie et Obstétrique |
| | BONNARD Christian | Chirurgie infantile |
| | BONNET Pierre | Physiologie |
| Mme | BONNET-BRILHAULT Frédérique | Physiologie |
| MM. | BOUGNOUX Philippe | Cancérologie ; Radiothérapie |
| | BRILHAULT Jean | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| | BRUNEREAU Laurent | Radiologie et Imagerie médicale |
| | BRUYERE Franck | Urologie |
| | BUCHLER Matthias | Néphrologie |
| | CALAIS Gilles | Cancérologie ; Radiothérapie |
| | CAMUS Vincent | Psychiatrie d'adultes |
| | CHANDENIER Jacques | Parasitologie et Mycologie |
| | CHANTEPIE Alain | Pédiatrie |
| | COLOMBAT Philippe | Hématologie ; Transfusion |
| | CONSTANS Thierry | Médecine interne ; Gériatrie et Biologie du vieillissement |
| | CORCIA Philippe | Neurologie |
| | COSNAY Pierre | Cardiologie |
| | COTTIER Jean-Philippe | Radiologie et Imagerie médicale |
| | COUET Charles | Nutrition |
| | DANQUECHIN DORVAL Etienne | Gastroentérologie ; Hépatologie |
| | DE LA LANDE DE CALAN Loïc | Chirurgie digestive |
| | DE TOFFOL Bertrand | Neurologie |
| | DEQUIN Pierre-François | Thérapeutique ; médecine d'urgence |
| | DESTRIEUX Christophe | Anatomie |
| | DIOT Patrice | Pneumologie |
| | DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague | Anatomie & Cytologie pathologiques |
| | DUMONT Pascal | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire |
| | FAUCHIER Laurent | Cardiologie |
| | FAVARD Luc | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| | FOUQUET Bernard | Médecine physique et de Réadaptation |
| | FRANCOIS Patrick | Neurochirurgie |
| | FUSCIARDI Jacques | Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence |
| | GAILLARD Philippe | Psychiatrie d'Adultes |
| | GOGA Dominique | Chirurgie maxillo-faciale et Stomatologie |
| | GOUDEAU Alain | Bactériologie -Virologie ; Hygiène hospitalière |
| | GOUPILLE Philippe | Rhumatologie |
| | GRUEL Yves | Hématologie ; Transfusion |
| | GUILMOT Jean-Louis | Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire |
| | GUYETANT Serge | Anatomie et Cytologie pathologiques |
| | HAILLOT Olivier | Urologie |
| | HALIMI Jean-Michel | Thérapeutique ; médecine d'urgence (Néphrologie et Immunologie clinique) |
| | HERAULT Olivier | Hématologie ; transfusion |
| | HERBRETEAU Denis | Radiologie et Imagerie médicale |
| Mme | HOMET Caroline | Médecine interne, Gériatrie et Biologie du vieillissement |
| MM. | HUTEN Noël | Chirurgie générale |
| | LABARTHE François | Pédiatrie |
| | LAFFON Marc | Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence |
| | LARDY Hubert | Chirurgie infantile |
| | LASFARGUES Gérard | Médecine et Santé au Travail |
| | LEBRANCHU Yvon | Immunologie |

| | | |
|-----|-------------------------|---|
| | LECOMTE Thierry | Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie |
| | LEMARIE Etienne | Pneumologie |
| | LESCANNE Emmanuel | Oto-Rhino-Laryngologie |
| | LINASSIER Claude | Cancérologie ; Radiothérapie |
| | LORETTE Gérard | Dermato-Vénérologie |
| | MACHET Laurent | Dermato-Vénérologie |
| | MAILLOT François | Médecine Interne |
| | MARCHAND Michel | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire |
| | MARCHAND-ADAM Sylvain | Pneumologie |
| | MARRET Henri | Gynécologie et Obstétrique |
| | MEREGHETTI Laurent | Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière |
| | MORINIERE Sylvain | O.R.L. |
| | MULLEMAN Denis | Rhumatologie |
| | PAGES Jean-Christophe | Biochimie et biologie moléculaire |
| | PAINTAUD Gilles | Pharmacologie fondamentale, Pharmacologie clinique |
| | PATAT Frédéric | Biophysique et Médecine nucléaire |
| | PERROTIN Dominique | Réanimation médicale ; médecine d'urgence |
| | PERROTIN Franck | Gynécologie et Obstétrique |
| | PISELLA Pierre-Jean | Ophthalmologie |
| | QUENTIN Roland | Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière |
| | ROBIER Alain | Oto-Rhino-Laryngologie |
| | ROINGEARD Philippe | Biologie cellulaire |
| | ROSSET Philippe | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| | ROYERE Dominique | Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction |
| | RUSCH Emmanuel | Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention |
| | SALAME Ephrem | Chirurgie digestive |
| | SALIBA Elie | Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction |
| Mme | SANTIAGO-RIBEIRO Maria | Biophysique et Médecine Nucléaire |
| MM. | SIRINELLI Dominique | Radiologie et Imagerie médicale |
| | THOMAS-CASTELNAU Pierre | Pédiatrie |
| Mme | TOUTAIN Annick | Génétique |
| MM. | VAILLANT Loïc | Dermato-Vénérologie |
| | VELUT Stéphane | Anatomie |
| | WATIER Hervé | Immunologie. |

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie Médecine Générale

PROFESSEURS ASSOCIES

MM. HUAS Dominique Médecine Générale
LEBEAU Jean-Pierre Médecine Générale
MALLET Donatien Soins palliatifs
POTIER Alain Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mmes ANGOULVANT Theodora Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique : addictologie
BAULIEU Françoise Biophysique et Médecine nucléaire
M. BERTRAND Philippe Biostatistiques, Informatique médical et Technologies de Communication
Mme BLANCHARD Emmanuelle Biologie cellulaire
BLASCO Hélène Biochimie et biologie moléculaire
MM. BOISSINOT Eric Physiologie
DESOUBEAUX Guillaume Parasitologie et mycologie
Mme DUFOUR Diane Biophysique et Médecine nucléaire
M. EHRMANN Stephan Réanimation médicale
Mmes FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie Anatomie et Cytologie pathologiques
GAUDY-GRAFFIN Catherine Bactériologie - Virologie ; Hygiène hospitalière
M. GIRAUDEAU Bruno Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication
Mme GOUILLEUX Valérie Immunologie
MM. GUERIF Fabrice Biologie et Médecine du développement et de la reproduction

| | | |
|------|-------------------------------|---|
| | GYAN Emmanuel | Hématologie, transfusion |
| | HOARAU Cyrille | Immunologie |
| | HOURIOUX Christophe | Biologie cellulaire |
| Mmes | LARTIGUE Marie-Frédérique | Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière |
| | LE GUELLEC Chantal | Pharmacologie fondamentale ; Pharmacologie clinique |
| | MACHET Marie-Christine | Anatomie et Cytologie pathologiques |
| | MARUANI Annabel | Dermatologie |
| MM. | PIVER Eric | Biochimie et biologie moléculaire |
| | ROUMY Jérôme | Biophysique et médecine nucléaire in vitro |
| Mme | SAINT-MARTIN Pauline | Médecine légale et Droit de la santé |
| M. | TERNANT David | Pharmacologie – toxicologie |
| Mme | VALENTIN-DOMELIER Anne-Sophie | Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière |
| M. | VOURC'H Patrick | Biochimie et Biologie moléculaire |

MAITRES DE CONFERENCES

| | | |
|------|-----------------|-----------------------------------|
| Mmes | BOIRON Michèle | Sciences du Médicament |
| | ESNARD Annick | Biologie cellulaire |
| M. | LEMOINE Maël | Philosophie |
| Mme | MONJAUZE Cécile | Sciences du langage - Orthophonie |
| M. | PATIENT Romuald | Biologie cellulaire |

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

| | | |
|------|-----------------------|-------------------|
| Mmes | HUAS Caroline | Médecine Générale |
| | RENOUX-JACQUET Cécile | Médecine Générale |
| M. | ROBERT Jean | Médecine Générale |

CHERCHEURS C.N.R.S. – INSERM

| | | |
|------|-----------------------|---|
| MM. | BIGOT Yves | Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239 |
| | BOUAKAZ Ayache | Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930 |
| Mmes | BRUNEAU Nicole | Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930 |
| | CHALON Sylvie | Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930 |
| MM. | COURTY Yves | Chargé de Recherche CNRS – U 618 |
| | GAUDRAY Patrick | Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239 |
| | GOUILLEUX Fabrice | Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239 |
| Mmes | GOMOT Marie | Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930 |
| | HEUZE-VOURCH Nathalie | Chargée de Recherche INSERM – U 618 |
| MM. | LAUMONNIER Frédéric | Chargé de Recherche INSERM - UMR CNRS-INSERM 930 |
| | LE PAPE Alain | Directeur de Recherche CNRS – U 618 |
| Mmes | MARTINEAU Joëlle | Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930 |
| | POULIN Ghislaine | Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS-INSERM 930 |

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

| | | |
|-----|------------------|-----------------------|
| Mme | DELORE Claire | Orthophoniste |
| MM. | GOUIN Jean-Marie | Praticien Hospitalier |
| | MONDON Karl | Praticien Hospitalier |
| Mme | PERRIER Danièle | Orthophoniste |

Pour l'Ecole d'Orthoptie

| | | |
|-----|-----------------|-----------------------|
| Mme | LALA Emmanuelle | Praticien Hospitalier |
| M. | MAJZOUB Samuel | Praticien Hospitalier |

Pour l'Ethique Médicale

| | | |
|-----|------------------|-----------------------|
| Mme | BIRMELE Béatrice | Praticien Hospitalier |
|-----|------------------|-----------------------|

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Christophe PAGES,

Vous m'avez accueilli dans votre service lors de mon premier stage d'interne. Vous m'avez fait confiance tout au long de mon internat. Vous m'avez proposé ce sujet et vous avez dirigé ce travail. Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité, votre bonne humeur, et votre simplicité. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Serge GUYETANT,

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Stéphane CHEVALIER,

Vous avez accepté de juger ce travail. Veuillez recevoir mes remerciements respectueux.

A Monsieur le Professeur Thierry LECOMTE,

Vous avez accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

A Madame Christine COLLIN,

Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Merci d'avoir été disponible pendant mes stages, de m'avoir initiée à la biologie moléculaire. Je te remercie de m'avoir guidée dans la réalisation de ce travail.

A Madame Elsa TAVERNIER,

Merci pour votre disponibilité et votre aide précieuse à la réalisation et à la compréhension des statistiques de ce travail.

J'aimerais dédier ce travail,

A mon arrière grand-mère, Mamie de Ladhuie, qui m'a toujours soutenue et encouragée pendant mes études, et qui aurait été fière de cet aboutissement.

A ma grand-mère Simone, qui nous a quitté trop tôt.

A mes grands-parents, merci Bonne Maman pour toutes ces réunions de famille sans qui elles n'existeraient pas, pour toutes tes anecdotes, tes conseils (même si je ne les approuve pas toujours !). Merci Bon Papa pour ta patience et ton enseignement de l'équitation. Tu as passé de longues heures par tous les temps à essayer de me transmettre ton savoir. J'ai essayé de suivre tes conseils et de les appliquer à la lettre, mais je ne suis pas parvenue à être au top niveau ! T'inquiètes pas, nous allons d'ici quelques mois pouvoir reprendre ces séances d'équitation.

A mes parents, merci de m'avoir accompagné toutes ces années d'études, et de m'avoir soutenu. Merci également pour tout le bonheur que vous m'avez donné. Si cet instant peut contribuer au votre, ce sera ma plus grande récompense.

A ma sœur Fannie, j'espère qu'un jour tu auras le déclic que tout le monde attend pour que tu puisses enfin mener la vie que tu mérites.

A Gautier, avec tout mon amour. Merci de m'avoir soutenue et encouragée. A nos années prometteuses, pleines de projets et d'ambition.

A toute ma famille.

A Laurence, pour ton soutien pendant toutes ces années de fac. A toutes ces soirées passées au téléphone à s'encourager et à se reconforter mutuellement. Je suis la première à passer ma thèse, j'attends avec impatience la tienne.

A Elodie, merci pour tous ces bons moments passés à Toulouse. Tu es quelqu'un de formidable et une battante. Je suis sûre qu'une brillante carrière t'attend. Merci pour ton aide à la rédaction de cette thèse.

A Aurélie, ma « deuxième sœur », à tous nos souvenirs d'enfance. Bientôt de retour dans le Sud-Ouest, j'espère qu'on se verra plus souvent maintenant.

A mon parrain Didier et sa femme Marie, perdus de vue pendant de nombreuses années, qui me font le plaisir d'être là. Il est temps de rattraper le temps perdu.

A tous les internes, Armand et Gwendoline, Charlotte, Raphaël, Clément L, Clément H, Bénédicte, Stéphanie, Kévin et Axelle, aux jeunes chefs et docteurs Hélène, Sylvie, Marlène, Estelle, Ségolène, Guillaume, Jean, Sébastien, pour tous ces bons moments passés ensemble pendant ces quatre années d'internat à Tours.

Caractérisation de nouveaux marqueurs moléculaires des tumeurs colorectales : étude de la relation entre infiltration lymphocytaire intra-tumorale, rétrovirus endogènes, délétion dans le locus APOBEC3, et caractéristiques MSI, CIN et CIMP pour une cohorte de 135 tumeurs.

Résumé :

Le cancer colorectal (CCR) est la troisième cause de cancer dans le monde. La compréhension des voies de transformation a débuté dans les années 90, conduisant à un premier modèle de carcinogénèse proposé par Vogelstein et Fearon. Par la suite, plusieurs autres types de CCR ont été décrits dans la littérature, ils étaient basés sur les « phénotypes moléculaires » d'instabilité chromosomique (CIN) (tumeurs caractérisées par la présence d'anomalies chromosomiques) et d'instabilité des microsatellites (MSI) (tumeurs caractérisées par un déficit en système de réparation de type MMR). Ces deux voies tendent à différer par des mutations spécifiques et par des caractéristiques clinico-pathologiques. Un troisième phénotype a été plus récemment décrit : le phénotype CIMP, caractérisé par la méthylation de plusieurs promoteurs, il contient pour une part le phénotype MSI, en cas de méthylation du promoteur du gène MLH1. Une meilleure compréhension des voies moléculaires de transformation et d'évolution des cellules tumorales contribuerait à l'amélioration des stratégies de prévention, de dépistage, de diagnostic, et de traitement des CCR.

Dans cette étude, nous avons analysé 135 tumeurs colorectales de patients pris en charge au CHRU de Tours entre 2007 et 2008. Nous avons étudié six altérations génétiques somatiques, un marqueur qui pourrait signer une réactivation de rétrovirus endogènes, une délétion dans le locus APOBEC3 et l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale. Nous avons effectué une analyse statistique par analyse des correspondances multiples et une classification hiérarchique ascendante afin de mettre en évidence une relation entre les anomalies moléculaires étudiées et l'infiltration lymphocytaire.

Mots clés : carcinogénèse colorectale, cancer colorectal, MSI, CIN, CIMP, rétrovirus endogènes, HERVH, délétion dans le locus APOBEC3, infiltration lymphocytaire intra-tumorale

Characterization of new molecular markers of colorectal tumours : a study of the relationship between intratumoral lymphocytic infiltration, endogenous retroviruses, deletion in the locus APOBEC3 and features MSI, CIN and CIMP in a cohort of 135 tumours.

Abstract :

Colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer in the world. Understanding the pathways of transformation began in the 90s, leading to a first model of carcinogenesis proposed by Vogelstein and Fearon. Subsequently, several other types of CRC have been described in the literature that were based on "molecular genotypes and phenotypes" of chromosomal instability (CIN) (tumours characterized by the presence of chromosomal abnormalities) and microsatellite instability (MSI) (tumours characterized by mismatch repair deficiency). These two pathways tend to differ by specific mutations and clinicopathological characteristics. A third phenotype was recently described : the CIMP phenotype, characterized by methylation of multiple promoters. The CIMP tends to partly overlap the MSI phenotype due to the methylation of MLH1 gene promoter. A better understanding of the molecular pathways of transformation and evolution of tumour cells would contribute to improving prevention strategies, screening, diagnosis, and treatment of CRC. In this study, we analyzed 135 colorectal tumours from patients treated at the University Hospital of Tours between 2007 and 2008. We studied six somatic genetic alterations, a tag that would sign a reactivation of endogenous retrovirus, a deletion in the locus Apobec3 and intra-tumoral lymphocytic infiltration. We performed a statistical analysis by multiple correspondence analysis and hierarchical cluster analysis to highlight the relationship between the molecular defects studied and lymphocytic infiltration.

Keywords : colorectal carcinogenesis, colorectal cancer, , endogenous retroviruses, HERVH, MSI, CIN, CIMP, deletion in the locus APOBEC3, intratumoral lymphocytic infiltration.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| 1. Introduction | 10 |
| 2. Données épidémiologiques du cancer colorectal | 12 |
| 2.1. Dans le monde | 12 |
| 2.2. En France (d'après l'institut national du cancer) | 13 |
| 2.3. Dépistage | 14 |
| 2.4. Facteurs de risque environnementaux et comportementaux | 15 |
| 3. Données anatomo-pathologiques et endoscopiques du cancer colorectal | 16 |
| 3.1. Foyers de cryptes aberrantes (FCA) | 17 |
| 3.2. Adénome | 17 |
| 3.3. Adénocarcinome in-situ | 18 |
| 3.4. Adénocarcinome infiltrant | 18 |
| 3.5. Classification TNM 2009 | 18 |
| 4. Histoire naturelle du cancer colorectal sur le plan moléculaire | 20 |
| 4.1. Les voies moléculaires impliquées dans la carcinogénèse colique | 23 |
| 4.1.1. Voie Wnt/APC/ β -caténine | 23 |
| 4.1.2. Voie Ras/MAPKinases | 25 |
| 4.1.3. Voie 18q deletion/SMAD/TGF- β signalling | 27 |
| 4.1.4. Gène suppresseur de tumeur p53 | 27 |
| 4.2. Génétique et cancer colorectal | 29 |
| 4.2.1. Instabilités chromosomiques (CIN ou chromosomal instability) | 30 |
| 4.2.2. Instabilité des microsatellites (MSI) | 31 |
| 4.2.3. Hyperméthylation | 34 |
| 4.3. Modèles de carcinogénèse | 37 |
| 4.3.1. Modèle de Vogelstein | 37 |
| 4.3.2. Modèle d'Ogino | 39 |
| 4.4. Prédispositions héréditaires au cancer colorectal | 43 |
| 4.4.1. HNPCC (Human Non-Polyposis Colorectal Cancer) | 44 |
| 4.4.2. Les polyposes | 45 |
| 4.4.2.1. Polyadénomatoase familiale | 45 |
| 4.4.2.2. Polyposes hamartomateuses | 47 |
| 4.4.2.3. Polyposes hyperplasiques et festonnées | 48 |
| 4.5. Infiltration lymphocytaire intra-tumorale | 50 |
| 4.6. HLA-G | 53 |
| 4.7. c-MET | 56 |
| 5. Thérapeutique et prise en charge du cancer colorectal | 57 |
| 5.1. Critères d'opérabilité et de résecabilité | 57 |
| 5.2. Traitement chirurgical | 57 |
| 5.3. Traitement endoscopique | 57 |
| 5.4. Chimiothérapie | 58 |
| 5.5. Anticorps monoclonaux | 58 |
| 5.6. Traitement selon le stade clinique | 58 |
| 5.7. Surveillance | 59 |
| 5.8. Survie | 60 |
| 6. Objectifs de notre travail | 61 |
| 7. Matériels et méthodes | 66 |
| 7.1. Patients | 66 |

| | |
|---|------------|
| 7.2. Biologie moléculaire | 67 |
| 7.2.1. Extraction de l'ADN | 67 |
| 7.2.2. Conversion | 67 |
| 7.2.3. Instabilité des microsatellites..... | 68 |
| 7.2.4. High Resolution Melting (HRM)..... | 70 |
| 7.2.5. Séquençage | 73 |
| 7.2.6. PCR quantitative | 74 |
| 7.2.7. Pyroséquençage | 76 |
| 7.3. Anato-mo-pathologie..... | 79 |
| 7.3.1. Sélection des blocs..... | 79 |
| 7.3.2. Immunohistochimie | 79 |
| 7.3.3. Quantification lymphocytaire | 80 |
| 7.4. Analyses statistiques..... | 80 |
| 7.4.1. Analyse des Correspondances Multiples (ACM)..... | 80 |
| 7.4.2. Classification Ascendante Hiérarchique..... | 81 |
| 7.4.3. Analyses statistiques complémentaires pour les variables CD3, CD8 et CD45RO.... | 81 |
| 8. Résultats | 83 |
| 8.1. Analyse des Correspondances Multiples (ACM) | 83 |
| 8.2. Classification Ascendante Hiérarchique | 85 |
| 8.3. Infiltration lymphocytaire intra-tumorale..... | 90 |
| 8.4. Analyse des principales altérations moléculaires | 100 |
| 8.4.1. KRAS | 101 |
| 8.4.2. Statut MSI et BRAF..... | 101 |
| 8.4.3. MSI-CIMP et méthylation LINE-1 | 102 |
| 8.4.4. Analyse des relations entre infiltrat lymphocytaire et les autres marqueurs moléculaires..... | 103 |
| 8.4.5. HLA-G | 104 |
| 8.4.6. Etude de la corrélation entre le statut c-MET et les tumeurs M1..... | 105 |
| 9. Discussion | 108 |

Index des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Taux d'incidence du cancer colorectal selon le sexe et les pays (d'après : GLOBOCAN 2008)..... | 12 |
| Figure 2 : Taux d'incidence standardisés à la population mondiale (TSM) d'incidence du CCR à l'échelle régionale en 2005 en France métropolitaine..... | 13 |
| Figure 3 : Séquence adénome-carcinome..... | 16 |
| Figure 4 : Stades tumoraux T de la classification pTNM. Extension de l'adénocarcinome à travers les différentes tuniques de la paroi colique..... | 19 |
| Figure 5 : Les six propriétés fondamentales de la cellule tumorale (Jass, 2007)..... | 21 |
| Figure 6 : Dégradation de la β -caténine par le protéasome (Matsuzawa et Reed, 2001).24 | |
| Figure 7 : Les protéines Ras, des interrupteurs biologiques..... | 25 |
| Figure 8 : Cinq domaines de la protéine p53 (d'après www.p53.free.fr); chacun ayant une fonction spécifique..... | 28 |
| Figure 9 : Schéma général des voies de pathogénicité dans le CCR. | 29 |
| Figure 10 : Répartition des CCR selon qu'ils soient sporadiques, secondaires à des pathologies inflammatoires, ou génétiques..... | 30 |
| Figure 11 : Inactivation du système de réparation des erreurs de réplication de l'ADN et ses conséquences..... | 32 |
| Figure 12 : Modèle d'ADN MMR et voies moléculaires de pathogénicité pour les CCR MSI-H..... | 33 |
| Figure 13 : Algorithme des anomalies moléculaires dans les CCR (Jass, 2007)..... | 36 |
| Figure 14 : Les mécanismes moléculaires impliqués dans le modèle de carcinogénèse de Vogelstein. | 38 |
| Figure 15 : Evènements moléculaires survenant dans le CCR..... | 39 |
| Figure 16 : Modèle de transformation de Vogelstein à Ogino..... | 40 |
| Figure 18 : Dérivation des groupes moléculaires de CCR 1 à 5, basés sur le phénotype CIMP (statuts H : High, L : Low, Neg : Negative) et sur le phénotype MSI (H : High, L : Low, S : Stable)..... | 42 |

| | |
|---|----|
| Figure 20 : Altérations génétiques et épigénétiques des CCR MSI. | 44 |
| Figure 21 : Critères d'Amsterdam II (1999). | 44 |
| Figure 22 : Critères diagnostiques de la PAF. | 46 |
| Figure 23 : Base moléculaire de la PAF associée au gène APC. | 46 |
| Figure 24 : Risque de transformation des polypes en adénocarcinome selon qu'il s'agisse de tumeur sporadique ou héréditaires (Kinzler and Vogelstein, 1998). | 50 |
| Figure 25 : Classification TNM (à gauche). | 51 |
| Figure 26 : Les marqueurs de différenciation ou « clusters of differentiation » des lymphocytes T. | 52 |
| Figure 27 : Courbes de Kaplan-Meier de survie globale et de survie sans événement ayant des tumeurs en fonction de la densité de cellules CD45RO+. | 53 |
| Figure 28 : Mécanismes potentiels de la suppression immune causée par les cellules tumorales. | 54 |
| Figure 29 : Représentations schématiques des principales fonctions de la molécule HLA-G. | 54 |
| Figure 30 : Représentation schématique des hypothèses et objectifs de notre étude. | 65 |
| Figure 31 : Exemple d'analyse des microsatellites d'une tumeur stable. | 69 |
| Figure 32 : Exemple d'analyse des microsatellites d'une tumeur instable. | 70 |
| Figure 33 : Exemple de courbes obtenues, en HRM, pour la recherche de la méthylation de MLH1. | 72 |
| Figure 34 : Exemple de courbes de fusion (figure A) et de courbes de <i>difference plot</i> obtenues en HRM pour la recherche de la mutation BRAF V600E. | 72 |
| Figure 35 : Exemples de séquençage de la mutation BRAF V600E avec un échantillon non muté (figure A) et un échantillon muté (figure B). | 74 |
| Figure 36 : Exemple de rapports d'amplification obtenus pour un ADN de tissu sain et de tissu tumoral pour une délétion APOBEC (figure B). | 76 |
| Figure 37 : PyroMark Q24 (Quiagen) | 77 |
| Figure 38 : Exemples d'histogramme de pyroséquençage LINE de tissu sain (figure A) et de tissu tumoral (figure B) méthylés. | 77 |

| | |
|--|-----|
| Figure 39 : Exemples d’histogramme de pyroséquençage LINE de tissu sain (figure A) méthylé et de tissu tumoral (figure B) déméthylé..... | 78 |
| Figure 40 : Exemples d’histogramme de pyroséquençage MLH1 de tissu sain (figure A) et de tissu tumoral (figure B) méthylés..... | 79 |
| Figure 41 : Influence des variables sur les deux premiers axes..... | 84 |
| Figure 42 : Dendogramme..... | 86 |
| Figure 43 : Adénocarcinomes avec un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral élevé CD3 (figure A), CD8 (figure B), et CD45RO (figure C). Adénocarcinome avec absence d’infiltrat lymphocytaire intra-tumoral (figure D). | 91 |
| Figure 44 : Résultats détaillés de l’étude immuno-histochimique : évaluation de l’importance de l’infiltration lymphocytaire intra-tumorale selon les 3 classes définies..... | 92 |
| Figure 45 : Nombre de tumeurs présentant un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral (élevé ou modéré) pour un, deux, ou trois des marqueurs T utilisés..... | 93 |
| Figure 46 : Fréquence de la mutation KRAS..... | 101 |
| Figure 47 : Distribution du niveau de méthylation des séquences LINE-1 au sein de la cohorte de 135 tumeurs colorectales..... | 102 |
| Figure 48 : Fréquence des sous-types de CCR selon le niveau de méthylation LINE-1.. | 103 |
| Figure 49 : Répartition des génotypes HLA-G. | 104 |
| Figure 50 : Relations mises en évidence dans notre étude, entre CIMP, MSI, BRAF, caractéristiques clinico-pathologiques, et infiltration lymphocytaire intra-tumorale | 113 |
| Figure 51 : Amplification..... | 119 |
| Figure 52 : Formation d’hétéroduplex, courbes de fusion..... | 119 |
| Figure 53 : Analyse des courbes de fusion..... | 120 |

Index des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Définition des risques de développer un cancer colorectal..... | 14 |
| Tableau 2 : Classification pTNM (2009) du cancer colorectal et correspondance clinique | 19 |
| Tableau 3 : Exemples d'anomalies génétiques et épigénétiques observées au cours de la progression tumorale du CCR, et permettant aux cellules d'acquérir les six propriétés fondamentales de la cellule tumorale..... | 21 |
| Tableau 4 : Deux types de CCR. | 34 |
| Tableau 5 : Caractéristiques des tumeurs CIMP | 35 |
| Tableau 6 : Classification des CCR en six groupes d'après Ogino, en fonction des statuts MSI et CIMP..... | 42 |
| Tableau 7 : Caractéristiques moléculaires, cliniques et anatomopathologiques des 5 groupes de CCR..... | 43 |
| Tableau 8 : Caractéristiques de l'HNPCC..... | 45 |
| Tableau 9 : Caractéristiques de la PAF..... | 47 |
| Tableau 10 : Récapitulatif des caractéristiques des polyposes avec prédisposition héréditaire..... | 49 |
| Tableau 11 : Caractéristiques clinico-pathologiques de la population étudiée. | 66 |
| Tableau 12 : Primers utilisés pour la recherche de l'instabilité des microsatellites. | 68 |
| Tableau 13 : Primers utilisés pour l'étude du microsatellite du promoteur du gène c-Met. | 70 |
| Tableau 14 : Primers utilisés pour la technique d'HRM..... | 71 |
| Tableau 15 : Primers utilisés pour le séquençage..... | 73 |
| Tableau 16 : Primers utilisés pour la PCR quantitative..... | 75 |
| Tableau 17 : Description des classes | 87 |
| Tableau 18 : Modalités pour la classe 1 de la classification hiérarchique ascendante. | 89 |
| Tableau 19 : Modalités pour la classe 2 de la classification hiérarchique ascendante. | 90 |

| | |
|--|-----|
| Tableau 20 : Résultats détaillés de l'étude immuno-histochimique : évaluation de l'importance de l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale selon les 3 classes définies..... | 91 |
| Tableau 21 : Nombre de tumeurs présentant un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral (élevé ou modéré) pour un, deux, ou trois des marqueurs T utilisés..... | 92 |
| Tableau 22 : Recoupement dans les deux classes (définies par la CHA) entre les variables CD3 et CD8..... | 93 |
| Tableau 23 : Résumé des données anatomocliniques et moléculaires en fonction de l'importance de l'infiltration tumorale par des lymphocytes CD3+ | 95 |
| Tableau 24 : Résumé des données anatomocliniques et moléculaires en fonction de l'importance de l'infiltration tumorale par des lymphocytes CD8+ | 97 |
| Tableau 25 : Résumé des données anatomocliniques et moléculaires en fonction de l'importance de l'infiltration tumorale par des lymphocytes CD45RO+..... | 99 |
| Tableau 26 : Fréquence globale des altérations moléculaires analysées. | 100 |
| Tableau 27 : Spectre des différentes mutations KRAS retrouvées dans notre population. | 101 |
| Tableau 28 : Recoupement dans les deux classes (définies par la CHA) entre le statut MSI et la mutation BRAF..... | 102 |
| Tableau 29 : Résultats des analyses moléculaires en fonction de l'importance de l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale pour CD3, CD8 et CD45RO..... | 103 |
| Tableau 30 : Résultats du calcul de la fréquence allélique d'une population coréenne (99 patients) d'après l'équilibre de Hardy-Weinberg..... | 104 |
| Tableau 31 : Résultats du calcul de la fréquence allélique d'une population coréenne (135 patients) d'après l'équilibre de Hardy-Weinberg..... | 105 |
| Tableau 32 : Association entre infiltration lymphocytaire intra-tumorale CD8+ et HLA-G. | 105 |
| Tableau 33 : Nombre de tumeurs M1 en fonction de la taille du polymorphisme C-Met. | 106 |
| Tableau 34 : Code selon lequel la variable TNM a été binarisée..... | 107 |
| Tableau 35 : Recoupement dans les deux classes (définies par la CHA) entre les variables TNM binaire et le polymorphisme C-Met..... | 107 |

Abréviations

ACE : antigène carcino-embryonnaire

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

APC : *Adenomatous Polyposis Coli*

APOBEC : *Apolipoprotein B-ARNm Editing enzyme Catalytic*

CCR : cancer colorectal

CHA : classification hiérarchique ascendante

CIMP : *CpG island methylator promoter*

CIN : *chromosomal instability*

ERK : *extracellular signal-related kinase*

ERV : *endogenous retroviruses*

FCA : foyers de cryptes aberrantes

GST : gène suppresseur de tumeur

HERV : *human endogenous retroviruses*

HLA-G : *Human Leucocyte Antigen-G*

INCa : institut national du cancer

LINE-1 : *Long interspersed nuclear element-1*

LOH : *Loss of Heterozygosity*

LTR : *long terminal repeat*

MICI : maladies chroniques inflammatoires de l'intestin

MLH1 : *Mull homolog 1*

MMR : *MisMatch Repair*

MSI : *Microsatellite Instability*

p53 : protéine 53

PAF : polyadénomatoze familiale

Pb : paire de bases

RCH : rectocolite hémorragique

TGF- β II : *Transforming growth factor β receptor II*

TNM : *Tumor Nodes Metastasis*

Vif : Viral Infectivity Factor

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Who : *world health organization*

Wt : *wild type*

1. Introduction

Le cancer colorectal (CCR) est la troisième cause de cancer dans le monde après le cancer du sein chez la femme et le cancer du poumon chez l'homme. La compréhension des voies de transformation a débuté dans les années 90 avec le premier modèle de carcinogénèse de Vogelstein et Fearon (Fearon and Vogelstein, 1990). Par la suite, deux principaux types de CCR ont été décrits dans la littérature, basés sur les « phénotypes moléculaires » de l'instabilité chromosomique (CIN) et de l'instabilité des microsatellites (MSI). Les cancers de phénotype CIN sont les plus communs et sont généralement caractérisés par la présence d'anomalies chromosomiques (aneuploïdie ou polyploïdie) (Lengauer et al., 1997). Les cancers de phénotype MSI résultent d'une déficience du système de réparation de type MMR (*MisMatch Repair*) (Ionov et al., 1993), par une accumulation de mutations (délétions ou des insertions) au sein de séquences répétées.

Ces deux voies tendent à différer par des mutations spécifiques à chacune d'elles : par exemple, les tumeurs MSI+ ont les mutations des gènes BRAF, AXIN1, et BAX, alors que les tumeurs CIN+ ont des mutations des gènes APC, KRAS et TP53 (Walther et al., 2009). De plus, les tumeurs CIN+ et MSI+ sont associées à des caractéristiques clinico-pathologiques différentes. Les tumeurs CIN+ ont tendance à être bien à modérément différenciées, distales, alors que les tumeurs MSI+ sont peu différenciées, proximales, et plus fréquentes chez les femmes (Sinicrope et al., 2006). Le phénotype MSI serait un marqueur de bon pronostic.

Un troisième phénotype a été plus récemment décrit : le phénotype CIMP (Toyota et al., 1999). Il est caractérisé par la méthylation de promoteurs et tendrait à recouvrir le phénotype MSI en partie à cause de la méthylation du promoteur du gène MLH1 (altération fréquemment retrouvée dans les cancers à profil MSI) (Weisenberger et al., 2006).

Le concept de la voie génétique somatique d'évolution des tumeurs, implique que certaines mutations soient co-sélectionnées, vraisemblablement à la suite de variations du micro-environnement des cellules cancéreuses, et que ces mutations pré-existent au sein de sous-clones de cellules cancéreuses. Une meilleure compréhension des voies moléculaires de transformation et d'évolution contribuerait à l'amélioration des stratégies de prévention, de dépistage, de diagnostic, et de traitement.

Des études ont montré que les tumeurs colorectales accompagnées d'une infiltration lymphocytaire étaient corrélées à une meilleure survie des patients.

La réactivation de l'expression de certaines classes de rétrovirus endogènes humains (HERV) accompagne fréquemment les processus de cancérisation. C'est la déméthylation des promoteurs des HERV (LTR) qui est à l'origine de leur expression. Or l'altération du profil de méthylation des gènes est une caractéristique fréquente des tumeurs colorectales. Il a de plus été démontré que des protéines d'enveloppe issues des HERV avaient une activité immunosuppressive favorisant la croissance tumorale.

Dans cette étude, nous avons analysé 135 tumeurs colorectales de patients pris en charge au CHRU de Tours entre 2007 et 2008. Nous avons étudié six altérations génétiques somatiques, un marqueur qui signerait la réactivation de rétrovirus endogènes, la délétion du locus APOBEC3 et l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale, puis nous avons effectué une analyse statistique par analyse des correspondances multiples et une classification hiérarchique ascendante afin d'essayer de mettre en évidence une relation entre les anomalies moléculaires étudiées et l'infiltration lymphocytaire.

2. Données épidémiologiques du cancer colorectal

2.1. Dans le monde

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme et le deuxième chez la femme, avec 1.2 millions de nouveaux cas diagnostiqués et environ 608 700 décès en 2008 (Jemal et al., 2011).

L'incidence du CCR est extrêmement variable dans le monde. Les pays et les régions les plus concernés sont la Nouvelle-Zélande, l'Europe, l'Australie, et l'Amérique du Nord. Les pays où l'incidence est la plus faible sont les pays d'Afrique, d'Asie Centrale et d'Asie du Sud (Ferlay et al., 2010) (Figure 1).

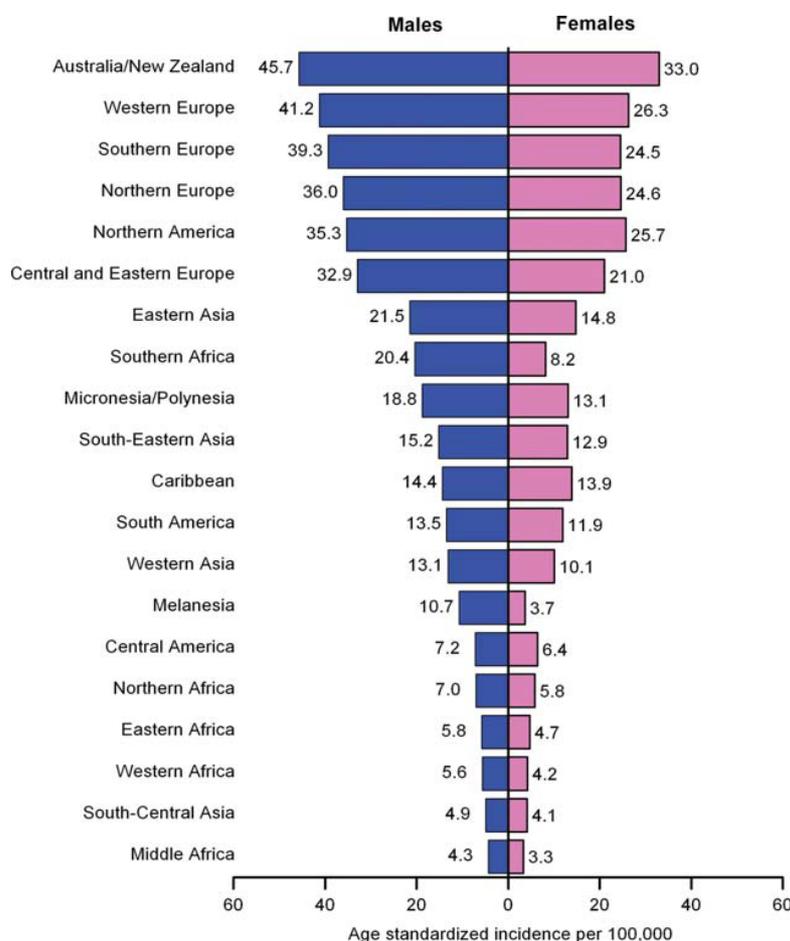


Figure 1 : Taux d'incidence du cancer colorectal selon le sexe et les pays (d'après : GLOBOCAN 2008).

2.2. En France (d'après l'institut national du cancer)

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquent dans la population générale ; le deuxième cancer le plus fréquent chez la femme (après le cancer du sein) et le troisième cancer le plus fréquent chez l'homme (après le cancer de la prostate et le cancer du poumon). En 2010, l'incidence du CCR était de 40 000 nouveaux cas. 49 % de ces cancers sont diagnostiqués entre 50 et 74 ans.

Les deux tiers des cancers colorectaux atteignent le colon et un tiers des cancers colorectaux atteint le rectum.

Chez l'homme, en région Centre, le taux régional d'incidence standardisé à la population mondiale estimé en 2005 varie entre 34,70 et 39,50 pour 100 000 hommes. Chez la femme, en région Centre, le taux régional d'incidence standardisé à la population mondiale estimé en 2005 varie entre 24,10 et 25,90 pour 100 000 femmes (Figure 2).

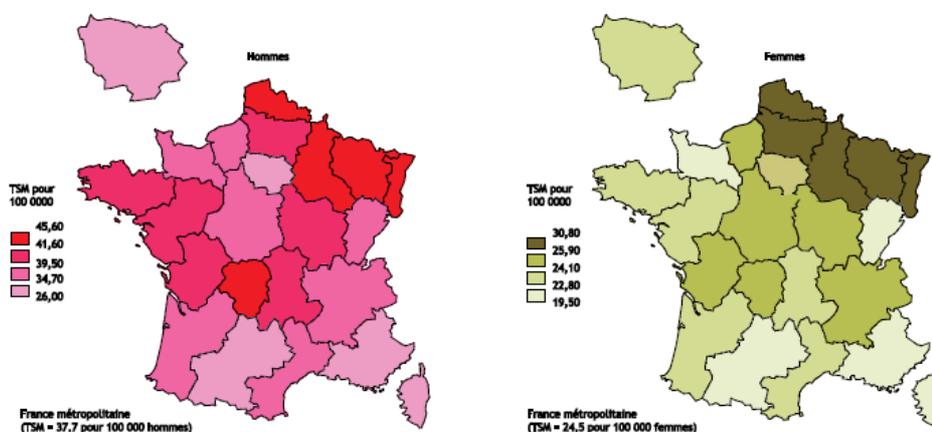


Figure 2 : Taux d'incidence standardisés à la population mondiale (TSM) d'incidence du CCR à l'échelle régionale en 2005 en France métropolitaine. Source : HCL/InVS/INCa/ Francim/Inserm, 2010 Infographie : INCa 2010

Avec 17 400 décès en 2010 (dont 53 % d'hommes), le cancer colorectal représente la deuxième cause de mortalité par cancer en France (après le cancer du poumon, et avant le cancer du sein). Il représente 11,9 % de l'ensemble des décès par cancer. Le taux de mortalité diminue régulièrement depuis 1980 dans la population générale.

2.3. Dépistage

Le dépistage s'adresse aux personnes asymptomatiques. Un programme de dépistage a été mis en place fin 2009. Ce programme s'adresse aux femmes et aux hommes de 50 à 74 ans à risque moyen de cancer colorectal, qui sont invités à consulter leur médecin traitant tous les deux ans. Le médecin traitant évalue le niveau de risque de son patient en fonction de son histoire personnelle et/ou familiale et lui remet un test de dépistage, s'il est éligible au programme de dépistage organisé.

On différencie trois groupes de sujets en fonction du niveau de risque de développer un cancer colorectal : risque moyen, risque élevé (15 à 20 % de la population générale), et risque très élevé de développer un CCR (1 à 3 % de la population générale) (Tableau 1).

Tableau 1 : Définition des risques de développer un cancer colorectal.

| Risque de développer un cancer colorectal | Type de population en fonction du niveau de risque |
|--|--|
| Risque moyen | Tous les sujets de plus de 50 ans |
| Risque élevé | -un antécédent personnel d'adénome ou de cancer colorectal ; -antécédent familial au premier degré de cancer colorectal ou d'adénome > 1 cm survenu avant 65 ans ; -deux ou plusieurs antécédents familiaux au premier degré de cancer colorectal quel que l'âge de survenue ; -une maladie inflammatoire chronique : RCH ou maladie de Crohn particulièrement en cas de pancolite. |
| Risque très élevé | -syndrome de Lynch (HNPCC) -polyadénomatoase familiale (PAF) |

Pour les sujets à risque moyen, le dépistage repose sur la recherche de sang occulte dans les selles (test au gäiac) tous les 2 ans chez les sujets âgés de 50 à 74 ans, suivie d'une coloscopie totale chez tous les sujets dépistés positifs pour rechercher un cancer ou un adénome.

Une recherche négative de sang occulte dans les selles ne permet pas d'éliminer l'éventualité d'un cancer colorectal. Par contre, la répétition du dépistage tous les deux ans augmente la sensibilité du test.

Pour les sujets à risque élevé, le dépistage repose sur la réalisation d'une coloscopie à partir de 45 ans ou 5 ans avant l'âge du diagnostic du cas index chez un parent de premier degré de moins de 65 ans.

Le dépistage de cancer dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) repose sur une surveillance endoscopique et biopsique spécifiques.

Le dépistage, pour les sujets à risque très élevé de développer un cancer colorectal, relève d'une prise en charge spécialisée.

2.4. Facteurs de risque environnementaux et comportementaux

Il existe des facteurs protecteurs du CCR tels que : l'activité physique, un indice de masse corporelle $\leq 24 \text{ Kg/m}^2$, la consommation de fibres alimentaires (fruits et légumes), l'absence de carence vitaminique (notamment vitamines A, C, D, E), de calcium, et les antioxydants.

Et à l'inverse, il existe des facteurs de risque tels que : la sédentarité, un indice de masse corporelle $> 24 \text{ Kg/m}^2$, les antécédents de cancer, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (en particulier : la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique), l'apport excessif de calories, les régimes riches en protéines, les régimes riches en graisse, le tabac et l'alcool.

3. Données anatomo-pathologiques et endoscopiques du cancer colorectal

La carcinogénèse colique est un processus multifactoriel et progressif suivant généralement la séquence « adénome-carcinome ». Sous l'influence de certaines hormones ou facteurs de croissance, des anomalies génétiques au sein des cellules épithéliales vont apparaître, celles-ci vont proliférer de façon anormale favorisant la formation de cryptes aberrantes et l'apparition de nouvelles anomalies génétiques. Ceci va conduire au développement d'adénomes comportant des lésions dysplasiques et enfin, à un adénocarcinome. La durée de cette séquence « adénome-carcinome » est en moyenne de 10 à 15 ans.

Certains critères ont été identifiés comme étant des facteurs de risque de transformation d'un adénome en adénocarcinome : un nombre d'adénomes > trois, une taille > 1 cm, une contingent villosité > 25 %, et un degré de dysplasie élevé (dysplasie de haut grade).

Ainsi, 10 % des adénomes atteindront la taille de 1 cm, et 2,5 % d'entre eux deviendront des cancers, dans un délai de 10 à 15 ans (Figure 3).

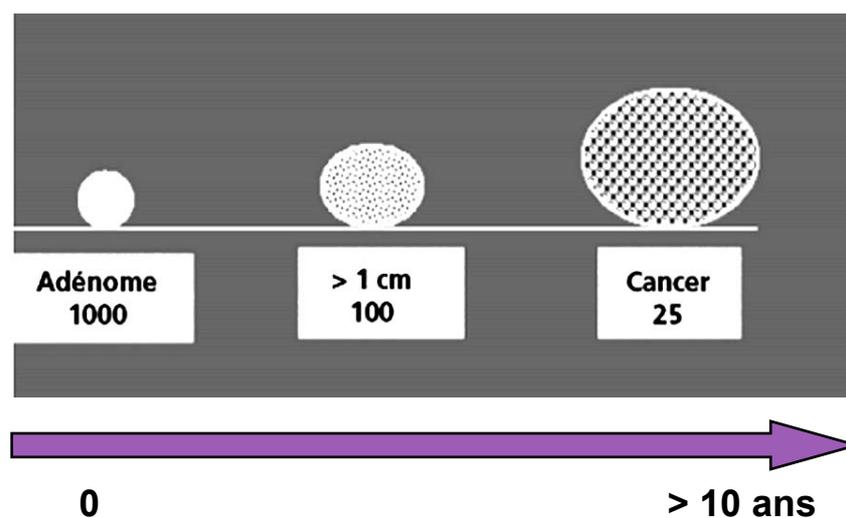


Figure 3 : Séquence adénome-carcinome

3.1. Foyers de cryptes aberrantes (FCA)

La première étape du développement du CCR est l'apparition d'une prolifération de l'épithélium des cryptes coliques. Ces modifications, non décelables par des techniques de coloscopie conventionnelle, ont été désignées par le terme de « foyers de cryptes aberrantes » (FCA).

Une technique de vidéo-endoscopie à fort grossissement optique a été mise au point afin de déceler ces premières modifications de la muqueuse colique après utilisation de colorants (bleu de méthylène). Celle-ci permettrait de faire la différence entre une simple hyperplasie des cryptes (orifice rond ou ovalaire associé à un élargissement de l'espace inter-cryptique) et des cryptes comportant des lésions dysplasiques (orifice à peine perceptible, punctiforme, bordé par un épithélium épaissi).

La prolifération cellulaire anormale entraîne l'accumulation des cellules dans la muqueuse et aboutit à la formation d'un polype.

3.2. Adénome

Les adénomes sont des lésions précancéreuses fréquentes. D'après les données de l'INCa, la prévalence de l'adénome augmente avec l'âge, passant de 7 % entre 45-49 ans, à 15 % entre 50-59 %, et à 20 à 33 % entre 65 et 74 ans.

Les adénomes sont visualisés en coloscopie sous la forme soit d'un polype (tumeur de petite taille faisant saillie dans la lumière colique ou rectale) sessile ou pédiculé, soit d'une lésion plane plus difficile à identifier.

L'examen microscopique des polypes permet, tout d'abord, de poser le diagnostic d'adénome : il s'agit d'une lésion proliférative de l'épithélium cryptique colique, comportant des lésions de dysplasie. En effet, certains polypes ne sont pas des adénomes traditionnels et peuvent correspondre à des polypes d'architecture festonnée (polypes hyperplasiques, adénome festonné traditionnel, et adénome/polype sessile festonné), à des polypes inflammatoires ou encore à des polypes hamartomateux (dont les polypes juvéniles).

Une fois le diagnostic d'adénome porté, l'anatomopathologiste identifie l'architecture et le degré de dysplasie de l'adénome. La classification OMS (Organisation Mondiale de la Santé) distingue trois types de polype adénomateux avec un risque de transformation tumorale : tubuleux (75 %), vilieux (5 %), et tubulo-vilieux (20 %). Un

adénome avec dysplasie de bas grade comporte des cellules avec des noyaux allongés, pseudo-stratifiés, restant localisés à la partie basale de l'épithélium, la muco-sécrétion est conservée. Dans la dysplasie de haut grade, les anomalies sont les mêmes que dans la dysplasie de bas grade, mais plus marquées et plus étendues. Il existe une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique, des atypies nucléaires avec des mitoses plus nombreuses, une muco-sécrétion souvent absente et surtout une désorganisation architecturale plus marquée.

3.3. Adénocarcinome in-situ

L'adénocarcinome in situ correspond à une prolifération épithéliale cryptique maligne associant des anomalies nucléo-cytoplasmiques marquées (noyaux stratifiés, augmentés de volumes, hyperchromatiques ou vésiculeux, perte de la muco-sécrétion) à une désorganisation architecturale des cryptes. Cependant, ces anomalies restent confinées à la muqueuse, sans franchissement de la musculaire muqueuse.

3.4. Adénocarcinome infiltrant

Lorsqu'il y a rupture de la membrane basale et franchissement de la musculaire muqueuse, on parle alors de carcinome invasif. Le carcinome peut s'étendre ensuite en profondeur pour envahir les différentes tuniques de la paroi colique : la sous-muqueuse, la musculaire, puis la sous-séreuse et la séreuse, avec envahissement des ganglions puis des organes de voisinage, et apparition de métastases à distance.

3.5. Classification TNM 2009

L'extension en profondeur du carcinome constitue l'un des facteurs pronostiques majeurs du CCR; celle-ci est évaluée par la classification TNM dont la dernière version date de 2009 (Figure 4). Cette classification prend en compte trois critères permettant ensuite d'établir un stade clinique : la profondeur d'infiltration de la tumeur primitive au sein de la paroi colique ou rectale (T), l'absence/la présence d'envahissement ganglionnaire régional (N), et l'absence/la présence de métastases à distance (M) (Figure 4 et Tableau 2).

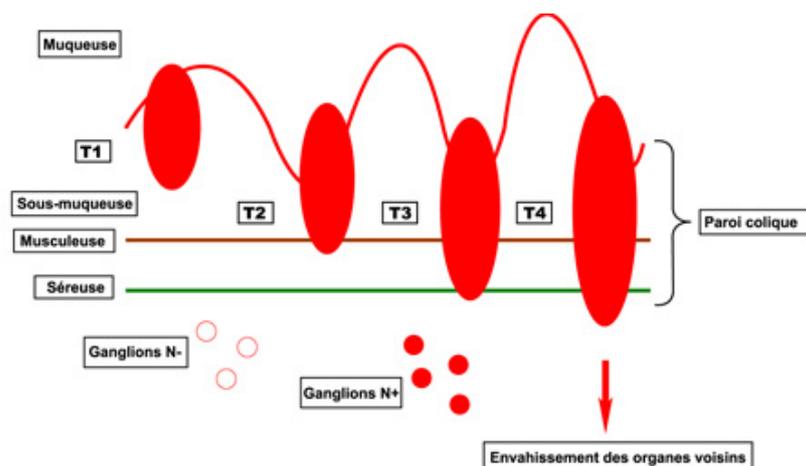


Figure 4 : Stades tumoraux T de la classification pTNM. Extension de l'adénocarcinome à travers les différentes tuniques de la paroi colique. (d'après Institut Paoli-calmettes)

Tableau 2 : Classification pTNM (2009) du cancer colorectal et correspondance clinique.

| Stade TNM | Signification | Stade clinique |
|-----------|---|----------------|
| Tis | Tumeur intra-épithéliale ou intra-muqueuse | 0 |
| T1 | Envahissement de la sous-muqueuse | I |
| T2 | Envahissement de la musculature | I |
| T3 | Envahissement de la sous-sèreuse | IIa |
| T4a | Envahissement de la sèreuse ; pénétration du péritoine viscéral | IIb |
| T4b | Envahissement d'un organe de voisinage | IIc |
| N1a | 1 ganglion envahi | III |
| N1b | 2 à 3 ganglions envahis | III |
| N1c | Dépôts tumoraux « satellites » dans la sous-sèreuse, ou dans le tissu péri-colique ou péri-rectal non péritonisé, dans le cadre d'une absence de ganglions lymphatiques métastatiques | III |
| N2a | 4 à 6 ganglions envahis | III |
| N2b | ≥ 7 ganglions envahis | III |
| M1a | Métastase viscérale d'un seul organe | IV |
| M1b | Métastase viscérale de plus d'un organe ou métastase péritonéale | IV |

Hormis les critères pTNM, l'étude anatomopathologique d'une tumeur prend en compte d'autres éléments pronostiques tels que la présence d'embolies carcinomateuses, la présence d'engainements péri-nerveux, ou encore la présence d'un stroma inflammatoire lymphocytaire. De même, sont précisés la qualité de l'exérèse longitudinale (berges proximales et distales) et circonférentielle.

4. Histoire naturelle du cancer colorectal sur le plan moléculaire

La carcinogénèse colorectale résulte d'un processus d'initiation et de transformation des cellules normales suite à des modifications génétiques et épigénétiques de l'ADN.

La transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale maligne résulte d'une perturbation d'un équilibre fragile entre prolifération, différenciation et élimination (par apoptose ou sénescence) cellulaires, et se fait par une accumulation progressive d'anomalies génétiques et épigénétiques, qui lui confèrent la capacité d'échapper aux mécanismes de régulation de la croissance cellulaire, de proliférer à l'infini, d'envahir les tissus et de métastaser. Les cellules tumorales sont caractérisées par six propriétés principales, caractérisées par Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000), et qui les différencient des cellules normales par (Figure 5 et Tableau 3):

- 1/ Une indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération, autonomie de croissance. La tumeur produit elle-même des signaux de croissance afin de ne pas dépendre totalement de son microenvironnement.
- 2/ Une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs. La prolifération des cellules est contrôlée par le cycle cellulaire. Il existe des signaux bloquant le cycle cellulaire. Afin de proliférer, les cellules tumorales doivent échapper à ces signaux.
- 3/ Une résistance à l'apoptose.
- 4/ Une prolifération illimitée (perte de la sénescence), capacité à se répliquer à l'infini. Une des capacités des cellules tumorales est de limiter l'érosion des télomères et d'échapper ainsi au phénomène de sénescence. Cela permet aux cellules tumorales d'avoir la capacité de proliférer à l'infini.
- 5/ Une capacité d'angiogénèse. Afin de survivre, les cellules qui nécessitent un apport suffisant en oxygène et en nutriments stimulent la formation de néo-vaisseaux sanguins. Lors d'une augmentation de volume de la tumeur, elle nécessite une irrigation plus importante. Elle doit être capable d'initier la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par un mécanisme appelé « angiogénèse ».

- 6/ Une capacité d'invasion et de diffusion métastatique. Durant le développement des tumeurs, des cellules vont se détacher de la tumeur et être à l'origine de la formation de tumeurs dans d'autres organes.

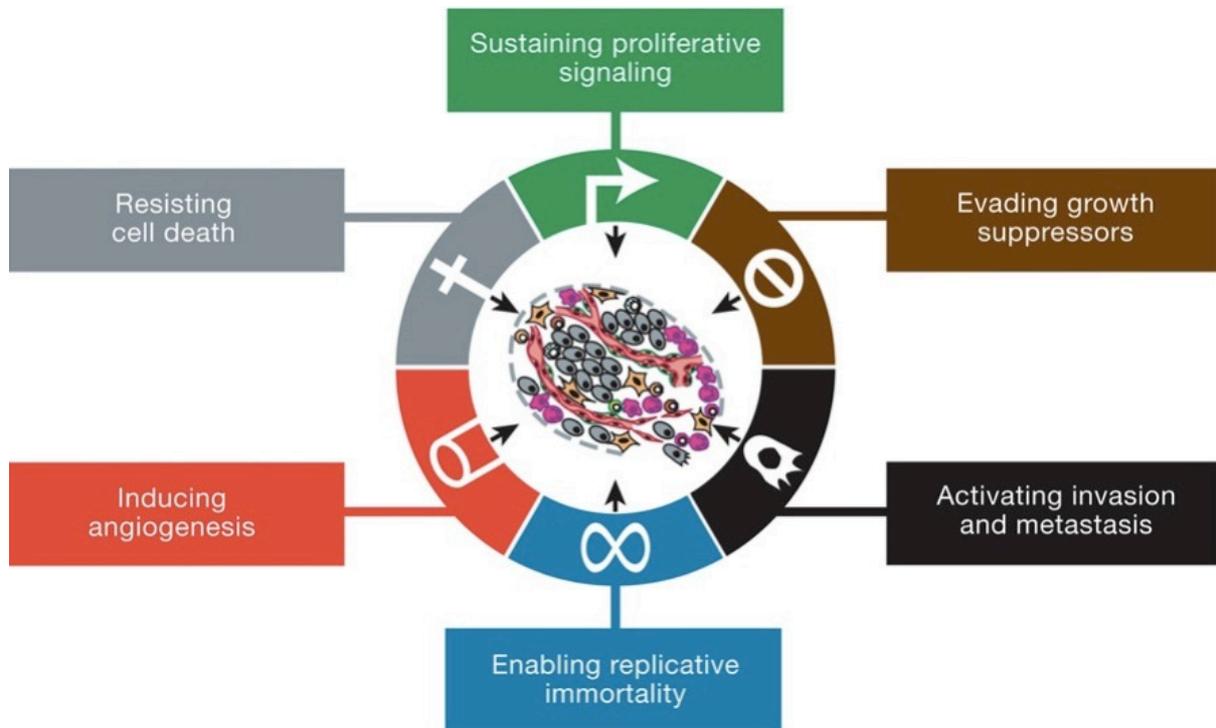


Figure 5 : Les six propriétés fondamentales de la cellule tumorale (Hanahan and Weinberg, 2000).

Tableau 3 : Exemples d'anomalies génétiques et épigénétiques observées au cours de la progression tumorale du CCR, et permettant aux cellules d'acquies les six propriétés fondamentales de la cellule tumorale.

| Les six propriétés de la cellule cancéreuse | Exemples d'anomalies génétiques et épigénétiques dans la progression néoplasique du CCR |
|---|---|
| 1/ L'autonomie de croissance | - anomalie de la PI3K - BRAF - KRAS - expression de l'EGFR |
| 2/ L'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs | - TGF-βRII |
| 3/ La résistance à l'apoptose : Inactivation de gènes suppresseurs de tumeur : | - inactivation de TP53 - inactivation de l'APC - Smad2/4 - PTEN |
| 4/ La capacité de proliférer à l'infini | - inactivation de TP53 - COX2 |
| 5/ La capacité d'angiogénèse | - VEGF |
| 6/ La capacité d'invasion et de métastaser | |

Les mécanismes de la carcinogénèse colorectale induisent une instabilité génomique, et se traduisent par l'existence d'une instabilité chromosomique (CIN), d'une instabilité génétique (MSI ou instabilité des microsatellites), ou d'une hyperméthylation des îlots CpG des régions régulatrices de gènes (CIMP).

L'apparition d'un cancer nécessite la production de plusieurs accidents génétiques dans une même cellule qui entraînent :

- l'activation des proto-oncogènes pour devenir des oncogènes
- et/ou l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeur.

Cette instabilité génomique se manifeste par de nombreuses mutations dans trois classes de gènes : les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur, et les gènes de surveillance ou de réparation de l'ADN (gènes mutateurs).

Les proto-oncogènes ont un rôle d'activateurs du cycle cellulaire dans un tissu donné et à un moment précis de la différenciation ou du développement cellulaire. Leur activité au sein de la cellule est normalement régulée.

Les mécanismes d'activation des oncogènes sont de plusieurs ordres : mutation ponctuelle, amplification génique, insertion virale, et remaniement chromosomique (délétion, translocation). La mutation d'un seul allèle est suffisante pour provoquer une stimulation exagérée de la prolifération cellulaire.

Les conséquences cellulaires de l'activation des oncogènes sont une stimulation de la prolifération cellulaire constitutive par activation de protéines mutées, une augmentation de la synthèse d'un facteur de croissance (PDGF p.e.), une augmentation de la synthèse d'un récepteur de facteur de croissance, une augmentation de la synthèse des protéines de transduction des signaux, et une augmentation de la synthèse d'un facteur de transcription.

Les gènes suppresseurs de tumeur (GST) ou anti-oncogènes sont des gènes qui agissent sur le contrôle du cycle cellulaire et la différenciation cellulaire, et certains sont impliqués dans l'induction de l'apoptose (comme la protéine p53). Leur mutation entraîne une perte de fonction. Une altération des deux allèles est nécessaire à l'obtention d'une perte de fonctionnalité qui aboutit à la transformation des cellules et à une prolifération cellulaire dérégulée. Ces GST incluent entre autres APC et TGF- β .

Le troisième type de gènes pouvant affecter la carcinogénèse colorectale sont les gènes de surveillance ou de réparation de l'ADN (gènes de type mutateur). Ces gènes sont impliqués dans les mécanismes de réparation. Au cours de la synthèse de l'ADN, la plupart des erreurs de réplication sont immédiatement corrigées par l'activité exonucléase de l'ADN polymérase. Les erreurs échappant à ce système intrinsèque sont corrigées par l'activation du système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR pour mismatch repair) contrôlant la fidélité de la réplication de l'ADN. Les mutations germinales de ces gènes sont responsables du syndrome de Lynch. Actuellement, cinq gènes impliqués dans le système MMR ont été identifiés chez l'homme : hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 et hMSH6.

4.1. Les voies moléculaires impliquées dans la carcinogénèse colique

Cinq voies moléculaires sont fréquemment impliquées dans la carcinogénèse colique, Wnt/APC/ β -caténine, Ras/MAPK, SMAD/TGF β , PI3K, et P53.

4.1.1. Voie Wnt/APC/ β -caténine

L'activité physiologique de la voie de signalisation Wnt régule la prolifération de l'épithélium intestinal des cryptes.

APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) est un gène suppresseur de tumeur localisé en 5q21. Il joue un rôle dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire, ainsi que dans la stabilité chromosomique. La protéine APC joue un rôle important de régulation de l'homéostasie épithéliale. Elle est impliquée dans l'adhésion cellulaire par le biais de la β -caténine, une composante du complexe de jonction. APC et la β -caténine sont des composants de la voie de signalisation Wnt, voie de signalisation de transduction importante dans la carcinogénèse colorectale.

Dans le cas du processus normal de développement, l'activation des récepteurs « *frizzled* » par la fixation du ligand Wnt conduit à la phosphorylation de la protéine Dishevelled qui, par son association à l'Axine, empêche la GSK3 β de phosphoryler ses substrats dont la β -caténine, qui sera alors transloquée dans le noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription de la famille Tcf pour activer la transcription de gènes cibles (c-myc, Cycline D1 ou c-jun, MMP7, PPAR δ). En l'absence du ligand Wnt, la GSK3 β

phosphoryle la β -caténine dans le complexe Axine/APC, qui sera ubiquitinilée et dégradée par le protéasome.

Dans l'épithélium colique normal, APC se concentre au sommet des villosités, c'est-à-dire dans les cellules matures qui subissent l'apoptose. Lorsque la protéine APC est exprimée sous sa forme mutée, elle empêche la migration et l'apoptose des cellules, conduisant ainsi à une accumulation de cellules à la base de la crypte et entraînant la formation d'un foyer de cryptes anormales FCA.

Dans 80 % des cas de CCR sporadiques, APC est inactivé par des mutations somatiques qui entraînent une perte d'expression d'une protéine ou l'expression d'une protéine tronquée. Les mutations du gène APC font des mutations les plus précoces et les plus fréquentes. Elles sont considérées comme le premier évènement génétique intervenant dans la « séquence adénome-carcinome » de la carcinogenèse colorectale. Cette mutation précoce suggère que APC est un initiateur de tumeur sporadique. Lorsque le gène APC est muté, il y a accumulation de β -caténine cytoplasmique qui va être transloquée dans le noyau où elle se lie aux facteurs de transcription de la famille Tcf induisant la transcription de nombreux gènes cibles (Burgess et al., 2011). (Figure 6)

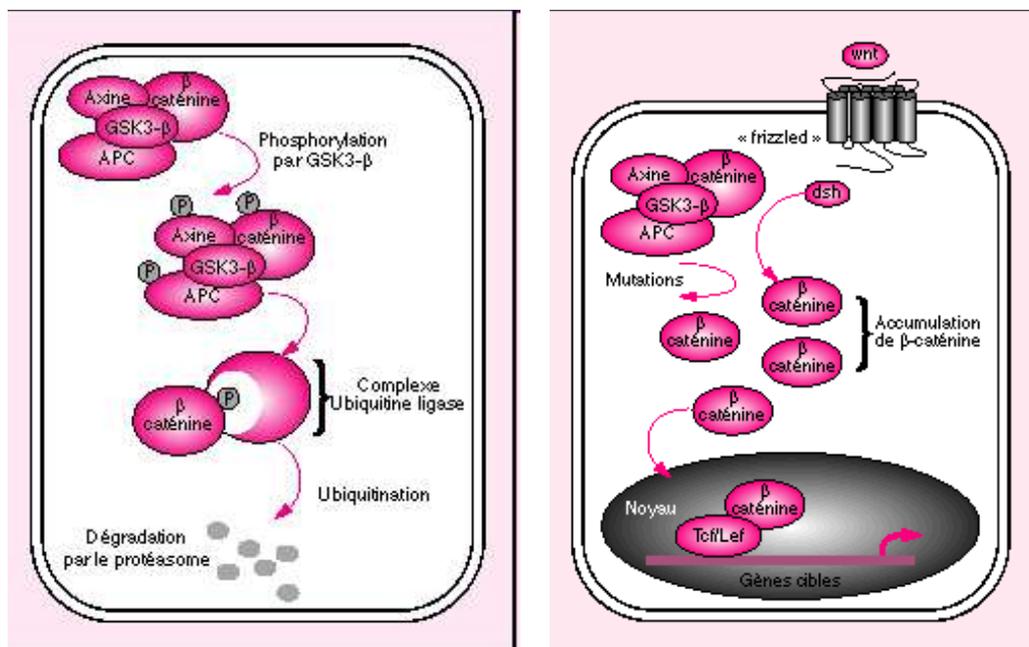


Figure 6 : Dégradation de la β -caténine par le protéasome (Matsuzawa et Reed, 2001). En position OFF (à gauche), la β -caténine fait partie d'un complexe protéique qui régule sa dégradation, et il n'y a pas d'activation des gènes cibles. En position ON (à droite), l'activation des récepteurs de la famille Frizzled par les ligands de la famille Wnt conduit à la phosphorylation de la protéine Dsh. La β -caténine est alors libérée du complexe. Non dégradée, elle transloque dans le noyau où elle régule l'expression de gènes cibles tels que *c-myc* et *cycline D1*, en s'associant aux facteurs de transcription TCF/LEF.

4.1.2. Voie Ras/MAPKinases

Les protéines RAS font parties des GTPases (ce sont des enzymes qui convertissent la molécule GTP (guanine triphosphate) en GDP (guanine diphosphate)). Elles jouent un rôle important dans la transduction de signaux intracellulaires provenant des récepteurs membranaires vers le noyau, aboutissant à la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation, de la migration, ainsi que de l'angiogénèse. Elles sont localisées à la face interne de la membrane cytoplasmique, ancrées dans la couche phospholipidique membranaire par palmitoylation de leur partie C terminale. Elles existent sous deux états : un état inactif et un état actif au cours duquel elles déclenchent les cascades de phosphorylation permettant de transduire le signal d'un récepteur membranaire jusqu'au noyau. Lorsque Ras est activé sous la forme Ras-GTP, elle entraîne une cascade de phosphorylations/activations successives de Raf1, des « mitogen-activated protein kinase kinases » 1 et 2 (MAPKK1 et MAPKK2) puis des « extracellular signal-regulated kinases » 1 et 2 (ERK1 et ERK2). (Figure 7)

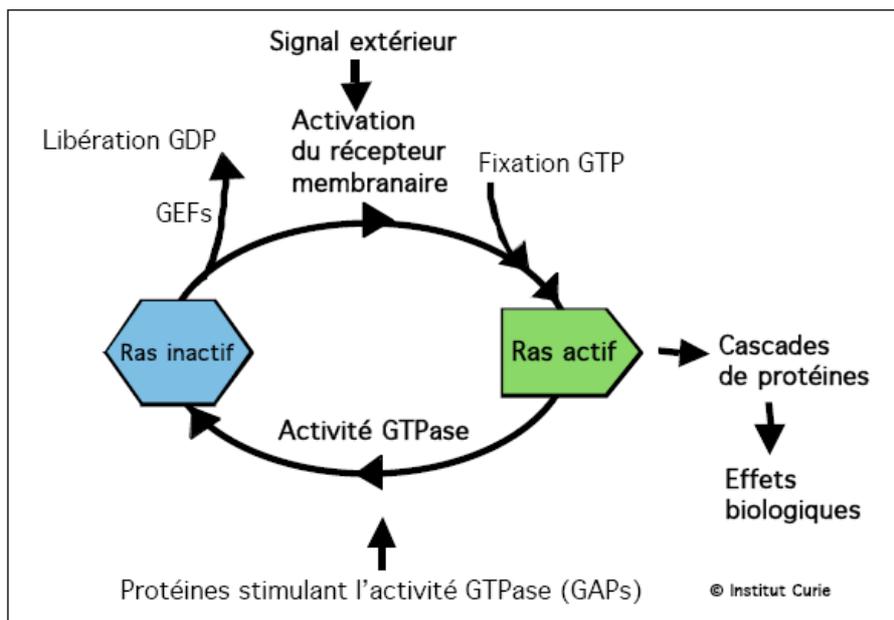


Figure 7 : Les protéines Ras, des interrupteurs biologiques. Ce sont les protéines de libération des nucléotides guanyliques (GEFs) qui « allument » la protéine Ras. Pour cela, elle libère une molécule de GDP liée à la protéine Ras, et permettent ainsi d'y substituer une molécule de GTP. Il y a alors modification de conformation de la protéine Ras qui devient active. Quant à « l'extinction », elle est assurée par les protéines GAPs qui forcent Ras à transformer le GTP en GDP. La protéine ras devient alors inactive.

Le gène KRAS code la protéine K-ras. Pour transmettre le signal venant de l'EGFR (entre autres, étant donné que cette voie de signalisation répond à plusieurs récepteurs membranaires), la protéine K-ras lie une molécule de GTP. Une fois le signal transmis, K-ras est inactivée et cette inactivation passe par l'hydrolyse de GTP en GDP grâce à son activité enzymatique. Les mutations du gène KRAS (souvent des mutations faux-sens) inactivent la fonction GTPase de la protéine et sont retrouvées dans 30 à 40 % des carcinomes colorectaux. Si la protéine perd la capacité d'hydrolyser le GTP en GDP, K-ras reste activée et la voie de signalisation continue à stimuler les processus cellulaires : la prolifération, la résistance à l'apoptose et l'angiogénèse. Le domaine du gène KRAS qui code la fonction GTPase se trouve dans l'exon 2, notamment les codons 12 et 13. L'oncogène KRAS joue un rôle important dans la transition adénome-carcinome.

Dans les tumeurs, les mutations de Ras génèrent une accumulation de la forme active de la protéine, Ras-GTP, induisant une dérégulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose, qui peut aboutir à la transformation tumorale, et favoriser l'invasion cellulaire et la formation de métastases.

Le gène BRAF est localisé sur le bras long du chromosome 7 en position 7q34. Ce gène, qui comporte 18 exons, code la protéine B-Raf, une sérine/thréonine-kinase appartenant à la voie RAS/MAPK, dont le rôle dans la carcinogénèse colorectale est bien établi, notamment par l'intermédiaire de l'activation de l'EGFR. Une fois activée par KRAS, la protéine B-Raf phosphorylée va activer par phosphorylation la protéine MEK qui active par double phosphorylation la protéine ERK, ce qui entraîne sa translocation dans le noyau et l'expression de gènes précoces codant des facteurs de transcription (*c-myc*, *c-Fos*). Ces derniers stimulent l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (dont la cycline D1) et, par conséquent, de la prolifération cellulaire, mais aussi de l'apoptose. Ces effets sur la transcription de facteurs de prolifération et de survie cellulaire expliquent pourquoi l'activation constitutive de BRAF possède un potentiel oncogénique. La mutation BRAF la plus fréquente est la V600E.

4.1.3. Voie 18q deletion/SMAD/TGF- β signalling

La voie du TGF- β est impliquée dans un grand nombre de fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la mobilité ou encore l'adhésion des cellules. Dans les CCR, l'inactivation de la voie du TGF- β est une étape importante de la tumorigénèse.

La voie de signalisation TGF- β implique l'activation des protéines SMADs qui régulent la transcription. Lorsque les ligands de type TGF- β se fixent à leurs récepteurs, le récepteur (de type II) va phosphoryler le récepteur de type I. La propagation du signal passe ensuite par l'intermédiaire des protéines SMADs qui seront phosphorylées à leur tour. Il existe trois classes de SMADs, seules les R-SMADs (SMAD1, 2, 3, 5 et 8) seront phosphorylés pour former des complexes avec SMAD' dans le cytoplasme. Cette interaction va entraîner une localisation nucléaire des SMADs, qui avec l'aide de cofacteurs ou de facteurs de transcription, vont activer l'expression des gènes cibles de la voie du TGF- β .

Les altérations de la voie du TGF- β sont des altérations génétiques majeures dans la tumorigénèse colorectale. La perte de SMAD4, protéine centrale de la transduction du signal, entraîne l'inactivation de la voie du TGF- β , constituant une étape importante dans le passage d'un adénome vers un carcinome. Le gène codant le récepteur TGF β RII, spécifique du ligand TGF- β , est muté dans 90 % des CCR qui présentent aussi une instabilité des microsatellites. Dans ce cas, les mutations interviennent dans les adénomes tardifs. La mutation TGF- β RII modifie la fonction du TGF (rôles de suppresseur tumoral et de promoteur dans les CCR).

4.1.4. Gène suppresseur de tumeur p53

Le gène p53, suppresseur de tumeur, est situé sur le chromosome 17. Le gène a été très conservé pendant l'évolution. La protéine TP53 est une phosphoprotéine de 393 acides aminés de masse moléculaire 53 kDa (Figure 8). On la trouve en très petite quantité dans les cellules normales, mais en grande abondance dans les cellules tumorales, en générale sous une forme mutée ou peu active. Cette protéine a deux principaux rôles : soit l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G 1 et la phase S, soit

l'induction de la mort cellulaire par apoptose. La protéine TP53 est normalement régulée négativement par MDM2, une E3-ubiquitin ligase, et MDM4. Elle joue un rôle important dans la stabilité du génome. Normalement, lorsque TP53 est activée suite à un stress cellulaire (hypoxie, cytokines, dommage de l'ADN, surexpression d'oncogènes,...), elle agit comme un agent décisionnel qui provoquerait soit l'arrêt du cycle cellulaire, soit l'apoptose.

La dérégulation de la TP53 compromet l'apoptose déclenchée en cas d'altérations non réparables du génome. La perte du gène codant la TP53 conduit à une instabilité génomique, à une dérégulation du cycle cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose. L'inactivation du gène codant la TP53, à la fois par pertes alléliques et par mutations ponctuelles, est une étape clé dans le développement des CCR. Plusieurs études ont montré que les mutations de GST interviennent tardivement dans la carcinogenèse colique et semblent être nécessaires à la transition de l'adénome vers le carcinome. Les mutations et la perte d'hétérozygotie du gène codant la TP53 sont importantes dans la séquence adénome-carcinome. Habituellement, les deux allèles sont inactivés par une mutation faux sens inactivant la transcription ou par une délétion chromosomique (p17) sur le second allèle p53. Les mutations du gène codant la TP53 concernent environ 50% des cancers et, dans les tumeurs où le gène n'est pas muté, il existe fréquemment une altération fonctionnelle de la protéine. Cette perte de fonction est retrouvée dans 4 à 26 % des adénomes, dans 50 % des adénomes invasifs, et dans 50 à 75 % des CCR (Pino and Chung, 2010).

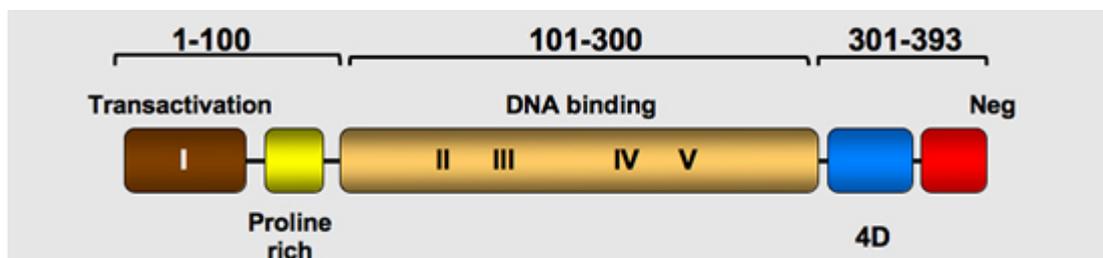


Figure 8 : Cinq domaines de la protéine p53 (d'après www.p53.free.fr); chacun ayant une fonction spécifique.

Ainsi, plusieurs voies de pathogénicité interviennent dans le développement du CCR (Figure 9).

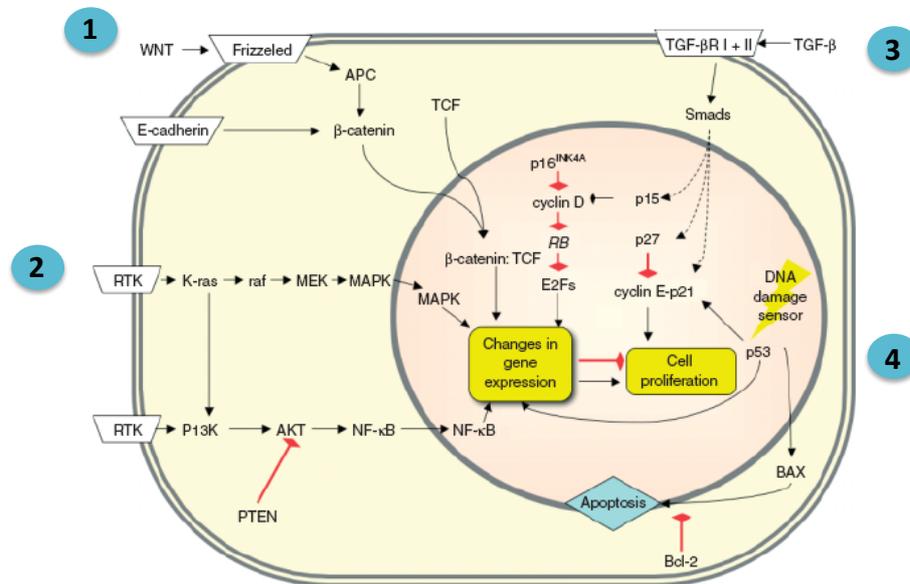


Figure 9 : Schéma général des voies de pathogénicité dans le CCR. Les flèches noires représentent les interactions positives et les flèches rouges représentent les contrôles négatifs (Søreide et al., 2006). (1 : voie Wnt/APC/β-caténine ; 2 : voie Ras/MAPKineses ; 3 : dél18q/Smads/TGF-β ; 4 : p53)

4.2. Génétique et cancer colorectal

Actuellement, les CCR peuvent se diviser en trois catégories :

- les CCR sporadiques non héréditaires, c'est-à-dire qui surviennent suite à des mutations somatiques spontanées, dans 80 à 90 % des cas ;
- les CCR héréditaires à transmission autosomique dominante pour les principaux, c'est-à-dire dus à des mutations germinales, dans 5 à 10 % des cas ; ils peuvent être de deux types : la polyadénomatose familiale (PAF) (1%) et le syndrome de Lynch (HNPCC) (3-5 %) ; d'autres formes plus rares existent ;
- les CCR d'origine inflammatoire (MICI, maladie de Crohn, colite ulcéreuse). (Figure 10).

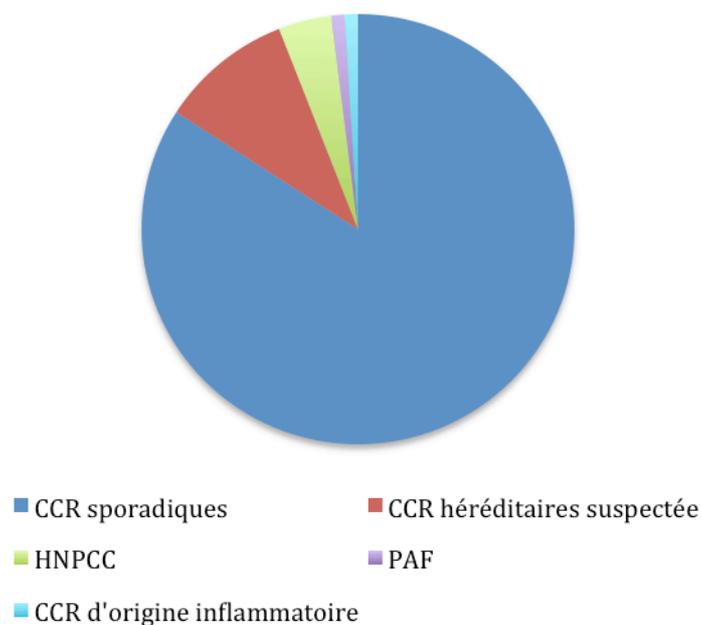


Figure 10 : Répartition des CCR selon qu'ils soient sporadiques, secondaires à des pathologies inflammatoires, ou génétiques.

4.2.1. Instabilités chromosomiques (CIN ou chromosomal instability)

L'instabilité chromosomique est la voie de développement des CCR la plus fréquente (80 % des CCR sporadiques et 1 % des FAP). Elle correspond au phénotype CIN ou aux cancers LOH (*Loss of Heterozygosity*). Cette voie est caractérisée par des anomalies caryotypiques résultant d'une perte de la totalité ou d'une partie d'un chromosome ou d'un gain de matériel chromosomique. Les mécanismes contribuant à cette voie peuvent être des amplifications chromosomiques, des translocations, des pertes alléliques. Les segments les plus fréquemment perdus dans le CCR sont : le bras court des chromosomes 17 (17p, contenant le gène *TP53*) et 8, et le bras long des chromosomes 18 (18q), 5 (5q, contenant le gène *Apc*), et 22 (Grady and Carethers, 2008). La perte 18q, appelée perte d'hétérozygotie 18q (LOH), est retrouvée dans plus de 70 % des CCR primitifs. Dans ce chromosome, sont inclus les gènes *SMAD2* et *SMAD4* qui ont une fonction dans la voie de signalisation du TGF- β .

En résumé, cette voie résulte à la fois du changement du nombre de copie et de la structure chromosomiques, et contribue à l'inactivation de GST tels que *APC*, *SMAD4*, et *TP53*.

Sur le plan clinique, les tumeurs issues de la voie des instabilités chromosomiques ont plus souvent une localisation distale, colon gauche, souvent un envahissement ganglionnaire, rarement un sous-type histologique mucineux, n'ont pas d'infiltration lymphocytaire, et sont métastatiques. Le phénotype CIN peut être détecté au stade de cryptes aberrantes.

Au cours de la progression tumorale, différents gènes sont altérés :

- au cours de l'initiation : des foyers de cryptes aberrantes vers un adénome : L'altération du GST APC localisé en 5q21 semble être un évènement précoce, voire initiateur dans la carcinogenèse colique. La protéine APC intervient dans la voie de signalisation Wnt, dans la régulation de la prolifération cellulaire. Son inactivation entraîne une hyperprolifération de l'épithélium colique. La mutation KRAS est elle aussi précoce dans la séquence adénome-carcinome.

- au cours de la promotion : d'un adénome vers un carcinome : SMAD2 et SMAD4

- au cours de la progression : ce sont des altérations plus tardives : La mutation inactivatrice du gène TP53 est plus tardive dans le développement du CCR, elle favorise alors la survenue d'altérations génétiques multiples.

4.2.2. Instabilité des microsatellites (MSI)

L'instabilité des microsatellites est retrouvée dans 15 % des CCR. Ce phénotype est caractérisé par des microsatellites deviennent anormalement longs ou courts.

Les tumeurs colorectales MSI, qu'elles soient héréditaires ou sporadiques résultent d'une altération du système de réparation des mésappariements (système MMR) qui contrôle la fidélité de la réplication de l'ADN. La conséquence directe de ce déficit du système MMR, est l'accumulation de mutations au sein de séquences répétées appelées microsatellites. Les microsatellites sont des répétitions de 1 à 5 nucléotides présentes en très grand nombre et réparties dans tout le génome. La majorité de ces séquences répétées se situent au sein de régions intergéniques non codantes de l'ADN. Lorsque ces répétitions sont codantes, leur instabilité est susceptible d'entraîner des altérations de la séquence des gènes qui les contiennent. Ces séquences répétées peuvent également être localisées dans les exons de certains gènes humains. Il s'agit, le plus souvent, de séquences mononucléotidiques de 6 à 10 nucléotides. Les mutations survenant dans les CCR MSI sont des délétions ou des insertions de 1 ou 2 bases ; on

parle alors d'instabilité de gènes. La conséquence directe est un décalage du cadre de lecture conduisant à la formation de protéines tronquées et parfois antigéniques. Les altérations du système MMR sont précoces dans le développement tumoral MSI (Figure 11). On considère que c'est l'accumulation de nombreuses mutations dans les gènes cibles d'instabilité qui seraient responsable du processus tumoral. Un premier gène cible identifié dans la voie de carcinogenèse des instabilités microsatellites, a été le gène codant le récepteur de type II du TGF β (TGF β -RII). Aujourd'hui, de nombreux autres gènes cibles d'instabilité, mutés à des fréquences variables, sont connus.

Il a été identifié six gènes participant au processus moléculaire du MMR, mais seuls quatre d'entre eux ont une fréquence clinique de mutation héréditaire significative : MLH1, MSH2, MSH6, et PMS2.

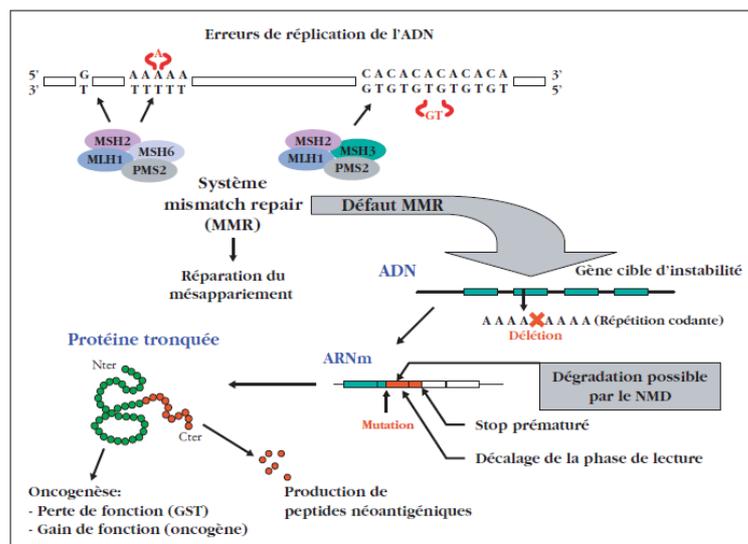


Figure 11 : Inactivation du système de réparation des erreurs de réplication de l'ADN et ses conséquences. GST : gène suppresseur de tumeur (Hamelin et al., 2008).

Dans les familles HNPCC, 90 % des altérations du MMR sont dues principalement à des mutations constitutionnelles des gènes MLH1 et MSH2, plus rarement MSH6 ou PMS2. Dans les cancers colorectaux sporadiques, l'altération du système MMR se traduit par une inactivation de l'expression de MLH1 par méthylation biallélique du promoteur de ce gène (Figure 12).

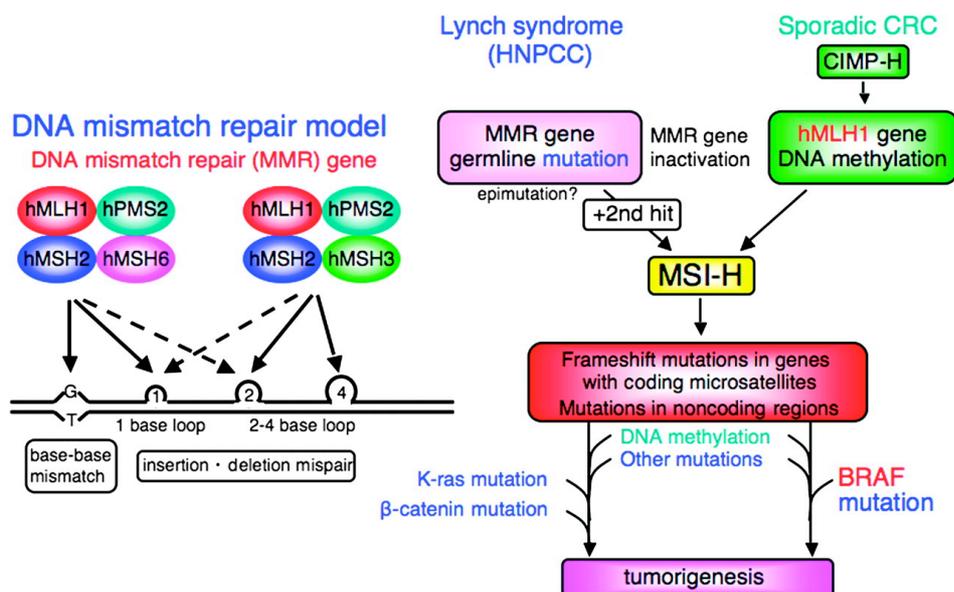


Figure 12 : Modèle d'ADN MMR et voies moléculaires de pathogénicité pour les CCR MSI-H (Imai and Yamamoto, 2008).

La détermination du statut MSI des tumeurs colorectales a plusieurs intérêts :

- diagnostique car cela permet d'identifier les patients susceptibles d'être atteints du syndrome HNPCC ;
- thérapeutique, les patients porteurs de tumeurs MSI répondent différemment aux chimiothérapies ;
- pronostique car il a été démontré que les patients porteurs de tumeurs MSI ont un meilleur pronostic après chirurgie.

Ces mutations ciblent essentiellement :

- des gènes régulateurs de la croissance
- des gènes régulateurs du cycle cellulaire
- des gènes régulateurs de l'apoptose
- et des gènes de réparation de l'ADN.

Sur le plan clinique, les tumeurs MSI ont plus souvent une localisation proximale, colon droit, un sous-type histologique mucineux, une infiltration lymphocytaire importante, et sont souvent classées N0 et M0. Les tumeurs MSI sont globalement associées à un meilleur pronostic que les tumeurs MSS (Popat et al., 2005).

Ainsi, on peut distinguer deux types de CCR selon la voie de carcinogénèse colorectale (MSI ou CIN), présentant chacune des caractéristiques clinico-patologiques et moléculaires différentes (Tableau 4).

Tableau 4 : Deux types de CCR.

| Tumeurs CIN+ | Tumeurs MSI+ |
|---|---|
| Aneuploïde | Diploïde |
| Pertes alléliques 18q, 17p, 22q, 5q, 8p | Pas de pertes alléliques |
| Mutations fréquentes de GST p53 et APC | Mutations rares de GST p53 et APC |
| | Altération des gènes MLH1, MSH2, MSH6, MSH3 |
| Mutations fréquentes KRAS et PI3K | Mutations fréquentes BRAF et PI3K |
| | Mutations R-TGFβ type II, BAX, TCF4, HNF1a |
| Localisation colique gauche | Localisation colique droite |
| Instabilité chromosomique | Instabilité génétique |

4.2.3. Hyperméthylation

Plus récemment, des anomalies de la méthylation de l'ADN ont été mises en évidence dans les tumeurs colorectales. Ces anomalies de la méthylation touchent les cytosines des îlots CpG et entraînent l'inactivation transcriptionnelle des promoteurs qui les contiennent.

La méthylation est un processus de régulation de l'expression des gènes qui est réalisé par des DNA méthyltransférase (DNMT). Celles-ci induisent l'addition enzymatique d'un groupement méthyl sur le carbone 5' d'une cytosine dans un dinucléotide CpG.

40 % du génome humain est constitué de séquences stigmates d'infections répétées au cours de l'évolution par des éléments « parasitaires » tels que les rétrovirus, qui ont ainsi acquis le statut de rétrovirus endogènes humains (HERV). Ces séquences contiennent des CpG qui sont le plus souvent inactivés par méthylation ; ce qui limite leur expression. La plupart des CpG, en dehors des îlots CpG, sont méthylés, et les îlots CpG non méthylés. La méthylation agit comme protectrice du génome.

L'hyperméthylation des cytosines des dinucléotides CpG, notamment dans les îlots riches en CpG situés dans les régions régulatrices, constitue la troisième voie de modification des génomes dans les CCR ; elle est appelée CIMP (CpG island methylator phenotype) et est retrouvée dans 30 à 35 % des CCR. Dans les cellules tumorales, il y a

une méthylation inversée ; l'hyperméthylation des régions promotrices entraîne une inhibition de la transcription des gènes, alors que l'hypométhylation est à l'origine du vieillissement et du processus tumoral par réactivation de transposons, par instabilité chromosomique et par activation de l'expression de proto-oncogènes. Bien que certains îlots CpG soient hyperméthylés, le génome des cellules cancéreuses se caractérise par une hypométhylation génomique globale qui peut avoir plusieurs implications fonctionnelles.

Ce phénotype est caractérisé par un fort taux de méthylation des îlots CpG et par son association majoritaire au phénotype MSI, avec la méthylation du promoteur du gène de réparation de l'ADN, MLH1.

Lorsque certains îlots CpG deviennent méthylés, cela entraîne une répression transcriptionnelle du gène par modification de la structure et de l'accessibilité de l'ADN.

Pour identifier le phénotype CIMP dans les CCR, l'analyse des promoteurs de plusieurs gènes (CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1, CRABP1, MLH1, CDKN2A) peuvent être utilisés. Une étude réalisée par Ogino (Ogino et al., 2007a) a abouti à une classification des CCR en fonction de la fréquence de méthylation des îlots CpG dans le panel étudié, et la distinction des tumeurs Non-CIMP, CIMP-Low, et CIMP-High.

Cliniquement, les tumeurs CIMP+ ont des caractéristiques communes avec les tumeurs MSI-H, elles sont proximales, et ont un faible degré de différenciation. Contrairement aux tumeurs MSI, elles ont un mauvais pronostic. Elles possèdent souvent une mutation BRAF et/ou KRAS. (Tableau 5)

Tableau 5 : Caractéristiques des tumeurs CIMP (Ogino et al., 2007b)

| | Non-CIMP | CIMP-Low | CIMP-High |
|--------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| Localisation | Distal > Proximal | - | Proximal > Distal |
| Sex ratio | Homme = Femme | Homme > Femme | Homme = Femme |
| Mutations : | | | |
| - BRAF | Sauvage | Sauvage | Muté |
| - KRAS | Muté | Muté | Sauvage |
| - PI3K | 70 % | 30 % | 10 % |
| Statut | CIN | CIN | MSI |

La méthylation aberrante est donc également favorable à la mise en place du phénotype « mutateur » des CCR.

Le diagnostic moléculaire est utilisé dans les CCR pour aider au diagnostic des formes héréditaires de type HNPCC et pour prédire la réponse au traitement par anti-EGFR dans les cas avancés de cancer (métastases) (Jass, 2007). Pour tous les CCR primaires, une instabilité des microsatellites est recherchée par PCR. Pour les tumeurs MSI-H, une analyse de la mutation BRAF est réalisée. S'il y a une mutation BRAF, cela oriente vers un CCR sporadique. En revanche, s'il n'y a pas de mutation BRAF, une étude de la méthylation de MLH1 est effectuée, ainsi qu'une étude de l'expression des protéines MSH2, MSH6 et PMS2 en IHC. Pour les CCR à un stade avancé, la recherche de la mutation KRAS est réalisée (Figure 13).

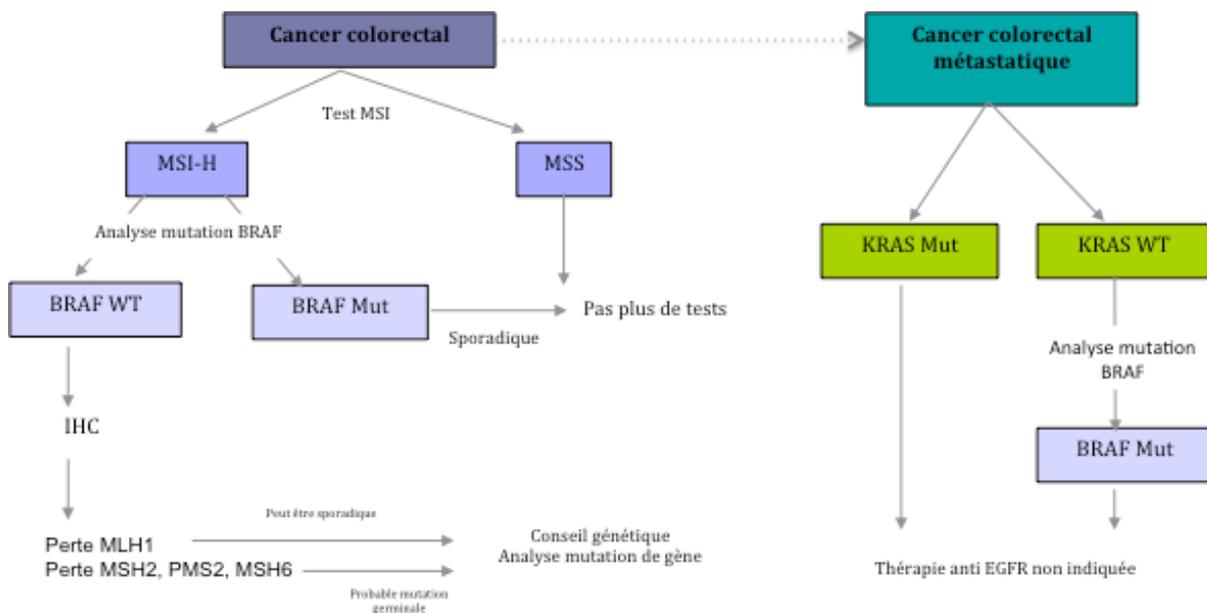


Figure 13 : Algorithme des anomalies moléculaires dans les CCR (Bedeir and Krasinskas, 2011). IHC : immunohistochimie.

Les statuts MSI et CIMP seraient le reflet global des aberrations génomique et épigénomique au sein des cellules tumorales.

4.3. Modèles de carcinogénèse

La compréhension des mécanismes d'instabilité génétique et épigénétique a permis une avancée vers l'individualisation et la caractérisation de sous-groupes de tumeurs colorectales plus homogènes quant à la voie de progression, leur pronostic et leur éventuelle réponse thérapeutique.

4.3.1. *Modèle de Vogelstein*

Le modèle de Vogelstein est le premier modèle de carcinogénèse décrit en 1990 (Fearon and Vogelstein, 1990). Ce modèle linéaire montre une évolution d'un épithélium normal vers un carcinome par accumulation de mutations activatrices d'oncogènes et de mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeur, selon une séquence précise appelée « séquence adénome-carcinome » ; mutations des gènes APC, KRAS et p53. Il a été établi par l'étude moléculaire comparative d'épithéliums normaux, d'adénomes et d'adénocarcinomes, en étudiant la fréquence des altérations moléculaires retrouvées dans les différents groupes.

Ce modèle de carcinogénèse comprendrait quatre étapes (la séquence proposée est illustrative des anomalies les plus fréquentes, l'ordre des événements peut varier) :

- étape 1 : inactivation du gène APC entraînant le développement d'adénome
- étape 2 : mutation KRAS favorisant la croissance de l'adénome
- étape 3 : altération génétique du chromosome 18q permettant la progression tumorale lorsque la perte est biallélique
- étape 4 : inactivation du gène p53 favorisant la transition finale vers le carcinome.

A partir de l'épithélium normal, vont se former des foyers de cryptes aberrantes. Certaines d'entre elles évolueront vers des adénomes, et enfin des carcinomes. Le passage vers chaque stade est associé à des modifications génétiques, les mutations d'APC étant impliquées dans l'initiation de la tumorigénèse (Arends, 2000) (Figure 14).

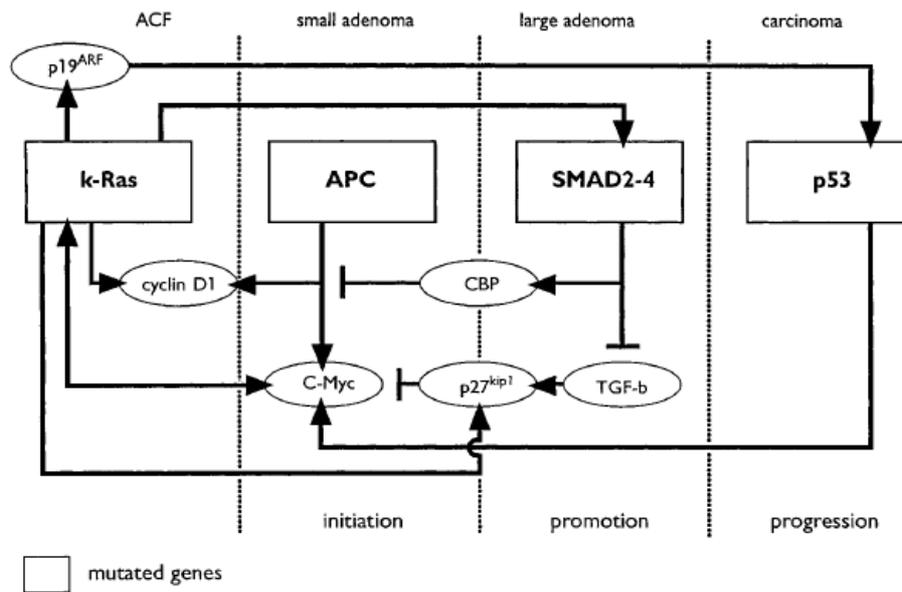


Figure 14 : Les mécanismes moléculaires impliqués dans le modèle de carcinogenèse de Vogelstein (Arends, 2000).

Cependant, moins de 10 % des CCR acquièrent l'ensemble des mutations des gènes APC, KRAS et p53.

La carcinogénèse a par la suite été expliquée par un déséquilibre entre le développement de mutations et les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire. En effet, lorsque les checks points du cycle cellulaire ne sont plus efficaces pour contrôler le taux de mutations, on parle « d'instabilité génomique ». De nombreux évènements moléculaires entraînant des modifications génétiques et épigénétiques, ont été identifiés dans le développement et la progression tumorale des CCR (Figure 15). Trois principales voies contribuant à ce déséquilibre ont été identifiées :

- instabilité chromosomique (CIN)
- instabilité microsatellite (MSI)
- méthylation des îlots CpG (CIMP).

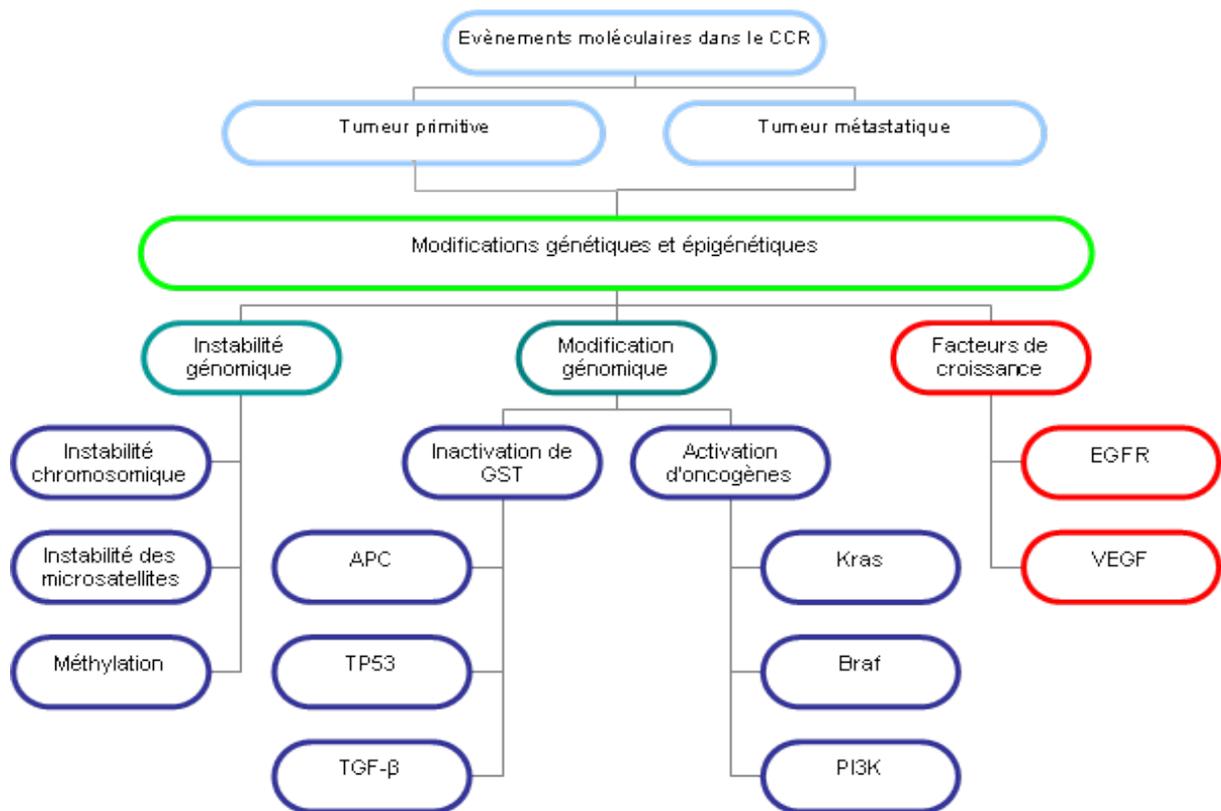


Figure 15 : Evènements moléculaires survenant dans le CCR (Kanthan et al., 2012).

4.3.2. *Modèle d'Ogino*

Des travaux de recherche sur la carcinogénèse colorectale selon la séquence « adénome-carcinome » ont complétés le modèle de Vogelstein en montrant l'implication de deux principales voies de pathogénicité, la voie de l'instabilité chromosomique et la voie de l'instabilité des microsatellites, comportant chacune des anomalies génétiques et épigénétiques jouant un rôle dans la carcinogénèse colorectale (Figure 16).

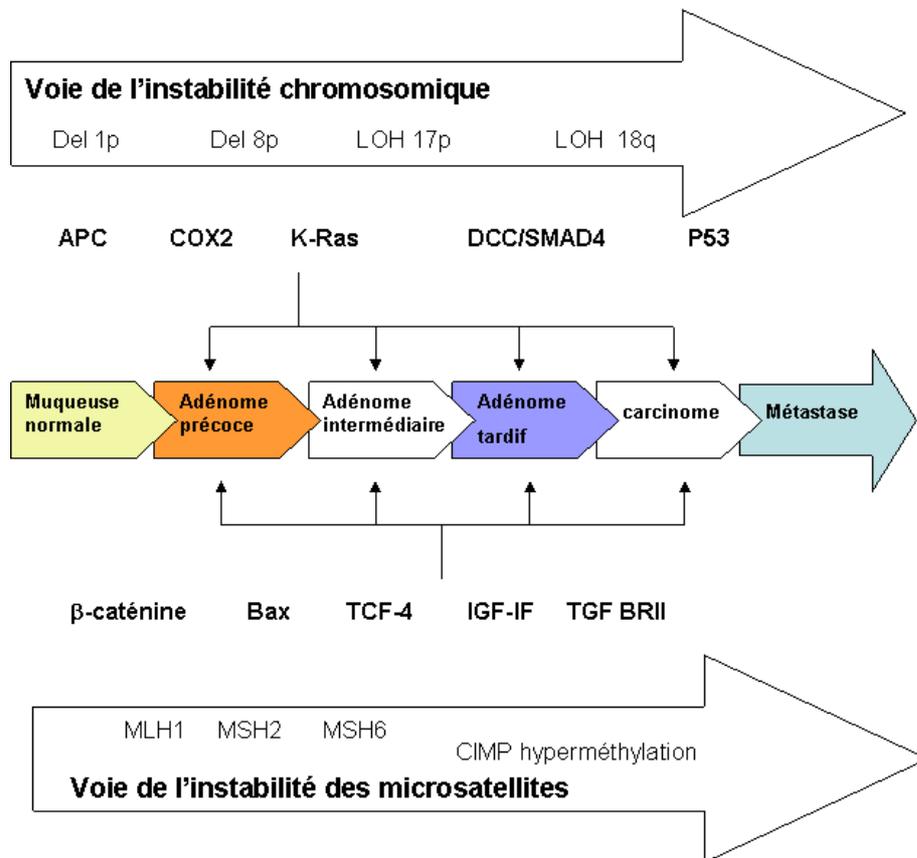


Figure 16 : Modèle de transformation de Vogelstein à Ogino.

Le modèle de carcinogenèse proposé par S. Ogino permet d'établir une classification moléculaire des tumeurs colorectales afin de déterminer le pronostic tumoral, de prédire la résistance ou la réponse à certains traitements (médicamenteux ou chirurgicaux), d'établir la relation entre facteurs étiologiques (mode de vie, environnement, génétique) et sous-types moléculaires (Ogino et al., 2011).

Pour chaque marqueur moléculaire, il est nécessaire de considérer deux points clés. La première question est de savoir si une particularité moléculaire donnée reflète l'ensemble du génome. Par exemple, l'instabilité des microsatellites, l'instabilité chromosomique, la méthylation des îlots CpG, et l'hypométhylation global du génome reflètent l'ensemble des aberrations génomiques ou épigénomiques. La deuxième question est de savoir si une anomalie moléculaire suffit à elle seule à conduire à l'initiation et à la progression tumorale, ou si elle est simplement liée à d'autres événements moléculaires.

Ogino propose de classer les tumeurs colorectales en six sous-types moléculaires en fonction des statuts MSI et CIMP (Ogino and Goel, 2008) (Tableau 6) :

- Groupe 1 : MSI-H CIMP-High (10 %).

Ce groupe de tumeurs montre une méthylation du promoteur MLH1, une mutation BRAF, une absence d'instabilité chromosomique, une TP53 *wild type* (wt), une expression de p21 intacte, une faible différenciation, une réaction lymphocytaire, et un sous-type histologique mucineux. Cliniquement, il s'agit de CCR sporadiques, de localisation colique proximale, touchant plutôt les femmes, et associés à un meilleur pronostic.

- Groupe 2 : MSI-H CIMP-Low (5 %).

Ce groupe de tumeurs inclut les tumeurs HNPCC. Il est associé à une mutation KRAS, une absence d'instabilité chromosomique, une TP53 wt, une localisation colique proximale, une réaction lymphocytaire, un aspect mucineux, et une faible différenciation.

- Groupe 3 : MSI-L/MSS CIMP-High (5 à 10 %).

Ce groupe de tumeurs est associé à une mutation BRAF, une absence d'instabilité chromosomique, une p53 wt, une faible différenciation, une localisation colique droite, à un mauvais pronostic, et touche plutôt les femmes.

- Groupe 4 : MSI-L CIMP- Low (~ 5 %).

Ce groupe de tumeurs est associé à une méthylation de MGMT et à une mutation KRAS.

- Groupe 5 : MSS CIMP- Low (30 à 35 %).

Ce groupe de tumeurs est associé à une mutation KRAS, une absence d'instabilité chromosomique, et touche plutôt les hommes.

- Groupe 6 : MSI-L/MSS CIMP-0 (~ 40 %).

Ce groupe de tumeurs est associé à une instabilité chromosomique, BRAF wt, KRAS wt, touche le colon distal, et ne montre pas de différence entre les deux sexes.

Tableau 6 : Classification des CCR en six groupes d'après Ogino, en fonction des statuts MSI et CIMP.

| | Groupe 1 | Groupe 2 | Groupe 3 | Groupe 4 | Groupe 5 | Groupe 6 |
|---------------------------|-----------|----------|-------------|----------|-----------|-----------|
| % | 10 | 5 % | 5 à 10 % | ~ 5 % | 30 à 35 % | ~ 40 % |
| Phénotype : | | | | | | |
| - MSI | MSI-H | MSI-H | MSI-L/MSS | MSI-L | MSS | MSI-L/MSS |
| - CIN | - | - | - | - | - | + |
| - CIMP | CIMP-High | CIMP-Low | CIMP-High | CIMP-Low | CIMP-Low | CIMP-O |
| Mutations : | | | | | | |
| - BRAF | Muté | | Muté | | | Sauvage |
| - KRAS | | Muté | | Muté | Muté | Sauvage |
| - TP53 | Sauvage | Sauvage | Sauvage | | | |
| Clinico-pathologiques : | | | | | | |
| - localisation | | | | | | |
| - sex ratio | Proximal | Proximal | Colon droit | | | Distal |
| - différenciation | Femmes | | Femmes | | Hommes | = |
| - infiltrat lymphocytaire | Faible | Faible | Faible | | | |
| - aspect mucineux | + | + | | | | |
| | + | + | | | | |

Une autre étude (Jass, 2007) propose une classification moléculaire des tumeurs colorectales en cinq groupes, basée sur les phénotypes CIMP et MSI (Figure 17).

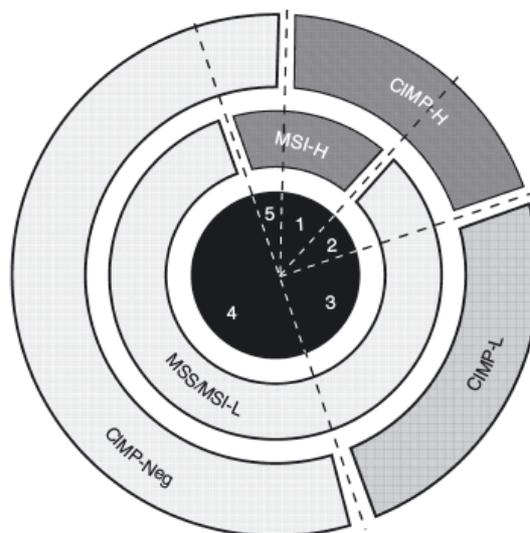


Figure 17 : Dérivation des groupes moléculaires de CCR 1 à 5, basés sur le phénotype CIMP (statuts H : High, L : Low, Neg : Negative) et sur le phénotype MSI (H : High, L : Low, S : Stable) (Jass, 2007)

Chaque groupe présente des caractéristiques moléculaires et clinico-pathologiques particulières (Tableau 7). Le groupe 1 correspondrait aux CCR sporadiques, alors que le groupe 5 correspondrait au syndrome de Lynch. Le groupe 1 représenterait 12 % des CCR, le groupe 2 8 %, le groupe 3 20 %, le groupe 4 57 %, et le groupe 5 3 % (Jass, 2007).

Tableau 7 : Caractéristiques moléculaires, cliniques et anatomopathologiques des 5 groupes de CCR.
Dip : diploïdie ; An : aneuploïdie ; D : droit ; G : gauche ; H : homme ; F : femme

| Caractéristiques | Groupe 1 | Groupe 2 | Groupe 3 | Groupe 4 | Groupe 5 |
|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Statut MSI | H | S/L | S/L | S | H |
| Methylation | +++ | +++ | ++ | +/- | +/- |
| Ploïdie | Dip > An | Dip > An | An > Dip | An > Dip | Dip > An |
| APC | +/- | +/- | + | +++ | ++ |
| KRAS | - | + | +++ | ++ | ++ |
| BRAF | +++ | ++ | - | - | - |
| TP53 | - | + | ++ | +++ | + |
| Localisation | D > G | D > G | G > D | G > D | D > G |
| Sexe | F > H | F > H | H > F | H > F | H > F |
| Type histologique mucineux | +++ | +++ | + | + | ++ |
| Nécrose | + | + | ? | +++ | + |
| Faible différenciation | +++ | +++ | + | + | ++ |
| Invasion | +++ | + | ? | ++ | ++ |
| Tumour budding | +/- | + | ? | +++ | + |
| Lymphocytes | +++ | + | ? | + | +++ |

4.4. Prédispositions héréditaires au cancer colorectal

Qu'elles soient héréditaires (HNPCC) ou sporadiques, les tumeurs MSI sont toutes déficientes dans le système MMR, consécutivement à l'inactivation bi-allélique d'un des gènes majeurs du système (Figure 18).

Les altérations concernent des gènes du système MMR, des gènes cibles d'instabilité ou des gènes ne contenant pas de répétitions codantes. Les tumeurs MSI sporadiques et héréditaires ont des altérations différentes des gènes du système MMR et des gènes sans répétitions codantes. Par contre, les altérations des gènes cibles d'instabilité sont les mêmes dans les deux cas. Les altérations du système MMR sont précoces dans le développement tumoral MSI. L'ordre de survenue et le rôle des autres altérations au cours du développement tumoral ne sont pas connus.

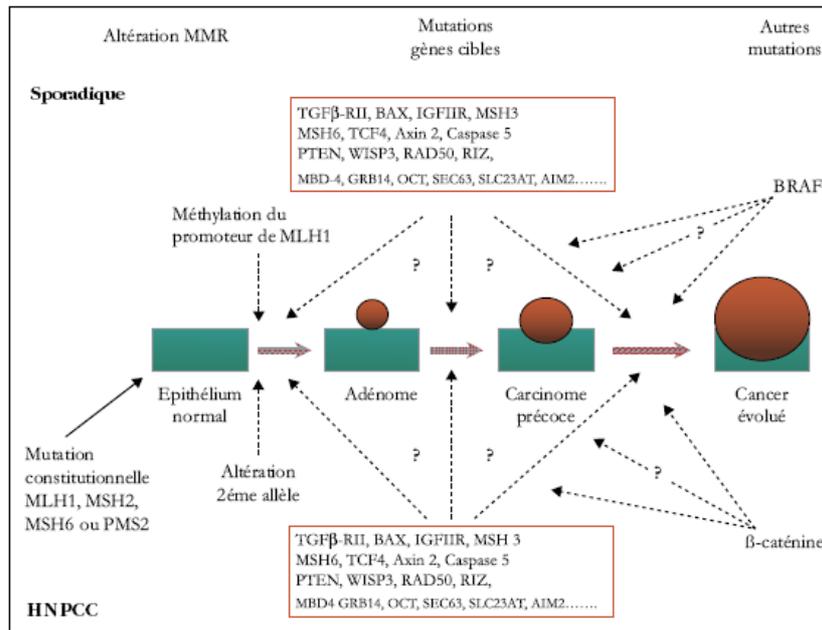


Figure 18 : Altérations génétiques et épigénétiques des CCR MSI (Hamelin et al., 2008).

4.4.1. HNPCC (Human Non-Polyposis Colorectal Cancer)

En 1966, Henry Lynch décrit des familles ayant développé à un âge jeune des CCR sans polypes, associés à des cancers de l'endomètre, et des cancers gastriques. Ces syndromes de cancers familiaux ont par la suite été désignés sous le nom Human Non-Polyposis Colorectal Cancer.

Le syndrome de Lynch ou HNPCC est une prédisposition héréditaire au cancer qui se transmet selon un mode autosomique dominant, définie cliniquement par les critères d'Amsterdam II (Figure 19). Il s'agit de la forme la plus commune des CCR héréditaires. Il représente 1 à 6 % des CCR (Søreide et al., 2009).

- AMSTERDAM (tous les critères) :**
- Au moins 3 sujets atteints de cancers du spectre HNPCC restreint
 - Au moins 1 sujet est parent au 1er degré avec 2 autres
 - Au moins 2 générations successives
 - Au moins 1 cas < 50 ans
 - PAF exclue

Figure 19 : Critères d'Amsterdam II (1999).

Au plan moléculaire, les tumeurs HNPCC sont le plus souvent la conséquence d'une altération constitutionnelle d'un gène MMR, associée à un phénotype des cellules tumorales appelé MSI. Les gènes du MMR en cause, sont MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2. (Tableau 8)

Tableau 8 : Caractéristiques de l'HNPCC (Søreide et al., 2009).

| | |
|-------------------------------|--|
| Mode de transmission | Autosomique dominant |
| Incidence | 1 : 2 000 |
| Gène | Altération du système MMR, au moins 5 gènes différents |
| Polypes coliques | Peu ou pas |
| Risque de CCR | 80 % à l'âge de 70 ans, moyenne d'âge de CCR ~ 44 ans |
| Localisation | Colon droit |
| Cancers extra-coliques | Estomac, endomètre, petit intestin, rein, urétéral |
| Clinique | Critères d'Amsterdam II |
| Surveillance | Absence de consensus, coloscopie tous les ans. Screening des cancers de l'endomètre |
| Traitement | En fonction de la localisation tumorale, colectomie totale ou subtotale. Surveillance |

4.4.2. Les polyposes

On parle de polypose lorsqu'il existe plus de dix polypes.

4.4.2.1. Polyadénomatoze familiale

La polyadénomatoze familiale (PAF) est une affection héréditaire rare à transmission autosomique dominante, causée par une délétion chromosomique sur le chromosome 5. C'est la moins rare des polyposes, son incidence est d'environ 1/10 000 habitants. Elle est caractérisée par le développement de nombreux polypes dans la paroi interne du colon et du rectum dès l'adolescence. Elle peut également atteindre l'estomac et le duodénum. Les critères diagnostiques sont résumés dans la Figure 20.

1. > 100 polypes
2. ou présence d'une mutation germinale du gène APC
3. ou un antécédent familial de PAF et le diagnostic d'un nombre quelconque d'adénomes, quelque soit l'âge du sujet

Figure 20 : Critères diagnostiques de la PAF.

Sur le plan moléculaire, deux gènes sont impliqués dans la PAF : le gène APC et le gène MYH. Elle est due à des mutations germinales du gène APC (Figure 21).

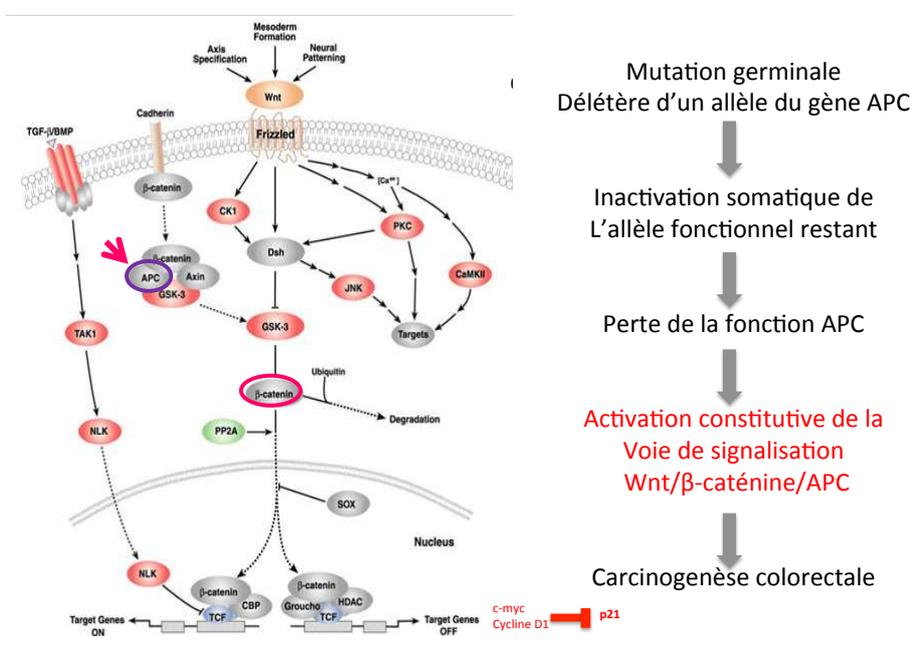


Figure 21 : Base moléculaire de la PAF associée au gène APC.

Le risque de développer un cancer en absence de traitement est de 100 % (Tableau 9).

Tableau 9 : Caractéristiques de la PAF (Søreide et al., 2009).

| | |
|-------------------------------|--|
| Mode de transmission | Autosomique dominant, mais 1/3 est une nouvelle mutation spontanée |
| Incidence | 1 : 10 000-1 : 18 000 |
| Gène | Mutation du gène APC, avec une pénétrance de 100 % |
| Polypes coliques | 100 à 1 000 polypes adénomateux au niveau du colon et du rectum, survenant pendant l'adolescence |
| Risque de CCR | 100 % à l'âge de 35-45 ans |
| Localisation | 70-80 % au niveau du colon gauche |
| Cancers extra-coliques | Cancer du petit intestin, tumeurs desmoïdes, cancer thyroïdien, cancer péri-ampullaire |
| Clinique | Critères d'Amsterdam |
| Surveillance | Endoscopie |
| Traitement | Ablation des polypes |

4.4.2.2. Polyposes hamartomateuses

L'hamartome correspond à du tissu normal en position anormale, c'est-à-dire la présence de glandes épithéliales, parfois kystiques, de chorion, et de muscle lisse.

On distingue trois polyposes hamartomateuses : la polypose juvénile, le syndrome de Peutz-Jeghers et le syndrome de Cowden.

La polypose juvénile est une polypose hamartomateuse rare ; l'incidence est de 1/100 000 naissances en Europe et aux USA. Elle est définie par la présence de trois polypes juvéniles au moins, associée à une polypose diffuse gastro-intestinale ou un nombre indifférent de polypes juvéniles dans une famille. Le diagnostic est souvent fait vers l'âge de 18, 5 ans Les principales manifestations cliniques sont les rectorragies. L'examen histologique des polypes est déterminant pour le diagnostic : présence de *lamina propria* abondante avec cellules mononuclées, sans arborisation importante de muscle lisse, et présence de glandes kystiques remplies de mucus, alors que l'épithélium est souvent normal.

Deux gènes ont été identifiés dans la polypose juvénile : SMAD4 (dans 50 % des cas) et BMPR1A. Les anomalies génétiques retrouvées au niveau des ces gènes sont soit des mutations ponctuelles, soit de larges délétions.

La prise en charge est une surveillance endoscopique, puis soit une résection des polypes, soit un colectomie en fonction du nombre de polypes et du rapport bénéfice/risque pour le patient.

Le syndrome de Peutz-Jeghers est un syndrome rare (1 personne sur 150 000 aux USA et en Europe). Le diagnostic repose sur la recherche d'une lentiginose caractéristique (tâches brun sépia de 1 à 5 mm de diamètre, apparaissant précocement dans l'enfance et disparaissant pendant l'adolescence, correspondant à une accumulation de pigment mélanique dans la membrane basale de l'épiderme), localisée au bord des lèvres (94 %), sur la muqueuse buccale (66 %), les mains (74 %) et les pieds (62 %). La polypose est prédominante au niveau de l'intestin grêle. L'âge moyen du diagnostic est de 23 ans chez les hommes et de 26 ans chez les femmes. Elle commence par une invagination intestinale aiguë avec des conséquences plus ou moins graves (occlusion intestinale, ischémie, nécrose, et perforation). Les hamartomes (environ 16 %) sont le siège de lésions dysplasiques correspondant au développement des adénomes (lésions pré-cancéreuses). Le risque de développement d'un CCR est de 25-50 %.

Le syndrome de Cowden est un syndrome rare (1/200 000 naissances) dont le principal diagnostic différentiel est la polypose juvénile. Sur le plan clinique, des hamartomes sont retrouvés dans de nombreux organes, notamment le tractus gastro-intestinal, ainsi qu'une anomalie cutanée appelée trichilemmome est retrouvée dans presque 100 % des cas. Les individus atteints ont un risque majoré de développer des tumeurs de la thyroïde, de l'endomètre, de la glande mammaire, et de la peau. Chez une proportion variable de patients atteints de ce syndrome, il a été trouvé des mutations de la lignée germinale du gène PTEN.

4.4.2.3. Polyposes hyperplasiques et festonnées

Le syndrome de polypose hyperplasique est défini selon la classification de WHO, par des critères de nombre et de taille des polypes à l'endoscopie ; présence d'au moins 5 polypes hyperplasiques en amont du colon sigmoïde (dont 2 > 1 cm) ou de 30 polypes hyperplasiques sans localisation préférentielle. La fréquence de ce syndrome n'est pas établie.

La prise en charge est empirique ; surveillance endoscopique, colectomie, ...

L'ensemble des caractéristiques des polyposes héréditaires est résumé dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Récapitulatif des caractéristiques des polyposes avec prédisposition héréditaire.

| Forme clinique | Gènes impliqués | Transmission | Fréquence | Histologie des polypes | Risque de cancer (pénétrance) |
|---------------------------|-----------------|----------------------|-------------|------------------------|-------------------------------|
| PAF | APC MYH | Autosomique dominant | 1 : 10 000 | adénomateux | 100 % |
| HNPCC | MMR | Autosomique dominant | 1 : 2 000 | adénomateux | 70 % |
| Polypose juvénile | SMAD4 BMPR1A | Autosomique dominant | 1 : 100 000 | hamartomateux | 10 à 20 % |
| Syndrome de Peutz-Jeghers | | Autosomique dominant | 1 : 150 000 | hamartomateux | 25 à 50 % |
| Polypose hyperplasique | ? | ? | ? | festonnés | ? |
| Syndrome de Cowden | PTEN | Autosomique dominant | 1 : 200 000 | hamartomateux | faible |

Le CCR peut être causé par des anomalies génétiques qui vont interrompre les fonctions des « gatekeeper », « caretaker », ou « landscaper » dans le colon.

Cancer colorectal sporadique. La probabilité qu'une cellule épithéliale acquière les modifications génétiques conduisant à la formation de polypes adénomateux est faible. Une fraction de ces tumeurs bénignes (polypes adénomateux) évolue vers un carcinome. Le risque de CCR est de 5 %.

PAF. Chez les patients atteints de PAF, il existe une anomalie héréditaire au niveau du gène APC conduisant au développement de centaines de polypes adénomateux. En raison de leur grand nombre, certains polypes sont pratiquement assurés d'évoluer vers un CCR. Le risque de CCR est > 95 %.

HNPCC. Les patients atteints d'HNPCC développent des polypes adénomateux au même rythme que la population générale, mais ces polypes évoluent beaucoup plus souvent vers un CCR en raison d'un défaut du système de réparation des mésappariements qui se traduit par une augmentation du taux de mutations. Le risque de CCR est de 70 %.

Polypose juvénile (JPS) et la colite ulcéreuse (UC). Les patients atteints du syndrome de polypose familiale et de colite ulcéreuse développent des polypes hamartomateux dans lesquels il y a prolifération d'une population de cellules

défectueuses dérivant du stroma. Par conséquent, les cellules épithéliales associées aux polypes sont susceptibles de subir une transformation néoplasique suite à un micro-environnement anormal. De même, les cellules épithéliales associées au processus inflammatoire de la colite ulcéreuse, ont un risque augmenté de transformation néoplasique. Le risque de CCR est de 10 à 20 % (Figure 22).

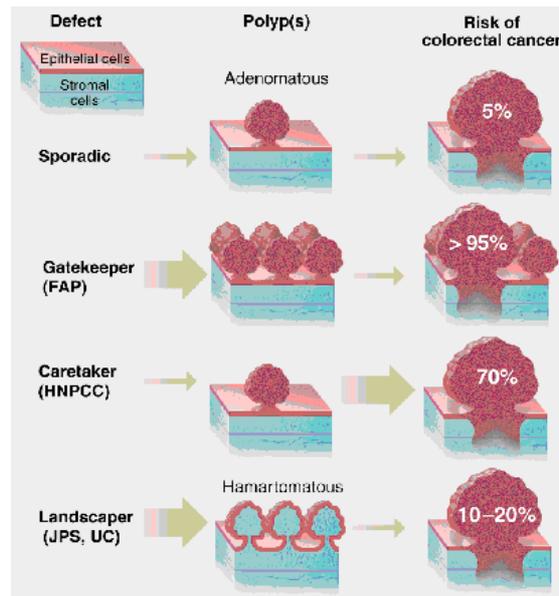


Figure 22 : Risque de transformation des polypes en adénocarcinome selon qu'il s'agisse de tumeur sporadique ou héréditaires (Kinzler and Vogelstein, 1998).

4.5. Infiltration lymphocytaire intra-tumorale

L'infiltrat lymphocytaire tumoral est un marqueur pronostique des CCR. Cependant, ce paramètre n'intervient pas dans les décisions de traitement adjuvant par manque de technique permettant une évaluation automatisée et reproductible de l'infiltrat lymphocytaire.

L'adaptation du système immunitaire semble jouer un rôle important dans la suppression de la progression tumorale. L'infiltration lymphocytaire intra-tumorale serait un indicateur de réponse immunitaire de l'hôte face à la tumeur et une cible immuno-thérapeutique attractive. Une forte réaction immunitaire observée en intra-tumoral ou au niveau de la zone marginale de la tumeur est associée à un bon pronostic qu'il y ait ou non une atteinte ganglionnaire ; alors qu'une faible réaction immunitaire observée en intra-tumoral ou au sein de la zone marginale de la tumeur est associée à un

mauvais pronostic qu'il y ait ou non une atteinte ganglionnaire, et cela même chez les patients avec une faible invasion tumorale (Pagès et al., 2008) (Figure 23).

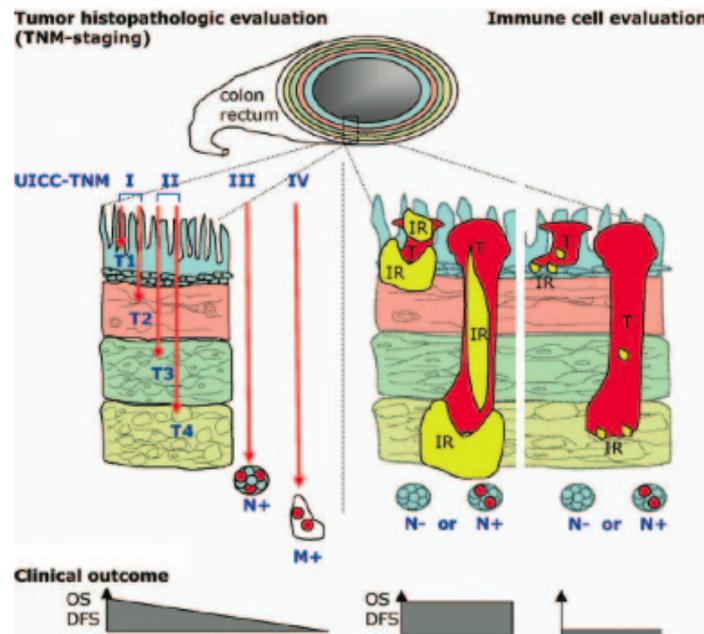


Figure 23 : Classification TNM (à gauche). T : tumeur primaire, IR : réaction immunitaire, OS : survie globale, DFS : disease free survival (à droite)(Pagès et al., 2008).

Le CD3 caractérise les lymphocytes T. Deux sous-populations lymphocytaires T se distinguent par leur CD : les CD4+ sont les lymphocytes T auxiliaires et les CD8+ les lymphocytes T cytotoxiques. D'autres marqueurs sont indispensables à l'activation du lymphocytes T : CD2 et CD28. Après une stimulation antigénique, les lymphocytes expriment des marqueurs d'activation (CD25, CD69, ...). Certains des ces lymphocytes activés deviennent des lymphocytes mémoires caractérisés par l'expression de CD45RO alors que les lymphocytes non stimulés par un antigène sont dit naïfs et expriment CD45RA. Une sous-population régule l'activation des lymphocytes T, ce sont les régulateurs qui expriment fortement CD25. Les lymphocytes cytotoxiques Natural Killer expriment CD56 et CD57. (Figure 24)

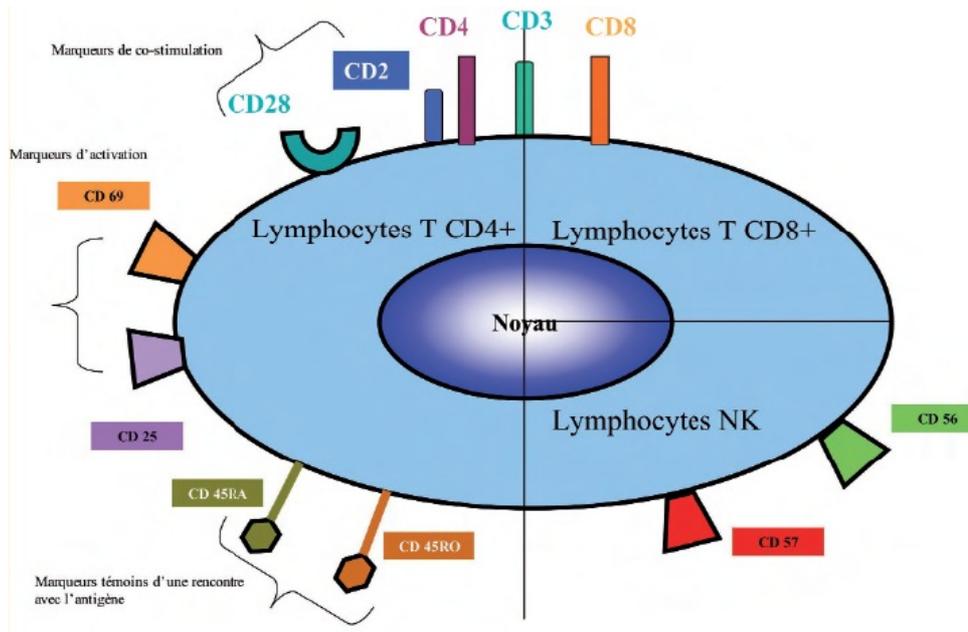


Figure 24 : Les marqueurs de différenciation ou « clusters of differentiation » des lymphocytes T.

L'infiltration lymphocytaire intra-tumorale serait associée à des altérations moléculaires spécifiques. En effet, plusieurs études ont montré que l'infiltration lymphocytaire était associée à une instabilité des microsatellites dans les CCR. La production de peptides tronqués induite par les mutations due à cette instabilité des microsatellites pourrait être immunogène et contribuer à la réponse immunitaire de l'hôte en recrutant les lymphocytes CD45RO+. Une forte infiltration lymphocytaire intra-tumorale CD45RO+ serait corrélée avec une meilleure issue clinique. Les patients avec une tumeur colorectale ayant une forte densité intra-tumorale de CD45RO+ ont une survie globale et sans événement plus longue que les patients avec une tumeur ayant une faible densité intra-tumorale de CD45RO+. Les patients avec une tumeur colorectale ayant une forte densité intra-tumorale de CD45RO+ ont une médiane de survie sans événement de 36.5 mois et une médiane de survie globale de 53.2 mois, comparée respectivement à 11.1 mois et 20.6 mois pour les patients avec une tumeur ayant une faible densité intra-tumorale de CD45RO+. Les taux de survie globale et sans événement à 5 ans sont respectivement de 46.3 % et 43.1 % chez les patients avec une tumeur ayant une forte densité intra-tumorale de CD45RO+, comparés à 23.7 % et 21.5 % chez les patients avec une tumeur ayant une faible densité intra-tumorale de CD45RO+ (Figure 25) (Jass, 2007).

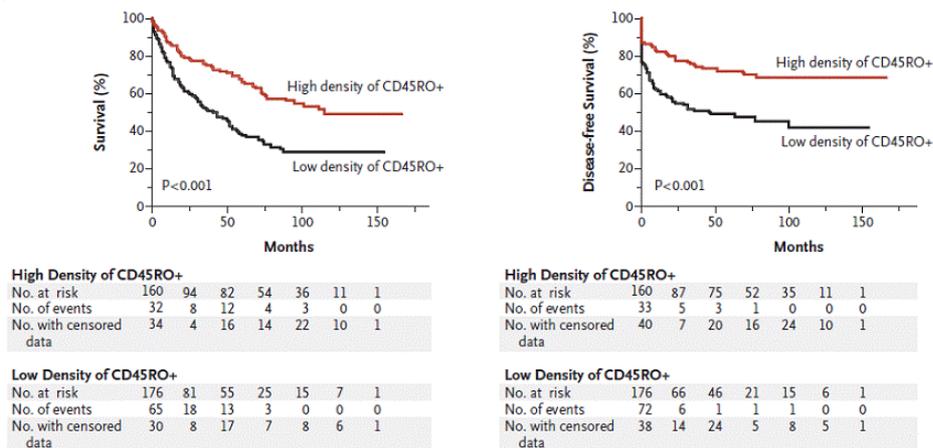


Figure 25 : Courbes de Kaplan-Meier de survie globale et de survie sans événement ayant des tumeurs en fonction de la densité de cellules CD45RO+(Jass, 2007).

Cependant, il y a peu d'études montrant une corrélation entre l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale et d'autres altérations moléculaires telles que le phénotype CIMP, hypométhylation globale de l'ADN, et les mutations KRAS, BRAF, et PI3K.

4.6. HLA-G

La molécule HLA-G (Human Leucocyte Antigen-G) est une molécule HLA de classe I non classique (il diffère des molécules HLA de classe I par sa diversité génétique, sa structure, son expression et ses fonctions) présentant un polymorphisme moindre et une expression dans les tissus sains restreinte aux tissus fœtaux tels que les cellules amniotiques, les précurseurs érythropoïétiques, et le trophoblaste, et à certains organes tels que la cornée, le thymus, les îlots pancréatiques, les précurseurs des cellules endothéliales. Certaines cellules telles que les cellules dendritiques ou les macrophages peuvent aussi exprimer le HLA-G. Son expression peut être induite au cours de certaines pathologies, comme les cancers, les pathologies inflammatoires, les infections virales, ... La molécule HLA-G a initialement été décrite comme une molécule sélectivement exprimée au cours de la grossesse par le tissu trophoblastique. Le gène HLA-G est situé sur le bras court du chromosome 6.

HLA-G présente des propriétés d'induction d'une immunotolérance en inhibant l'activité cytolytique des cellules natural killer (NK) et conduit également à l'inhibition

Le gène HLA-G est organisé en 8 exons séparés par 7 introns et comprend une extrémité 3' non traduite. Il est transcrit en sept ARNm différents du fait d'un épissage alternatif, qui génère sept protéines différentes dont quatre sont ancrées dans la membrane cellulaire et trois sont produites sous forme de protéines solubles sécrétées par la cellule.

Un certain nombre de polymorphismes de HLA-G ont été identifiés. Le polymorphisme d'une séquence insertion/délétion de 14pb dans l'exon 8, extrémité 3' UTR du gène HLA-G, semble être associé avec la stabilité des ARNm (Hviid et al., 2003; Larsen and Hviid, 2009). Ce polymorphisme affecte l'expression du gène HLA-G avec une perte fonctionnelle. Le polymorphisme 14 del (-) est associé une stabilité des ARNm et une augmentation de l'expression de HLA-G. De ce fait, la présence de la forme +/+ de ce polymorphisme à l'état homozygote va entraîner une altération du taux et de la stabilité de l'ARNm de HLA-G et de l'expression de la protéine soluble par les cellules mononucléaires du sang périphérique (Djurisic et al., 2012).

Les propriétés inhibitrices de HLA-G à l'encontre des cellules immunitaires pourraient être sélectionnées par les tumeurs, qui par expression de cette molécule, échapperaient à l'élimination par le système immunitaire. En effet, HLA-G exprimée par les cellules tumorales permet à ces dernières d'échapper à la destruction immunitaire en inhibant la fonction des cellules immunocompétentes infiltrantes telles que les cellules NK, CTL, et APC via l'interaction avec leurs récepteurs inhibiteurs de surface.

HLA-G peut être exprimée à la surface des cellules tumorales ou sécrétées sous forme soluble, ou encore être incluse dans des vésicules d'exosomes sécrétées par la tumeur. Mais son expression ne concerne pas uniquement les cellules tumorales, elle est également retrouvée dans les cellules immunitaires infiltrant la tumeur, préférentiellement les cellules présentatrices de l'antigène.

L'état homozygote 14 -/- est associé à une stabilité des ARNm et à l'augmentation de l'expression de HLA-G.

4.7. c-MET

c-MET est un gène localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q 21-31) qui code un récepteur « à activité tyrosine kinase » du même nom, dont le ligand est l'hépatocyte growth factor (HGF). c-MET est l'initiateur d'une signalisation intracellulaire complexe qui intervient dans la prolifération et la résistance à l'apoptose, la mobilité, l'invasion, et l'angiogénèse. Il a récemment été identifié comme une cible thérapeutique dans plusieurs cancers humains (Sierra and Tsao, 2011). Particulièrement impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse, c-MET active notamment la prolifération cellulaire (activation de la voie des MAP kinases), la survie cellulaire (voie PI3K/AKT/mTOR), et la mobilité cellulaire (activité sur le cytosquelette d'actine). La voie HGF/MET peut être altérée par différents mécanismes, comme la surexpression d'HGF et/ou de MET, ou par mutation ou amplification du gène c-MET. L'amplification du gène c-MET est associée à un mauvais pronostic (Di Renzo et al., 1995). HGF est un puissant mitogène pour les cellules épithéliales et favorise la progression et l'invasion tumorale.

5. Thérapeutique et prise en charge du cancer colorectal

La prise en charge thérapeutique doit être définie en accord avec le patient et le médecin traitant, et basée sur l'avis de la réunion de concertation pluridisciplinaire. Les options thérapeutiques sont établies en fonction du stade tumoral.

5.1. Critères d'opérabilité et de résecabilité

La résecabilité d'une tumeur est conditionnée par l'extension locale (T) et métastatique (M).

5.2. Traitement chirurgical

Le principe du traitement chirurgical repose sur l'exérèse de la tumeur avec une marge distale et proximale d'au minimum 5cm.

On distingue différents types de résection selon la localisation tumorale :

- Colon droit : hémi-colectomie droite avec anastomose iléo-transverse
- Sigmoides et colon gauche : colectomie segmentaire ou hémi-colectomie gauche et anastomose colorectale
- Jonction recto-sigmoïdienne avec anastomose colorectale
- Pour les formes héréditaires : recommandations INCa

5.3. Traitement endoscopique

La résection endoscopique d'un cancer in situ ou intra-muqueux peut être un traitement suffisant.

Pour les lésions avec des foyers de carcinomes sous-muqueux, la résection endoscopique est considérée comme suffisante uniquement s'il y a un envahissement sous-muqueux superficiel et si la pièce de polypectomie rassemble les critères suivants :

- Des limites de résection saines
- L'absence de foyers de carcinomes indifférenciés
- L'absence d'embolies vasculaire ou lymphatique
- Une marge de sécurité > 1mm

5.4. Chimiothérapie

Les protocoles de chimiothérapie utilisés dans le traitement du cancer colorectal, associent principalement :

- pour les stades non métastatiques : le 5-fluoro-uracile, l'oxaliplatine, l'irinotecan, la capécitabine, la leucovorine (acide folinique), la mitomycine C ;
- pour les stades métastatiques : l'oxaliplatine, l'irinotecan, le 5-fluoro-uracile, la leucovorine (acide folinique), la capécitabine, le raltitrexed, l'uracile-tegafur, la mitomycine C ainsi que des traitements ciblés tels que le cétuximab, le panitumab et le bévacizumab (aucun facteur prédictif de réponse n'a été identifié pour cette molécule).

5.5. Anticorps monoclonaux

Le traitement du CCR métastatique a évolué ces dernières années avec le développement de molécules dites « ciblées » telles que les anticorps monoclonaux dirigés contre le VEGF ou le récepteur à l'EGF. Les deux principaux anticorps monoclonaux anti-EGFR utilisés sont le cetuximab et le panitumumab. Ce sont des antagonistes qui inhibent les voies d'activation liées à l'EGFR impliquées dans la division cellulaire, l'angiogénèse, la diffusion métastatique, et une inhibition de l'apoptose. Une mutation somatique de KRAS constitue un facteur de résistance au traitement par cetuximab ou par panitumumab.

5.6. Traitement selon le stade clinique

Stade I : La chirurgie seule suffit.

Stade II : En cas de statut MSI ou l'absence de facteurs de mauvais pronostic reconnus, aucune chimiothérapie.

En cas de facteurs de mauvais pronostic (T4, nombre de ganglions examinés < 12, tumeur peu différenciée, invasion veineuse périlymphatique ou nerveuse, perforation ou occlusion) pour les tumeurs MSS, il n'y a pas de références. Une chimiothérapie peut être proposée aux patients ne présentant pas de comorbidités.

Stade III: Une chimiothérapie post-opératoire (avant le 42^{ème} jour post-opératoire), FOLFOX4 (oxaliplatine + acide folinique + 5FU) ou XELOX (oxaliplatine + capécitabine), peut être administrée pendant 6 mois. Chez les sujets de plus de 70 ans, une monochimiothérapie par fluoropyrimidine est recommandée.

5.7. Surveillance

Après un traitement curatif, chez les patients pouvant supporter une ré-intervention ou une chimiothérapie, il est recommandé de réaliser :

- Un examen clinique tous les 3 mois pendant 3 ans, puis tous les 6 mois pendant 2 ans.
- Une échographie abdominale ou scanner tous les 3 à 6 mois pendant 3 ans, puis tous les 6 mois pendant 2 ans.
- Une radiographie pulmonaire ou scanner thoracique annuel pendant 5 ans.
- Une coloscopie selon les recommandations de pratique clinique : en cas d'antécédent personnel de CCR :
 - Si incomplète ou de mauvaise qualité avant l'intervention à faire dans les 6 mois post-opératoire, puis tous les 2-3 ans, puis tous les 5 ans, si elle est normale.
 - Si complète et de bonne qualité en pré-opératoire, elle est refaite à 2-3 ans, puis à 5 ans si elle est normale.
 - Après 3 coloscopies normales, le rythme de surveillance est espacé.
 - Si syndrome de Lynch : contrôle tous les 1 à 2 ans avec chromoscopie par indigo-carmin à partir de l'âge de 20 ans.
 - Si PAF : contrôle endoscopique avec chromoendoscopie du réservoir après anastomose iléo-anale tous les 2 ans (1 fois par an en cas d'anastomose iléo-rectale).
 - Si polypose MYH : contrôle endoscopique avec chromoendoscopie annuel du rectum restant.
- Le dosage de l'ACE tous les 3 mois les 3 premières années avec bilan en cas d'élévation initiale.

- Un TEP scan : la TEP-FDG est indiquée pour la localisation des récurrences en cas d'élévation confirmée de l'ACE chez un patient déjà opéré d'un CCR sans cible visible sur les examens standards.

5.8. Survie

Le cancer colorectal est un cancer de bon pronostic lorsqu'il est diagnostiqué à un stade précoce : la survie relative à 5 ans est de 91 % pour les stades localisés, de 70 % pour les stades avec un envahissement locorégional. En revanche, la survie à 5 ans est environ 11 % dans les situations métastatiques qui représentent 25 % des patients lors du diagnostic. Tous stades confondus, le taux de survie à 5 ans est de 56 %.

6. Objectifs de notre travail

Le génome des eucaryotes est composé d'un nombre important de séquences de « parasites génétiques ». Certaines ont la capacité de se dupliquer et de se déplacer au sein de l'ADN dans lequel ils se trouvent. Ces éléments génétiques sont regroupés, chez les eucaryotes, en quatre classes principales : les transposons à ADN, les rétroposons sans LTR (long terminal repeat), les rétroposons à LTR, et les rétrovirus endogènes (ERV). Actuellement chez les mammifères, les seuls éléments mobiles caractérisés sont les rétroposons sans LTR et les ERV.

Les rétrovirus endogènes humains (HERV) représentent 8 à 10 % du génome humain. Ils se sont développés au cours de l'évolution par intégration dans la lignée germinale de rétrovirus exogènes. Ils dérivent de virus répliatifs qui se composent habituellement de 4 gènes qui sont exprimés sous le contrôle de la séquence terminale répétée longue (LTR) : le gène *gag* codant la matrice, la capsid, la nucléocapside et des protéines à fonction enzymatique, le gène *pro* codant une protéase virale et *pol* codant une reverse transcriptase et une protéine intégrase qui sont impliquées dans les processus d'intégration et de réplication des rétrovirus, le gène *env* codant l'enveloppe virale, ainsi que de séquences régulatrices rétrovirales (PPT), une séquence d'encapsidation (PSI ou Ψ). Les HERV sont bordés par deux LTR, chacune composée de trois domaines U3, R et U5, impliqués, entre autres, dans le contrôle de la transcription des gènes du rétrovirus.

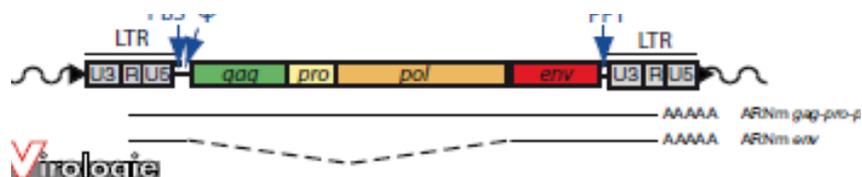


Figure : Organisation génomique d'un rétrovirus (ERV). (LTR, long terminal repeat ; PBS, primer binding site ; PPT, polypurine tract)

La réactivation de l'expression de certaines classes de HERV, accompagne fréquemment les processus de cancérisation. C'est la déméthylation des promoteurs des

ERV (LTR) qui est à l'origine de leur expression. Or l'altération du profil de méthylation des gènes est une caractéristique fréquente dans les CCR. Une expression dérégulée de HERV, liée à la déméthylation des LTR de HERV dans les cellules tumorales, associée à des épitopes HERV exprimés de manière aberrante, pourrait aussi déclencher une réponse immunitaire anti-tumorale lorsqu'ils sont exposés (Ruprecht et al., 2008). En accord avec cette notion, les anticorps contre HERV-K (HML-2) Gag et Env ont été détectés dans 50 à 80% des patients atteints de tumeur à cellules germinales dans le testicule.

La première preuve que les peptides de HERV exprimés dans les cellules tumorales humaines peuvent aussi être des cibles pour lymphocytes T cytotoxiques CD8+ provient d'une étude qui a identifié une séquence de HERV-K (appelé HERV-K-Mel), comme étant reconnue par des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ chez deux patients atteints de mélanomes. De plus, les lymphocytes T cytotoxiques contre des peptides dérivés de HERV-K *Gag* ont été détectés chez certains patients ayant des antécédents de séminome alors qu'ils n'étaient retrouvés que dans une minorité d'individus sains.

Des études (Wentzensen et al., 2007; Mullins and Linnebacher, 2012) ont montré qu'un HERV-H était exprimé dans 16/34 (47%) CCR. Cette expression était corrélée à la déméthylation de la LTR de ce HERV. Le tissu sain n'exprimait pas l'HERV-H. Mais à l'heure actuelle, il n'existe aucune preuve que l'expression de l'ARNm de ce locus serait impliquée dans la tumorigénèse colorectale.

Dans les CCR, l'instabilité génomique pourrait engendrer la dérégulation de l'expression des rétrovirus endogènes. Il en résulterait l'expression d'immunomodulateurs de type enveloppe de rétrovirus endogènes ou l'expression de néo-antigènes suscitant une réaction immunitaire particulière. Nous avons déterminé le profil de méthylation des LTR de HERV-H connus pour être exprimés dans les lignées de cancers coliques (Wentzensen et al., 2007), ou pour leur propriété immunosuppressive.

Les LINE-1 (*Long interspersed nuclear element-1*) sont une classe de rétrotransposons qui est la plus représentée dans le génome humain, environ 18%. Le degré de méthylation des sites CpG des Line-1 est le reflet du niveau de méthylation globale du génome humain.

L'hypométhylation globale de l'ADN est considérée comme jouant un rôle important l'instabilité génomique et dans le processus de carcinogénèse.

Le CCR est une pathologie complexe résultant d'altérations génétiques et épigénétiques y compris les anomalies de méthylation de l'ADN. L'hypométhylation de l'ADN des séquences LINE-1 est associée à un mauvais pronostic dans les CCR. L'hypométhylation des séquences LINE-1 pourrait provoquer une alternative à l'activation des promoteurs. Les rétrotransposons activés par l'hypométhylation de l'ADN pourraient se transposer tout long du génome.

La muqueuse normale aurait des niveaux de méthylation des séquences LINE-1 plus élevés que les tissus tumoraux appariés. Les tumeurs CIMP-High auraient un niveau moyen de méthylation supérieur à celui des tumeurs CIMP-0 ou CIMP-Low. De même, les tumeurs MSI auraient un niveau moyen de méthylation supérieur à celui des tumeurs MSI-L ou MSS (Jass, 2007).

Des études antérieures ont rapporté un lien entre la déméthylation des séquences LINE-1 et l'instabilité chromosomique.

Les APOBEC (*apolipoprotein B-ARNm Editing enzyme Catalytic*) sont une famille de protéines qui agissent comme un système de défense inné contre les rétrovirus et d'autres séquences endogènes. Une dizaine de protéines ont été identifiées. Selon les gènes cibles, elles permettent la conversion d'une cytidine en uridine sur des matrices ADN et ARN. Bien que la capacité de cette famille de protéines à modifier l'ADN constitue un danger potentiel pour la cellule du fait de leur action mutagène, elles jouent un rôle important dans les systèmes immunitaires inné et adaptatif.

La sous-famille APOBEC3 est constituée de sept protéines (APOBEC3 A à H), dont la plupart permettent une inhibition de la réplication de divers rétrovirus ainsi que d'autres rétroéléments endogènes. Quatre de ces membres (APOBEC3B, D/E, F, et G) sont capables d'inhiber le VIH. Cependant la protéine Vif du VIH-1 permet de contourner cette défense antivirale en séquestrant APOBEC3G et en l'entraînant vers le protéasome par ubiquitinylation ; elle permet au virus d'échapper à cette restriction en empêchant les protéines APOBEC d'exercer leur activité enzymatique qui entraîne une hypermutation stérilisante du génome viral. Dans le cas d'une infection avec un virus délété du gène *vif*, la protéine APOBEC3 est encapsidée dans les particules virales, et induit une hypermutation (G→A) du génome rétroviral rétrotranscrit, qui perd ainsi son infectivité. L'enzyme APOBEC3G (une cytidine désaminase) induisant de nombreuses désaminations de cytidine en uridine aurait ainsi une action antivirale en bloquant la

réplication du virus ou en générant des génomes édités moins infectieux. En plus de leur pouvoir hypermutagène, les protéines APOBEC3 auraient la capacité de bloquer la mobilité des rétrotransposons à l'aide d'un mécanisme différent et encore inconnu. De façon intéressante les APOBEC3G et F ont également une activité sur les rétrovirus endogènes et les séquences LINE-1, qui sont des éléments génétiques dérégulés dans les cancers.

Considérant ces propriétés, nous nous sommes demandé si ces gènes pouvaient influencer le processus tumoral par réactivation des séquences LINE-1 et par réactivation des rétrovirus endogènes en affectant l'expression des HERV (déméthylation des HERVH) et en modifiant leur activité immuno-modulatrice.

Les gènes de la famille des APOBEC3 sont codés par un locus de la région 22q13. Dans les cancers colorectaux, la délétion d'un fragment du bras long du chromosome 22 (22q13) a été décrite par des approches de génétique moléculaire de suivi de marqueurs polymorphes et plus récemment par les techniques d'analyse non ciblées tel la *CGH array*. La région 22q13 pourrait héberger un gène suppresseur de tumeur, qui serait surtout impliqué dans le cancer du colon gauche. Ce gène serait désactivé par perte d'hétérozygotie (28,38% des cas), liée à une instabilité chromosomique (Zheng et al., 2005). La fréquence de délétion du locus 22q13 est de 20 à 50 % dans les cancers du sein et du colon.

Outre la fréquence de cette délétion, sa détection dans plusieurs types histologiques tumoraux, sein et système nerveux central par exemple, nous a semblé suggestive de la présence de gènes assurant des fonctions importantes dans l'homéostasie cellulaire.

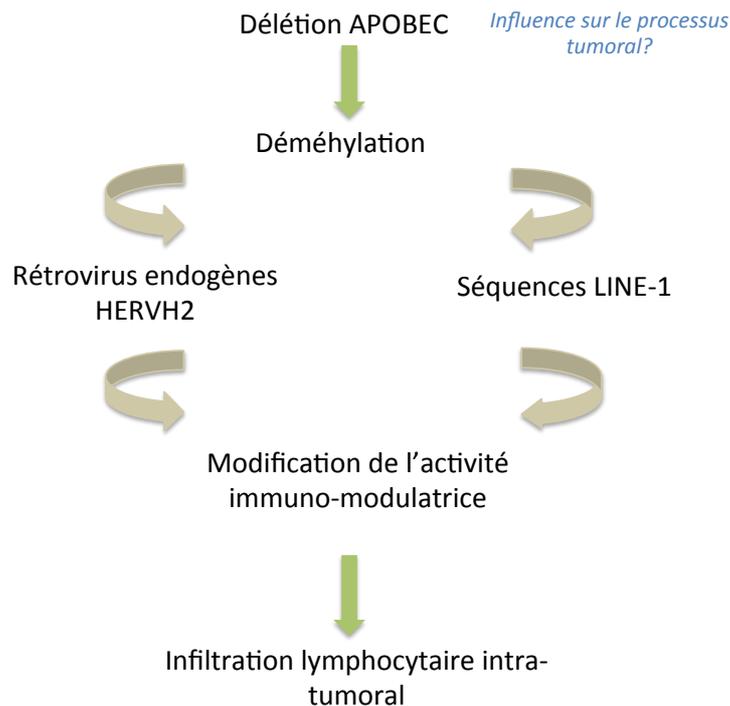


Figure 28 : Représentation schématique des hypothèses et objectifs de notre étude.

L'objectif de notre étude était d'établir (Figure 28) :

- une relation entre des données moléculaires et immunologiques dans une cohorte de tumeurs colorectales ;
- une relation entre les différentes anomalies moléculaires retrouvées et le stade tumoral.

Pour cela, nous avons étudié :

- L'infiltration lymphocytaire intra-tumorale par immunohistochimie
- La délétion APOBEC3G et 3B (chromosome 22).
- La méthylation du promoteur MLH1, la méthylation des LTR de HERV-H sur le chromosome X, la méthylation et l'expression des LINE-1
- Un microsatellite du promoteur C-Met
- Le statut PI3K
- Les mutations BRAF et KRAS
- L'instabilité des microsatellites
- Un polymorphisme HLA-G

7. Matériels et méthodes

7.1. Patients

Nous avons étudié rétrospectivement 135 cancers colorectaux provenant de patients pris en charge au CHRU de Tours entre 2007 et 2008. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le service de Gastroentérologie et le Laboratoire d'Anatomopathologie du CHRU de Tours. La population étudiée était composée de 73 hommes (54 %) et de 62 femmes (46 %), dont l'âge médian était de 72 ans (36 à 93 ans). 55 patients avaient un carcinome du colon droit (40.7 %) et 80 un carcinome du colon gauche (59.3 %). Pour les stades cliniques, les patients étaient répartis de la manière suivante : 12 stade 1, 50 stade 2, 43 stade 3, et 30 stade 4 (Tableau 11).

Un consentement écrit a été recueilli auprès de l'ensemble des patients après une information sur l'utilisation d'une partie de leurs prélèvements à des fins scientifiques.

Tableau 11 : Caractéristiques clinico-pathologiques de la population étudiée.

| | Nombre de tumeurs (%) |
|--------------------------------|-----------------------|
| Age (années) : | |
| - moyenne | 72 ans |
| - intervalle | 36-93 ans |
| Sexe : | |
| - hommes | 73 (54 %) |
| - femmes | 62 (46 %) |
| Localisation tumorale : | |
| - colon droit | 55 (40.7 %) |
| - colon gauche | 80 (59.3 %) |
| Stades : | |
| - 1 | 12 (9 %) |
| - 2 | 50 (37 %) |
| - 3 | 43 (31.8 %) |
| - 4 | 30 (22.2 %) |
| Différenciation : | |
| - bien | 14 (10 %) |
| - modérée | 90 (67 %) |
| - peu | 31 (23 %) |

7.2. Biologie moléculaire

Pour ce qui concerne l'analyse en biologie moléculaire, nous avons utilisé deux échantillons congelés et conservés à -80°C, pour chaque patient, un échantillon de tissu normal et l'autre de tumeur.

7.2.1. Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN génomique (ADNg) a été faite sur des prélèvements, tissus congelés à -80°C provenant du service d'anatomie cytologie et pathologie, à l'aide du kit QIAGEN QIAamp DNA Mini kit (Qiagen).

Le prélèvement est mis dans un tampon de lyse en présence de Proteinase K, à 56°C pendant une nuit. Ensuite, un second tampon est ajouté pour terminer la lyse. De l'éthanol est ajouté pour ajuster les conditions de fixation de l'ADN à la colonne de silice. Le lysat est transféré sur une colonne de silice, l'ADN se fixe alors à celle-ci et l'éluat est éliminé après centrifugation. La colonne est lavée successivement par deux tampons, cela permet d'éliminer les impuretés (protéines, résidus...). La colonne est ensuite séchée pour éliminer toutes traces d'éthanol. L'ADN est décroché de la colonne par ajout d'eau sur celle-ci, puis elle est centrifugée afin de récupérer l'ADN dans l'éluat. L'ADN élué est ensuite dosé au spectrophotomètre (Cary100Scan, Varian).

7.2.2. Conversion

Tous les échantillons ont été convertis avec le Kit EZ DNA Methylation-Gold™ (ZYMO RESEARCH).

Tous les ADN ont été ramenés à une concentration de 500 ng. Pour chaque réaction de conversion, dans un tube de PCR, 130 µl de CT Conversion Reagent était ajouté au 20 µl d'ADN (500 ng). La réaction de conversion est réalisée dans un thermocycler selon le programme suivant : 98°C pendant 10 minutes, 64°C pendant 2,5 heures et maintien à 4°C jusqu'à la suite.

Ensuite, l'échantillon est placé dans une colonne (Zymo-Spin™ IC Column) et sont ajoutés 600µl de M-Binding Buffer. Le mélange est centrifugé à grande vitesse pendant 30 secondes. La colonne est lavée avec 100 µl de M-Wash Buffer et centrifugée à grande vitesse pendant 30 secondes.

Pour la réaction de désulfonation, 200 µl de M-Desulphonation Buffer est ajouté sur la colonne, suivie d'une incubation de 20 minutes. Le mélange est centrifugé à grande vitesse pendant 30 secondes. La colonne est lavée deux fois successivement avec 200 µl de M-Wash Buffer et centrifugée à grande vitesse pendant 30 secondes.

Puis, l'ADN converti est élué dans 10 µl d'eau et conservé à -20°C.

7.2.3. Instabilité des microsatellites

L'étude de l'instabilité des microsatellites est faite par analyse de fragments sur séquenceur capillaire 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems). L'analyse est réalisée sur 6 microsatellites à répétition mononucléotidique, NR21, NR24, NR27, Bat25, Bat26 et Cat25. Une PCR multiplex pour 6 marqueurs est réalisée avec les primers ci-dessous (Tableau 12).

Tableau 12 : Primers utilisés pour la recherche de l'instabilité des microsatellites.

| Nom | Séquence | Taille | Fluorescence en 5' |
|------------------------------------|--|-----------|--------------------|
| NR21 F NR21 R | 5'-GAG TCG CTG GCA CAG TTC TA-3' 5'-CTG GTC ACT GCG TTT ACA A-3' | 107-110pb | VIC (vert) |
| NR24 F NR24 R | 5'-GCT GAA TTT TAC CTC CTG AC-3' 5'-ATT GTG CCA TTG CAT TCC AA3' | 126-131pb | FAM (bleu) |
| NR27 F NR27 R | 5'-AAC CAT GCT TGC AAA CCA CT-3' 5'-CGA TAA TAC TAG CAA TGA CC-3' | 85-90pb | FAM (bleu) |
| BAT 25 F BAT 25 R | 5'-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3' 5'-TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3' | 120-124pb | VIC (vert) |
| BAT 26 F BAT 26 R | 5'-TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC-3' 5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3' | 116-120pb | TED (noir) |
| CAT25 F CAT25 R | 5'-CCT AGA AAC CTT TAT CCC TGC TT-3' 5'-GAG CTT GCA GTG AGC TGA GA-3' | 119pb | TED (noir) |

A 100 ng d'ADN sont ajoutés, le tampon buffer II de la polymérase (1X), 1,5mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 12,5 pmol de chacun des primers et 0,8 µl de l'ADN polymérase AmpliTaq^R Gold (Applied Biosystems) dans un volume final de 20 µl.

Les conditions d'amplification sont les suivantes : une dénaturation initiale 10 min à 95°C suivie de 35 cycles à 94°C 45sec, 53°C 45 sec et 72°C 15 min avec une extension finale à 72°C 15 min.

1µl du produit de PCR est ajouté à 18,5 µl de formamide (Applied Biosystems) et 0,5 µl de marqueur de taille GeneScan™-500 LIZ^R (Applied Biosystems) puis le mélange est dénaturé 5 min à 96°C.

Les produits sont ensuite chargés sur une plaque 96 puits et analysés sur le séquenceur capillaire. Les données sont analysées à l'aide du logiciel GeneMapper (Applied Biosystems).

Le statut d'instabilité est déterminé en fonction du nombre de microsatellites instables :

- pas d'instabilité : microsatellite stable, MSS (Figure 29)
- moins de 2 instabilités : instabilité de microsatellite basse, MSI-L
- au moins 2 instabilités : instabilité de microsatellite forte, MSI-H (Figure 30)

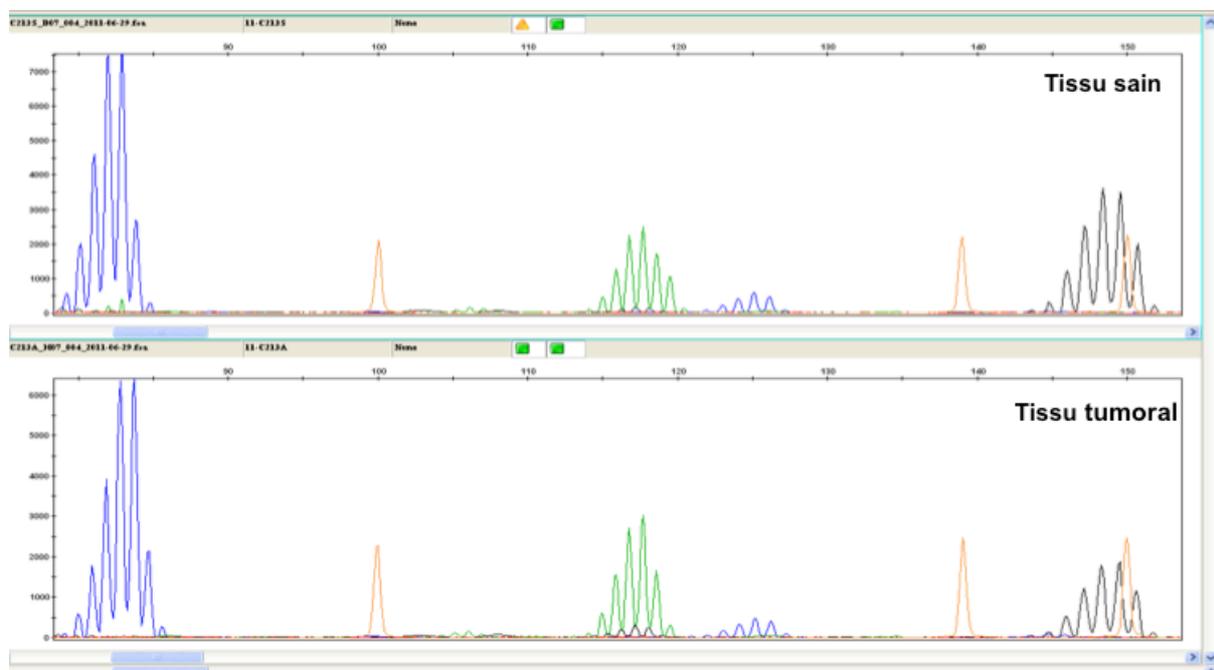


Figure 29 : Exemple d'analyse des microsatellites d'une tumeur stable.

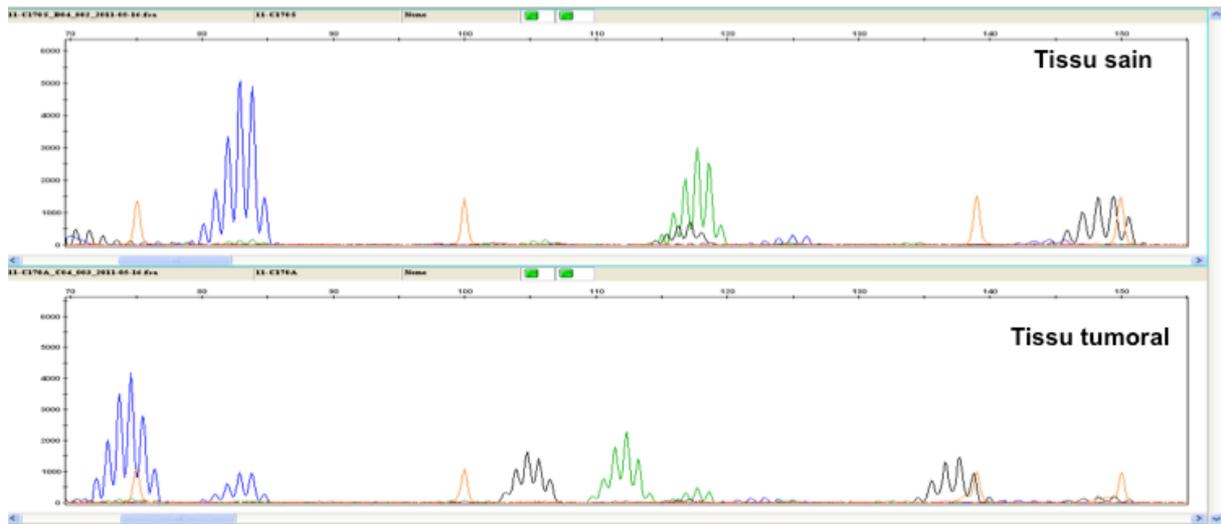


Figure 30 : Exemple d'analyse des microsatellites d'une tumeur instable.

L'étude du microsatellite du promoteur du gène c-Met a été réalisée selon la même technique et le même protocole que l'étude de l'instabilité des microsatellites. La PCR a été faite avec les primers indiqués dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Primers utilisés pour l'étude du microsatellite du promoteur du gène c-Met.

| Nom | Séquence | Taille | Fluorescence en 5' |
|---------|----------------------------------|--------|--------------------|
| c-Met F | 5'-AGT TAA CAT ATT GCT ATG GA-3' | 222 pb | FAM (bleu) |
| c-Met R | 5'-CAC TAA TTT ACT GGT AAT AA-3' | | |

Les données sont également analysées à l'aide du logiciel GeneMapper (Applied Biosystems). En sélectionnant le pic majoritaire, le logiciel nous donne la taille du fragment (pb) et nous renseigne ainsi sur la taille du microsatellite du promoteur.

7.2.4. High Resolution Melting (HRM)

L'HRM est réalisée à l'aide du kit Light Cycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche) sur l'appareil LightCycler^R 480 II (Roche).

Le mélange réactionnel se compose de 30 ng d'ADN génomique, 0,4 µL de chacune des 2 primers (Tableau 14), 2.4 µL de MgCl₂ (25 mM) et 10 µl du Master mix 2X contenant les dNTP, l'intercalant LC green et la fastStart Taq DNA polymérase. Le volume final est ajusté à 20 µl avec de l'eau.

Tableau 14 : Primers utilisés pour la technique d'HRM.

| Nom du primer | Séquence | Taille du produit | Tm |
|--|---|-------------------|------|
| KRAS-ex2-S KRAS-ex2-AS | 5'-TATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAA-3' 5'-GAATTAGCTGTATCGTCAAGGCACT-3' | 92pb | 68°C |
| BRAF-ex15-S BRAF-ex15-AS | 5'-ATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTA-3' 5'-AGACAACGTTCAAACTGATGGGAC-3' | 97pb | 53°C |
| PI3KCA-ex9-S PI3KCA-ex9-AS | 5'-GCTCAAAGCAATTTCTACACGAGA-3' 5'-TCCATTTTAGCACTTACCTGTGCA-3' | 92pb | 50°C |
| PI3KCA-ex20-S PI3KCA-ex20-S | 5'-GAGGCTTTGGAGTATTTTCAT-3' 5'-AATCCATTTTTGTTGTCCAG-3' | 70pb | 50°C |
| MLH1meth-S MLH1meth-AS | 5'-TGTTTTTATTGGTTGGATAT-3' 5'-TCTCTTCGTCCTCCCTAAA-3' | 140pb | 50°C |

Le protocole utilisé sur le LightCycler^R 480 II (Roche) est composé de deux programmes. Le premier (PCR en temps réel) comporte une dénaturation de 5 minutes à 95°C suivie de 55 cycles d'amplification : dénaturation 15 secondes à 95°C, hybridation des amorces pendant 15 secondes à x°C (voir Tm dans le tableau) et élongation pendant 20 secondes à 72°C. Le second programme (courbe de fusion) comprend les étapes suivantes : 1 minute à 95°C, 1 minute à 40°C, 1 seconde à 65°C puis augmentation de la température de 0,02°C par seconde jusqu'à 95°C et refroidissement à 40°C pendant 30 secondes.

L'analyse des courbes de fusion est réalisée avec le logiciel Light Cycler 480 software release 1.5.0 (Roche) (Figure 31 et Figure 32).

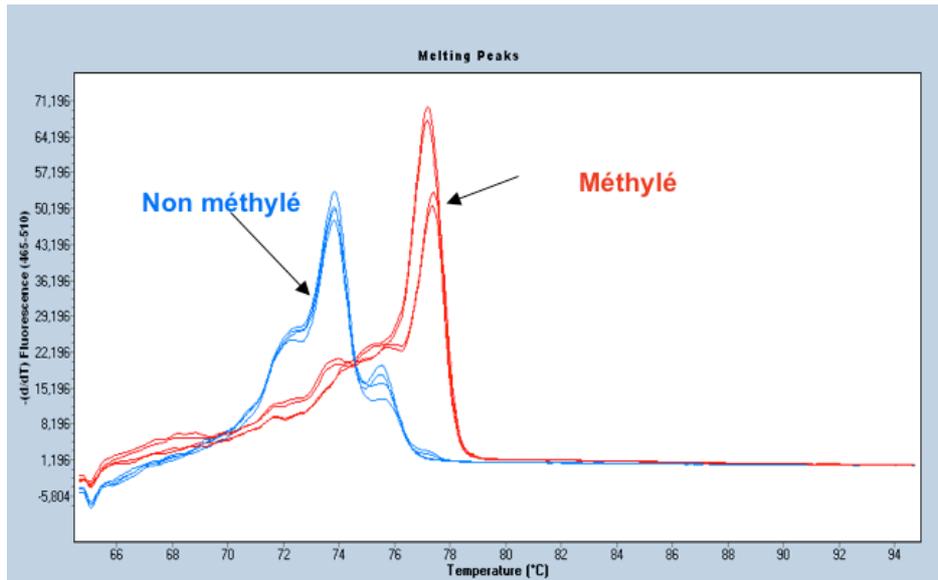


Figure 31 : Exemple de courbes obtenues, en HRM, pour la recherche de la méthylation de MLH1.

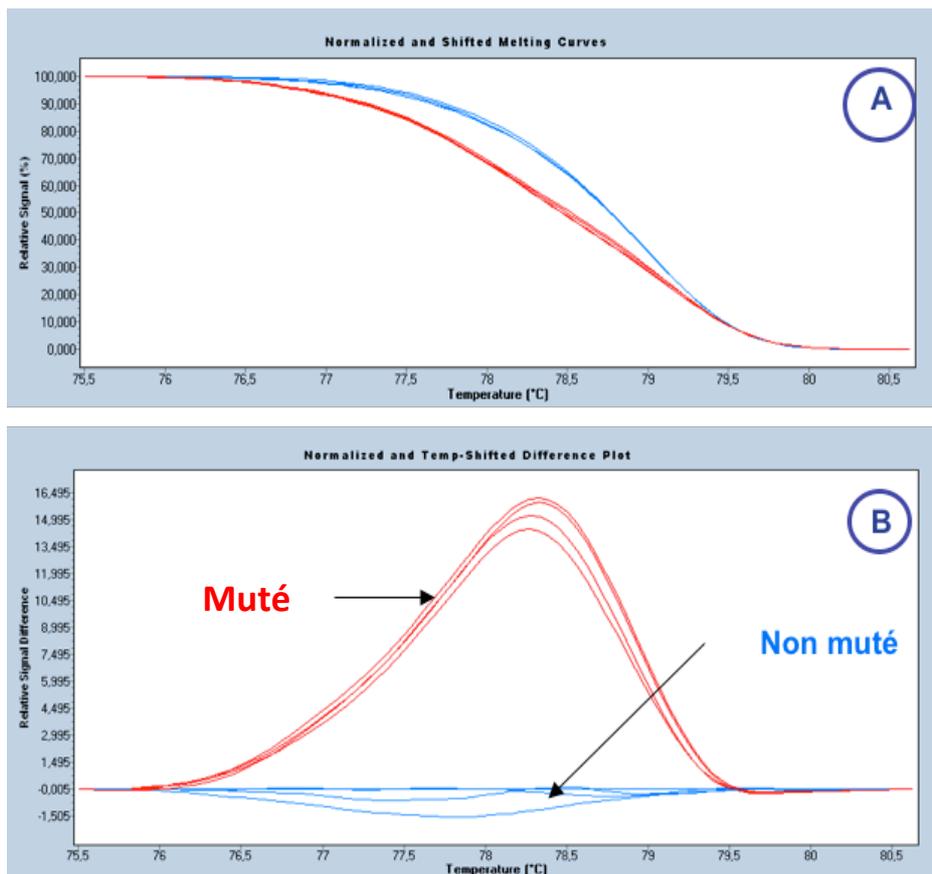


Figure 32 : Exemple de courbes de fusion (figure A) et de courbes de *difference plot* obtenues en HRM pour la recherche de la mutation BRAF V600E.

7.2.5. Séquençage

La PCR d'amplification est réalisée pour le gène d'intérêt avec les primers suivants (Tableau 15).

Tableau 15 : Primers utilisés pour le séquençage.

| Nom du primer | Séquence | Taille du produit | Tm |
|--|---|-------------------|------|
| KRASseq-S KRASseq-AS | 5'-GTG TGA CAT GTT CTA ATA TAG TCA -3' 5'-GAA TGG TCC TGC ACC AGT AA -3' | 214pb | 48°C |
| BRAFseq-S BRAFseq-AS | 5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA -3' 5'-GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A -3' | 224pb | 48°C |
| PI3KCAseq-ex9-S PI3KCAseq-ex9-AS | 5'-ATC CAG AGG GGA AAA ATA TG -3' 5'-ATG CTG AGA TCA GCC AAA T -3' | 261pb | 55°C |
| PI3KCAseq-ex20-S PI3KCAseq-ex20-S | 5'- TCA TTT GCT CCA AAC TGA CCA A-3' 5'-TGG AAT CCA GAG TGA GCT TTC A -3' | 352pb | 55°C |
| HERVH2meth-S HERVH2meth-AS | 5'-ATA TGA GGA TAT ATA GAG TAG GTT AT-3' 5'-TAA TTC TTC AAT TAC TTC AAA CCA-3' | 114pb | 55°C |
| HLA-G-S HLA-G-AS | 5' -GTG ATG GGC TGT TTA AAG TGT CAC C-3' 5' -GGA AGG AAT GCA GTT CAG CAT-3' | | |

La réaction de PCR contient 2 µl du tampon de polymérase, 1,2 µl de MgCl₂ à 25 mM, 0,4 µl de dNTP à 10 mM, 1 µl de primer sens et 1 µl de primer anti-sens à 10 µM, 1 unité de l'ADN polymérase AmpliTaq[®] Gold (Applied Biosystems) et 100 ng d'ADNg dans un volume total de 20 µl. Les conditions d'amplification sont : 94°C 9 min suivi de 30 cycles à 94°C 30 sec, X°C (tableau) 30 sec et 72°C 45 sec puis 72°C 7 min. Les produits d'amplification sont purifiés à l'aide d'ExoSap-IT[®] (GE Healthcare) suivant les recommandations du fournisseur. La réaction de séquençage est réalisée à l'aide du kit BigDye[®] terminator V3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems) suivant les recommandations du fournisseur et à l'aide des primers ci-dessus. Les produits de séquençage sont précipités à l'isopropanol avant d'être analysés sur le séquenceur capillaire 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Les données de séquençage sont analysées par le logiciel Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems)(Figure 33).

Pour l'analyse des données du séquençage HERVH2 (séquence comprenant deux sites CpG de méthylation), nous avons calculé la hauteur des pics des C et des T pour les

deux sites CpG. Nous avons ensuite calculé le pourcentage que représente chaque base C et T par rapport à la hauteur du pic. Nous avons fait la moyenne, pour tous les échantillons, des pourcentages obtenus pour les C. Nous avons considéré que l'échantillon est méthylé lorsque la différence entre le tissu sain et le tissu tumoral est supérieure ou égale à 20.

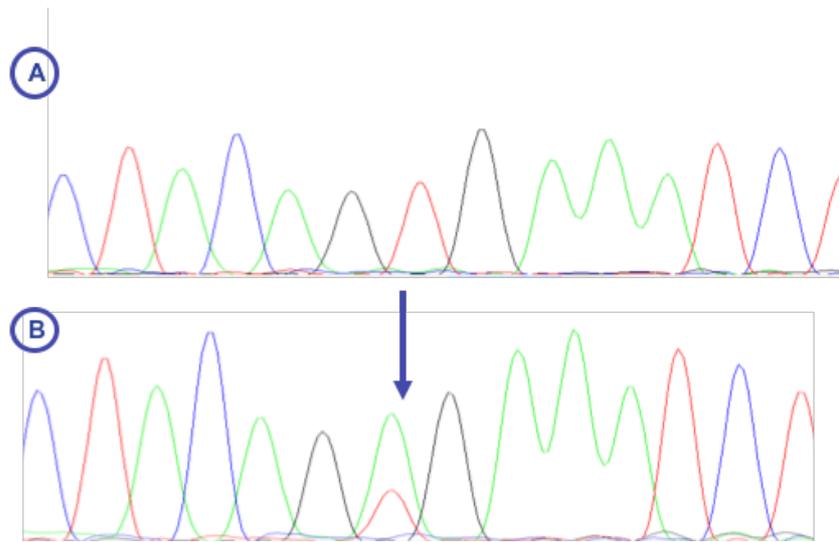


Figure 33 : Exemples de séquençage de la mutation BRAF V600E avec un échantillon non muté (figure A) et un échantillon muté (figure B).

7.2.6. PCR quantitative

La délétion du gène APOBEC 3G et APOBEC 3B est étudié par PCR quantitative par rapport à un gène contrôle, l'albumine à l'aide du kit LightCycler^R 480 SYBR green I master (Roche) sur l'appareil LightCycler^R 480 II (Roche).

La réaction de PCR comprend 50 ng d'ADNg, 10 μ l du Master Mix, 1 μ l du primer sens et 1 μ l du primer antisens (Tableau 16) dans un volume total de 20 μ l.

Tableau 16 : Primers utilisés pour la PCR quantitative.

| Nom du primer | Séquence | Taille du produit |
|---|---|-------------------|
| APOBEC 3B- S APOBEC 3B- AS | 5'-GGT TTC CCC TGT CTT TGT CC-3' 5'-GCG CTC CAC CTC ATA GCA-3' | 121pb |
| APOBEC 3G- S APOBEC 3G- AS | 5'-GAG GGG CCA TGA CTA CGA G-3' 5'-GCA GCG GTA CCT GAA GTG A-3' | 156pb |
| ALB-F ALB-R | 5'- TGA AAC ATA CGT TCC CAA AGA GTT T-3' 5'- CTC TCC TTC TCA GAA AGT GTG CAT AT-3' | 81pb |

Le protocole utilisé sur le LightCycler^R 480 II (Roche) est le suivant : 95°C pendant 5 minutes suivi de 45 cycles à 95°C 10 sec, 60°C 10 sec et 72°C 10 sec puis d'une phase de refroidissement 40°C 30sec.

A la fin du protocole, les données sont analysées à l'aide du logiciel LightCycler^R 480 SW 1.5.

Les rapports d'amplification gène cible/gène contrôle sont obtenus pour chaque ADNg de tissu sain (Rs) et de tissu tumoral (Rt). Pour interpréter les résultats obtenus, nous avons considéré que tout rapport tissu sain (Rs)/tissu tumoral (Rt) supérieur à 1,5 est le témoin d'une délétion du gène APOBEC (Figure 34).

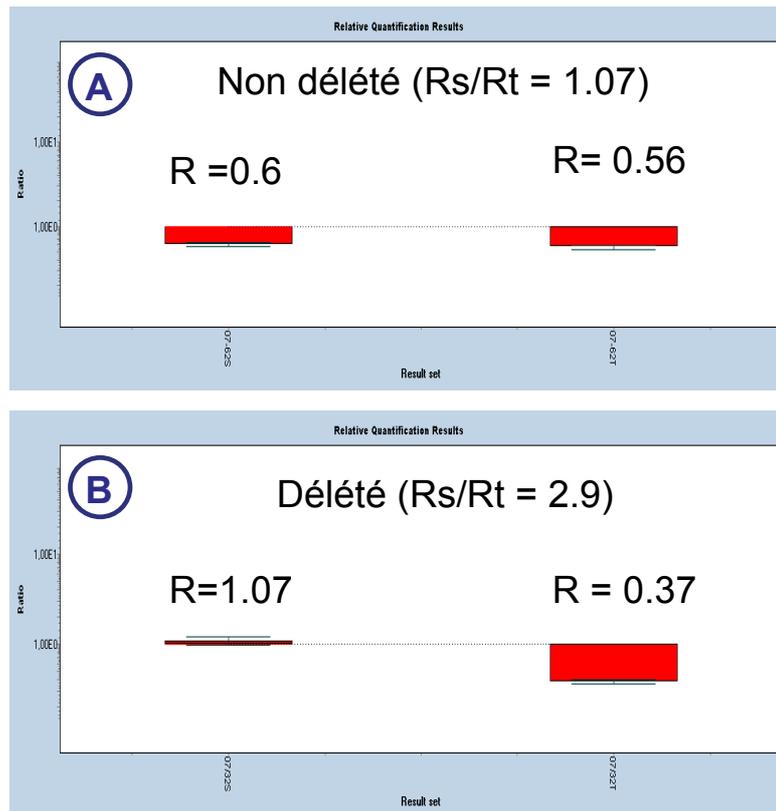


Figure 34 : Exemple de rapports d'amplification obtenus pour un ADN de tissu sain et de tissu tumoral pour une délétion APOBEC (figure B).

7.2.7. Pyroséquençage

Après conversion de l'ADN au bisulfite, la méthylation des LINEs est analysé par pyroséquençage à l'aide des kits PyroMark Q24 CpG LINE-1 et PyroMark Gold Q24 reagents (Qiagen) selon les instructions du fournisseur sur un PyroMark Q24 (Qiagen) (Figure 35). Les données sont analysées à l'aide du logiciel PyroMark Q24 Software (Qiagen). Ainsi, les trois sites CpG sont quantifiés (en %) pour chaque échantillon (tissu sain et tissu tumoral). La moyenne des pourcentages obtenus pour les trois sites CpG de chaque échantillon est calculée. Nous avons considéré pour l'analyse des résultats que nous avons une déméthylation lorsque la différence des moyennes entre le tissu sain et le tissu tumoral est supérieure ou égale à 20 (Figure 36 et Figure 37).



Figure 35 : PyroMark Q24 (Quiagen)

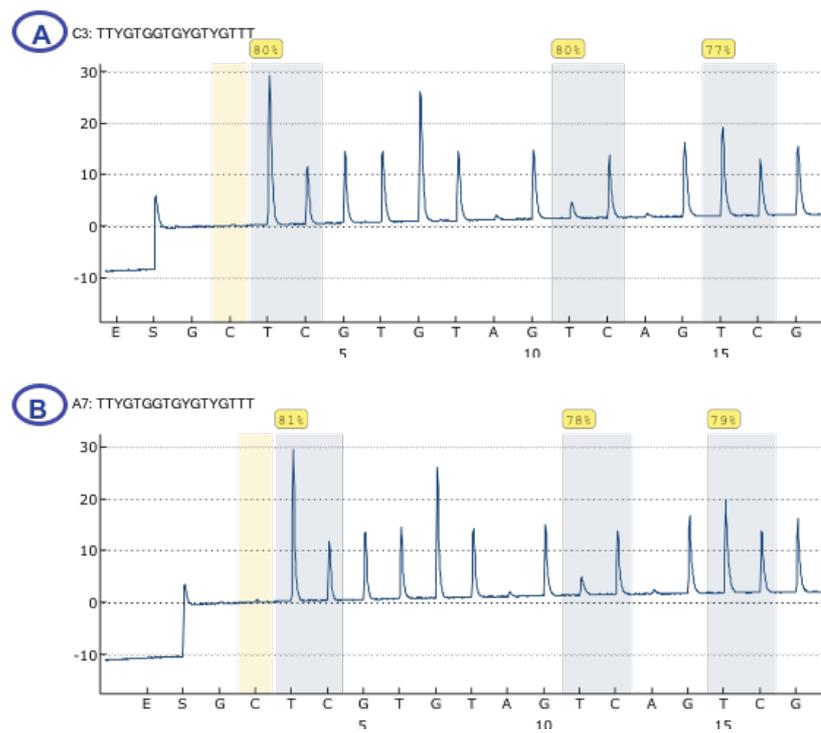


Figure 36 : Exemples d'histogramme de pyroséquence LINE de tissu sain (figure A) et de tissu tumoral (figure B) méthylés.

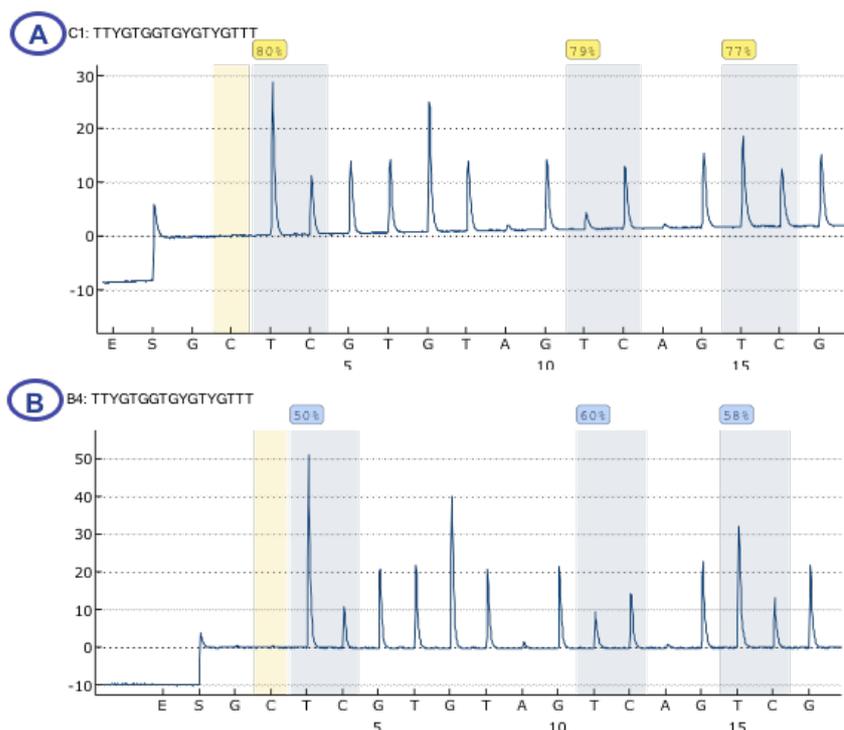


Figure 37 : Exemples d’histogramme de pyroséquenceur LINE de tissu sain (figure A) méthylé et de tissu tumoral (figure B) déméthylé.

De même, pour tous les échantillons méthylés MLH1 en HRM, une quantification de la méthylation MLH1 est analysée par pyroséquenceur à l’aide des kits PyroMark Q24 CpG MLH1 et PyroMark Gold Q24 reagents (Qiagen) selon les instructions du fournisseur sur un PyroMark Q24 (Qiagen). Les données sont analysées à l’aide du logiciel PyroMark Q24 Software (Qiagen). Ainsi, les cinq sites CpG sont quantifiés (en %) pour chaque échantillon (tissu sain et tissu tumoral). La moyenne des pourcentages obtenus pour les cinq sites CpG est calculée (Figure 38).

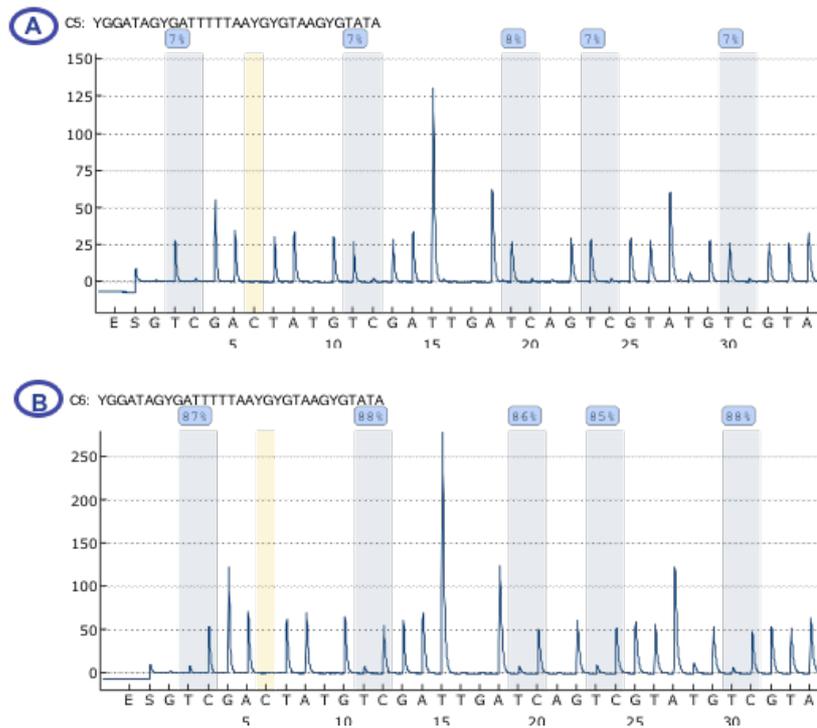


Figure 38 : Exemples d'histogramme de pyroséquenceur MLH1 de tissu sain (figure A) et de tissu tumoral (figure B) méthylés.

7.3. Anatomopathologie

Nous avons recueilli les données anatomopathologiques concernant notamment la différenciation du cancer, l'invasion vasculaire et le stade tumoral.

7.3.1. Sélection des blocs

Pour chaque tumeur, toutes les lames ont été revues par les anatomopathologistes. Ils ont choisi, pour l'immunohistochimie, la lame avec le plus d'infiltration lymphocytaire intra-tumorale et le moins de nécrose.

7.3.2. Immunohistochimie

Pour chaque bloc des coupes de 4µm ont été obtenues et étalées sur les lames. La technique a été réalisée après déparaffinage et démasquage antigénique par la chaleur dans une solution d'EDTA. La révélation a été réalisée avec un kit ultraview universal DAB (Ventana) utilisant une technique avec un anticorps secondaire multimère sur lequel la peroxydase est directement conjuguée, sans biotine. Les anticorps de sous-

types de lymphocytes T suivants ont été utilisés : CD3 monoclonal (clone F7.2.38, dilution 1:200, incubation de l'anticorps 32 minutes, Dako, Danemark), CD8 monoclonal (clone C8/144B, dilution 1:50, incubation de l'anticorps 20 minutes, Dako, Danemark) et CD45RO monoclonal (clone UCHL1, dilution 1:2000, incubation de l'anticorps 20 minutes, Dako, Danemark). Une contre-coloration par l'hématoxyline était appliquée. La technique a été réalisée sur un automate Benchmark XT.

7.3.3. Quantification lymphocytaire

Chaque section de la tumeur a été évaluée pour l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale au grossissement $\times 100$ (objectif $\times 10$) pour choisir la zone d'infiltration lymphocytaire la plus élevée. Ensuite, le nombre de lymphocytes infiltrant les nids de cellules tumorales (lymphocytes intra-épithéliaux) a été évalué dans 3 champs au grossissement $\times 200$, ce qui correspondait à une surface totale de $1,19 \text{ mm}^2/\text{champ}$. La moyenne des 3 champs a été calculée. Le degré d'infiltration lymphocytaire a été classé en utilisant cette moyenne, comme suit: nulle ou légère: 0-19, modérée: 20-49 et sévère: ≥ 50 cellules positives. Ce compte des lymphocytes a été effectué par un pathologiste, en aveugle des données de la biologie moléculaire

7.4. Analyses statistiques

7.4.1. Analyse des Correspondances Multiples (ACM)

Une Analyse des Correspondances Multiples (ACM) a été réalisée. Celle-ci permet de résumer un tableau de données où les individus sont décrits par des variables qualitatives. Les objectifs sont de dégager des profils d'individus et d'étudier les associations entre les modalités des variables. L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel R et du package *FactoMineR*.

Les six variables suivantes ont été mises en actif: la *délétion*, la *méthylation* (MLH1, LINE1, HERVH2) et *l'infiltration lymphocytaire* (CD3, CD8 et CD45). Seules ces variables participent à la construction des axes de l'ACM et sont utilisées pour calculer les distances entre individus lors de la classification ascendante hiérarchique. Aucune modalité de ces variables n'a une fréquence inférieure à 5%. Nous ajoutons en variables

supplémentaires toutes les autres variables qualitatives : Sexe, Localisation, Stade, TNM, pTNM, différenciation, invasion vasculaire, Statut MSI, BRAF, KRAS, PI3K, C-Met, mucineux, HLA-G TS ainsi que l'âge.

7.4.2. Classification Ascendante Hiérarchique

La Classification Ascendante Hiérarchique a pour objectif de regrouper les individus dans des classes les plus homogènes possibles. Cette méthode est ascendante car elle part d'une situation où tous les individus sont seuls dans une classe, puis sont rassemblées dans des classes de plus en plus grandes jusqu'à arriver, au sommet de la hiérarchie, à une seule classe regroupant tous les individus. A chaque étape on regroupe deux classes minimisant le critère de Wald (le critère de Wald étant une distance entre les projections des classes sur le sous-espace engendré par les cinq axes de l'ACM).

Le dendrogramme est la représentation graphique d'une classification ascendante hiérarchique. Il se présente sous forme d'un arbre binaire et se lit de bas en haut. Les individus sont alignés sur l'axe des abscisses, et lorsque deux classes se rejoignent elles sont reliées par un segment horizontal. Si les traits verticaux précédant une telle jointure sont longs, c'est que les deux classes étaient assez éloignées. La "meilleure" partition se voit donc sur le dendrogramme à une hauteur où il y a difficilement des regroupements de classes, ce qui se traduit par un vide vertical, et qui dénote d'une bonne stabilité des classes.

7.4.3. Analyses statistiques complémentaires pour les variables CD3, CD8 et CD45RO

Des analyses statistiques complémentaires sont réalisées par un test d'indépendance du Chi-deux, ou un test exact de Fisher (une alternative au test de Chi-deux lorsque les échantillons sont petits) pour chaque variable (CD3, CD8, et CD45RO) :

- Indépendance entre la variable CD3 (dont on a regroupé les modalités "infiltrée" et "moyennement infiltrée") et les autres variables.
- Indépendance entre la variable CD8 (dont on a regroupé les modalités "infiltrée" et "moyennement infiltrée") et les autres variables.

- Indépendance entre la variable CD45RO (dont on a regroupé les modalités "infiltrée" et "moyennement infiltrée") et les autres variables.

Ces analyses complémentaires permettent de mettre en évidence un croisement entre les deux variables « infiltrée ou moyennement infiltrée » et « non infiltrée » pour chacune des variables CD3, CD8, et CD45RO, et les autres variables sexe, localisation, stade, délétion, anomalies moléculaires, ...

8. Résultats

8.1. Analyse des Correspondances Multiples (ACM)

Le critère de Kaiser nous conduit à retenir 5 axes qui représentent 75.53% de l'inertie totale (c'est à dire qu'ils permettent d'expliquer 75.53% du tableau). Pour interpréter quelles variables décrivent le mieux chaque axe, on estime un modèle par variable qualitative. On réalise une analyse de la variance sur les coordonnées des individus sur l'axe en fonction de la variable qualitative. Puis on réalise un test T par modalité, pour interpréter dans quelle direction la variable décrit l'axe.

L'influence de chaque variable peut être mesurée à l'aide du R2. Le R2 va de 0 à 1 et représente le taux de variabilité expliqué par le modèle. Plus le R2 est proche de 1 plus les coordonnées des individus sur l'axe sont expliqués par la variable (et donc plus la variable décrit l'axe), et quand R2 vaut à 0 la variable ne décrit pas du tout l'axe.

On décrit donc les variables présentant des R2 significativement différents de 0, puis les tests sur modalités permettent de définir la direction des axes.

Le premier axe permet d'expliquer 28.13 % du tableau total. Cet axe est fortement caractérisé par les variables CD8, CD3 et CD45RO étant infiltrées, puis :

- Méthylation MLH1 = méthylé
- Statut-MSI = MSI-H
- BRAF = muté
- KRAS = non muté
- Localisation = colon droit
- Délétion APOBEC= non délété
- Stade pTNM = 2
- Différenciation intra-tumorale = peu différenciée

Le deuxième axe permet d'expliquer 15.07 % du tableau total. Cet axe est fortement caractérisé par les variables CD8 et CD3 étant moyennement infiltrées, puis :

- Délétion APOBEC = non délété
- Méthylation MLH1 = non méthylé

- MétLINE1 = non méthylé
- Statut MSI = MSS

L'influence des variables des deux premiers axes est représentée par la Figure 39.

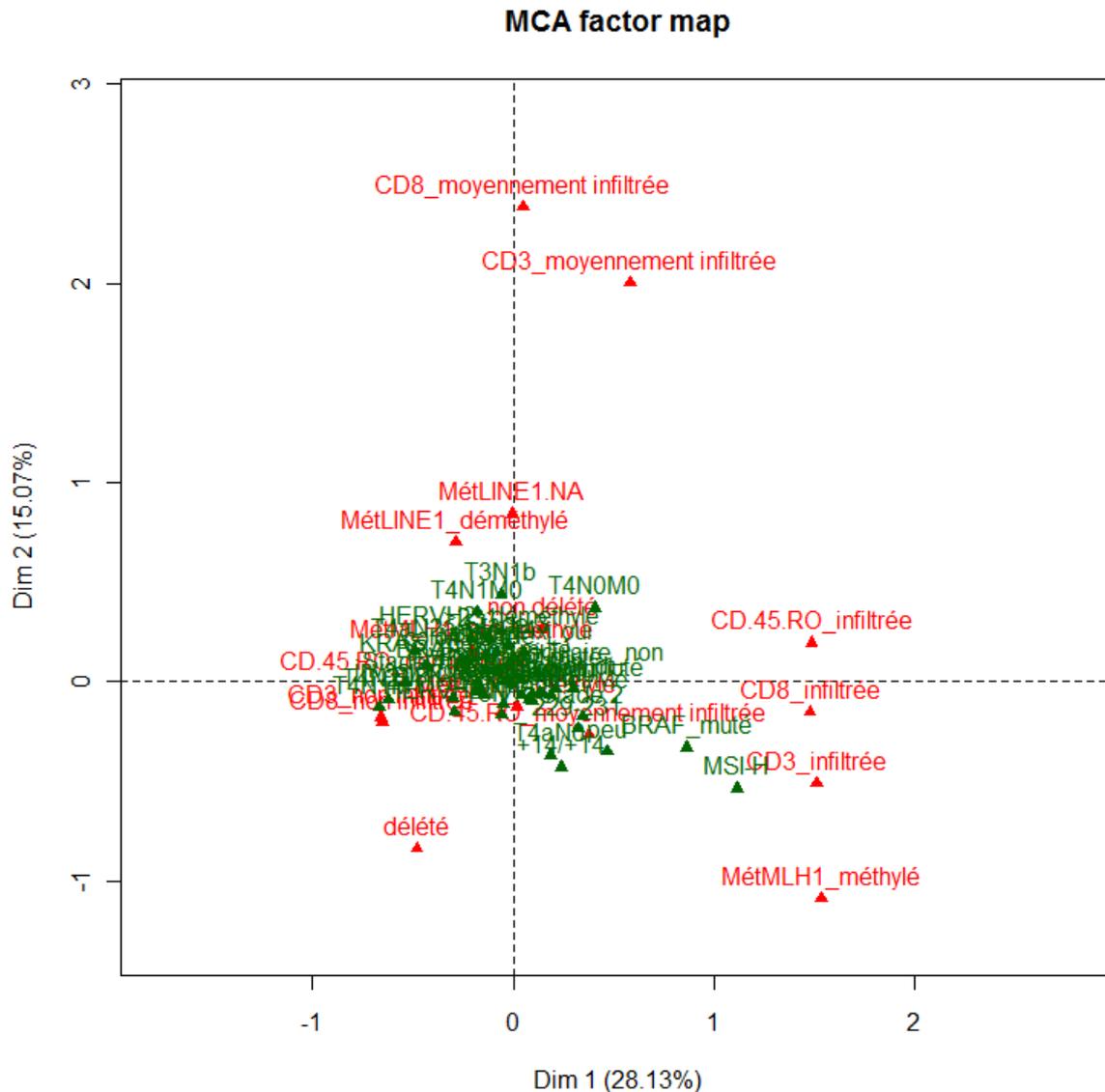


Figure 39 : Influence des variables sur les deux premiers axes.

Le troisième axe permet d'expliquer 12.39 % du tableau total. Cet axe est caractérisé par les variables :

- Méthylation LINE1 = déméthylé
- Infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD45RO + = moyennement infiltré

- Délétion APOBEC = délété
- Infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD8+ = moyennement infiltrée
- Infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD3 += moyennement infiltrée
- c-Met \geq 227

Le quatrième axe permet d'expliquer 11.14 % du tableau total. Cet axe est caractérisé par les variables :

- Méthylation LINE1 = déméthylé
- Infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD45RO + = infiltrée
- Délétion APOBEC = délété
- Méthylation HERV-H2 = déméthylé

Le cinquième axe permet d'expliquer 8.81 % du tableau total. Cet axe est caractérisé par les variables:

- Infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD45RO + = moyennement infiltrée
- Délétion APOBEC = délété
- HLA-G TS = +14/+14
- Méthylation MLH1 = déméthylé
- Statut MSI = MSS
- Différenciation tumorale = bien différenciée
- BRAF = muté

8.2. Classification Ascendante Hiérarchique

Le dendrogramme de la Classification Ascendante Hiérarchique est représenté par la Figure 40. Il n'y a pas de saut évident, mais nous pouvons voir une coupure intéressante tout en haut, ce qui nous mènera à étudier deux classes, ainsi que la configuration avec six classes. La configuration avec six classes donne des tailles de classes peu homogènes (28, 64, 14, 14, 5 et 10), nous préférons donc nous intéresser à la configuration avec seulement deux classes qui donne des classes plus homogènes. Ces classes sont décrites dans le Tableau 17.

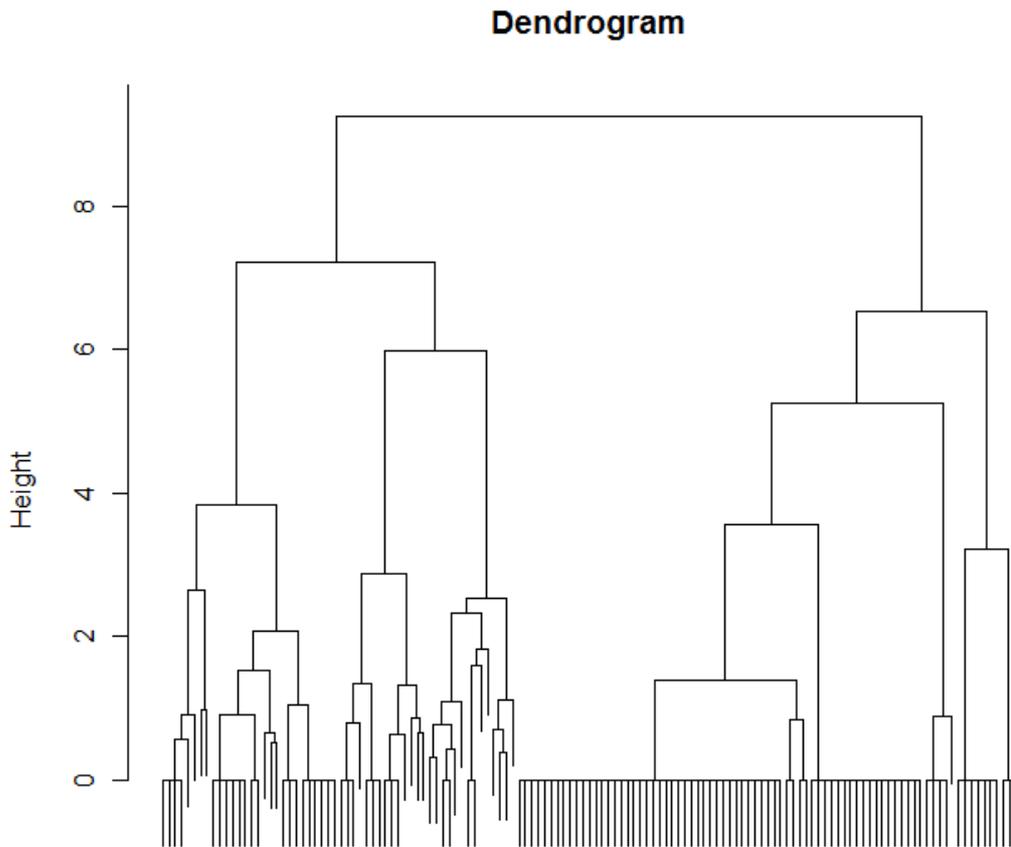


Figure 40 : Dendrogramme

La classe 1 est composée de 56 tumeurs. Elle décrit sur le plan anatomo-clinique, des tumeurs de localisation colique droite, de stade clinique II ou III, non métastatiques, peu différenciées, sans invasion vasculaire, et avec une infiltration lymphocytaire intense ou modérée (pour CD3, CD8 et CD45RO). Au plan moléculaire, ce sont des tumeurs plutôt : MSI-H, BRAF muté, KRAS non muté, PI3K non muté, non délétées et méthylées MLH1.

La classe 2 est composée de 79 tumeurs. Elle décrit sur le plan anatomo-clinique des tumeurs de localisation colique gauche, de stade clinique IV, métastatiques, bien ou moyennement différenciées, sans invasion vasculaire et sans infiltration lymphocytaire (pour CD3, CD8 et CD45RO). Au plan moléculaire, ce sont des tumeurs plutôt : MSS, BRAF non muté, KRAS muté, PI3K muté, délétées et non méthylées MLH1.

Concernant la méthylation de HERVH2, la méthylation de LINE-1, les polymorphismes C-Met, le HLA-G, le type histologique mucineux, l'âge, on n'observe pas de différence entre la classe 1 ou la classe 2 par rapport à notre population globale.

Tableau 17 : Description des classes

| Nombre de patients | | Classe 1 : 56 | Classe 2 : 79 | Total : 135 |
|--|-----------------------|---------------|---------------|-------------|
| Sexe | F | 27(48.2) | 35(44.3) | 62(45.9) |
| | M | 29(51.8) | 44(55.7) | 73(54.1) |
| Localisation | Colon droit | 30(53.6) | 25(31.6) | 55(40.7) |
| | Colon gauche | 26(46.4) | 54(68.4) | 80(59.3) |
| Stade | 1 | 5(8.93) | 7(8.86) | 12(8.89) |
| | 2 | 25(44.6) | 25(31.6) | 50(37) |
| | 3 | 21(37.5) | 22(27.8) | 43(31.9) |
| | 4 | 5(8.93) | 25(31.6) | 30(22.2) |
| Infiltration lymphocytaire intra-tumorale CD3 | Infiltrée | 29(51.8) | 3(3.8) | 32(23.7) |
| | Moyennement infiltrée | 16(28.6) | 0(0) | 16(11.9) |
| | Non infiltrée | 11(19.6) | 76(96.2) | 87(64.4) |
| Infiltration lymphocytaire intra-tumorale CD8 | Infiltrée | 35(62.5) | 3(3.8) | 38(28.1) |
| | Moyennement infiltrée | 10(17.9) | 0(0) | 10(7.41) |
| | Non infiltrée | 11(19.6) | 76(96.2) | 87(64.4) |
| Infiltration lymphocytaire intra-tumorale CD45RO | Infiltrée | 23(41.1) | 5(6.33) | 28(20.7) |
| | Moyennement infiltrée | 18(32.1) | 0(0) | 18(13.3) |
| | Non infiltrée | 15(26.8) | 74(93.7) | 89(65.9) |
| Différenciation tumorale | Bien | 4(7.14) | 10(12.7) | 14(10.4) |
| | Moyen | 36(64.3) | 54(68.4) | 90(66.7) |
| | Peu | 16(28.6) | 15(19) | 31(23) |
| Sous-type histologique mucineux | Non | 51(91.1) | 72(91.1) | 123(91.1) |
| | Oui | 5(8.93) | 7(8.86) | 12(8.89) |

| | | | | |
|-----------------------|-------------|----------|----------|-----------|
| Invasion vasculaire | Non | 36(64.3) | 41(51.9) | 77(57) |
| | Oui | 20(35.7) | 38(48.1) | 58(43) |
| Délétion APOBEC | Délétée | 10(17.9) | 22(27.8) | 32(23.7) |
| | Non délétée | 46(82.1) | 57(72.2) | 103(76.3) |
| Statut MSI | MSI-H | 18(32.1) | 5(6.33) | 23(17) |
| | MSI-L | 1(1.79) | 0(0) | 1(0.741) |
| | MSS | 37(66.1) | 74(93.7) | 111(82.2) |
| BRAF | Muté | 14(25) | 5(6.33) | 19(14.1) |
| | Non muté | 42(75) | 74(93.7) | 116(85.9) |
| KRAS | Muté | 13(23.2) | 31(39.2) | 44(32.6) |
| | Non muté | 43(76.8) | 48(60.8) | 91(67.4) |
| PI3K | Muté | 4(7.14) | 12(15.2) | 16(11.9) |
| | Non muté | 52(92.9) | 67(84.8) | 119(88.1) |
| Methylation de MLH1 | Méthylé | 14(25) | 2(2.53) | 16(11.9) |
| | Non méthylé | 42(75) | 77(97.5) | 119(88.1) |
| Methylation de HERVH2 | Déméthylé | 18(33.3) | 26(36.1) | 44(34.9) |
| | Méthylé | 36(66.7) | 46(63.9) | 82(65.1) |
| Methylation de LINE-1 | Déméthylé | 3(5.45) | 5(7.25) | 8(6.45) |
| | Méthylé | 52(94.5) | 64(92.8) | 116(93.5) |
| c-MET | ≤ 227 | 44(78.6) | 56(70.9) | 100(74.1) |
| | 229-231 | 10(17.9) | 8(10.1) | 18(13.3) |
| | >231 | 2(3.57) | 14(17.7) | 16(11.9) |
| HLA-G (Tissu Sain) | -14/-14 | 18(32.1) | 29(36.7) | 47(34.8) |
| | -14/+14 | 29(51.8) | 42(53.2) | 71(52.6) |
| | +14/+14 | 9(16.1) | 8(10.1) | 17(12.6) |

Pour savoir quelles variables et quelles modalités caractérisent le mieux ces classes, on compare modalité par modalité le pourcentage de la modalité dans les classes au pourcentage de la modalité dans l'ensemble total. Ces comparaisons peuvent être converties en valeurs tests afin de tester si la proportion dans la population globale diffère significativement de celle dans la classe. Cette interprétation n'a en principe de sens que pour les variables supplémentaires n'ayant pas participé à la construction des classes car il n'y a pas indépendance entre les classes et les variables actives. Le Tableau 18 et Tableau 19 rapportent les résultats des tests significatifs.

Tableau 18 : Modalités pour la classe 1 de la classification hiérarchique ascendante.

NA : not available

Cla/Mod : fréquence d'appartenance à la classe 1 pour une modalité donnée (%)

Mod/Cla : fréquence d'une modalité donnée dans la classe 1 (%)

| Modalité | Cla/Mod (%) | Mod/Cla (%) | Global (%) | p.value |
|------------------------------|-------------|-------------|------------|---------|
| Localisation colique droite | 54.55 | 53.57 | 40.74 | 0.02 |
| Localisation colique gauche | 32.5 | 46.43 | 59.26 | 0.02 |
| Stade = 4 | 16.67 | 8.93 | 22.22 | < 0.01 |
| Infiltration CD3+ élevée | 90.62 | 51.79 | 23.7 | < 0.01 |
| Infiltration CD3 modérée | 100 | 28.57 | 11.85 | < 0.01 |
| Infiltration CD8+ élevée | 92.11 | 62.5 | 28.15 | < 0.01 |
| Infiltration CD8 modérée | 100 | 17.86 | 7.41 | < 0.01 |
| Infiltration CD45RO+ modérée | 100 | 32.14 | 13.33 | < 0.01 |
| Infiltration CD45RO+ élevée | 82.14 | 41.07 | 20.74 | < 0.01 |
| Méthylation MLH1 (méthylé) | 87.5 | 25 | 11.85 | < 0.01 |
| MSI-H | 78.26 | 32.14 | 17.04 | < 0.01 |
| MSS | 33.33 | 66.07 | 82.22 | < 0.01 |
| BRAF = muté | 73.68 | 25 | 14.07 | < 0.01 |
| C-Met ≥ 231 | 12.5 | 3.57 | 11.85 | 0.02 |

Tableau 19 : Modalités pour la classe 2 de la classification hiérarchique ascendante.

NA : not available

Cla/Mod : fréquence d'appartenance à la classe 2 pour une modalité donnée (%)

Mod/Cla : fréquence d'une modalité donnée dans la classe 2 (%)

| Modalité | Cla/Mod (%) | Mod/Cla (%) | Global (%) | p.value |
|--|-------------|-------------|------------|---------|
| Localisation colique gauche | 75 | 34.18 | 26.67 | 0.03 |
| Infiltration lymphocytaire CD3 + faible | 87.36 | 96.2 | 64.44 | < 0.01 |
| Infiltration lymphocytaire CD8 + faible | 87.36 | 96.2 | 64.44 | < 0.01 |
| Infiltration lymphocytaire CD45RO + faible | 83.15 | 93.67 | 65.93 | < 0.01 |
| MSS | 66.67 | 93.67 | 82.22 | < 0.01 |
| Méthylation de MLH1 (non méthylé) | 64.71 | 97.47 | 88.15 | < 0.01 |
| Stade = 4 | 83.33 | 31.65 | 22.22 | < 0.01 |
| BRAF wt | 63.79 | 93.67 | 85.93 | < 0.01 |
| C-Met \geq 231 | 87.5 | 17.72 | 11.85 | 0.02 |
| TNM = T4N1M1 | 100 | 8.86 | 5.19 | 0.04 |

8.3. Infiltration lymphocytaire intra-tumorale

Des études ont montré que la présence d'une infiltration lymphocytaire T au sein de la tumeur serait associée à un meilleur pronostic et serait corrélée à une tumeur MSI-H. Dans cette étude, nous avons étudié l'association entre les altérations moléculaires et l'infiltration lymphocytaire T à l'aide de trois marqueurs : CD3, CD8 et CD45RO (Figure 41).

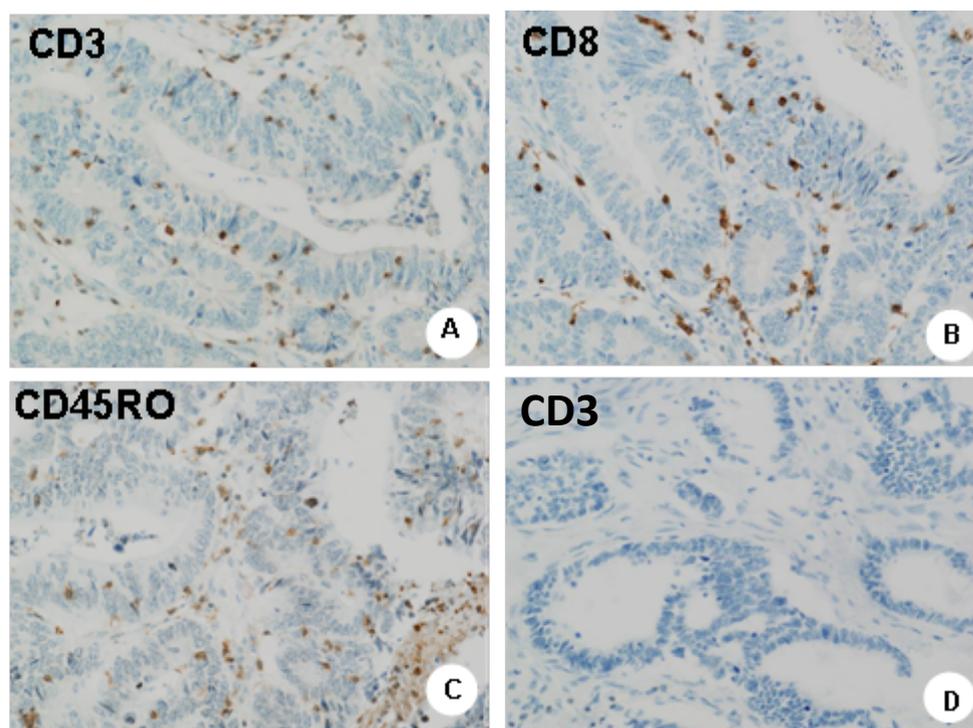


Figure 41 : Adénocarcinomes avec un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral élevé CD3 (figure A), CD8 (figure B), et CD45RO (figure C). Adénocarcinome avec absence d’infiltrat lymphocytaire intra-tumoral (figure D). Objectif × 10 (grossissement × 100).

Les résultats de l’étude immuno-histochimique montrent que nous avons, pour le sous-type CD3 et CD8, une infiltration lymphocytaire intra-tumorale dans 48 cas sur 135 (35.6 %), et pour le sous-type CD45RO, une infiltration lymphocytaire intra-tumorale dans 46 cas sur 135 (34 %) (Tableau 20 et Figure 42).

Tableau 20 : Résultats détaillés de l’étude immuno-histochimique : évaluation de l’importance de l’infiltration lymphocytaire intra-tumorale selon les 3 classes définies

| Infiltration lymphocytaire intra-tumorale | nulle ou légère (%) | modérée (%) | sévère (%) |
|--|----------------------------|--------------------|-------------------|
| CD3 | 87 (64,4 %) | 16 (11,9 %) | 32 (23,7 %) |
| CD8 | 87 (64,4 %) | 10 (7,41 %) | 38 (28,1 %) |
| CD45RO | 89 (65,9 %) | 18 (13,3 %) | 28 (20,7 %) |

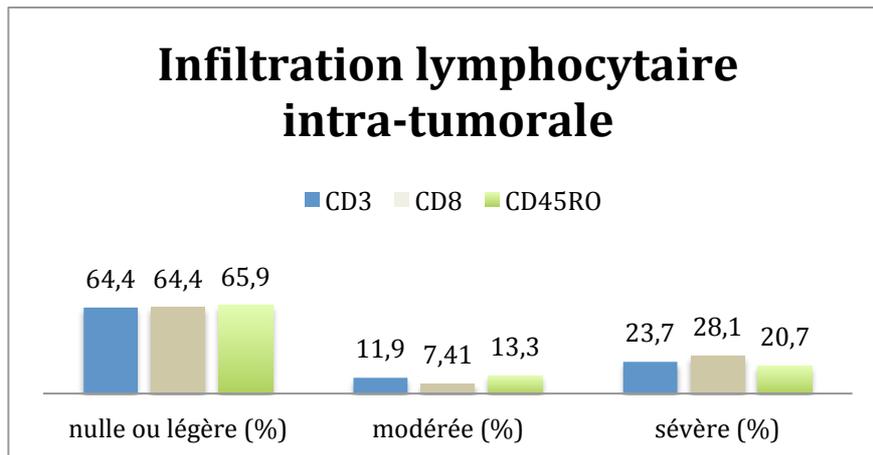


Figure 42 : Résultats détaillés de l'étude immuno-histochimique : évaluation de l'importance de l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale selon les 3 classes définies

D'après nos données, ce sont bien les mêmes tumeurs qui ont un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD3 et CD8. Mais, parmi les 46 tumeurs ayant un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD45RO, il y en a 33 qui sont aussi infiltrées CD3 et CD8, 9 qui sont non infiltrées CD3 et CD8, 2 qui sont infiltrées CD3 et pas CD8, et 2 sont infiltrées CD8 et non infiltrées CD3 (Tableau 21 et Figure 43).

Tableau 21 : Nombre de tumeurs présentant un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral (élevé ou modéré) pour un, deux, ou trois des marqueurs T utilisés.

| CD3 | CD8 | CD45RO | Nombre de tumeurs |
|-----|-----|--------|-------------------|
| - | - | + | 9 |
| - | + | + | 2 |
| + | + | + | 33 |
| + | + | - | 11 |
| + | - | - | 2 |
| + | - | + | 2 |
| - | + | - | 2 |

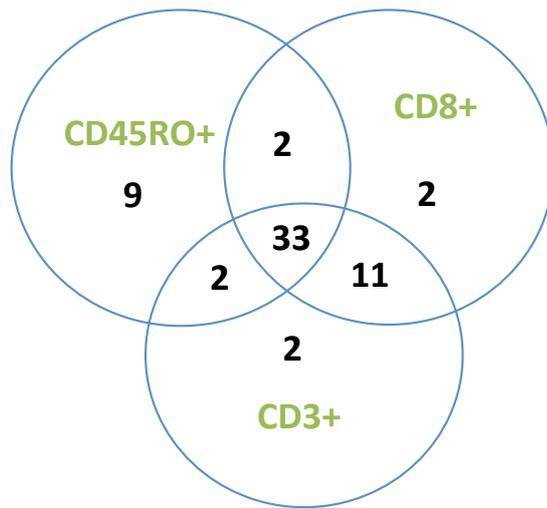


Figure 43 : Nombre de tumeurs présentant un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral (élevé ou modéré) pour un, deux, ou trois des marqueurs T utilisés.

Après analyse du recouplement dans les deux classes (Tableau 22) entre l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale CD3+ et l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale CD8+, nous observons qu'au sein de la classe 1, parmi les 45 tumeurs infiltrées ou moyennement infiltrées CD3+, 41 sont infiltrées ou moyennement infiltrées CD8+ et 4 sont non infiltrées CD8+ ; et que, parmi les 11 tumeurs non infiltrée CD3+, 4 sont moyennement infiltrées CD8+ et 7 sont non infiltrées CD8+. Pour la classe 2, les 3 tumeurs infiltrées CD3+ sont également infiltrées CD8+ et les 76 tumeurs non infiltrées CD3+ sont non infiltrées CD8+.

Tableau 22 : Recouplement dans les deux classes (définies par la CHA) entre les variables CD3 et CD8.

| | CD3\CD8 | Tumeur infiltrée | Tumeur moyennement infiltrée | Tumeur non infiltrée |
|-----------------|------------------------------|------------------|------------------------------|----------------------|
| CLASSE 1 | Tumeur infiltrée | 27 | 1 | 1 |
| | Tumeur moyennement infiltrée | 8 | 5 | 3 |
| | Tumeur non infiltrée | 0 | 4 | 7 |
| CLASSE 2 | Tumeur infiltrée | 3 | 0 | 0 |
| | Tumeur moyennement infiltrée | 0 | 0 | 0 |
| | Tumeur non infiltrée | 0 | 0 | 76 |

48 tumeurs avaient un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD3 d'intensité élevée ou modérée (Tableau 23). Il s'agissait de carcinomes ayant une localisation colique droite (54.2 % ; $p = 0.0296$) et étant de stade II (50 % ; $p = 0.0035$). Sur le plan moléculaire, ces tumeurs étaient associées à un statut MSI-H (33.3 % ; $p = 0.0001$), à une mutation BRAF (25 % ; $p = 0.0142$), et à une méthylation du promoteur MLH-1 (27.1 % ; $p = 0.0002$). Elles étaient inversement associées à la mutation KRAS (81.5 % ; $p = 0.0184$) et avec la délétion dans le locus APOBEC (89.6 % ; $p = 0.0123$).

Tableau 23 : Résumé des données anatomo-cliniques et moléculaires en fonction de l'importance de l'infiltration tumorale par des lymphocytes CD3+

* : valeurs de p significatives (<0,05), test du Khi² ou test de Fisher exact.

| Variable | Modalité | Infiltration lymphocytaire CD3+ modérée ou élevée (%) | Infiltration lymphocytaire CD3+ faible (%) | Total | p-value |
|--|--------------|---|--|-----------|----------|
| Effectif | | 48 | 87 | 135 | |
| Sexe | F | 23(47.9) | 39(44.8) | 62(45.9) | 0.8694 |
| | M | 25(52.1) | 48(55.2) | 73(54.1) | |
| Localisation | colon droit | 26(54.2) | 29(33.3) | 55(40.7) | 0.0296* |
| | colon gauche | 22(45.8) | 58(66.7) | 80(59.3) | |
| Stade pTNM | 1 | 4(8.33) | 8(9.2) | 12(8.89) | 0.0035* |
| | 2 | 24(50) | 26(29.9) | 50(37) | |
| | 3 | 17(35.4) | 26(29.9) | 43(31.9) | |
| | 4 | 3(6.25) | 27(31) | 30(22.2) | |
| Différenciation tumorale | bien | 4(8.33) | 10(11.5) | 14(10.4) | 0.4174 |
| | moyen | 30(62.5) | 60(69) | 90(66.7) | |
| | peu | 14(29.2) | 17(19.5) | 31(23) | |
| Invasion vasculaire | non | 33(68.8) | 44(50.6) | 77(57) | 0.0628 |
| | oui | 15(31.2) | 43(49.4) | 58(43) | |
| Sous-type histologique mucineux | non | 43(89.6) | 80(92) | 123(91.1) | 0.7541 |
| | oui | 5(10.4) | 7(8.05) | 12(8.89) | |
| Infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD8 + | élevé | 38(79.2) | 0(0) | 38(28.1) | <0.0001* |
| | modéré | 6(12.5) | 4(4.6) | 10(7.41) | |
| | faible | 4(8.33) | 83(95.4) | 87(64.4) | |
| Infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD45RO + | élevé | 25(52.1) | 3(3.45) | 28(20.7) | <0.0001* |
| | modéré | 10(20.8) | 8(9.2) | 18(13.3) | |
| | faible | 13(27.1) | 76(87.4) | 89(65.9) | |
| Statut MSI | MSI-H | 16(33.3) | 7(8.05) | 23(17) | 0.0001* |
| | MSI L | 1(2.08) | 0(0) | 1(0.741) | |
| | MSS | 31(64.6) | 80(92) | 111(82.2) | |
| BRAF | muté | 12(25) | 7(8.05) | 19(14.1) | 0.0142* |
| | non muté | 36(75) | 80(92) | 116(85.9) | |
| KRAS | muté | 9(18.8) | 35(40.2) | 44(32.6) | 0.0184* |
| | non muté | 39(81.2) | 52(59.8) | 91(67.4) | |
| PI3K | muté | 3(6.25) | 13(14.9) | 16(11.9) | 0.2234 |
| | non muté | 45(93.8) | 74(85.1) | 119(88.1) | |
| Méthylation de MLH1 | méthylé | 13(27.1) | 3(3.45) | 16(11.9) | 0.0002* |
| | non méthylé | 35(72.9) | 84(96.6) | 119(88.1) | |
| Méthylation de HERVH2 | déméthylé | 15(31.2) | 29(33.3) | 44(32.6) | 0.6787 |
| | méthylé | 31(64.6) | 51(58.6) | 82(60.7) | |
| Méthylation de LINE1 | déméthylé | 3(6.25) | 5(5.75) | 8(5.93) | 1 |
| | méthylé | 41(85.4) | 75(86.2) | 116(85.9) | |
| Délétion APOBEC3 | délété | 5(10.4) | 27(31) | 32(23.7) | 0.0123* |
| | non délété | 43(89.6) | 60(69) | 103(76.3) | |

48 tumeurs avaient un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD8 d'intensité élevée ou modérée (Tableau 24). Il s'agissait de carcinomes ayant une localisation colique droite (56.2 % ; $p = 0.0110$) et étant de stade II (50 % ; $p = 0.0142$). Sur le plan moléculaire, ces tumeurs étaient associées à un statut MSI-H (35.4 % ; $p < 0.0001$), à une mutation BRAF (29.2 % ; $p = 0.0005$), et à une méthylation du promoteur MLH-1 (27.1% ; $p = 0.0002$). Elles étaient inversement associées à la mutation KRAS (83.3 % ; $p = 0.0061$) et avec la délétion dans le locus APOBEC (85.7 % ; $p = 0.0392$).

Tableau 24 : Résumé des données anatomo-cliniques et moléculaires en fonction de l'importance de l'infiltration tumorale par des lymphocytes CD8+

* : valeurs de p significatives (<0,05), test du Khi² ou test de Fisher exact.

| Variable | Modalité | Infiltration lymphocytaire CD8+ modérée ou élevée (%) | Infiltration lymphocytaire CD8+ faible (%) | Total | p-value |
|---|--------------|---|--|-----------|----------|
| Effectif | | 48 | 87 | 135 | |
| Sexe | F | 25(52.1) | 37(42.5) | 62(45.9) | 0.3756 |
| | M | 23(47.9) | 50(57.5) | 73(54.1) | |
| Localisation | colon droit | 27(56.2) | 28(32.2) | 55(40.7) | 0.0110* |
| | colon gauche | 21(43.8) | 59(67.8) | 80(59.3) | |
| Stade pTNM | 1 | 4(8.33) | 8(9.2) | 12(8.89) | 0.0142* |
| | 2 | 24(50) | 26(29.9) | 50(37) | |
| | 3 | 16(33.3) | 27(31) | 43(31.9) | |
| | 4 | 4(8.33) | 26(29.9) | 30(22.2) | |
| Différenciation tumorale | bien | 4(8.33) | 10(11.5) | 14(10.4) | 0.2632 |
| | moyen | 29(60.4) | 61(70.1) | 90(66.7) | |
| | peu | 15(31.2) | 16(18.4) | 31(23) | |
| Invasion vasculaire | non | 31(64.6) | 46(52.9) | 77(57) | 0.2568 |
| | oui | 17(35.4) | 41(47.1) | 58(43) | |
| Sous-type histologique mucineux | non | 43(89.6) | 80(92) | 123(91.1) | 0.7541 |
| | oui | 5(10.4) | 7(8.05) | 12(8.89) | |
| Infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD3+ | élevé | 31(64.6) | 1(1.15) | 32(23.7) | <0.0001* |
| | modéré | 13(27.1) | 3(3.45) | 16(11.9) | |
| | faible | 4(8.33) | 83(95.4) | 87(64.4) | |
| Infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD45RO+ | élevé | 26(54.2) | 2(2.3) | 28(20.7) | <0.0001* |
| | modéré | 9(18.8) | 9(10.3) | 18(13.3) | |
| | faible | 13(27.1) | 76(87.4) | 89(65.9) | |
| Statut MSI | MSI-H | 17(35.4) | 6(6.9) | 23(17) | <0.0001* |
| | MSI L | 1(2.08) | 0(0) | 1(0.741) | |
| | MSS | 30(62.5) | 81(93.1) | 111(82.2) | |
| BRAF | muté | 14(29.2) | 5(5.75) | 19(14.1) | 0.0005* |
| | non muté | 34(70.8) | 82(94.3) | 116(85.9) | |
| KRAS | muté | 8(16.7) | 36(41.4) | 44(32.6) | 0.0061* |
| | non muté | 40(83.3) | 51(58.6) | 91(67.4) | |
| PI3K | muté | 3(6.25) | 13(14.9) | 16(11.9) | 0.2234 |
| | non muté | 45(93.8) | 74(85.1) | 119(88.1) | |
| Méthylation de MLH1 | méthylé | 13(27.1) | 3(3.45) | 16(11.9) | 0.0002* |
| | non méthylé | 35(72.9) | 84(96.6) | 119(88.1) | |
| Méthylation de HERVH2 | déméthylé | 16(33.3) | 28(32.2) | 44(32.6) | 0.3072 |
| | méthylé | 31(64.6) | 51(58.6) | 82(60.7) | |
| Méthylation de LINE1 | déméthylé | 3(6.25) | 5(5.75) | 8(5.93) | 1 |
| | méthylé | 41(85.4) | 75(86.2) | 116(85.9) | |
| Délétion APOBEC3 | délété | 6(12.5) | 26(29.9) | 32(23.7) | 0.0392* |
| | non délété | 42(87.5) | 61(70.1) | 103(76.3) | |

46 tumeurs avaient un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD45RO d'intensité élevée ou modérée (Tableau 25). Il s'agissait de carcinomes de stade II (47.8 % ; p = 0.0011). Sur le plan moléculaire, ces tumeurs étaient significativement associées à un statut MSI-H (32.6 % ; p = 0.0012) et à une méthylation du promoteur MLH-1 (23.9 % ; p = 0.0046). Elles étaient inversement associées à la mutation KRAS (82.6 % ; p = 0.0119).

Tableau 25 : Résumé des données anatomocliniques et moléculaires en fonction de l'importance de l'infiltration tumorale par des lymphocytes CD45RO+.

* : valeurs de p significatives (<0,05), test du Khi² ou test de Fisher exact.

| Variable | Modalité | Infiltration lymphocytaire CD45RO+ modérée ou élevée (%) | Infiltration lymphocytaire CD45RO+ faible (%) | Total | p-value |
|--|--------------|--|---|-----------|----------|
| Effectif | | 46 | 89 | 135 | |
| Sexe | F | 21(45.7) | 41(46.1) | 62(45.9) | 0.8916 |
| | M | 25(54.3) | 48(53.9) | 73(54.1) | |
| Localisation | colon droit | 23(50) | 32(36) | 55(40.7) | 0.1647 |
| | colon gauche | 23(50) | 57(64) | 80(59.3) | |
| Stade pTNM | 1 | 6(13) | 6(6.74) | 12(8.89) | 0.0011* |
| | 2 | 22(47.8) | 28(31.5) | 50(37) | |
| | 3 | 16(34.8) | 27(30.3) | 43(31.9) | |
| | 4 | 2(4.35) | 28(31.5) | 30(22.2) | |
| Différenciation tumorale | bien | 4(8.7) | 10(11.2) | 14(10.4) | 0.3437 |
| | moyen | 28(60.9) | 62(69.7) | 90(66.7) | |
| | peu | 14(30.4) | 17(19.1) | 31(23) | |
| Invasion vasculaire | non | 32(69.6) | 45(50.6) | 77(57) | 0.0535 |
| | oui | 14(30.4) | 44(49.4) | 58(43) | |
| Sous-type histologique mucineux | non | 44(95.7) | 79(88.8) | 123(91.1) | 0.2202 |
| | oui | 2(4.35) | 10(11.2) | 12(8.89) | |
| Infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD3+ | élevé | 26(56.5) | 6(6.74) | 32(23.7) | <0.0001* |
| | modéré | 9(19.6) | 7(7.87) | 16(11.9) | |
| | faible | 11(23.9) | 76(85.4) | 87(64.4) | |
| Infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD8+ | élevé | 31(67.4) | 7(7.87) | 38(28.1) | <0.0001* |
| | modéré | 4(8.7) | 6(6.74) | 10(7.41) | |
| | faible | 11(23.9) | 76(85.4) | 87(64.4) | |
| Statut MSI | MSI-H | 15(32.6) | 8(8.99) | 23(17) | 0.0012* |
| | MSI L | 0(0) | 1(1.12) | 1(0.741) | |
| | MSS | 31(67.4) | 80(89.9) | 111(82.2) | |
| BRAF | muté | 10(21.7) | 9(10.1) | 19(14.1) | 0.1141 |
| | non muté | 36(78.3) | 80(89.9) | 116(85.9) | |
| KRAS | muté | 8(17.4) | 36(40.4) | 44(32.6) | 0.0119* |
| | non muté | 38(82.6) | 53(59.6) | 91(67.4) | |
| PI3K | muté | 4(8.7) | 12(13.5) | 16(11.9) | 0.5928 |
| | non muté | 42(91.3) | 77(86.5) | 119(88.1) | |
| Méthylation de MLH1 | méthylé | 11(23.9) | 5(5.62) | 16(11.9) | 0.0046* |
| | non méthylé | 35(76.1) | 84(94.4) | 119(88.1) | |
| Méthylation de HERVH2 | déméthylé | 12(26.1) | 32(36) | 44(32.6) | 0.5329 |
| | méthylé | 31(67.4) | 51(57.3) | 82(60.7) | |
| Méthylation de LINE1 | déméthylé | 2(4.35) | 6(6.74) | 8(5.93) | 0.7909 |
| | méthylé | 41(89.1) | 75(84.3) | 116(85.9) | |
| Délétion APOBEC3 | délété | 8(17.4) | 24(27) | 32(23.7) | 0.3047 |
| | non délété | 38(82.6) | 65(73) | 103(76.3) | |

En résumé, 48 cas (35,6%) avaient un infiltrat lymphocytaire intratumoral d'intensité modérée ou sévère de sous-type CD3 et CD8 et pour le CD45RO, 46 cas (34,1%) avaient un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral d'intensité modérée ou sévère.

Sur le plan clinique et anatomopathologique, nous n'avons pas mis en évidence d'association statistiquement significative entre l'infiltration lymphocytaire (CD3, CD8, et CD45RO) avec le sexe, la différenciation tumorale, l'invasion vasculaire et le sous-type histologique mucineux.

De même, sur le plan moléculaire, nous n'avons pas mis en évidence d'association statistiquement significative entre l'infiltration lymphocytaire (CD3, CD8, et CD45RO) avec la mutation PI3K, la méthylation HERVH2 et la méthylation des LINE-1.

8.4. Analyse des principales altérations moléculaires

Concernant l'instabilité des microsatellites, 23 cas (17 %) étaient MSI-H, 1 cas (0,74 %) était MSI-L et 111 cas (82,2 %) était MSS. 19 cas (14 %) comportaient une mutation BRAF, 44 cas (33 %) une mutation KRAS, 16 cas (12 %) une mutation PI3K et 16 cas (12 %) présentaient une méthylation du promoteur du gène MLH1.

Il y avait 8 cas (6 %) avec déméthylation des séquences LINE-1 et 44 cas (33 %) avec déméthylation du rétrovirus endogène HERV-H2. Enfin, 32 cas (24 %) présentaient une délétion dans le locus APOBEC3 (Tableau 26).

Tableau 26 : Fréquence globale des altérations moléculaires analysées.

| Altérations moléculaires | Fréquence des altérations moléculaires (%) |
|--------------------------|--|
| MSI | 23/135 (17 %) |
| KRAS | 44/135 (33 %) |
| BRAF | 19/135 (14 %) |
| PI3K | 16/135 (12 %) |
| Déméthylation de LINE1 | 8/135 (6 %) |
| Méthylation de MLH1 | 16/135 (12 %) |
| Déméthylation de HERVH2 | 44/135 (33 %) |
| Délétion APOBEC | 32/135 (24 %) |

8.4.1. KRAS

44 tumeurs sur 135 étaient mutées KRAS. La mutation la plus fréquente était la G12D (14/44 ; 32 %) (Tableau 27 et Figure 44).

Tableau 27 : Spectre des différentes mutations KRAS retrouvées dans notre population.

| Mutations KRAS | Nombre de tumeurs (%) |
|----------------|-----------------------|
| G12A | 6 (14 %) |
| G12C | 3 (7 %) |
| G12D | 14 (32 %) |
| G12R | 2 (5 %) |
| G12S | 4 (9 %) |
| G12V | 8 (18 %) |
| G13D | 6 (14 %) |
| G13S | 1 (2 %) |

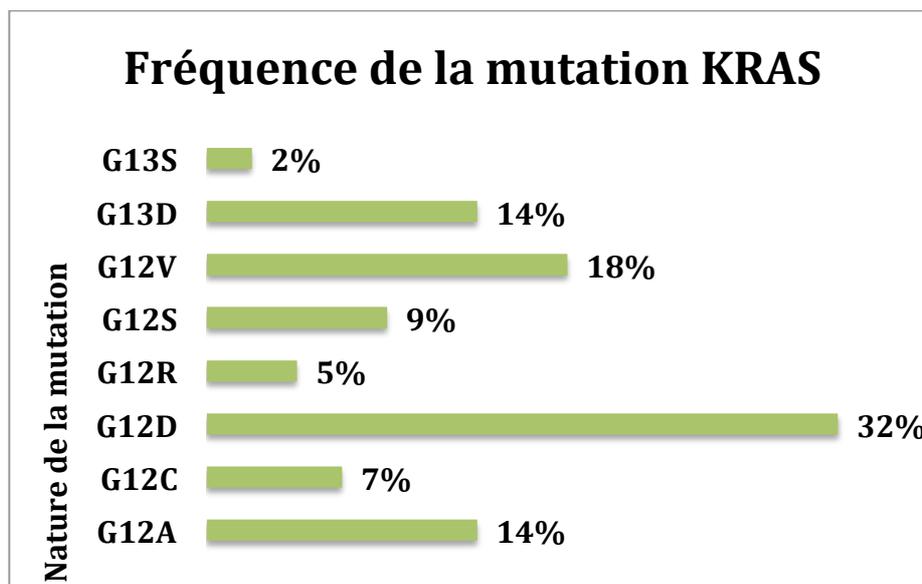


Figure 44 : Fréquence de la mutation KRAS.

8.4.2. Statut MSI et BRAF

D'après les données moléculaires, nous avons au sein de notre cohorte, 23 (17 %) tumeurs MSI et 19 (14,1 %) tumeurs mutées BRAF.

Après analyse du recoupement dans les deux classes entre le statut MSI et la mutation BRAF nous observons que dans la classe 1, parmi les 18 tumeurs MSI, 10 sont

mutées BRAF et 8 sont non mutées BRAF ; et que, parmi les 38 tumeurs MSS, 4 sont mutées BRAF et 34 sont non mutées BRAF. Pour la classe 2, nous avons 5 tumeurs MSI dont 2 mutées BRAF et 3 non mutées BRAF, et nous avons 74 tumeurs MSS dont 3 mutées BRAF contre 74 non mutées BRAF (Tableau 28).

Tableau 28 : Recoupement dans les deux classes (définies par la CHA) entre le statut MSI et la mutation BRAF.

| | Statut MSI | BRAF | |
|-----------------|------------|------|----------|
| | | muté | non muté |
| CLASSE 1 | MSI-H | 10 | 8 |
| | MSI L | 1 | 0 |
| | MSS | 3 | 34 |
| CLASSE 2 | MSI-H | 2 | 3 |
| | MSI L | 0 | 0 |
| | MSS | 3 | 71 |

8.4.3. MSI-CIMP et méthylation LINE-1

Dans notre cohorte, le niveau de méthylation des séquences LINE-1, déterminé par pyroséquençage après conversion des échantillons au bisulfite, se situe pour la majorité de tumeurs colorectales étudiées, entre 60 et 80 % (Figure 45).

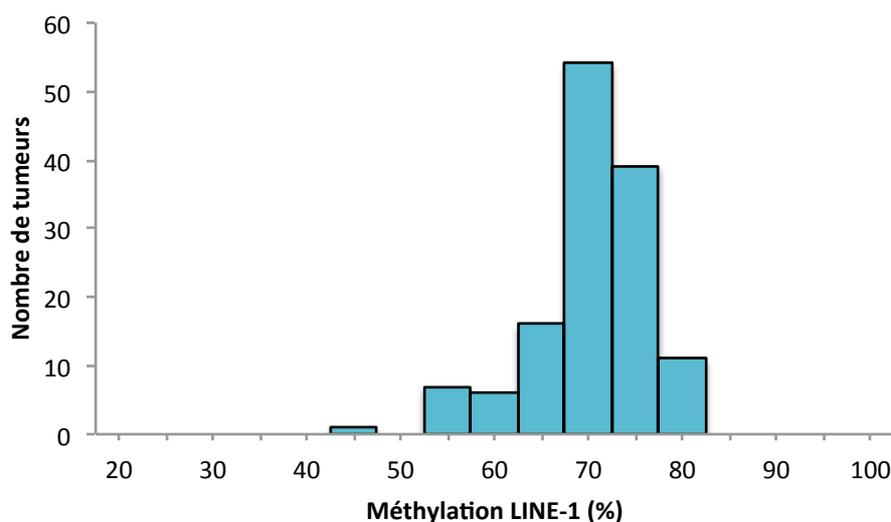


Figure 45 : Distribution du niveau de méthylation des séquences LINE-1 au sein de la cohorte de 135 tumeurs colorectales. La méthylation des séquences LINE-1 a été déterminée par pyroséquençage après conversion des échantillons au bisulfite comme décrit dans matériel et méthode.

La présence du statut MSI-H ou CIMP-H ou les deux paraît plus fréquent dans les tumeurs colorectales avec une méthylation de LINE-1 $\geq 70\%$ (19 % = 20/105, $p=1$) et entre 60-70 % (13.7 % = 3/22, $p=1$) que dans les tumeurs colorectales avec une méthylation de LINE-1 $< 50\%$ (0 % = 0 /1) (Figure 46).

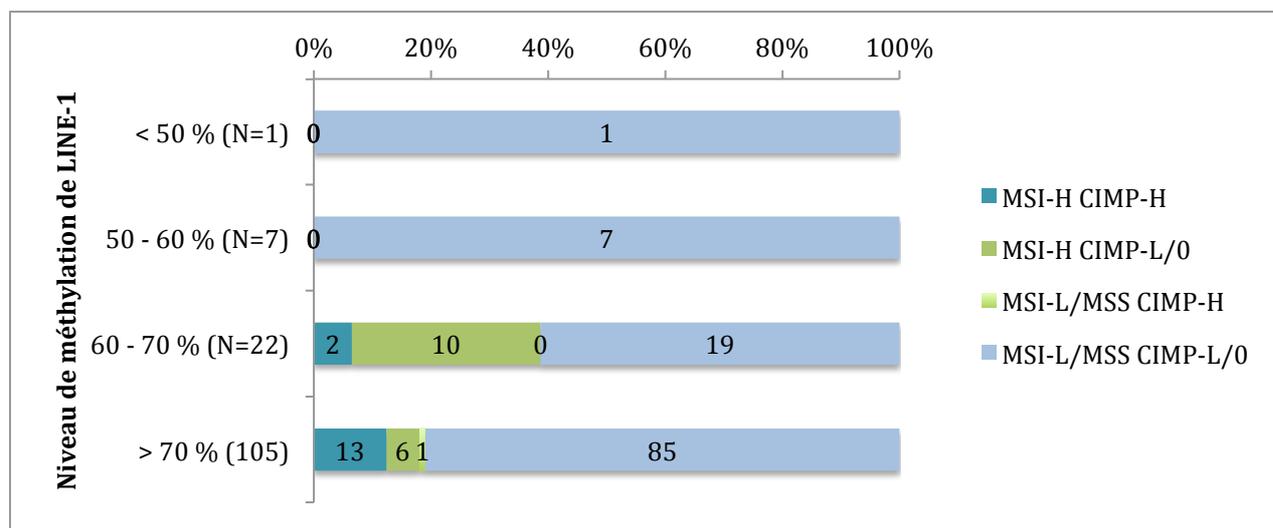


Figure 46 : Fréquence des sous-types de CCR selon le niveau de méthylation LINE-1.

8.4.4. Analyse des relations entre infiltrat lymphocytaire et les autres marqueurs moléculaires

Le Tableau 29 montre le pourcentage des anomalies moléculaires en relation avec l'infiltrat lymphocytaire intra-tumoral (pour les 3 sous-types de lymphocytes T).

Tableau 29 : Résultats des analyses moléculaires en fonction de l'importance de l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale pour CD3, CD8 et CD45RO.

| | MSI-H | Mutation BRAF | Mutation KRAS | Mutation PI3K | Méthylation MLH1 | Déméthylation HERVH | Déméthylation LINE-1 | Délétion apobec3 |
|---------------|--------|---------------|---------------|---------------|------------------|---------------------|----------------------|------------------|
| CD3 | 69.6 % | 63 % | 20.5 % | 18.8 % | 81.25 % | 34 % | 37.5 % | 15.6 % |
| CD8 | 73.9 % | 73.6 % | 22.2 % | 18.8 % | 81.25 % | 36.4 % | 37.5 % | 18.8 % |
| CD45RO | 65.2 % | 52.6 % | 20.5 % | 25 % | 68.75 % | 27.3 % | 25 % | 25 % |

8.4.5. HLA-G

Les trois génotypes HLA-G, dans notre population, sont répartis de la manière suivante : 7 tumeurs (12 %) avaient un génotype +14/+14, 71 tumeurs (52 %) avaient un génotype +14/-14, et 47 avaient un génotype -14/-14 (Figure 47).

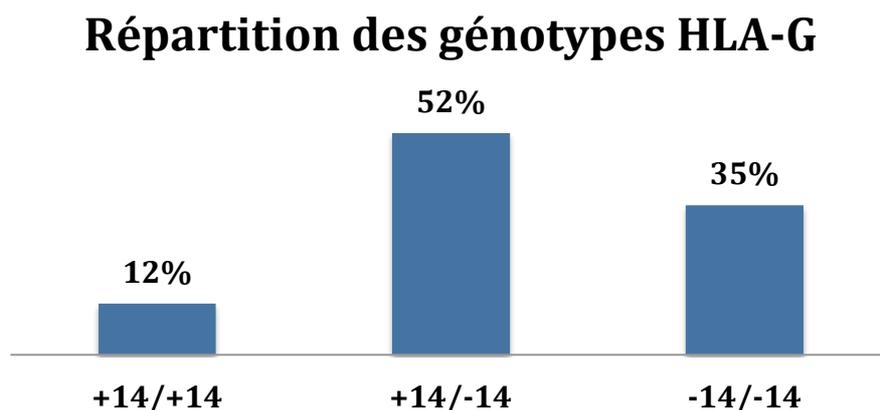


Figure 47 : Répartition des génotypes HLA-G.

Nous avons vérifié si notre population était à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Il n'existe pas de référence de fréquence allélique HLA-G chez les caucasiens. Nous avons donc pris pour référence une population coréenne d'après un article.

Notre population est à l'équilibre de Hardy-Weinberg. La valeur seuil pour 3 2=1 degré de liberté et un risque de 5 % est 3.84. La valeur statistique X^2 étant inférieure à la valeur seuil, on conclut qu'il n'y a pas de différence entre la distribution observée (notre population) et la distribution théorique (population coréenne).

Tableau 30 : Résultats du calcul de la fréquence allélique d'une population coréenne (99 patients) d'après l'équilibre de Hardy-Weinberg.

| Genotype | Expected | Observed |
|--------------------|----------|----------|
| Common homozygotes | 37.59 | 35 |
| Heterozygotes | 46.83 | 52 |
| Rare homozygotes | 14.59 | 12 |

Calcul de la fréquence allélique : p allele frequency = 0.62; q allele frequency = 0.38

Test de Chi deux : $X^2 = 1.21$

Tableau 31 : Résultats du calcul de la fréquence allélique d'une population coréenne (135 patients) d'après l'équilibre de Hardy-Weinberg.

| Genotype | Expected | Observed |
|--------------------|----------|----------|
| Common homozygotes | 74.07 | 73 |
| Heterozygotes | 51.85 | 54 |
| Rare homozygotes | 9.07 | 8 |

Calcul de la fréquence allélique : p allele frequency = 0.74; q allele frequency = 0.26

Test de Chi deux : $X^2 = 0.23$

Parmi les 48 tumeurs avec une infiltration lymphocytaire intra-tumorale CD8+ d'intensité modérée ou sévère, 24 avaient un génotype HLA-G +14/-14. De même, parmi les 87 tumeurs non infiltrées CD8, 47 avaient un génotype HLA-G +14/-14. Aucune tumeur avec une infiltration lymphocytaire intra-tumorale CD8+ ne présentait un génotype HLA-G -14/-14 (Tableau 32).

Tableau 32 : Association entre infiltration lymphocytaire intra-tumorale CD8+ et HLA-G.

| Infiltration intra-tumorale CD8+ | HLA-G | |
|----------------------------------|----------------|----------------|
| | +14/+14 | +14/-14 |
| Infiltrées | 7/48 (14.6 %) | 24/48 (50 %) |
| Non infiltrées | 10/87 (11.5 %) | 47/87 (53.5 %) |

Les résultats statistiques ne mettent pas en évidence de lien entre l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale et le HLA-G.

8.4.6. Etude de la corrélation entre le statut c-MET et les tumeurs M1

Nous avons regardé aux vues de nos résultats, si nous observions une influence de la taille du promoteur c-Met (longueur du polymorphisme) sur le stade M (classification

TNM). Pour l'analyse statistique, nous avons choisi de classer les polymorphismes C-Met en trois catégories, de façon arbitraire, en fonction de leur longueur : ≤ 227 , 229-231, et > 231 .

31 tumeurs sur les 135 sont classées M1, selon la classification TNM. 23 (74.2 %) tumeurs ont un polymorphisme C-Met ≤ 227 , 5 (16 %) ont un polymorphisme C-Met 229-231, et 3 (9.7 %) ont un polymorphisme C-Met > 231 (Tableau 33).

Tableau 33 : Nombre de tumeurs M1 en fonction de la taille du polymorphisme C-Met.

| TNM | C-Met | | |
|--------------|------------|----------|----------|
| | ≤ 227 | 229-231 | > 231 |
| T3N0M1 | 4 | 1 | 0 |
| T3N2M1 | 2 | 1 | 0 |
| T3-4N2M1 | 1 | 0 | 0 |
| T4N0M1 | 5 | 1 | 0 |
| T4N1M1 | 5 | 0 | 2 |
| T4N2M1 | 6 | 2 | 1 |
| Total | 23 | 5 | 3 |

Après analyse du recoupement dans les deux classes entre les variables TNM binaire et le polymorphisme C-Met (Tableau 34 et Tableau 35), nous observons qu'au sein de la classe 1, parmi les 5 tumeurs métastasées, 4 ont un polymorphisme C-Met ≤ 227 , et 1 a un polymorphisme C-Met 229-231 ; et, parmi les 51 tumeurs non métastasées, 40 ont un polymorphisme C-Met ≤ 227 , 9 ont un polymorphisme C-Met 229-231, et 2 tumeurs ont un polymorphisme C-Met > 231 . Pour la classe 2, il y a 52 tumeurs non métastasées dont 37 avec un polymorphisme C-Met ≤ 227 , 4 avec un polymorphisme C-Met 229-231, et 11 avec un polymorphisme C-Met > 231 ; et, il y a 26 tumeurs métastasées dont 19 avec un polymorphisme C-Met ≤ 227 , 4 avec un polymorphisme C-Met 229-231, et 3 avec un polymorphisme C-Met > 231 .

Tableau 34 : Code selon lequel la variable TNM a été binarisée.

| | |
|----------|------------------|
| T2N0M0 | Métastase |
| T2N1M0 | |
| T3/4N1M0 | |
| T3N0M0 | |
| T4N1M0 | |
| T3N1M0 | |
| T3N2M0 | |
| T4N0M0 | |
| T4N2M0 | |
| T4/3N2M1 | |
| T3N0M1 | Pas de métastase |
| T4N0M1 | |
| T3N2M1 | |
| T4N1M1 | |
| T4N2M1 | |

Tableau 35 : Recoupement dans les deux classes (définies par la CHA) entre les variables TNM binaire et le polymorphisme C-Met.

| | C-Met \ TNM binaire | Métastase | Pas de métastase |
|----------|---------------------|-----------|------------------|
| CLASSE 1 | ≤227 | 4 | 40 |
| | 229-231 | 1 | 9 |
| | >231 | 0 | 2 |
| CLASSE 2 | ≤227 | 19 | 37 |
| | 229-231 | 4 | 4 |
| | >231 | 3 | 11 |

9. Discussion

La carcinogénèse colorectale est un processus d'initiation et de transformation de cellules normales en cellules tumorales suite à des modifications génétiques et épigénétiques de l'ADN. Le CCR se développe à la suite d'une série d'événements moléculaires conduisant à la transformation d'une muqueuse normale en adénocarcinome. L'instabilité du génome des cellules en cours de transformation est un élément important de ce processus de carcinogénèse. Deux grandes voies de carcinogénèse colorectale correspondant à deux types d'instabilité génomique ont été décrites : l'instabilité chromosomique (CIN) et l'instabilité des microsatellites (MSI).

L'instabilité chromosomique, caractérisée par une aneuploïdie, est le type le plus commun d'instabilité génomique concernant des régions entières ou ciblées de chromosomes et qui résulte en la perte ou l'amplification d'un ou plusieurs allèle(s). Celui-ci représente 85% des CCR sporadiques. Les altérations génétiques les plus courantes sont des mutations des gènes APC et KRAS.

Le mécanisme d'instabilité des microsatellites caractérise les cancers du syndrome HNPCC et environ 15% des CCR sporadiques. Il se caractérise par une réparation déficiente de l'ADN, un défaut de réparation des mésappariements d'ADN dans les tumeurs. Les carcinomes colorectaux MSI-H sporadiques sont habituellement causés par la méthylation du promoteur de MLH1. Ces carcinomes colorectaux MSI-H ont un phénotype distinct. Les tumeurs MSI-H ont surtout une localisation proximale, dans le côlon droit, un infiltrat lymphocytaire important, un type histologique mucineux et peu différencié. Les mutations de BRAF sont fréquemment observées dans les carcinomes colorectaux MSI-H sporadiques. Cette caractéristique permet de les distinguer d'une autre forme de carcinome colique, qui résulte de la transmission verticale d'une mutation d'un des gènes de réparation des mésappariements (MMR), le syndrome de Lynch.

L'étude des mécanismes de carcinogénèse dans notre population est en accord avec les observations faites dans la littérature. En effet, nous avons observé que la voie de l'instabilité chromosomique représentait 83 % (112 tumeurs avaient un statut MSS) des tumeurs de notre cohorte contre 70-85 % dans ce qui est décrit dans la littérature, et que la voie de l'instabilité des microsatellites représentait 9 % (13 tumeurs avaient un

statut MSI, étaient BRAF muté, et étaient associée à une méthylation du promoteur de MLH1) des tumeurs de notre cohorte contre 12 % dans ce qui est décrit dans la littérature pour les CCR sporadiques.

Dans notre cohorte, nous avons 119 (88 %) tumeurs déméthylées MLH1 contrairement à la cohorte d'Ogino. Ceci pourrait être dû à un problème technique lors du traitement des échantillons au bisulfite. De plus, parmi les 16 tumeurs méthylées MLH1, seules 10 sont mutées BRAF. Des études récentes ont montré qu'il n'y aurait pas toujours de corrélation entre la présence de la méthylation MLH1 dans les tumeurs colorectales MSI-H indiquant généralement la participation de CIMP dans le développement tumoral. Pour cela, il aurait fallu analyser en plus de MLH1 d'autres marqueurs du panel du phénotype CIMP tels que : CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1, CRABP1, CDKN2A. Le taux de méthylation des tumeurs colorectales est variable en fonction des marqueurs utilisés (de leur sensibilité et de leur spécificité) et de la technique utilisée pour la recherche et la quantification de la méthylation.

Quatre sous-types de CCR ont été identifiés en combinant les statuts CIMP et la méthylation MLH1 ; on retrouve par ordre de fréquence : CIMP-L/0 MLH1m-, CIMP-H MLH1m+, CIMP-L/0 MLH1m+, et CIMP-H MLH1m- (Kim et al., 2013).

L'étude du CIN a été nécessaire, celle-ci a été réalisée secondairement à ce travail.

En ce qui concerne l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale, l'instabilité des microsatellites, et le pronostic, dans notre étude, les tumeurs MSI-H ont un degré plus élevé d'infiltration lymphocytaire intra-tumorale, et cela, quel que soit l'anticorps utilisé [CD3+ (p= 0.0001) ; CD8+ (p= 0.0001) et CD45RO+ (p= 0.0012)]. Ce résultat est en accord avec les données de précédentes études (Deschoolmeester et al., 2010; Lee et al., 2010; Dahlin et al., 2011). Dans notre étude, on retrouve que l'infiltration lymphocytaire pour les trois sous-types, est associée à la méthylation du promoteur de MLH1 et à l'absence de mutation du gène KRAS, mais seules les tumeurs avec des infiltrats lymphocytaires CD3+ et CD8+ ont été associées à la mutation de BRAF. Alors que d'après les données de littérature et comme déjà mentionné, les tumeurs MSI-H sont situées préférentiellement dans le colon droit, et associées à une mutation BRAF, à une méthylation de MLH1 et à l'absence de mutation du gène KRAS. On note aussi que les

tumeurs qui sont infiltrées par les trois sous-types de lymphocytes T sont plus souvent de stade II (50% de CD3+, p= 0,0035 ; 50 % de CD8+, p= 0,0142 et 47,8 % de CD45RO+, p= 0,0011), qui ont un pronostic plutôt favorable. Dans la plupart des études, l'instabilité des microsatellites dans le cancer du côlon a été associée à une meilleure survie, bien que le mécanisme qui sous-tend cette association reste largement inconnu. Nos résultats suggèrent que la stimulation d'une réponse immunitaire de l'hôte dans les tumeurs instable pourrait offrir une explication. Plus précisément, la forte association entre le phénotype MSI et l'infiltration lymphocytaire soutient l'hypothèse selon laquelle les cellules tumorales présenteraient des peptides comportant des mutations qui les différencieraient des antigènes du soi et résulteraient de l'instabilité des microsatellites, qui par l'introduction de décalages du cadre de lecture lors de la traduction induirait la formation de variants protéiques. Cette présentation d'antigènes pourrait déclencher une réponse immunitaire anti-tumorale de l'hôte.

Dans une étude, Nosho et ses collaborateurs (Nosho et al., 2010) ont étudié l'infiltrat inflammatoire dans 768 carcinomes colorectaux, et ont trouvé qu'en analyse univariée, la présence d'un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral CD8+ ou CD45RO+ était significativement associée à une meilleure survie globale (p <0.04). En analyse multivariée, seules les tumeurs avec un infiltrat lymphocytaire CD45RO+ étaient associées à une meilleure survie globale (p= 0.0036), quel que soit le stade (marqueur pronostic indépendant). Ils ont suggéré dans les études précédentes, que l'amélioration de survie associée à l'infiltrat lymphocytaire CD8+ pourrait être due, en partie, à la présence de lymphocytes exprimant également le CD45RO. Ils n'ont pas retrouvé d'association entre l'infiltrat lymphocytaire intra-tumoral et le stade de la tumeur. Dans une autre étude, l'analyse de 599 tumeurs colorectales (Mlecnik et al., 2011) a montré que la présence d'un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral à la fois CD3+, CD8+ et CD45RO+ était associée à des tumeurs de stade I et II (p <0,001) et associée aussi à une meilleure survie en analyse univariée (p <0,005) et en analyse multivariée (p <0,001). L'infiltration intra-tumorale par des lymphocytes T cytotoxiques ou mémoires pourrait être le reflet de l'immunité anti-tumorale formée grâce à la combinaison de multiples paramètres tumoraux (altération de l'expression des antigènes leucocytaires, expression d'antigènes tumoraux, des multiples voies de carcinogénèse (MSI, CIN, CIMP), et de facteurs tels que le microenvironnement tumoral. Comme dans ces deux études, nous

retrouvons une association entre l'infiltrat lymphocytaire intra-tumoral et le stade tumoral. Pour le CD45RO, comme dans le travail de Mlecnik (et à la différence du travail du Nosho), nous ne mettons pas en évidence de différence avec les marquages CD3 et CD8.

Nous n'avons pas étudié la relation entre la survie, car nous ne disposions pas des données du suivi des patients. Afin de pouvoir évaluer la survie des patients inclus dans notre étude, il faudrait réaliser une étude prospective.

Des études ont rapporté une relation entre l'hypométhylation des séquences LINE-1, l'hypométhylation globale de l'ADN, et l'instabilité chromosomique. L'hypométhylation globale de l'ADN et l'instabilité chromosomique affectent le statut épigénétique et le nombre de copies des gènes. De ce fait, il n'est pas surprenant que l'hypométhylation globale de l'ADN et/ou l'instabilité chromosomique affectent le niveau d'expression des gènes qui contribuent aux interactions avec les cellules hôtes et à la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte.

L'étude de Nosho (Nosho et al., 2010) est la seule à avoir examiné la relation entre la méthylation des séquences LINE-1 et l'infiltration inflammatoire de la tumeur. Ils ont constaté que CD45RO+ était associé inversement avec la déméthylation des séquences LINE-1 [306 cas (41%) étaient déméthylés, $p=0,0035$]. Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de relation entre la déméthylation des séquences LINE-1 et l'infiltrat lymphocytaire intra-tumoral, pour les trois sous-types de lymphocytes T étudiés. Ceci pourrait être dû au petit nombre de cas déméthylés [8 cas (6%)]. La cause de cette différence du pourcentage de déméthylation des séquences LINE-1 entre notre étude et celle de Nosho n'est pas évidente, reflétant peut-être des différences dans les populations étudiées, ou des problèmes techniques lors de la conversion des échantillons.

Des études (Jass, 2007; Ogino et al., 2008) ont montré que l'hypométhylation des séquences LINE-1 était inversement associée aux statuts MSI et CIMP dans les CCR. Les statuts CIMP-high et MSI-H seraient inversement associés avec l'hypométhylation des séquences LINE-1, suggérant ainsi que les phénotypes CIMP/MSI et l'hypométhylation génomique pourraient représenter des voies de carcinogénèse colorectale différentes.

Notre étude est la première à avoir examiné la relation entre l'infiltrat lymphocytaire et la déméthylation HERV-H. Pour les 44 cas (32,6%) qui étaient déméthylés dans la LTR

de HERV-H, on ne retrouve pas d'association entre l'infiltration lymphocytaire et cette déméthylation HERV-H ($p= 0,6787$ pour CD3+, $p= 0,3072$ pour CD8+, $p= 0,5329$ pour CD45RO+). Wentzensen (Wentzensen et al., 2007) a montré dans une de ses études qu'un HERV-H était surexprimé dans 16 CCR sur 34 (47 %), alors que le tissu sain n'exprimait pas l'HERV-H. Cette expression était corrélée à la déméthylation de la LTR de ce HERV.

Zheng et ses collaborateurs (Zheng et al., 2005) ont retrouvé que la région 22q13 pourrait aussi héberger un gène suppresseur de tumeur, qui serait surtout impliqué dans le cancer du colon gauche ($p= 0,02$). Ce gène serait désactivé par perte d'hétérozygotie (28,38% des cas), liée à une instabilité chromosomique.

Dans notre étude, nous avons étudié une délétion dans le locus APOBEC3, observée dans 32 cas (23,7%) dont 18 cas sont situés dans le colon gauche. Nous retrouvons qu'elle est inversement associée avec la présence d'un infiltrat lymphocytaire intra-tumoral de sous-type CD3 ($p=0,0123$) et CD8 ($p= 0,0392$).

Cette délétion est plus souvent retrouvée dans les tumeurs où l'infiltrat lymphocytaire intra-tumoral est faible. Les relations entre cette délétion et la tumorigénèse des CCR restent à explorer.

Une étude récente sur le rôle d'APOBEC3B dans le cancer du sein (Burns et al., 2013) à montrer que la cytidine désaminase APOBEC3B serait une source enzymatique importante de mutations. En effet, APOBEC3 jouerait un rôle mutateur. La délétion APOBEC3 pourrait survenir en réaction, par pression de sélection négative. La première étape serait la sélection de cellules qui surexprimeraient APOBEC3B, acquerraient des mutations avantageuses sur le plan tumoral, puis la pression sélective agissant, une délétion surviendrait, pour diminuer le fardeau de mutations qui pourraient finir par être délétère sur le plan évolutif. Ces tumeurs ayant une des mutations seraient plus infiltrées. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour comprendre la régulation A3B et son interaction potentielle avec d'autres oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs. L'existence d'un lien entre l'augmentation de la protéine APOBEC3B et l'inactivation du gène p53 semblerait apparaître dans les tumeurs primitives et dans les lignées cellulaires. L'inactivation de p53 pourrait être nécessaire pour permettre aux cellules de contourner les modifications de l'ADN provoquées par A3B. A3B est un facteur dominant sous-jacent qui contribue à l'hétérogénéité tumorale.

La délétion APOBEC3 serait associée à la déméthylation des séquences LINE-1 et des rétrovirus endogènes HERV.

Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre HLA-G et un infiltrat intra-tumoral CD3+, CD8+, ou CD45RO+. Nous ne disposons pas de plasma des patients inclus dans notre étude, de ce fait, n'avons pas pu dosé HLA-G. Des études (Cao et al., 2011) ont montré que HLA-G pourrait être utilisé comme marqueur tumoral en association au dosage de l'ACE. D'autres études (Ye et al., 2007) ont montré que l'expression de HLA-G dans les tumeurs colorectales était corrélée avec le degré d'invasion, le grade histologique, la réponse immunitaire de l'hôte, la présence de métastases ganglionnaires, et le stade clinique. Les patients avec des tumeurs n'exprimant pas HLA-G auraient une meilleure survie que les patients exprimant HLA-G.

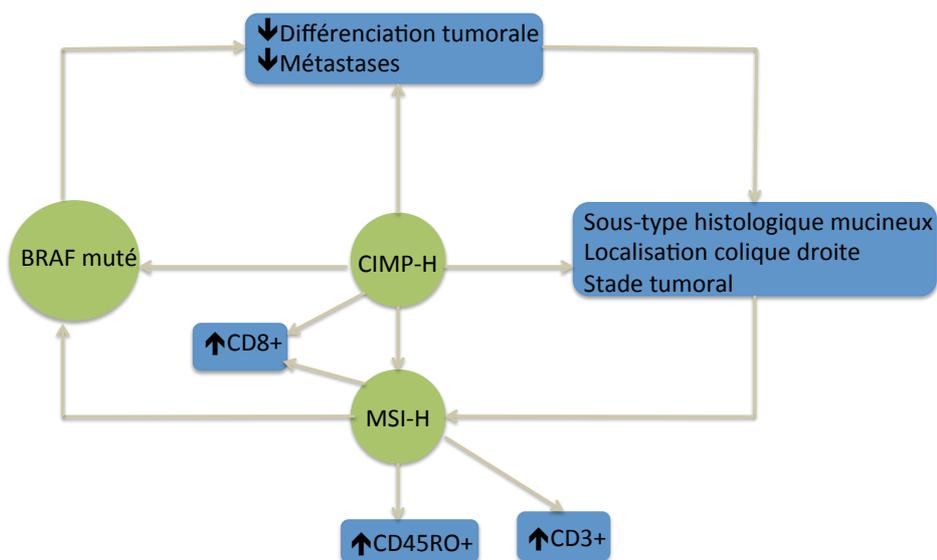


Figure 48 : Relations mises en évidence dans notre étude, entre CIMP, MSI, BRAF, caractéristiques clinico-pathologiques, et infiltration lymphocytaire intra-tumorale

Ainsi, notre étude de 135 carcinomes colorectaux ne met pas en évidence de relation entre l'infiltrat lymphocytaire intra-tumoral, la déméthylation des séquences LINE-1, la déméthylation de la LTR des HERV-H, et d'autres variables moléculaires et clinico-pathologiques. Ceci pourrait être dû au manque de puissance de notre étude. Ainsi d'autres études, explorant un plus grand nombre de patients seront nécessaires pour valider ce résultat. Elles permettraient également de préciser la place des altérations moléculaires identifiées dans la séquence « adénome-carcinome ». Cependant, nous

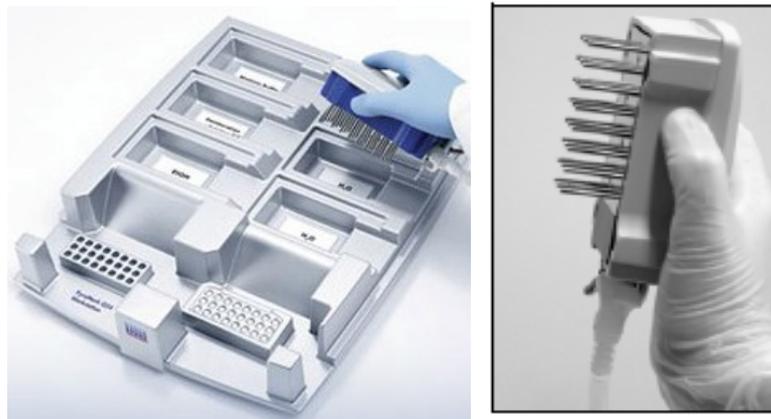
avons retrouvé que l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale est associée au phénotype MSI-H et à un stade tumoral bas.

En conclusion, il est donc évident qu'en dépit de nombreuses avancées dans la compréhension de l'apparition et la progression des CCR, des études sont encore nécessaires. Malgré l'abondance des voies moléculaires et des marqueurs continuellement rapportés, le taux de mortalité reste élevé dans le CRC. L'objectif pour l'avenir réside dans le développement d'outils de recherche qui permettent de cibler la détection précoce de l'apparition de CCR afin de diminuer les taux de mortalité et de morbidité liés au CCR.

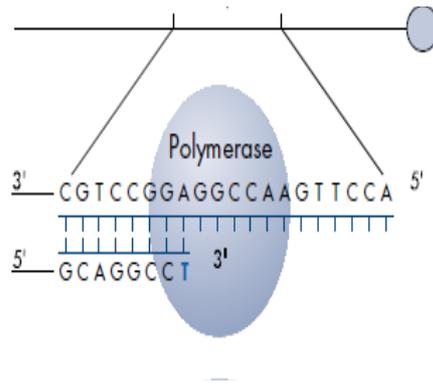
Annexe : Pyroséquençage



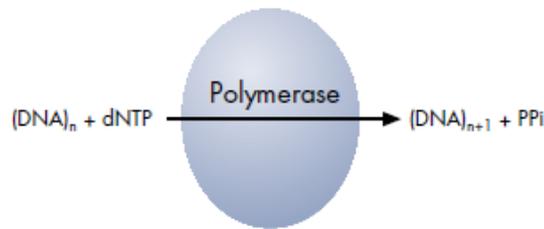
Etape 1 : Amplification du fragment d'ADN. Le brin servant de matrice pour le pyroséquençage est biotinylé (amorce reverse biotinylé). Le produit de PCR biotinylé est fixé sur des billes de streptavidine. Dénaturation. Relargage en P24 en présence du primer de séquençage. Chargement de la plaque dans l'appareil.



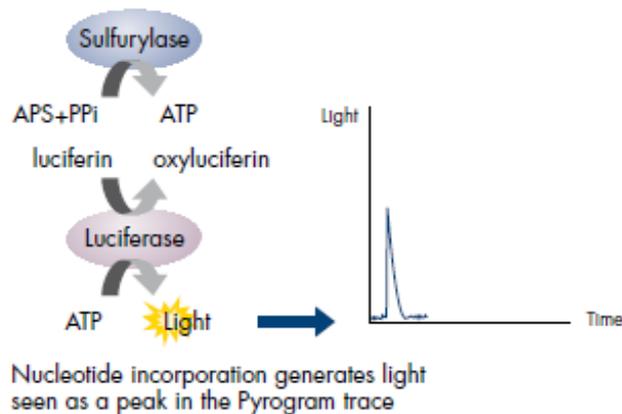
Etape 2 : Incubation avec la DNA polymérase, l'ATP sulfurylase, la luciferase, l'apyrase, l'adenosine 5' phosphosulfate (APS), et la luciferine.



Etape 3 : Ajout du 1^{er} nucléotide, incorporation si complémentaire du brin matrice. Relargage d'un PPi proportionnel à la quantité de nucléotide incorporé.



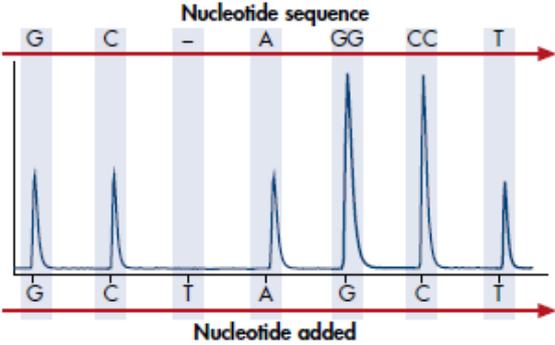
Etape 4 : Conversion du PPi en ATP. ATP + luciférase permet la conversion de la luciférin en oxyluciférin, réaction qui va générer de la lumière, proportionnelle à la quantité d'ATP. La lumière est détectée par un capteur et traduit sous forme de pyrogram.



Etape 5 : Dégradation des dNTP et de l'ATP résiduels avant l'injection d'un nouveau nucléotide.

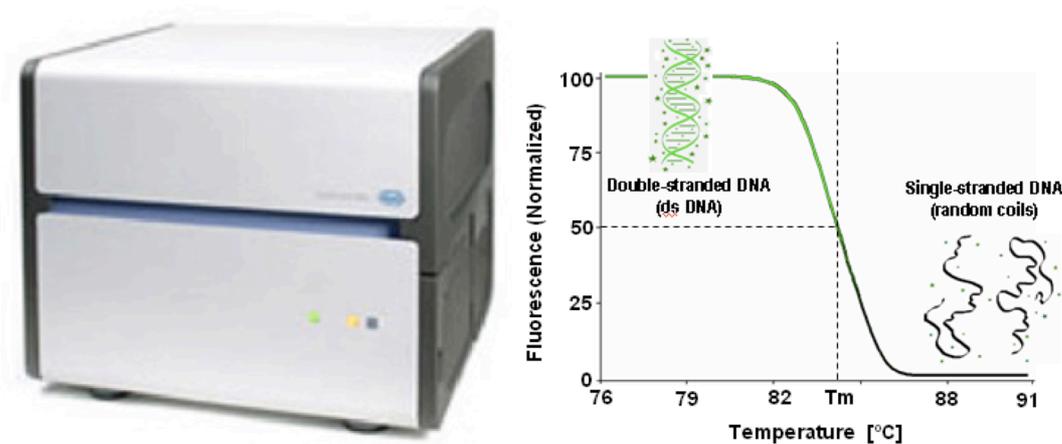


Etape 6 : Addition séquentielle des dNTP. Détermine la séquence nucléotidique en fonction des signaux sur le pyrogramme.



Annexe : HRM

L'HRM est une technique de criblage rapide d'une population par détermination du statut « muté » ou « non muté ». L'HRM permet la caractérisation d'échantillons d'ADN par leur comportement de dissociation de double à simple brin par une augmentation de température, et la détection de mutations par modification de la courbe.



Un fluorochrome intercalant à de l'ADN amplifié est intégré. Puis, l'augmentation de température de façon progressive entraîne une dénaturation des fragments d'ADN, éliminant le fluorochrome, ce qui provoque une diminution de la fluorescence. Ainsi, à une séquence d'ADN donnée correspond, une fluorescence spécifique représentée par une courbe de fusion.

L'ADN hétérozygote forme des hétéroduplex qui commencent à se séparer en un simple brin à des températures plus basses que l'ADN homozygote ; de plus, la forme des courbes de dissociation est différente selon qu'il s'agit d'un ADN homo- ou hétérozygote.

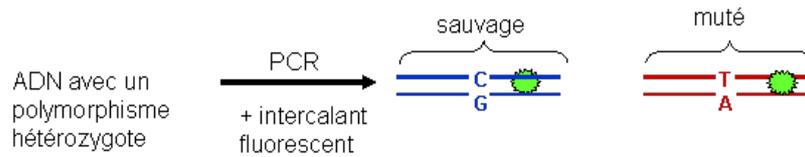


Figure 49 : Amplification

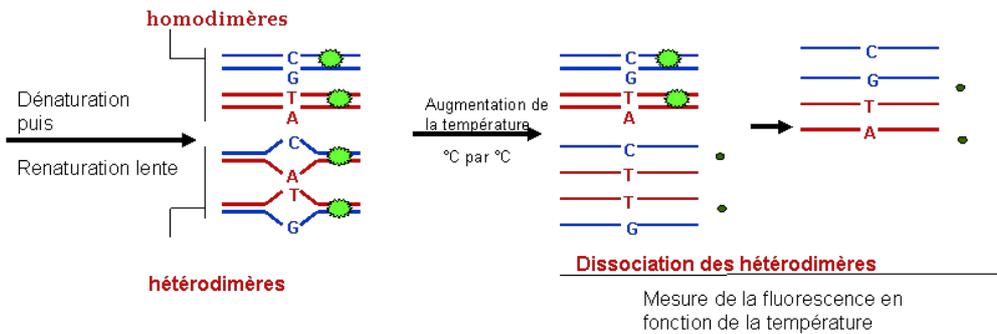


Figure 50 : Formation d'hétéroduplex, courbes de fusion.

Une fois la PCR réalisée, l'analyse des courbes de fusion se déroule en trois étapes :

- La première étape est la normalisation, c'est-à-dire que l'on va mettre les signaux *pré-melting* à 100% et les signaux *post-melting* à 0%, en essayant d'obtenir toutes les courbes regroupées. On a alors une modification de la forme des courbes qui prennent un aspect différent.

- La deuxième étape est normalisation du signal, appelée « *Tm shift* », qui consiste à compenser la dispersion entre les échantillons d'un même groupe pour en améliorer l'homogénéité. Le logiciel applique par défaut une valeur de 5%.

- La dernière étape est appelée *difference plot* et consiste à analyser les différences dans la forme des courbes de fusion en soustrayant une courbe de référence, ce qui génère une différences de points, entraînant la mise des courbes de fusion similaires en grappes.

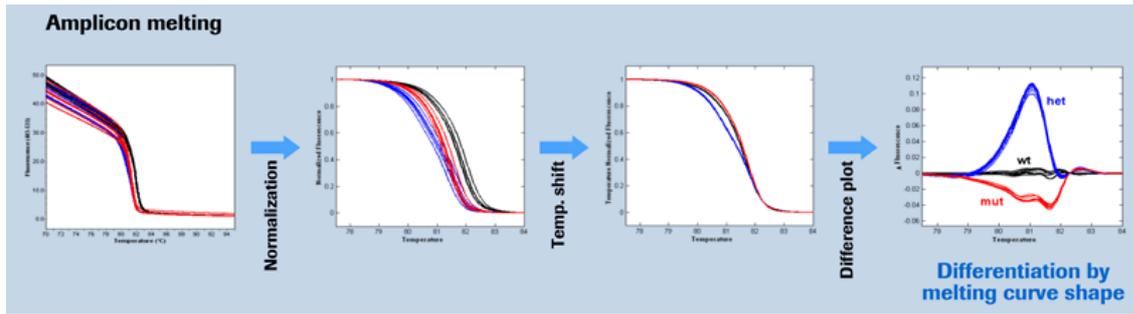


Figure 51 : Analyse des courbes de fusion.

Bibliographie

Arends, J.W. (2000). Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J. Pathol.* *190*, 412–416.

Bedeir, A., and Krasinskas, A.M. (2011). Molecular diagnostics of colorectal cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *135*, 578–587.

Burgess, A.W., Faux, M.C., Layton, M.J., and Ramsay, R.G. (2011). Wnt signaling and colon tumorigenesis--a view from the periphery. *Exp. Cell Res.* *317*, 2748–2758.

Burns, M.B., Lackey, L., Carpenter, M.A., Rathore, A., Land, A.M., Leonard, B., Refsland, E.W., Kotandeniya, D., Tretyakova, N., Nikas, J.B., et al. (2013). APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature* *494*, 366–370.

Cao, M., Yie, S.-M., Liu, J., Ye, S.R., Xia, D., and Gao, E. (2011). Plasma soluble HLA-G is a potential biomarker for diagnosis of colorectal, gastric, esophageal and lung cancer. *Tissue Antigens* *78*, 120–128

Dahlin, A.M., Henriksson, M.L., Van Guelpen, B., Stenling, R., Oberg, A., Rutegård, J., and Palmqvist, R. (2011). Colorectal cancer prognosis depends on T-cell infiltration and molecular characteristics of the tumor. *Mod. Pathol.* *24*, 671–682.

Deschoolmeester, V., Baay, M., Van Marck, E., Weyler, J., Vermeulen, P., Lardon, F., and Vermorken, J.B. (2010). Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol.* *11*, 19.

Djurisic, S., Sørensen, A.E., and Hviid, T.V.F. (2012). A fast and easy real-time PCR genotyping method for the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism in the 3' untranslated region. *Tissue Antigens* *79*, 186–189.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759–767.

Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* *127*, 2893–2917.

Grady, W.M., and Carethers, J.M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* *135*, 1079–1099.

Hamelin, R., Chalastanis, A., Colas, C., El Bchiri, J., Mercier, D., Schreurs, A.-S., Simon, V., Svrcek, M., Zaanani, A., Borie, C., et al. (2008). [Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers]. *Bull Cancer* *95*, 121–132.

- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hviid, T.V.F., Hylenius, S., Rørbye, C., and Nielsen, L.G. (2003). HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 55, 63–79.
- Imai, K., and Yamamoto, H. (2008). Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 29, 673–680.
- Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D., and Perucho, M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363, 558–561.
- Jass, J.R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50, 113–130.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69–90.
- Kanthan, R., Senger, J.-L., and Kanthan, S.C. (2012). Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Patholog Res Int* 2012, 597497.
- Kim, J.H., Rhee, Y.-Y., Bae, J.-M., Kwon, H.-J., Cho, N.-Y., Kim, M.J., and Kang, G.H. (2013). Subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers exhibit discordance between the CpG island methylator phenotype and MLH1 methylation status. *Mod. Pathol.*
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science* 280, 1036–1037.
- Larsen, M.H., and Hviid, T.V.F. (2009). Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. *Hum. Immunol.* 70, 1026–1034.
- Lee, W.-S., Park, S., Lee, W.Y., Yun, S.H., and Chun, H.-K. (2010). Clinical impact of tumor-infiltrating lymphocytes for survival in stage II colon cancer. *Cancer* 116, 5188–5199.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386, 623–627.
- Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T., Bruneval, P., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., Pagès, F., et al. (2011). Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J. Clin. Oncol.* 29, 610–618.
- Mullins, C.S., and Linnebacher, M. (2012). Endogenous retrovirus sequences as a novel class of tumor-specific antigens: an example of HERV-H env encoding strong CTL epitopes. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 1093–1100.

Nosho, K., Baba, Y., Tanaka, N., Shima, K., Hayashi, M., Meyerhardt, J.A., Giovannucci, E., Dranoff, G., Fuchs, C.S., and Ogino, S. (2010). Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J. Pathol.* *222*, 350–366.

Ogino, S., Chan, A.T., Fuchs, C.S., and Giovannucci, E. (2011). Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. *Gut* *60*, 397–411.

Ogino, S., and Goel, A. (2008). Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn* *10*, 13–27.

Ogino, S., Kawasaki, T., Kirkner, G.J., Kraft, P., Loda, M., and Fuchs, C.S. (2007a). Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J Mol Diagn* *9*, 305–314.

Ogino, S., Kawasaki, T., Nosho, K., Ohnishi, M., Suemoto, Y., Kirkner, G.J., and Fuchs, C.S. (2008). LINE-1 hypomethylation is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* *122*, 2767–2773.

Ogino, S., Kawasaki, T., Ogawa, A., Kirkner, G.J., Loda, M., and Fuchs, C.S. (2007b). TGFBR2 mutation is correlated with CpG island methylator phenotype in microsatellite instability-high colorectal cancer. *Hum. Pathol.* *38*, 614–620.

Pagès, F., Galon, J., and Fridman, W.H. (2008). The essential role of the in situ immune reaction in human colorectal cancer. *J. Leukoc. Biol.* *84*, 981–987.

Pino, M.S., and Chung, D.C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* *138*, 2059–2072.

Popat, S., Hubner, R., and Houlston, R.S. (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol.* *23*, 609–618.

Di Renzo, M.F., Olivero, M., Giacomini, A., Porte, H., Chastre, E., Mirossay, L., Nordlinger, B., Bretti, S., Bottardi, S., and Giordano, S. (1995). Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* *1*, 147–154.

Ruprecht, K., Mayer, J., Sauter, M., Roemer, K., and Mueller-Lantzsch, N. (2008). Endogenous retroviruses and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 3366–3382.

Sierra, J.R., and Tsao, M.-S. (2011). c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther Adv Med Oncol* *3*, S21–35.

Sinicrope, F.A., Rego, R.L., Halling, K.C., Foster, N., Sargent, D.J., La Plant, B., French, A.J., Laurie, J.A., Goldberg, R.M., Thibodeau, S.N., et al. (2006). Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology* *131*, 729–737.

Søreide, K., Janssen, E.A.M., Söiland, H., Körner, H., and Baak, J.P.A. (2006). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg* 93, 395–406.

Søreide, K., Nedrebø, B.S., Knapp, J.-C., Glomsaker, T.B., Søreide, J.A., and Körner, H. (2009). Evolving molecular classification by genomic and proteomic biomarkers in colorectal cancer: potential implications for the surgical oncologist. *Surg Oncol* 18, 31–50.

Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., and Issa, J.P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8681–8686.

Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., and Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9, 489–499.

Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., et al. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 38, 787–793.

Wentzensen, N., Coy, J.F., Knaebel, H.-P., Linnebacher, M., Wilz, B., Gebert, J., and Von Knebel Doeberitz, M. (2007). Expression of an endogenous retroviral sequence from the HERV-H group in gastrointestinal cancers. *Int. J. Cancer* 121, 1417–1423.

Ye, S.-R., Yang, H., Li, K., Dong, D.-D., Lin, X.-M., and Yie, S.-M. (2007). Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Mod. Pathol.* 20, 375–383.

Zheng, H.-T., Peng, Z.-H., Zhou, C.-Z., Li, D.-P., Wang, Z.-W., Qiu, G.-Q., and He, L. (2005). Detailed deletion mapping of loss of heterozygosity on 22q13 in sporadic colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 11, 1668–1672.

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

Vu, le Directeur de Thèse

**Vu, le Doyen
de la Faculté de médecine de TOURS**

Faculté de Médecine de TOURS

CAUMONT Charline

Thèse n°

124 pages – 35 tableaux – 53 figures

Résumé :

Le cancer colorectal (CCR) est la troisième cause de cancer dans le monde. La compréhension des voies de transformation a débuté dans les années 90, conduisant à un premier modèle de carcinogénèse proposé par Vogelstein et Fearon. Par la suite, plusieurs autres types de CCR ont été décrits dans la littérature, ils étaient basés sur les « phénotypes moléculaires » d'instabilité chromosomique (CIN) (tumeurs caractérisées par la présence d'anomalies chromosomiques) et d'instabilité des microsatellites (MSI) (tumeurs caractérisées par un déficit en système de réparation de type MMR). Ces deux voies tendent à différer par des mutations spécifiques et par des caractéristiques clinico-pathologiques. Un troisième phénotype a été plus récemment décrit : le phénotype CIMP, caractérisé par la méthylation de plusieurs promoteurs, il contient pour une part le phénotype MSI, en cas de méthylation du promoteur du gène MLH1. Une meilleure compréhension des voies moléculaires de transformation et d'évolution des cellules tumorales contribuerait à l'amélioration des stratégies de prévention, de dépistage, de diagnostic, et de traitement des CCR.

Dans cette étude, nous avons analysé 135 tumeurs colorectales de patients pris en charge au CHRU de Tours entre 2007 et 2008. Nous avons étudié six altérations génétiques somatiques, un marqueur qui pourrait signer une réactivation de rétrovirus endogènes, une délétion dans le locus APOBEC3 et l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale. Nous avons effectué une analyse statistique par analyse des correspondances multiples et une classification hiérarchique ascendante afin de mettre en évidence une relation entre les anomalies moléculaires étudiées et l'infiltration lymphocytaire.

Mots clés : carcinogénèse colorectale, cancer colorectal, MSI, CIN, CIMP, rétrovirus endogènes, HERVH, délétion dans le locus APOBEC3, infiltration lymphocytaire intra-tumorale

Jury :

Président de Jury : Monsieur le Professeur Serge GUYÉTANT

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Jean-Christophe PAGÈS

Membres du jury : Monsieur le Professeur Stéphane CHEVALIER
Monsieur le Professeur Thierry LECOMTE
Madame Christine COLLIN

Date de la soutenance : Vendredi 3 Mai 2013 à Tours