



**HAL**  
open science

**BOULEVERSEMENTS ARCHITECTURAUX  
INDUITS DANS LA MUQUEUSE COLIQUE  
NORMALE ET TUMORALE PAR LA  
TRANSFORMATION MALIGNNE ET LA  
PROGRESSION TUMORALE : APPROCHE  
MORPHOLOGIQUE**

Joelle Simony

► **To cite this version:**

Joelle Simony. BOULEVERSEMENTS ARCHITECTURAUX INDUITS DANS LA MUQUEUSE COLIQUE NORMALE ET TUMORALE PAR LA TRANSFORMATION MALIGNNE ET LA PROGRESSION TUMORALE : APPROCHE MORPHOLOGIQUE. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00250911

**HAL Id: tel-00250911**

**<https://theses.hal.science/tel-00250911v1>**

Submitted on 12 Feb 2008

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

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

**THESE DE DOCTORAT DE  
L' UNIVERSITE GRENOBLE 1- JOSEPH FOURIER  
ECOLE DOCTORALE INGENIERIE POUR LA SANTE LA COGNITION ET  
L'ENVIRONNEMENT**

*Spécialité INFORMATIQUE-BIOLOGIE*

*Présentée par*  
**Joëlle SIMONY**

*Pour obtenir le titre de*  
**DOCTEUR de l' UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**

*Sujet :*

**BOULEVERSEMENTS ARCHITECTURAUX  
INDUITS  
DANS LA MUQUEUSE COLIQUE NORMALE ET  
TUMORALE PAR LA TRANSFORMATION  
MALIGNNE ET LA PROGRESSION TUMORALE :  
APPROCHE MORPHOLOGIQUE**

**Thèse soutenue le 24 Octobre 2007**  
devant le jury composé de :

**Daniel SEIGNEURIN**  
**Philippe VAGO**  
**Frédéric PINGUET**  
**Jacques MARTI**  
**Françoise GIROUD**

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Directeur de Thèse



*Cette thèse a vu le jour grâce à la direction éclairée et à la disponibilité de Madame Françoise Giroud, dont j'ai sans cesse pu apprécier les conseils pertinents et la grande rigueur.*

*Le Professeur Philippe Vago et le Docteur Frédéric Pinguet ont accepté avec beaucoup de spontanéité d'en être les rapporteurs. Qu'ils en soient ici chaleureusement remerciés.*

*Je remercie vivement les professeurs Daniel Seigneurin et Jacques Marti d'avoir accepté de faire partie du Jury.*

*La partie expérimentale de ces travaux a été rendue possible grâce à la compétence, à l'aide constante et à l'amitié de Mesdames Marie-Paule Montmasson et Malika Hamel (Laboratoire TIMC-IMAG/RFMQ), ainsi que de Mesdames Nadine Lequeux et Roselyne Lavaill (Laboratoire d'Anatomie Pathologique du CRLCC de Montpellier). Qu'elles trouvent ici l'expression de ma reconnaissance particulière.*

*Mes très vifs remerciements à Madame Claudine Gras, qui a fourni avec une extrême gentillesse et un total désintéressement les premiers éléments statistiques, ainsi qu'à Mesdames Lise Roca et Caroline Blondin, du département de Biostatistiques du CRLCC de Montpellier, dont le travail considérable a permis de finaliser cette thèse.*

*Une pensée particulière à Madame Vénus Sharifi et à Monsieur Redha Heuss, dont les travaux ont fourni le fondement à un enrichissement considérable de cette thèse, ainsi qu'à Madame Julie Bourbeillon qui m'a aidée de ses conseils et de ses remarques.*

*Je ne saurais oublier Madame Paulette Souillard qui tout au long de nombreux mois, m'a fourni un soutien logistique et amical tout à fait exceptionnel.*

*J'aimerais également saluer et remercier chacun des membres de l'équipe RFMQ qui m'ont accueillie avec beaucoup de gentillesse et de spontanéité.*

*Enfin, que ma petite famille trouve ici le témoignage de ma reconnaissance pour sa patience souvent mise à rude épreuve.*

## **ABSTRACT : ARCHITECTURAL DISORDERS OF NORMAL AND MALIGNANT COLONIC MUCOSA DUE TO MALIGNANT TRANSFORMATION AND PROGRESSION : A MORPHOLOGICAL - BASED APPROACH**

We present a morphological - based approach of architectural disorders due to malignant transformation and progression. With this aim in view, sporadic colorectal cancers were compared with non malignant (normal and dysplastic) colonic mucosa samples .

First, owing to histomorphological parameters (significantly increased thickness, low density of normal crypts, an increase of abnormal crypts), normal mucosa adjacent to cancer was distinguished from distant mucosa. Yet proliferating cells marker ( Ki-67),  $\beta$ -catenin and Cyclin D1 immunolabelling showed no significant difference . Those data suggest a balancing mechanism to preserve normal crypt cells rather than a genuine proliferative process.

Secondly, immunolabelling with Ki-67,  $\beta$ -catenin and Cyclin D1 antigens was done on malignant and non malignant samples, to determine cycling cells. Then, we used Voronoï's diagram, a tool of cellular sociology, to quantify tissular architecture disorders within cycling and non cycling cells. Compared to normal mucosa cycling cells, malignant cycling cells show significant spatial rearrangement disorders, which is not the case of non cycling cells.

Finally this study stresses tumor cells heterogeneity ; tumor cells heterogeneity was analyzed by « virtual spotting », demonstrating markers-dependant labelling heterogeneity. Then, we quantified this heterogeneity, using a spatial heterogeneity index, a new mathematical tool. Dysplastic mucosa samples and well differentiated tumors demonstrate higher levels of heterogeneity than poor differentiated cancers.

**Key words :** colorectal cancer –cellular sociology – Voronoï's diagram – spatial heterogeneity index

# SOMMAIRE

---

## INTRODUCTION GENERALE

### I. DU COLON NORMAL AU COLON CANCEREUX.

#### 1. MISE EN PLACE DU COLON NORMAL.

1.1. ARCHITECTURE MACROSCOPIQUE DU COLON NORMAL : UN ORGANE AU CONTACT DU MILIEU EXTERIEUR.

1.2. ARCHITECTURE MICROSCOPIQUE : UNE MUQUEUSE A L'ORGANISATION COMPLEXE.

1.2.1. LA MUQUEUSE COLIQUE.

1.2.2. LES AUTRES COUCHES :

1.2.2.1. LA MUSCULAIRE MUQUEUSE.

1.2.2.2. LA SOUS-MUQUEUSE.

1.2.2.3. LA TUNIQUE MUSCULAIRE PROPRE.

1.2.2.4. LA SOUS-SEREUSE.

1.2.2.5. LA SEREUSE.

1.3. DE L'ASPECT MICROSCOPIQUE A L'ASPECT FONCTIONNEL : UNE ORGANISATION SPATIALE ELABOREE.

1.3.1. LA MUQUEUSE COLIQUE.

1.3.2. LES CELLULES SOUCHES INTESTINALES.

#### 2. DU COLON NORMAL AU COLON CANCEREUX : ASPECTS MICROSCOPIQUES DES BOULEVERSEMENTS ARCHITECTURAUX AU COURS DE LA TRANSFORMATION MALIGNE ET DE LA PROGRESSION TUMORALE.

2.1. DESCRIPTION HISTOLOGIQUE DES LESIONS.

2.1.1. ETATS PRECURSEURS DU CANCER COLORECTAL :

2.1.1.1. NOTION D'HYPERPLASIE, DE DYSPLASIE, DE NEOPLASIE INTRAEPITHELIALE.

2.1.1.2. LES CRYPTES ABERRANTES.

2.1.1.3. LES ADENOMES.

2.1.1.4. ASPECTS EVOLUTIFS.

- 2.1.2. LES CANCERS INVASIFS :
  - 2.1.2.1. ETUDE MACROSCOPIQUE.
  - 2.1.2.2. ETUDE MICROSCOPIQUE.
  - 2.1.2.3. EXTENSION.
- 2.2. LES DIFFERENTS SYSTEMES DE CLASSIFICATION :
  - 2.2.1. CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE DE L'OMS.
  - 2.2.2. UNE CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE REPOSANT SUR L'EXTENSION LOCALE DE LA TUMEUR : LA CLASSIFICATION « MODIFIEE » DE DUKES.
  - 2.2.3. UNE CLASSIFICATION INTEGRANT LA TUMEUR DANS LA MALADIE CANCEREUSE : LA CLASSIFICATION TNM (PTNM).
- 2.3. ONTOLOGIE DES MODIFICATIONS ARCHITECTURALES DU CANCER COLORECTAL AU COURS DE LA TRANSFORMATION MALIGNES.
  - 2.3.1. UNE DEFINITION, OU DES DEFINITIONS, DU CONCEPT D'ONTOLOGIE ?
  - 2.3.2. POURQUOI ELABORER UNE ONTOLOGIE PERSONNELLE DU CANCER COLORECTAL ?
  - 2.3.3. CHOIX DU VOCABULAIRE ET DE LA SYNTAXE.
  - 2.3.4. MISE EN PLACE D'UNE ONTOLOGIE DU CANCER COLORECTAL.

## **II. LE POINT DE VUE DU BIOLOGISTE : LA CANCEROGENESE COLORECTALE, UNE DEREGLATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT?**

### **1. DU SCHEMA PRINCEPS DE VOGELSTEIN AUX CONCEPTIONS ACTUELLES :**

- 1.1. LE SCHEMA PRINCEPS DE VOGELSTEIN.
- 1.2. LA VOIE CANONIQUE WNT ET LA CANCEROGENESE COLORECTALE.
  - 1.2.1. LE GENE APC ET LA VOIE WNT.
    - 1.2.1.1. VOIE DE L'APC.
    - 1.2.1.2. SIGNALISATION WNT.
  - 1.2.2. SIGNALISATION WNT ET CANCEROGENESE COLIQUE.
  - 1.2.3. ACTIVATION DE LA VOIE CANONIQUE WNT.
  - 1.2.4. LES GENES CIBLES DE LA BETA-CATENINE DANS LA VOIE WNT.
  - 1.2.5. AUTRES PROCESSUS D'ACTIVATION DE LA VOIE WNT.
  - 1.2.6. QUELQUES INHIBITEURS DE LA VOIE WNT.
  - 1.2.7. RESUME DU ROLE DE LA BETA-CATENINE DANS LA VOIE WNT ET LA CANCEROGENESE COLIQUE.
- 1.3. MISE EN JEU DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT AU COURS DE LA CANCEROGENESE COLIQUE.
  - 1.3.1. CRITIQUE DU MODELE DES VOIES CLASSIQUES DE LA CANCEROGENESE COLORECTALE.
  - 1.3.2. MECANISMES GENERAUX DE MISE EN JEU DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT AU COURS DE LA CANCEROGENESE COLIQUE.
    - 1.3.2.1. CONCEPTIONS ACTUELLES DU MODELE DE CANCEROGENESE PROPOSE PAR KINZLER ET VOGELSTEIN.
    - 1.3.2.2. MISE EN JEU DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT : LES DEUX GRANDS PHENOTYPES DE CANCERS COLIQUES.



1.3.2.3. MECANISMES D'INACTIVATION GENIQUE PAR HYPERMETHYLATION.

**2. CARACTERISATION MOLECULAIRE DES GRANDS SYNDROMES CLINIQUES.**

- 2.1. LA PAF.
- 2.2. LES SYNDROMES HNPCC.
- 2.3. LES CANCERS COLORECTAUX SPORADIQUES.

**III. ASPECTS DYNAMIQUES DE LA SEQUENCE HYPERPLASIE-ADENOME-CANCER.**

**1. HISTOGENESE DES LESIONS DANS LA SEQUENCE HYPERPLASIE-ADENOME-CANCER**

- 1.1. HISTOGENESE DES LESIONS.
  - 1.1.1. FOYERS DE CRYPTES ABERRANTES (ACF).
  - 1.1.2. DE LA CRYPTTE ABERRANTE A L'ADENOME ET AU POLYPE HYPERPLASIQUE : LE MODELE DES LESIONS DE PAF.
  - 1.1.3. DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE A LA FORMATION DES ADENOMES ET DES POLYPES HYPERPLASIQUES : FISSION ET BOURGEONNEMENT.
- 1.2. QUELQUES POINTS SINGULIERS DANS LA SEQUENCE HYPERPLASIE-ADENOME-CANCER DE CERTAINES LESIONS.
  - 1.2.1. ADENOMES EN DENTS DE SCIE
  - 1.2.2. DE L'ADENOME EN DENTS DE SCIE AU CCR MSI-H.
  - 1.2.3. DE L'ADENOME EN DENTS DE SCIE AU CCR MS-L.
  - 1.2.4. ADENOMES MODELE DE HAUT EN BAS.
  - 1.2.5. ADENOME MODELE DE BAS EN HAUT.

**2. LA CANCEROGENESE COLIQUE D'UN POINT DE VUE DYNAMIQUE.**

- 2.1. LE RENOUVELLEMENT DE L'EPITHELIUM INTESTINAL, UN MODELE REPOSANT SUR UNE ORGANISATION CELLULAIRE COMPLEXE.
- 2.2. DE LA CELLULE A L'ORGANISATION TISSULAIRE : UN SCHEMA MULTIPARAMETRIQUE.

**IV. ETUDE MORPHOLOGIQUE DES BOULEVERSEMENTS ARCHITECTURAUX INDUITS PAR LA PROGRESSION TUMORALE DANS LES CANCERS COLIQUES**

**1. MATERIEL ET METHODES**

- 1.1. CHOIX DES PATIENTS ET RECUEIL DES DONNEES.
  - 1.1.1. CHOIX DES PATIENTS.
  - 1.1.2. RECUEIL DES DONNEES CLINIQUES
  - 1.1.3. COLLECTE DES BLOCS ET DES LAMES.
- 1.2. ETUDE HISTOLOGIQUE.
  - 1.2.1. APPROCHES HISTOLOGIQUE ET IMMUNO-HISTOCHIMIQUE..

- 1.2.2. LA SOCIOLOGIE CELLULAIRE.
- 1.2.3. L'INDEX D'HETEROGENEITE DES TUMEURS
- 1.2.4. ETUDE STATISTIQUE
- 1.3. MISE EN OEUVRE DES METHODOLOGIES.
  - 1.3.1. HISTOLOGIE DE ROUTINE.
    - 1.3.1.1. MUQUEUSE NON TUMORALE ADJACENTE ET A DISTANCE DE LA TUMEUR.
    - 1.3.1.2. DETERMINATION DE L'INDEX MITOTIQUE.
  - 1.3.2. ETUDE IMMUNO-HISTOCHIMIQUE.
    - 1.3.2.1. CHOIX DES MARQUEURS.
    - 1.3.2.2.. REALISATION DU MARQUAGE IMMUNO-HISTOCHIMIQUE SUR COUPES.
    - 1.3.2.3. LECTURE DES MARQUAGES.
  - 1.3.3. CALCUL DE L'INDEX D'HETEROGENEITE. DES CELLULES.
  - 1.3.4.. SOCIOLOGIE CELLULAIRE.
    - 1.3.4.1. PARAMETRES RETENUS POUR L'ETUDE.
    - 1.3.4.2. ACQUISITION DES IMAGES A PARTIR DES LESIONS MARQUEES AU KI-67.
    - 1.3.4.3. POSITIONNEMENT DES GERMES.
    - 1.3.4.4.. CALCUL DES PARAMETRES.
- 1.4. EXPRESSION DES RESULTATS.
  - 1.4.1. ETUDE HISTOLOGIQUE.
  - 1.4.2. EVALUATION DES MARQUAGES IMMUNO-HISTOCHIMIQUES.
  - 1.4.3. INDEX D'HETEROGENEITE
  - 1.4.4. SOCIOLOGIE CELLULAIRE.

## **2. RESULTATS.**

- 2.1. ETAT DE LA MUQUEUSE AU VOISINAGE DE LA TUMEUR.
  - 2.1.1. ASPECTS HISTOLOGIQUE.S.
  - 2.1.2. EVALUATION DES MARQUEURS DU CYCLE CELLULAIRE.
    - 2.1.2.1. MUQUEUSE A DISTANCE DE LA TUMEUR.
    - 2.1.2.2. MUQUEUSE ADJACENTE A LA TUMEUR.
    - 2.1.2.3. MARQUAGE DES CRYPTES ANORMALES.
- 2.2. PROFIL DE PROLIFERATION DES CELLULES TUMORALES.
  - 2.2.1. L'ACTIVITE MITOTIQUE EST IMPORTANTE, MAIS NON DISCRIMINANTE.
  - 2.2.2. EVALUATION DES MARQUEURS DU CYCLE CELLULAIRE.
    - 2.2.2.1. PROFIL DE MARQUAGE DES LESIONS DYSPLASIQUES.
    - 2.2.2.2. PROFIL DE MARQUAGE DES CANCERS INVASIFS.
- 2.3. HETEROGENEITE DE L'ECHANTILLONNAGE :
  - 2.3.1. APPROCHE PAR LA METHODE DES SPOTS VIRTUELS.
    - 2.3.1.1. APPRECIATION DES MITOSES SUR SPOTS VIRTUELS.
    - 2.3.1.2. PROFIL IMMUNO-HISTOCHIMIQUE DES SPOTS VIRTUELS.
    - 2.3.1.3. CONCORDANCE DES LECTURES SUR SPOTS VIRTUELS.
  - 2.3.2. HETEROGENEITE DE DISTRIBUTION DES CELLULES EN CYCLE ENGENDREES PAR LE DEGRE DE DIFFERENTIATION DES TUMEURS.

2.4. BOULEVERSEMENTS ARCHITECTURAUX ENGENDRES LORS DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE.

2.4.1. VARIATION DE L'AIRES DES POLYGONES AVEC LE DEGRE DE DIFFERENCIATION TUMORALE.

2.4.2. MODIFICATIONS DE VOISINAGE INDUITES PAR LES CELLULES EN CYCLE.

2.4.2.1. DIMINUTION DU FACTEUR DE FORME RFAV DANS LES HAUTS GRADES.

2.4.2.2. STABILITE RELATIVE DU FACTEUR D'HETEROGENEITE D'OCCUPATION DE L'ESPACE AD.

2.4.2.3. DIMINUTION DU FACTEUR D'HOMOGENEITE GEOMETRIQUE DES POLYGONES RFH.

2.4.2.4. STABILITE RELATIVE DU NOMBRE MOYEN DES CELLULES POSITIVES VOISINES.

2.4.2.5. AUGMENTATION DE LA DISTANCE MEDIANE AUX CELLULES POSITIVES VOISINES AVEC LE GRADE.

2.4.3. LES CELLULES HORS CYCLE PARTICIPENT PEU A CES BOULEVERSEMENTS.

### **3. DISCUSSION.**

**CONCLUSION**

**BIBLIOGRAPHIE**

**TABLE DES FIGURES**

**TABLE DES TABLEAUX.**

**ANNEXES.**

ANNEXE 1. LEXIQUE

ANNEXE 2. CARACTERISTIQUES ANATOMOCLINIQUES DES PATIENTS.

ANNEXE 3. TABLEAU DES ANTICORPS

ANNEXE 4. CALCUL DE L'INDEX D'HETEROGENEITE

# INTRODUCTION GENERALE

---

C'est à propos du cancer colorectal, à la faveur notamment des formes familiales que Vogelstein (69) a pu élaborer le premier modèle de cancérogénèse par étapes. Dans ce modèle il reliait les séquences de la progression tumorale aux évènements moléculaires successifs. Ce schéma a été largement précisé, sans être fondamentalement remis en cause.

Les bouleversements architecturaux qui découlent de cette cancérogénèse ont fait l'objet de nombreux travaux, essentiellement dans leur chronologie et dans leurs liens avec la survenue des évènements moléculaires présumés leur avoir donné naissance. Ils ont ouvert la voie à un enrichissement considérable de la compréhension des mécanismes moléculaires de la cancérogénèse, non seulement colique mais encore générale. Assez récemment, des études envisageant les aspects dynamiques de la cancérogénèse colorectale ont vu le jour. Elles sont encore rares, et leurs conclusions divergent souvent, mais elles ont le grand intérêt d'intégrer les bouleversements architecturaux de la cancérogénèse et les évènements biologiques qui les ont générés dans un cadre plus vaste, pouvant inclure les facteurs environnementaux.

Cette thèse se propose d'étudier les modifications de l'architecture tissulaire et de la distribution spatiale des cellules cancéreuses en cycle et hors cycle générées par les tumeurs. Il s'agit donc d'une première phase dans l'appréhension des mécanismes

morphologiques qui conduisent à un nouvel équilibre des cellules cancéreuses au cours de la progression tumorale.

Pour cela, au cours d'un travail essentiellement morphologique, notre étude s'est limitée volontairement aux cancers colorectaux (CCR) de type adénocarcinomes. Elle a été rendue possible par la mise à notre disposition du considérable matériel biologique du Centre Régional de Lutte contre le cancer de Montpellier. Ce matériel d'archives a consisté en échantillons de tissus normaux et de lésions coliques, cancéreuses et non cancéreuses, inclus dans la paraffine, accompagnés du dossier clinique des patients. Nous avons ainsi pu étudier une série de cancers coliques de différents grades histologiques de malignité (grade 1, bien différencié ; grade 2, moyennement différencié ; grade 3, peu différencié), selon la classification histologique de l'OMS (41), et la comparer d'une part à des populations témoins représentées par un petit nombre de muqueuses coliques dysplasiques, d'autre part, à la muqueuse colique normale.

Nous avons utilisé diverses méthodes d'étude en microscopie optique des tissus. L'observation en microscopie dite « de routine » des tissus au voisinage de la tumeur nous a montré tout d'abord les modifications architecturales de la muqueuse normale à l'échelon histologique au contact et à distance du cancer. Nous avons ainsi pu appréhender l'influence de la tumeur sur la muqueuse environnante. Puis le marquage immuno-histo-chimique par des marqueurs du cycle en rapport avec la cancérogénèse colique a permis de mettre en évidence le pool des cellules susceptibles de proliférer. Cela nous a conduits à évaluer l'importance de l'hétérogénéité du marquage des tissus tumoraux à l'aide de deux concepts. Le premier utilise un outil virtuel développé à partir d'une méthode de lecture des lames immuno-marquées et concerne l'hétérogénéité de la distribution du marquage dans le tissu de façon globale. Le second a été développé récemment : il s'agit de l'index d'hétérogénéité spatiale du marquage, qui permet de quantifier objectivement l'hétérogénéité cellulaire en calculant à partir des coordonnées spatiales de chaque cellule dans l'échantillon tissulaire examiné pour chaque tumeur un indice d'hétérogénéité. Les outils de sociologie cellulaire ont dans un dernier temps été utilisés pour étudier la distribution dans le plan des cellules tumorales en cycle et des cellules en dehors du cycle. Ceci nous a permis de cerner les rapports que ces cellules à la recherche d'un nouvel équilibre établissent avec leur environnement immédiat et d'évaluer

le pouvoir discriminatif des bouleversements ainsi objectivés sur les populations cellulaires cancéreuses et non cancéreuses.

La thèse comporte quatre grandes parties. Les trois premières sont constituées par des rappels nécessaires au positionnement du sujet. La quatrième concerne l'étude morphologique expérimentale proprement dite.

**La première partie** met en place l'architecture normale du colon, anatomique, macroscopique et microscopique. Nous montrons ainsi que la muqueuse colique présente une organisation fonctionnelle complexe dépendante de son organisation spatiale. Cette architecture subit des altérations progressives menant du colon normal au colon cancéreux. Les entités anatomo-pathologiques qui en découlent sont décrites et illustrées ; les principales classifications de ces lésions sont évoquées. Nous proposons à la fin de cette partie une ontologie des lésions cancéreuses et précancéreuses du colon, accompagnée de son lexique.

**La deuxième partie** évoque les événements moléculaires de la cancérogénèse colorectale qui sont à l'origine des lésions histologiques décrites précédemment. Nous rappellerons le schéma modifié de Vogelstein, dont les développements conduisent à une mise en cause des altérations de la signalisation de la voie Wnt. Nous insisterons essentiellement sur cette voie, car c'est par le biais d'un de ses acteurs (la  $\beta$ -caténine) que nous serons amenés à aborder par la suite notre étude expérimentale. Ce chapitre sera suivi par un bref rappel de la mise en jeu des voies de signalisation au cours de la cancérogénèse colorectale. Nous évoquerons brièvement à cette occasion la signature moléculaire des grands syndromes associés au CCR.

**Dans une troisième partie**, nous décrirons certains aspects dynamiques de la cancérisation colorectale et de l'histogénèse de la séquence muqueuse normale-hyperplasie-dysplasie-adénome-cancer à la lumière de travaux récents .

**La quatrième partie** sera consacrée à l'étude expérimentale des bouleversements architecturaux générés par la cancérisation colorectale. Ces bouleversements seront envisagés d'un point de vue morphologique à partir des cas de CCR que nous avons observés.

# **I. DU COLON NORMAL AU COLON CANCEREUX**

---

## **1. MISE EN PLACE DU COLON NORMAL.**

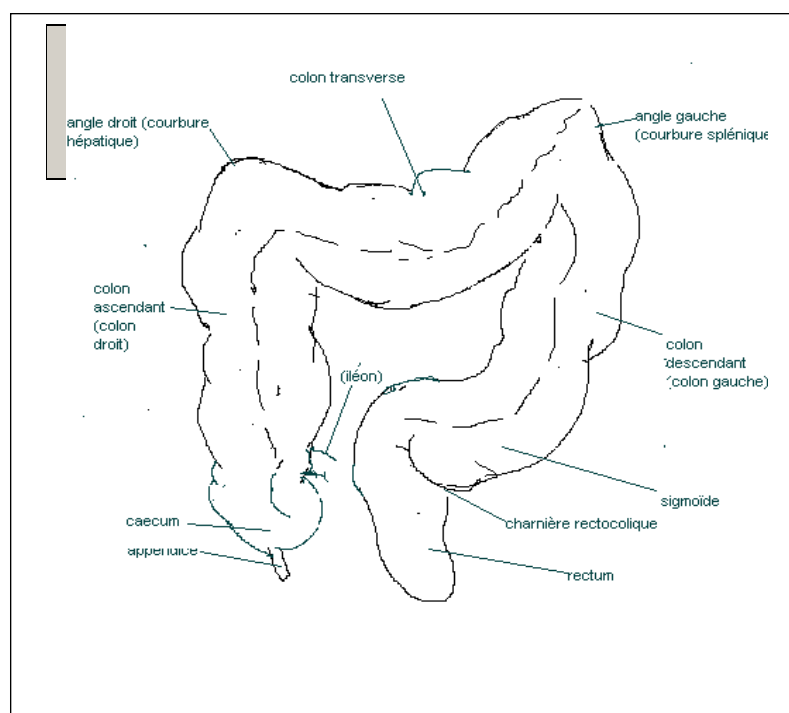
Le colon fait suite à la portion jéjunale du grêle et trouve sa terminaison au niveau de la naissance du rectum ; il présente un trajet anatomique en segments marqués par leurs rapports avec le foie et la rate. Cet organe creux organisé en plusieurs couches est revêtu par une muqueuse qui le sépare du milieu extérieur (lumière intestinale) et par laquelle il est en contact avec les matières fécales. Il possède une structure histologique complexe dominée par les phénomènes de perte cellulaire par anoikis et de renouvellement dans des structures hautement spécialisées.

Ce sont ces aspects, tant macroscopiques que microscopiques, qui vont être décrits dans les paragraphes suivants.

## 1.1 Architecture macroscopique du colon normal : un organe au contact du milieu extérieur.

Le colon mesure entre 1 m et 1,5 m de long et est, sauf pour son extrémité distale, entièrement intrapéritonéal. On décrit au colon, à partir de sa naissance à la valvule iléo-caecale, les parties suivantes (figure1) :

- le caecum, où débouche l'appendice, en position abdominale droite basse ;
- le colon ascendant, ou colon droit, qui se termine par un coude au niveau du foie ;
- le colon transverse, qui relie la coudure hépatique à la coudure splénique à gauche ;
- le colon descendant, ou colon gauche ;
- le colon sigmoïde, plus ou moins important selon les individus ;
- le rectum, qui constitue sur 8 à 15 cm la portion extrapéritonéale du colon.



*Figure 1. Les différentes régions du côlon.*

Le colon est fixé à la paroi abdominale postérieure par des plis péritonéaux et par des fascias.



A travers la séreuse et la sous-séreuse qui empaquettent le colon, les couches musculaires longitudinales de la tunique musculaire externe forment des bandelettes distinctes, trois à droite et deux à gauche (par confluence de deux bandelettes). La vascularisation est assurée par des branches de l'artère mésentérique supérieure du caecum à la coudure hépatique, et par des branches de l'artère mésentérique inférieure pour le reste. Le rectum est en outre partiellement vascularisé par des branches des artères iliaques internes. Le retour veineux est assuré par le système porte, ainsi que par le plexus hémorroïdal pour certaines portions du rectum. Le drainage lymphatique se fait vers les ganglions épicoliques à la racine d'insertion de la séreuse, puis vers les ganglions paracoliques le long de l'arcade artérielle, pour aboutir dans les ganglions des groupes intermédiaires et principaux près des artères coliques. Les lymphatiques du rectum sont drainés par des ganglions hypogastriques et de l'antra mésentérique. Le colon est innervé par des branches parasymphatiques du nerf vague et par les nerfs sympathiques venant des ganglions nerveux mésentériques supérieurs, mésentériques inférieurs et pelviens.

Les variations anatomiques selon les individus sont fréquentes, dues à des variations dans le développement.

## **1.2. Architecture microscopique : une muqueuse à l'organisation complexe.**

Le colon, qui fait suite à l'iléon, s'en différencie histologiquement par l'absence de villosités. Pour le reste, sa muqueuse présente le même degré de complexité que celle de l'iléon, et sa paroi comporte les mêmes couches tissulaires successives.

### **1.2.1. La muqueuse colique.**

La muqueuse colique (figures 2 et 3) est composée d'une couche épithéliale unique de cellules cylindriques hautes bordant la lumière et s'invaginant pour former les cryptes, dans un chorion ou lamina propria. L'ensemble est sous-tendu par une fine couche musculaire lisse, la musculaire muqueuse ou muscularis mucosae. Les cryptes s'ouvrent dans la lumière épithéliale le plus souvent par un abouchement unique, cependant un aspect ramifié peut parfois s'observer à l'état normal. Le tout est sous-tendu par une basale avec ses divers constituants. Cette basale, qui possède des ouvertures et est perméable aux ions, à l'eau et aux protéines, ainsi qu'aux mouvements de lymphocytes à partir de ou vers

l'épithélium de surface. L'architecture en cryptes se retrouve tout au long du colon, sauf lorsqu'elle est interrompue par des nids de lymphocytes, ou dans la zone de transition de la valvule iléo-caecale, ou encore vers l'épithélium malpighien anal.

L'épithélium qui revêt la muqueuse à la surface et le long des cryptes est complexe :

#### **1.2.1.1. L'épithélium de surface.**

Il a un rôle important dans la physiologie de l'organe .

Il est composé de cellules absorbantes, ou entérocytes, les plus nombreuses, et de cellules caliciformes.

- Les entérocytes ont un pôle apical à plateau strié en microscopie optique, ce qui correspond en ultrastructure aux microvillosités et au glycocalix. Le cytoplasme est éosinophile et dénué de mucus dans les cellules matures; le noyau est ovale, souvent nucléolé. Les entérocytes assurent le transport de l'eau et des ions.
- Les cellules caliciformes, ou cellules en gobelet, présentent pour la plupart d'entre elles à leur face apicale des microvillosités visibles en ultrastructure. Leur noyau est basal et orienté selon le grand axe de la cellule. Leur cytoplasme est rempli au pôle apical de granules constitués par des glycoprotéines, des sialomucines et des mucopolysaccharides sulfatés. La représentation de ces différents composants dans la cellule varie selon les régions du colon.

On trouve entre les cellules épithéliales des lymphocytes, quelques éosinophiles et des corps apoptiques.

#### **1.2.1.2. L'épithélium des cryptes.**

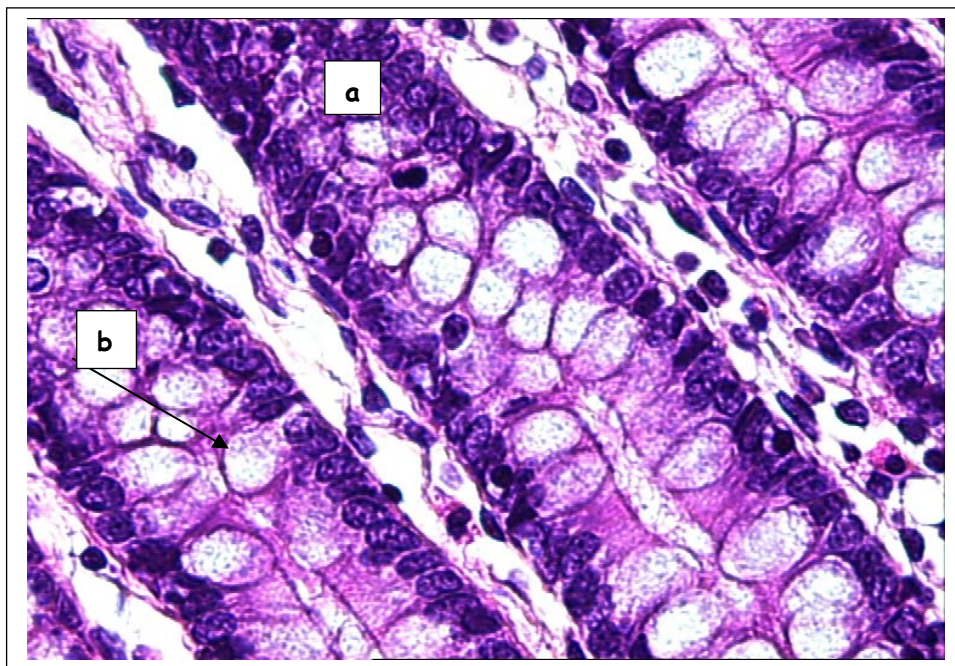
La population cellulaire est plus hétérogène : outre les entérocytes, ici beaucoup plus rares, et les cellules caliciformes qui forment ici la population cellulaire la plus nombreuse, on trouve des cellules endocrines, des cellules de Paneth et des cellules souches. Les cellules endocrines montrent en général une polarité différente de celle de la plupart des entérocytes et des cellules caliciformes. Leurs granules éosinophiles sont plus petits que ceux des cellules de Paneth et n'ont pas une localisation apicale mais basale, et ils contiennent des hormones variées. Leur siège de prédilection est le fond des cryptes. Les cellules de Paneth sont des cellules sécrétoires dont la fonction n'est pas totalement établie; elles ont une forme pyramidale et ont une polarité analogue à celle des entérocytes et des cellules caliciformes. Leur cytoplasme présente de gros granules sécrétoires éosinophiles contenant du lysozyme, l'Epidermal Growth Factor et des protéines riches en bases

arginine. On les trouve uniquement dans le caecum et le colon droit proximal. Les cellules souches participent au renouvellement des cellules éliminées par apoptose. Ce renouvellement est une fonction importante des cryptes. La moitié profonde des cryptes constitue une zone de prolifération pour les précurseurs épithéliaux, et se caractérise par la présence de nombreuses figures mitotiques; cette zone de prolifération représente généralement 50% de la zone basale des cryptes, mais parfois plus. La zone luminale des cryptes, 25% environ de leur masse, constitue la zone de maturation, où les cellules ne peuvent plus se diviser, mais continuent à se différencier jusqu'à ce qu'ayant achevé leur maturité elles soient exfoliées en surface dans la lumière.

Outre ces cellules spécialisées, l'épithélium des cryptes comporte quantité de cellules variées, le plus souvent impliquées dans les phénomènes immunitaires locaux contre les agents du contenu luminal. Les plus nombreuses de ces cellules sont les plasmocytes (lymphocytes B). Les lymphocytes T sont présents non seulement dans le chorion, mais aussi dans l'épithélium colique et dans la sous-muqueuse. Les lymphocytes sont soit dispersés soit regroupés en follicules et alors, soit restreints au chorion ou à la sous-muqueuse, soit à cheval sur les deux zones; ils créent alors des interruptions de la musculature muqueuse par lesquelles les cryptes peuvent se faufiler pour produire des « complexes lymphoglandulaires » qui peuvent donner le change avec des figures pathologiques. On trouve également des éosinophiles en nombre très variable suivant les individus, mais bien inférieur à celui des lymphocytes, et des mastocytes peu nombreux et essentiellement cantonnés dans la région iléocaecale. Il n'y a pas de neutrophiles dans les conditions normales. Les fibroblastes et les macrophages sont nombreux. Il existe quelques cellules endocrines. L'ensemble baigne dans un enchevêtrement lâche de collagène, de faisceaux musculaires lisses et de filets nerveux. Enfin, le réseau vasculaire se résume aux capillaires sanguins et lymphatiques.



*Figure 2. Muqueuse colique normale (HESx20) : section transversale :  
a : épithélium de revêtement ; b : crypte ; c : chorion.*



*Figure 3. Muqueuse colique normale (HESx20) : section longitudinale.  
a : entérocyte ; b : cellule caliciforme.*

## **1.2.2. Les autres couches.**

### **1.2.2.1. La musculaire muqueuse (muscularis mucosae).**

Elle sépare la muqueuse de la sous-muqueuse. Elle est constituée d'une mince couche de tissu musculaire lisse d'épaisseur variable. Outre les complexes lymphoglandulaires, elle est traversée par les réseaux vasculaires et nerveux.

### **1.2.2.2. La sous-muqueuse.**

Elle comporte globalement les mêmes constituants que la musculaire muqueuse. Elle comporte également quelques structures normalement absentes de la musculaire muqueuse, comme les cellules adipeuses. Deux plexus nerveux occupent la sous-muqueuse, le plexus sous-muqueux de Meissner, constitué de neurones et de cellules gliales dispersés dans les éléments de soutien et situé immédiatement sous la musculaire muqueuse, et le plexus sous-muqueux profond (ou plexus d'Henle), vraisemblablement l'analogue du plexus d'Auerbach de l'étage suivant. La vascularisation comporte des artérioles, des veinules et des vaisseaux lymphatiques.

### **1.2.2.3. La tunique musculaire propre.**

Elle est constituée par du muscle lisse organisé en une couche interne circulaire et une couche externe longitudinale, entre lesquelles le plexus nerveux d'Auerbach a une composition analogue à celle du plexus de Meissner. Elle est perforée par les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

### **1.2.2.4. La sous-séreuse.**

Elle est d'épaisseur variable, constituée de tissu conjonctif, et entoure la tunique musculaire propre.

### **1.2.2.5. La séreuse.**

Elle est représentée par une mince couche de cellules mésothéliales qui bordent cette dernière structure.

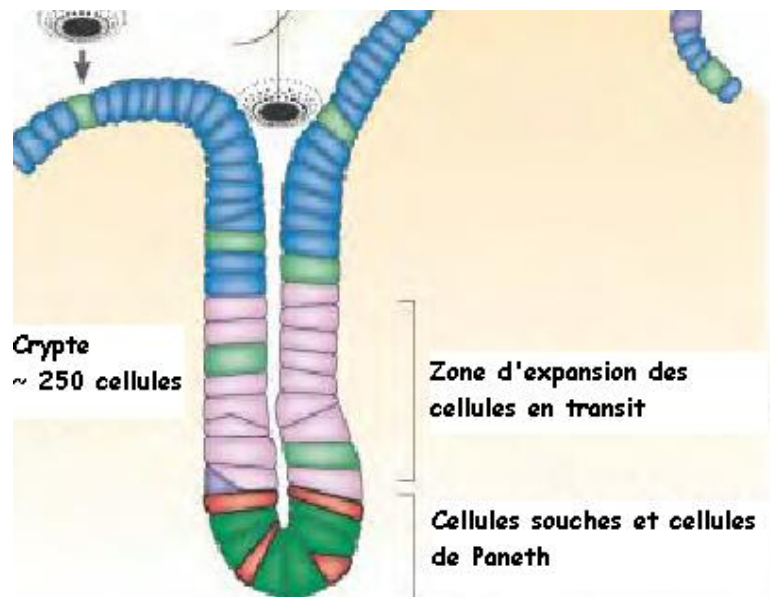
### **1.3. De l'aspect microscopique à l'aspect fonctionnel : une organisation spatiale élaborée.**

Alors que l'épithélium de l'intestin grêle est organisé en deux compartiments fonctionnellement distincts, les cryptes de Lieberkühn qui s'invaginent dans le chorion de la sous-muqueuse, et les villosités intestinales, qui forment des digitations dans la lumière intestinale, le colon ne possède pas de villosités, mais un épithélium de revêtement où s'abouchent les cryptes.

#### **1.3.1. La muqueuse colique.**

Particulière par sa rapidité de renouvellement, elle se présente comme une structure ordonnée comportant un compartiment de cellules prolifératives qui vont évoluer au cours du temps et de l'espace, quittant le fond des cryptes pour monter vers la surface tandis qu'elles se différencient; les cellules de surface, contact avec le contenu de la lumière intestinale, sont confrontées aux processus de l'apoptose et de l'anoïkis .

Un schéma fonctionnel théorique de cet agencement spécialisé est donné par la figure 4 : dans ce schéma, le tiers inférieur de la crypte est dévolu à la prolifération, avec la présence de cellules souches et de cellules progénitrices; la zone supérieure comporte les cellules qui se différencient. Les cellules de l'épithélium de revêtement sont définitivement différenciées, ne se multiplient plus et ne se divisent plus.



**Figure 4 . Schéma de mise en place fonctionnelle de la muqueuse intestinale**

*D'après Crosnier et col., Nat review 2006, 7 :349 (28).*

### **1.3.2. Les cellules souches intestinales.**

Ce sont les cryptes qui constituent le compartiment de prolifération de l'intestin, avec leur population spécifique de cellules souches (8, 20). En effet, parmi les tissus épithéliaux, la muqueuse du tube digestif est particulière par son renouvellement constant (28). D'après les études menées à partir du modèle de l'intestin de souris adulte, on estime que des cellules souches multipotentes à division lente sont localisées dans le tiers inférieur de chaque crypte; ces cellules donnent naissance à une population intermédiaire de cellules définies comme « cellules d'amplification du transit » (cellules TA). Cette population prolifère rapidement à raison, dans le modèle de souris, de 33 nouvelles cellules par crypte chaque jour. Les cellules filles qui en sont issues ne sont pas proliférantes et s'accumulent dans le tiers médian des cryptes. Ce sont elles qui vont se différencier et donner les quatre types cellulaires principaux de l'intestin : entérocytes, cellules caliciformes (ou cellules en gobelet), cellules endocrines et cellules de Paneth. Le processus de différenciation se déroule le long de la migration des cellules vers le haut. Les cellules de Paneth migrent vers le sommet des cryptes, où elles séjournent environ trois semaines; les autres types cellulaires migrent du tiers supérieur des cryptes vers l'apex des villosités (dans l'intestin grêle) ou l'épithélium de revêtement (pour le colon); là, les cellules différenciées subissent l'apoptose et s'exfolient dans la lumière. L'épithélium intestinal est ainsi renouvelé



totalemment tous les 3 jours chez la souris, tous les 5 jours chez l'homme. Cette durée correspond au temps de migration des cellules différenciées jusque vers la lumière. Elle peut être accélérée dans certaines conditions pathologiques (20). Les cellules susceptibles d'assurer ce turn-over peuvent vraisemblablement être assimilées aux cellules souches. Aucun marqueur spécifique pour les cellules souches intestinales n'a été identifié jusqu'à présent (probablement à cause de la très grande plasticité de leur phénotype), mais on a pu les mettre en évidence de façon indirecte (expériences d'incorporation de thymidine tritiée après irradiation de l'intestin de souris nouveau-né, par exemple). On a ainsi pu préciser certains critères pour l'identification des cellules souches des cryptes intestinales chez la souris adulte :

- ✓ une origine monoclonale ;
- ✓ la présence d'un phénotype indifférencié ;
- ✓ le caractère multipotent ;
- ✓ la présence tout au long de la vie d'une forte capacité à proliférer ;
- ✓ la capacité à repeupler la totalité des cryptes intestinales après une altération ;
- ✓ la localisation à la base des cryptes : elles constitueraient une « niche » où les cellules auraient le caractère de cellule souches et, seules avec leurs voisines de proximité immédiate, recevraient le signal pour proliférer.

## **2. DU COLON NORMAL AU COLON CANCEREUX : ASPECTS MICROSCOPIQUES DES BOULEVERSEMENTS ARCHITECTURAUX AU COURS DE LA TRANSFORMATION MALIGNNE ET DE LA PROGRESSION TUMORALE. .**

Le chapitre précédent a permis de voir que l'architecture normale du colon présente un haut degré d'organisation, centré sur la problématique du renouvellement cellulaire à partir de l'épithélium des cryptes. Le renouvellement cellulaire est en effet rendu nécessaire par la perte cellulaire permanente par anoïkis au niveau de l'épithélium de revêtement. Ce perpétuel renouvellement cellulaire accroît les risques de mutations accidentelles à l'échelon cellulaire et explique la fréquence des anomalies cellulaires qu'on peut y retrouver, avec ou sans traduction architecturale. Les plus mineures d'entre elles donneront



lieu à des lésions de dysplasie tandis que leur aggravation permettra la transformation maligne puis la progression tumorale, le colon subissant alors des bouleversements architecturaux allant du plus minime d'entre eux (les cryptes aberrantes) au cancer invasif (164).

Lorsque le pathologiste porte un diagnostic de lésion colique, son examen comporte trois niveaux d'évaluation. En tout premier lieu, il observe si la lésion étudiée est plane, ou si au contraire elle fait protrusion dans la lumière colique : il parlera alors de lésion polypoïde, qui est un terme macroscopique. Ensuite, à l'échelon de l'architecture microscopique du tissu, il doit s'attacher à différencier une néoplasie, qui équivaut à une production de tissu néoformé, plane ou polypoïde, d'une lésion non néoplasique, voire d'un bouleversement architectural plus ou moins important; si la lésion est polypoïde<sup>1</sup> et formée de tissu de type glandulaire, il parlera de lésion adénomateuse, bénigne ou maligne. Enfin il abordera la microscopie cellulaire en évaluant les altérations des cellules qui composent la lésion; ces altérations décrivent tout un spectre de gravité croissante, de la simple hyperplasie aux altérations caractérisant les dysplasies de divers degrés de gravité, dont les plus sévères conduisent au cancer. Ce sont en définitive ces anomalies cellulaires qui lui permettront d'affirmer la bénignité, la malignité ou l'état précurseur de cancer. L'intrication de ces lésions cellulaires avec les autres altérations, de nature architecturale, permettront de porter un diagnostic précis de lésion.

Nous allons décrire à l'échelon histologique, ces différents bouleversements architecturaux, puis nous envisagerons les classifications auxquelles ils ont donné naissance. Enfin, nous citerons les grands syndromes cliniques qui leur correspondent.

Cependant, dans un souci de clarification pour des lésions et des niveaux lésionnels fortement intriqués, nous ne suivons pas la démarche du pathologiste dans son observation microscopique allant du plus faible grossissement (caractère polypoïde etc) au plus fort (altérations cellulaires de la dysplasie). Au contraire, nous commencerons par décrire le spectre des altérations cellulaires qui vont de la bénignité au cancer, puis les bouleversements architecturaux qui leur correspondent ou sont intriqués avec elles. Nous envisagerons ensuite les classifications auxquelles ces altérations ont donné naissance. Enfin, nous regrouperons ces différents états pathologiques suivant un ordre hiérarchique. Cela nous conduira à proposer une ontologie du cancer colorectal.

---

<sup>1</sup> Cette notion a fait récemment l'objet de modifications: on peut ainsi parler d' « adénomes plans ».

## 2.1. Description histologique des lésions.

### 2.1.1. Etats précurseurs du Cancer Colorectal (CCR).

Nous allons décrire classiquement le spectre des lésions précancéreuses de l'épithélium colique, par ordre de gravité croissante.

#### 2.1.1.1. Notion d'hyperplasie, de dysplasie, de néoplasie intra-épithéliale.

L'**hyperplasie** est définie comme une simple augmentation de volume du tissu par multiplication cellulaire. Elle ne s'accompagne pas d'altérations cellulaires et n'est généralement pas un état précurseur du cancer<sup>1</sup>.

L'hyperplasie atypique, dénomination que certains donnent à une augmentation de volume du tissu qui s'accompagne d'altérations, ou atypies, cellulaires, n'est en fait pas une hyperplasie vraie, puisqu'elle comporte des atypies cellulaires.

La **dysplasie** associe un trouble de la prolifération cellulaire, par échappement aux mécanismes de contrôle normaux, et des anomalies cellulaires, l'ensemble de ces lésions étant commun à certaines proliférations bénignes et aux cancers. Contrairement à l'hyperplasie vraie, la dysplasie est un état précurseur du cancer.

La dysplasie est une lésion en elle-même; lorsqu'elle est pure, elle n'a généralement pas de traduction macroscopique, bien qu'elle puisse donner lieu à des modifications architecturales importantes microscopiquement. On la retrouve souvent en périphérie d'un cancer, en contiguïté avec les lésions malignes, mais aussi parfois à quelque distance (elle peut alors jouer un rôle de marqueur du terrain cancéreux).

L'analyse histologique de la dysplasie requiert dans tous les cas un examen microscopique minutieux. Suivant la sévérité des altérations cellulaires qui la constituent, on identifie classiquement trois degrés :

- ✓ la dysplasie légère, où la prolifération cellulaire reste modérée, les glandes sont différenciées et mucosécrétantes en profondeur ;
- ✓ la dysplasie moyenne, où la prolifération est active avec de nombreuses figures de mitoses, les cellules indifférenciées occupent de larges zones ;

---

<sup>1</sup> Cette règle admet des exceptions, représentées par certaines pathologies particulières.

- ✓ la dysplasie sévère, où la prolifération est très active avec un grand nombre de mitoses dans toutes les couches et sur toute la hauteur des glandes, la totalité de la lésion est indifférenciée, il existe de nombreuses anomalies nucléo-cytoplasmiques.
- ✓ Le stade ultime de la dysplasie sévère est le **carcinome in situ** (CIS).

On entre dès lors dans le chapitre des cancers, et la description des altérations morphologiques de la cellule cancéreuse sera donnée ultérieurement.

L'identification exacte et l'interprétation de ces lésions qui décrivent un spectre aux limites mal définies, ne sont pas toujours consensuelles. Nous allons évoquer dans les lignes suivantes quelques problèmes posés par leur définition.

#### **a. Difficultés nosologiques.**

Les deux premiers groupes de dysplasies sont d'identification relativement facile. En revanche, la dysplasie sévère se distingue très mal morphologiquement du CIS, et pour certains pathologistes elle ne s'en distingue pas, au point que les termes « dysplasie sévère » et « CIS » apparaissent souvent comme des synonymes l'un de l'autre. Or, si l'on considère qu'on reste dans le cadre d'une lésion non cancéreuse (même si elle est précancéreuse), ceci implique qu'elle est susceptible de régresser sous certaines conditions, tandis qu'une lésion cancéreuse, même in situ et donc par définition non encore invasive, ne régressera pas.

C'est pourquoi de nombreux auteurs ont eu le souci de modifier la terminologie classique, qui a le mérite d'être très simple, mais qui n'est pas suffisamment précise et est parfois source de confusion (notamment dans les intrications de la dysplasie sévère avec le CIS).

On est ainsi en présence pour les mêmes lésions, de terminologies différentes suivant les écoles. Ces terminologies reflètent des conceptions différentes de l'ontogénèse des lésions.

#### **b. De la nécessité d'une terminologie consensuelle.**

Les discordances essentielles résident entre les dénominations des écoles japonaise et orientales d'une part, et les dénominations occidentales d'autre part. Ainsi, en l'absence d'invasion de la lamina propria, une même lésion peut être appelée cancer intramuqueux par l'école japonaise et en Orient, et dysplasie de haut grade en Occident (118).

Il a donc été nécessaire de trouver un consensus. Ses grandes lignes figurent dans la classification de Vienne (119). On verra ainsi, lors de la description de la classification histologique des CCR, que la terminologie de « néoplasie intramuqueuse » proposée lors de diverses réunions de consensus entre pathologistes, a été introduite dans la nouvelle classification des tumeurs digestives de l’OMS (146). En effet, contrairement aux termes « dysplasie » ou « cancer in situ », le terme de « néoplasie » ne préjuge pas du caractère bénin ou malin des lésions. La terminologie de « néoplasie intra-épithéliale de faible ou haut grade » est également employée, à la place du terme de dysplasie, pour une lésion d’adénocarcinome n’envahissant pas la lamina propria.

### **c. Nouvelle terminologie.**

La nouvelle terminologie consensuelle qui se met progressivement en place admet pour chaque terme plusieurs synonymes qui rappellent la terminologie classique :

- La **néoplasie intra-épithéliale certaine de bas grade**, ou **dysplasie légère**, ou **dysplasie de bas grade**, correspond à l’ancienne terminologie de dysplasie légère et modérée; les critères du diagnostic sont :

- persistance d’une mucosécrétion ;

- cellules cylindriques avec noyau ovalaire ne dépassant pas les 3/4 de la hauteur de l’épithélium ;

- pléomorphisme nucléaire peu marqué.

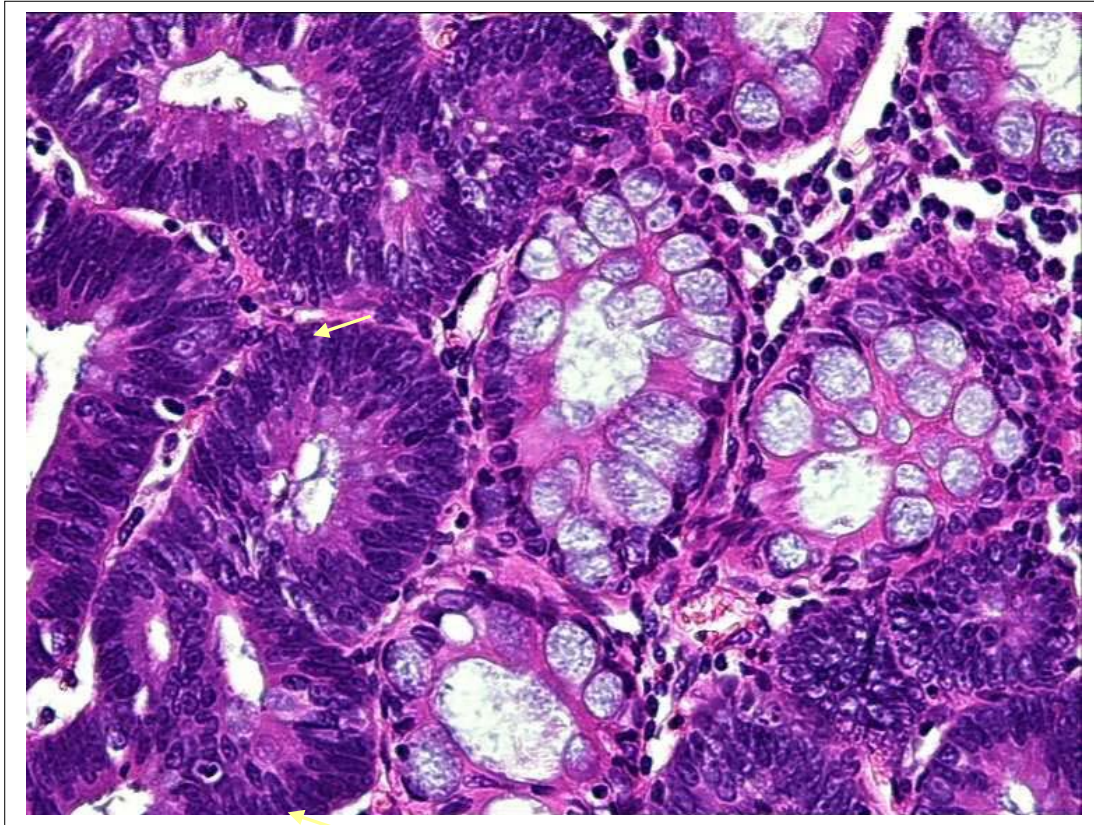
- La **néoplasie intra-épithéliale de haut grade**, ou **dysplasie de haut grade**, ou **cancer intra-épithélial** (figure 5) correspond au CIS ; les critères du diagnostic sont :

- perte de la mucosécrétion ;

- stratification nucléaire à la partie haute de l’épithélium ;

- pléomorphisme nucléaire marqué .

- L’**adénocarcinome intra-muqueux** équivaut à une néoplasie avec invasion de la lamina propria, avec ou sans invasion de la musculaire muqueuse mais sans atteinte de la sous-muqueuse.



**Figure 5 : zone de néoplasie épithéliale de haut grade.**  
 (HESx40) : perte de la mucosécrétion, atypies cellulaires et mitoses (flèches)

### 2.1.1.2 Les Cryptes Aberrantes.

Alors que les dysplasies sont définies essentiellement à l'échelon cellulaire, on entre avec le chapitre des cryptes aberrantes, dans les lésions définies par leurs bouleversements architecturaux, qu'elles soient ou non intriquées avec les lésions cellulaires de dysplasie.

La crypte aberrante représente sans doute la lésion la plus discrète et la plus difficile à identifier, du fait de sa très petite taille . C'est ce qui explique qu'elle n'a été individualisée que très récemment, et qu'elle est probablement sous-diagnostiquée et encore méconnue par de nombreux pathologistes (129).

Dans la conception actuelle, la crypte aberrante représente la première lésion adénomateuse identifiable et le terme de « microadénome » a parfois pu lui être attribué (112). La lésion a d'abord été décrite chez des animaux d'expérience soumis à l'influence de carcinogènes coliques. On l'a ensuite identifiée chez l'homme, où elle semble plus fréquente en présence de transformations néoplasiques, même débutantes. C'est pourquoi

elle est de plus en plus considérée comme un état précurseur initial de la transformation maligne (93, 109, 141).

La crypte aberrante apparaît macroscopiquement comme une anomalie de la surface colique, visible dès l'examen à la loupe et accentuée par l'application de colorant, qui va cheminer par son ouverture élargie et/ou déformée pour s'accumuler dans son fond.

Au microscope, on en distingue trois types, selon qu'elles correspondent à une simple anomalie de l'abouchement sous forme d'un élargissement de l'ouverture avec souvent une hyperplasie épithéliale, soit qu'elles y associent des lésions de dysplasie plus ou moins sévère. C'est cette dernière forme avec dysplasie qui est susceptible de constituer la lésion précurseur de l'adénome plan, et donc de certains cancers (109).

### **2.1.1.3. Les Adénomes.**

A l'exception de l'adénome plan, entité particulière et de reconnaissance relativement récente, les adénomes font saillie dans la lumière intestinale et correspondent donc macroscopiquement à des polypes.

Au plan étiologique, deux grands types s'individualisent, les polypes adénomateux de nature sporadique, et les polypes adénomateux entrant dans le cadre des syndromes de polyposes héréditaires et familiales. Ces deux grands types ne sont pas discernables quant à leur aspect microscopique.

Les adénomes sont des lésions néoplasiques, c'est-à-dire qu'elles réalisent une croissance avec perte du contrôle de la prolifération cellulaire. Comme telles, il faut les distinguer des polypes non néoplasiques<sup>1</sup>, dans lesquels il y a toujours persistance des mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire. Cette distinction est essentielle, car c'est à partir des adénomes que les théories pathogénétiques actuelles font naître la majorité des CCR, à travers la séquence adénome-carcinome désormais classique (69).

---

<sup>1</sup>Les polypes non néoplasiques regroupent essentiellement :

- les polypes hyperplasiques, formations en général de petite taille, à surface relativement lisse, soit isolées soit multiples, composées au microscope de glandes et de cryptes bien différenciées séparées par un chorion conjonctif. Bien qu'on puisse occasionnellement trouver dans un polype hyperplasique un foyer adénomateux et/ou un foyer dysplasique, leur potentiel dégénératif est controversé, et en règle générale on ne les considère pas comme des lésions précancéreuses ;

- et les polypes juvéniles, qui sont des proliférations hamartomateuses formées essentiellement dans le chorion de la muqueuse, de 1 à 3 cm de diamètre, avec au microscope, typiquement, des glandes dilatées ;

Les adénomes sont classés d'après le type histologique de leur architecture, avec d'une part les adénomes plans, et d'autre part les adénomes polypoïdes classiques dont on reconnaît trois types essentiels, tubuleux, vilieux et tubulo-vilieux (45, 104).

Nous allons décrire successivement l'adénome plan, puis les adénomes polypoïdes classiques avec leurs trois types morphologiques, enfin les lésions mixtes, adénomateuses et hyperplasiques.

**a. Adénome Plan** (ou « adénome non polypoïde »).

Il a été individualisé en 1985 par Muto (2) comme une lésion à peine surélevée de la muqueuse colique mesurant moins d'un cm de diamètre, légèrement érythémateuse. Il correspond au microscope à un adénome particulier par son épaisseur inférieure au double de celle de la muqueuse saine adjacente. L'aspect adénomateux, d'architecture tubuleuse, peut affecter la muqueuse partiellement ou sur toute son épaisseur, et montre des signes de dysplasie de grade variable. Cette dysplasie s'étend fréquemment à la surface de la muqueuse adjacente. On distingue les adénomes totalement plans et les adénomes légèrement surélevés, ceux à surface plane et ceux à surface ombiliquée ou entaillée d'une dépression superficielle ou profonde. Ils se répartissent à peu près également entre colon proximal et colon distal avec une prédominance sur le colon transverse.

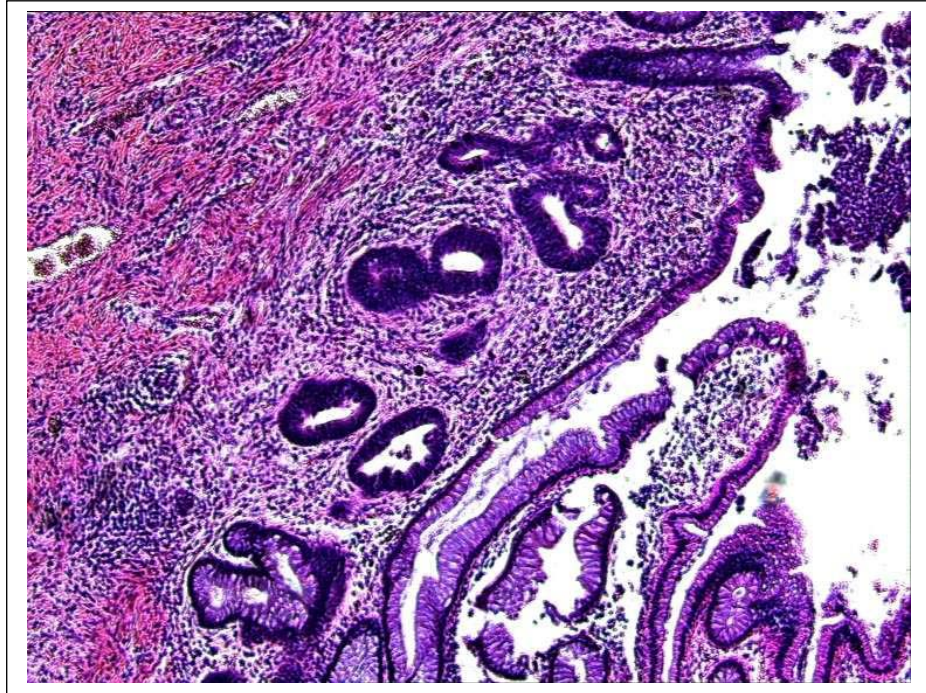
Deux variantes anatomocliniques sont importantes à reconnaître : l'adénome festonné et l'adénome tubuleux.

**L'adénome « festonné »** ou « en dents de scie » (serrated adenoma)(148) (figures 6 et 7) n'est plan que dans 53% des cas (il est sessile dans 42% et pédiculé dans 5%). Dans sa forme typique plane et inférieure à 5 mm de diamètre, il a macroscopiquement l'aspect d'une lésion hyperplasique et microscopiquement l'aspect d'une intrication de polype hyperplasique et d'adénome avec des signes de dysplasie de grade variable; microscopiquement, sa surface est d'aspect non néoplasique alors qu'en profondeur il existe des zones de dysplasie parfois sévère (58). Il est à différencier d'une part du polype hyperplasique pur, d'autre part du polype mixte associant côte à côte un contingent hyperplasique et un contingent adénomateux.

---

*ce sont généralement des lésions solitaires si l'on exclut le syndrome de polypose juvénile autosomique dominant; eux non plus ne présentent pas de potentiel dégénératif, en dehors de situations controversées.*





*Figure 6 : adénome plan « serrated ». HESx20.*



*Figure 7 : adénome plan « serrated ». HESx40 : détail de la muqueuse.*

L'**adénome plan tubuleux** ou « adénome à extension superficielle » (laterally spreading adenoma) (76) est à l'examen macroscopique plan de taille supérieure à 1cm. Il présente



microscopiquement une architecture mixte, tubulo-villeuse; il siège presque exclusivement dans le caecum et le rectum. Des reliquats adénomateux de type plan sont retrouvés en périphérie de 10 à 30% des adénocarcinomes de type plan débutants.

L'évolution de ces lésions est fonction de plusieurs paramètres et sera exposée en même temps que l'évolution des adénomes polypoïdes. L'âge moyen de diagnostic est plus élevé que pour les adénomes polypoïdes, dans la 6<sup>e</sup> décennie, et en dehors des syndromes de prédisposition héréditaire elles sont rares avant 40 ans.

Les adénomes plans participent à l'histoire naturelle des syndromes de prédisposition héréditaire : il existe une forme de Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) dite « atténuée » (« syndrome héréditaire des adénomes plans ») (81) comportant 50% d'adénomes plans, de siège proximal prédominant, se caractérisant par un nombre moindre d'adénomes, une cancérisation plus tardive (6<sup>e</sup> décennie) et correspondant à une mutation du gène APC de siège particulier. D'autre part, dans le syndrome HNPCC (106), les adénomes plans sont multiples, prédominent dans le colon proximal et leur responsabilité dans la genèse du cancer est sujette à controverses.

#### **b. Adénomes Polypoïdes classiques.**

Comme on l'a vu, le terme de polype correspond à une description purement macroscopique qui ne préjuge en rien de sa nature histologique : il s'agit d'une lésion faisant saillie sur la muqueuse intestinale. Il peut être sessile lorsqu'il repose directement sur la muqueuse, ou pédiculé, le plus souvent, lorsque son pied ou pédicule, qui fait partie de la paroi colique, est étiré. Les polypes pédiculés prédominent sur le colon gauche.

Les polypes ont des structures histologiques très variées. L'aspect le plus fréquent, celui de l'adénome, qui constitue l'objet de ce paragraphe, est représenté dans sa définition par une tumeur néoplasique constituée par une prolifération épithéliale bénigne comportant des degrés variés de dysplasie. Les adénomes polypoïdes sont subdivisés en trois types selon leur architecture microscopique : tubuleux, villeux (tumeur villeuse) et tubulo-villeux (cf classification histologique de l'OMS).

Les adénomes polypoïdes sont rares chez l'enfant en dehors du contexte des syndromes de prédisposition héréditaire. Leur fréquence croît de 30 à 69 ans pour rester stable à 20% ensuite.

Pour estimer le potentiel évolutif de la lésion, sa taille est un critère plus important que son type architectural ou histologique (104).

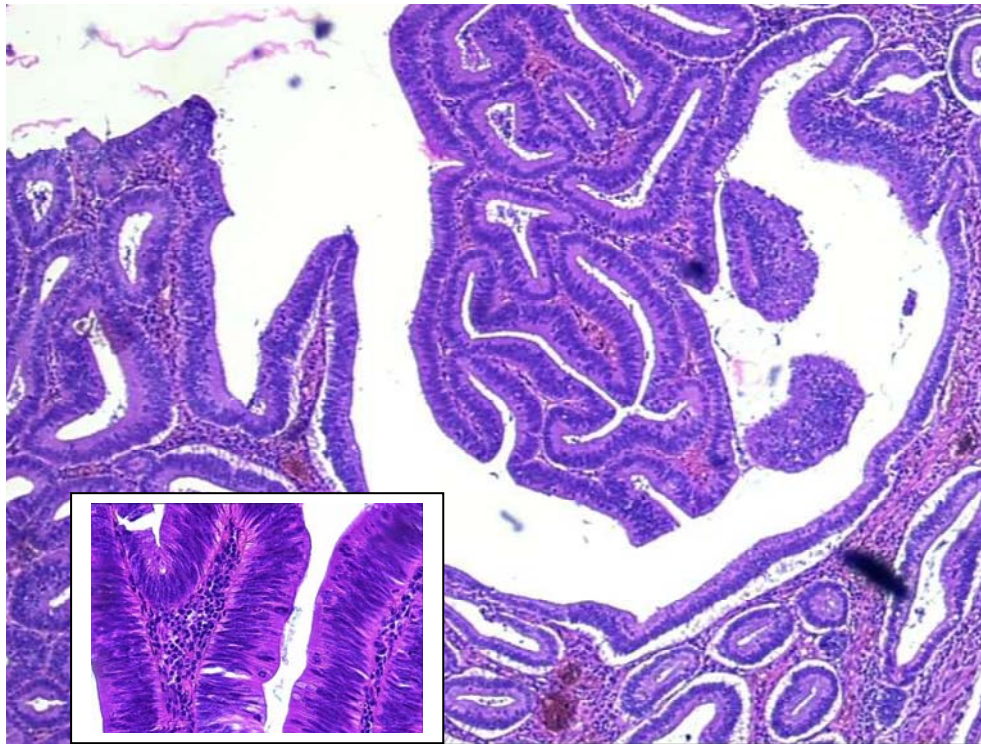
### **Aspects macroscopiques des adénomes polypoïdes.**

Les adénomes, de couleur rose à rouge, peuvent être arrondis ou polylobés, sessiles ou pédiculés. Un aspect mou avec une surface cérébriforme signe une participation vilieuse. Ils peuvent mesurer de 2 à plus de 60 mm, les deux tiers mesurant cependant moins de 10 mm de diamètre tandis que les tumeurs vilieuses ont souvent une taille supérieure à 20 mm de diamètre. Moins du tiers des patients n'ont que 1 à 2 polypes. Dans 42% des cas, ils se localisent au recto-sigmoïde, tandis que les tumeurs vilieuses sont, elles, rectosigmoïdiennes dans près de 90% des cas.

### **Aspects microscopiques des adénomes polypoïdes.**

Au microscope, on retrouve une zone de prolifération glandulaire constituée par la muqueuse et reposant sur la musculaire muqueuse. Elle est sous-tendue par un axe conjonctivo-vasculaire qui se continue avec le conjonctif pédiculaire dans le cas d'un polype pédiculé, ou avec la sous-muqueuse dans le cas d'un polype sessile. Comme pour les adénomes plans, le terme d'adénome est réservé aux lésions qui présentent une dysplasie épithéliale.

On en décrit quatre grands types histologiques, dont trois principaux distingués par l'OMS et un quatrième d'identification plus récente. Le premier type, l'**adénome tubuleux** (adenomatous polyp) est une prolifération de tubes épithéliaux séparés par un tissu conjonctif peu abondant; on peut y trouver des remaniements kystiques ou hémorragiques. La prolifération épithéliale se fait de la surface vers la profondeur. C'est la forme la plus commune (75% environ des adénomes). Il contient plus de 80% de composante tubuleuse. L'**adénome vilieux** (tumeur vilieuse, villous papilloma) (figure 8)) est constitué d'axes conjonctifs grêles tapissés de cellules cylindriques. La prolifération épithéliale se fait vers la lumière colique; la lésion est souvent volumineuse. Elle représente environ 5% des adénomes. On parle d'architecture vilieuse, de façon arbitraire, quand la hauteur des glandes est supérieure à deux fois l'épaisseur de la muqueuse colorectale normale. L'adénome vilieux contient plus de 80% de composante vilieuse.



*Figure 8. Adénome vilieux. HES x 10.  
En cartouche : zone de dysplasie sévère.HES x 40*

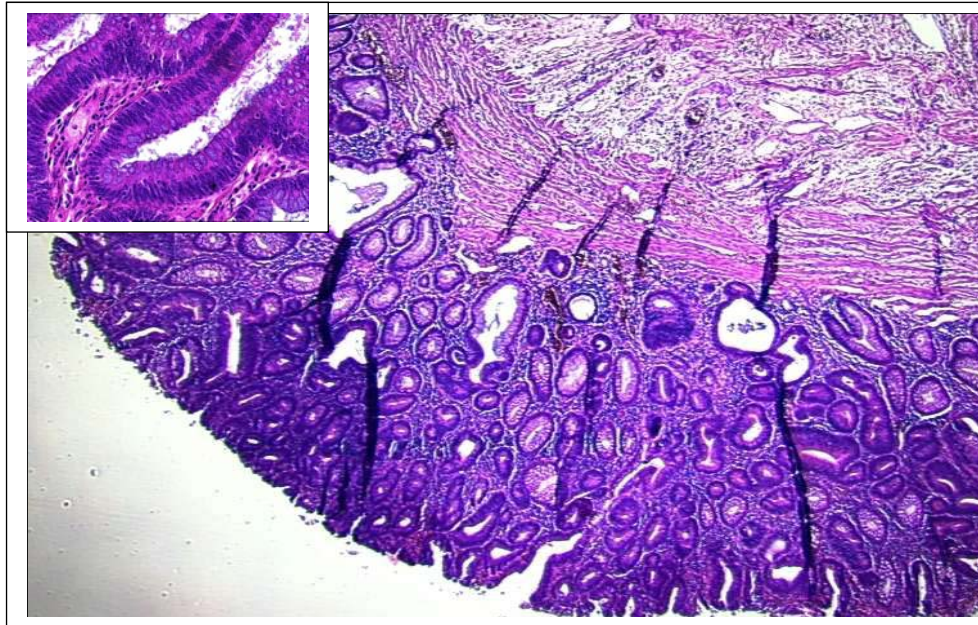
L'**adénome tubulovilleux** (papillary adenoma, villo-glandular adenoma) (figures 9 et 10) associe des aspects tubuleux et vilieux et est très fréquent pour les lésions de plus de 20 mm de diamètre. (20% environ des adénomes).

Le quatrième type est représenté par l'**adénome festonné** (« serrated adenoma »), comportant un aspect festonné des glandes adénomateuses (comme dans les polypes hyperplasiques) avec des atypies cytologiques (comme dans les adénomes).

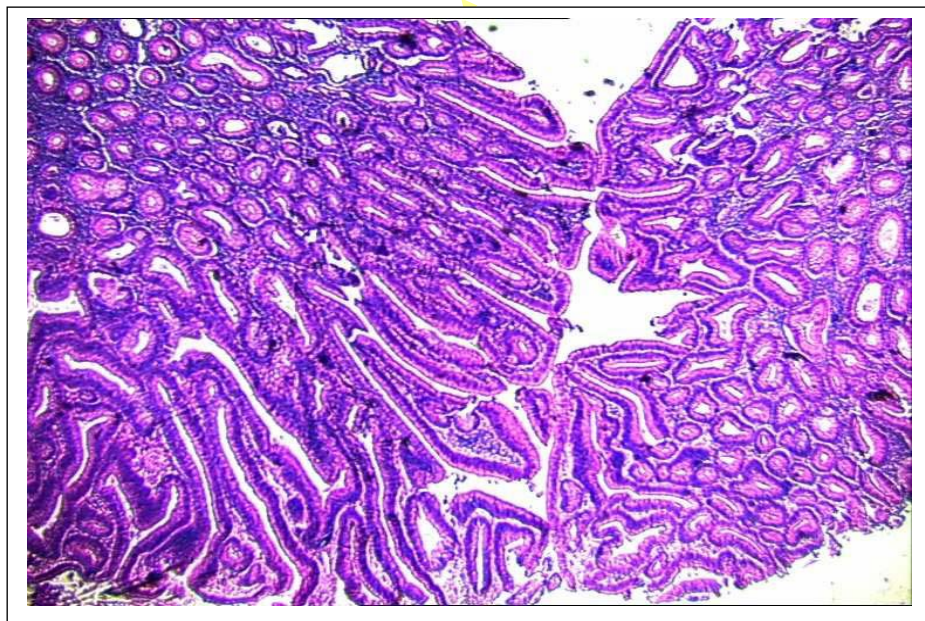
### **c. Adénomes se présentant comme des polypes mixtes hyperplasiques et adénomateux.**

Cette entité a été décrite dès 1970 (44). Les lésions présentent soit deux composantes distinctes à type de polype hyperplasique et d'adénome classique, soit une intrication étroite des deux contingents. Elles pourraient correspondre soit à des tumeurs de collision, soit à l'apparition d'une dysplasie au sein d'un polype hyperplasique, soit encore à une inflexion morphologique festonnée d'un adénome classique.





*Figure 9 : adénome tubulovilleux .HESx10 : vue d'ensemble.  
En cartouche :.détail de la muqueuse en dysplasie de bas degré*



*Figure 10: adénome tubulovilleux.: zone vilieuse. HESx10*

#### **2.1.1.4. Aspects évolutifs.**

La filiation adénome-cancer a été évoquée en premier lieu sur des constatations anatomocliniques dès 1971 par Potet et coll. (104), avant d'être considérablement étayée

au plan moléculaire dans la séquence dysplasie-adénome-cancer proposée par Vogelstein (68) et communément admise actuellement. Potet schématise ainsi le passage de l'adénome au cancer, au plan morphologique :

- ✓ au stade I le cancer est encore limité par la musculaire muqueuse ;
- ✓ au stade II débutant, il effondre la musculaire muqueuse et dans un premier temps atteint l'axe du polype; il envahira ultérieurement son pédicule ;
- ✓ au stade II tardif, le cancer envahit totalement le polype (où peuvent persister quelques foyers adénomateux non transformés), déclenche une stroma-réaction, infiltre tout le pédicule qui disparaît; la musculature est attirée par la prolifération; la surface peut s'ulcérer. A ce stade, le caractère malin de la lésion est évident dès l'examen macroscopique ;
- ✓ au stade III, le cancer envahit la musculature; il peut rester végétant ou s'ulcérer plus ou moins en surface. On est alors en présence d'un cancer invasif classique qu'il est difficile de rattacher morphologiquement à l'adénome qui lui a donné naissance.

Si cette stadification est en partie obsolète (les classifications ultérieures d'usage courant ne la conservant qu'en partie), la séquence morphologique qu'elle décrit et qui est d'observation courante lors de l'examen microscopique des lésions, reste tout à fait valable.

Le potentiel évolutif précancéreux des lésions adénomateuses est associé aux lésions de dysplasie que présente leur muqueuse, souvent à partir de la surface. Ces lésions n'affectent pas la totalité du polype de manière homogène, mais au contraire les foyers affectés le sont de façon différente, par des lésions de degrés de sévérité différents, qui évoluent pour leur propre compte.

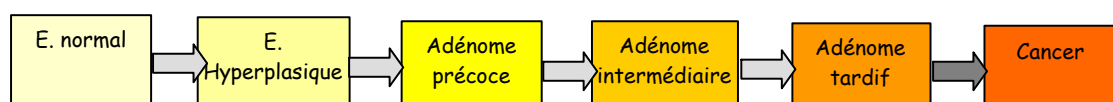
Le potentiel évolutif des adénomes plans est particulier. L'adénome plan dans sa forme habituelle (surface plane, taille inférieure à 10 mm de diamètre) est, en dépit des signes de dysplasie sévère qu'il peut présenter, une lésion bénigne de croissance lente. Par contraste, les lésions planes à surface déprimée, et mesurant plus de 5mm de diamètre, doivent faire craindre dès le diagnostic endoscopique une dégénérescence maligne (73,74). Les adénomes festonnés présentent également un risque important d'évolution vers le cancer (10). L'adénome plan tubulo-villeux, quant à lui, présente un risque de cancer invasif dès 15 mm de diamètre, et ce risque est de 25% à partir de 20 mm. Pour l'école Japonaise

(118), les adénomes débutants, de moins de 3mm de diamètre, ou « adénomes précoces » (early adenoma), ont une morphologie plane et peuvent évoluer comme des lésions non-polyptoïdes de plus grandes dimensions en s'élargissant, mais aussi comme des polypes classiques. Lors de la transformation maligne de ces lésions, il importe de différencier les cancers survenus sur un adénome plan des cancers « de novo », ce terme désignant des cancers qui se développent directement en l'absence de toute lésion adénomateuse préexistante. Ces deux situations ne sont pas de distinction facile.

Les différents types d'adénomes polyptoïdes ont un potentiel évolutif différent, qui peut être apprécié sur l'analyse de trois paramètres : le degré de dysplasie le plus élevé de l'adénome, son type architectural, sa taille. Le taux de transformation maligne des adénomes s'accroît bien évidemment avec le degré de dysplasie épithéliale et son étendue dans l'adénome. Un adénome présentant des lésions de dysplasie légère peut ne pas évoluer pendant des années. En revanche, il en est tout autrement dès que la dysplasie s'accroît. On comprend donc qu'il est capital pour le pathologiste de s'attacher à rechercher un ou plusieurs foyers de cancérisation, et d'effectuer une analyse très fine de l'axe du polype, et de son pied d'implantation en muqueuse présumée saine, dont l'envahissement signe le passage à un degré de malignité supplémentaire.

Concernant le risque de transformation maligne en rapport avec le type histologique architectural de l'adénome, l'adénome tubuleux semble ne dégénérer que rarement (1% dans les séries déjà anciennes de Potet). Au contraire, l'adénome vilieux dégénère dans environ 30% des cas et l'adénome tubulo-vilieux, dans 25% des cas. Dans tous les cas la fréquence de transformation croît avec l'âge. Elle croît également de façon significative dès qu'il existe une participation vilieuse dans une lésion tubuleuse. Un paramètre majeur pour apprécier le risque de transformation maligne reste la taille de la lésion. Dans les mêmes statistiques de Potet, 27% des adénomes de plus de 15 mm de diamètre et 50% des adénomes de plus de 20 mm de diamètre dégénèrent.

La figure 11 schématise le continuum des lésions, de l'épithélium normal au cancer.



**Figure 11 : de la muqueuse normale au cancer (d'après le schéma de Vogelstein) (69)**

### **2.1.1.5. Regroupements cliniques particuliers : les Polyposes.**

Les polypes sporadiques, représentent les lésions les plus fréquentes du colon. Les polypes héréditaires sont plus rares. Ils définissent cependant le cadre de syndromes polyposiques héréditaires familiaux. Ces syndromes sont nombreux, bien que de fréquence relativement rare.

Un grand groupe est représenté par des polypes adénomateux. C'est l'étude des familles présentant ces lésions qui a permis de réaliser des progrès majeurs dans la compréhension des mécanismes de la cancérogénèse, colique et non colique. Ils sont au plan clinique très importants à identifier car pour bon nombre d'entre eux la dégénérescence maligne est inéluctable; or il existe des possibilités de prévention par dépistage des familles à risque. La plupart d'entre eux ont en effet aujourd'hui une signature moléculaire qui permet de les identifier. Nous la décrirons dans le chapitre suivant.

Le deuxième groupe rassemble des polypes non adénomateux, de nature hamartomateuse et qui pour la plupart, sans risque de dégénérescence maligne (même si on les trouve en classiquement associés à des cancers d'autres localisations) n'entrent pas dans cette étude. Nous décrirons brièvement les différents syndromes cliniques réalisés dans la mesure où ils s'accompagnent d'un risque de transformation maligne des polypes qui les constituent.

#### **a. Les Polyposes Adénomateuses Familiales.**

La PAF (anciennement dénommée par l'école française, Polypose Rectocolique familial) est une affection héréditaire, rare en elle-même. C'est l'entité la plus fréquente du groupe des polyposes coliques héréditaires. Il s'agit d'une affection autosomique dominante à fort degré de pénétrance. Elle est définie anatomiquement par la présence d'un minimum de 100 polypes adénomateux, mais leur nombre peut atteindre des milliers. Les polypes peuvent être disséminés (comme dans les formes mineures) ou diffus. Ils sont responsables d'une apparence caractéristique du colon à son ouverture, décrit comme un «tapis de haute laine». On trouve les polypes sur toutes les portions du tractus digestif à côté des lésions coliques. Au plan microscopique, tous les types architecturaux peuvent être réalisés et rien ne les distingue microscopiquement des adénomes polypoïdes sporadiques de même type. Au plan évolutif, une des caractéristiques de l'affection est l'apparition à l'examen coloscopique des premières tumeurs entre 15 et 20 ans, donc beaucoup plus tôt que pour les lésions sporadiques analogues. Elles ont une évolution cancéreuse inéluctable dans les 20 ans qui suivent le diagnostic, avec ici aussi apparition du cancer à un âge moyen plus précoce que dans les cancers sporadiques. Une autre caractéristique de l'affection est la

fréquence de cancers coliques multiples, chaque adénome pouvant se Cancériser indépendamment des autres. Les cancers nés sur une PAF n'ont pas d'individualité histologique ou évolutive, si ce n'est par leur nombre. Il peut s'y associer d'autres lésions de localisations diverses (ostéomes essentiellement). L'affection a depuis plusieurs années une signature biologique précise, le gène responsable étant le gène de l'APC localisé sur le chromosome 5q21. La détection du gène dans les familles à risque rend possible, et indispensable, la prévention de la Cancérisation par une chirurgie du recto-colon qui, après avoir longtemps été totale, permet maintenant la conservation du rectum et de la fonction rectale.

Le Syndrome de Gardner, plus rare, comporte de nombreuses similitudes avec la PAF : caractère héréditaire autosomique dominant, présence d'innombrables polypes adénomateux qui tapissent le colon, taux élevé de Cancérisation des lésions, mutations du gène de l'APC. Cependant, les lésions extra-digestives sont plus fréquentes et diverses que dans la PAF (ostéomes, exostoses, kystes dermoïdes, etc...).

Le Syndrome de Turcot, encore moins fréquent, associe des adénomes coliques et des tumeurs cérébrales, essentiellement des gliomes. On lui reconnaît deux sortes d'altérations géniques, soit mutations du gène de l'APC, soit altération de gènes du mismatch-repair.

#### **b. Les polyposes héréditaires non adénomateuses.**

La Polypose hyperplasique, décrite pour la première fois en 1980, est définie par la présence d'au moins 5 polypes hyperplasiques de sièges particuliers (proximaux, en amont du sigmoïde) dont 2 au moins mesurent plus de 10 mm de diamètre ; le critère de nombre des polypes disparaît quand le patient a un parent au premier degré qui présente l'affection; le critère de taille disparaît quand on observe plus de 30 polypes répartis sur l'ensemble du cadre colique. Histologiquement, il s'agit de polypes hyperplasiques classiques, mais auxquels s'associent fréquemment des adénomes festonnés, tubuleux, tubulo-villeux et/ou des polypes mixtes. Cette affection rare dont on a décrit quelques formes familiales, également observée chez l'homme et chez la femme, à un âge moyen de 50 ans, s'associe chez 40% des patients à un adénocarcinome colique.

Les autres polyposes héréditaires non adénomateuses ne sont qu'exceptionnellement associées à une transformation colique maligne. La polypose du Syndrome de Peutz-Jeghers, la plus fréquente de ce groupe, est aussi la seule qui présente un risque, assez



faible, de transformation maligne des polypes hamartomateux qui la caractérisent. Les polypes hamartomateux peuvent être nombreux, sans jamais atteindre les chiffres observés dans la PAF. Le plus souvent cependant ils sont en petit nombre. Ils se répartissent sur tout le tractus digestif. Ils s'associent à des lésions cutanéomuqueuses à type de taches pigmentées brunes, et parfois, à des tumeurs malignes de localisations diverses.

**c. Les Polyposes non héréditaires**, dont la plus fréquente est le Syndrome de Cronkhite-Canada, sont peu impliquées dans la transformation maligne

### **2.1.2. Les cancers invasifs.**

L'aboutissement de la transformation maligne conduit de la muqueuse normale au cancer invasif. C'est ce dernier état qui va faire l'objet de ce paragraphe. Notre étude se limitera aux adénocarcinomes, qui représentent à eux seuls 97% des CCR.

#### **2.1.2.1. Etude macroscopique.**

Les CCR siègent, par fréquence décroissante, dans le recto-sigmoïde (66%), puis dans le colon descendant (10%) et le caecum (10%). Le reste se répartit sur les autres segments du colon. Uniques dans la plupart des cas, ils peuvent être multiples dans près de 5% des cas au moment du diagnostic. C'est notamment le cas chez les patients présentant une PAF ou de nombreux adénomes sporadiques. La survenue d'une deuxième localisation plusieurs années après la première se rencontre dans plus de 6% des cas.

En l'absence d'identification d'un adénome préexistant au cancer, on peut décrire des cancers semblant survenir « de novo » (cancers se développant directement en l'absence de toute lésion adénomateuse préexistante). Si la survenue d'un cancer « de novo », sans lésion adénomateuse préexistante, est considérée comme extrêmement rare, et est même controversée par certains, il est très rare de pouvoir identifier l'adénome préexistant au cancer invasif.

La localisation du cancer conditionne des aspects différents. Les cancers du colon gauche sont des lésions souvent circonférencielles, infiltrantes, qui peuvent rétrécir de façon importante la lumière et causer une dilatation de nature obstructive du colon en amont. La paroi est épaissie et indurée, et la lésion est souvent ulcérée. Le développement de la lésion se fait essentiellement vers la séreuse, avec nombreux nodules carcinomateux. La

dissémination se fait vers les lymphatiques régionaux et le foie, mais ces localisations ne sont pas exclusives. Au contraire, les cancers du colon droit ont typiquement une apparence polypoïde, végétante, en chou-fleur, avec protrusion dans la lumière intestinale. Les aspects infiltratifs et ulcérés sont plus rares au début. Cependant, là encore, lorsque la tumeur croît fortement, elle finit par infiltrer en profondeur vers la séreuse, et atteindre les lymphatiques régionaux, puis le foie. Les cancers du colon droit ne s'accompagnent pas, généralement, de rétrécissement significatif de la lumière.

Ces différences de développement rendent compte des quatre formes macroscopiques majeures des CCR, dont nous reprenons ici la description classique :

**a. Les formes végétantes.**

Elles réalisent des masses exophytiques sessiles, faisant saillie dans la lumière coliques; elles peuvent être partiellement érodées en surface. Elles sont rarement pures. Elles peuvent atteindre de grandes dimensions et être sténosantes, partiellement ou totalement. Elles prédominent à droite (caecum essentiellement).

**b. Les formes ulcéro-infiltrantes.**

Les plus fréquentes, elles réalisent une ulcération entourée d'un bourrelet circulaire ou plus souvent ovalaire, à versant externe recouvert de muqueuse normale et à versant interne carcinomateux. Elles sont très fréquentes, en anneau, dans le rectum. Elles peuvent également être sténosantes du fait de l'infiltration, et forment parfois une viròle (cas du transverse et du colon descendant).

**c. La linite plastique.**

Rare, elle se présente comme une tumeur colique primitive, rectale ou colique gauche. Elle réalise un segment épaissi et rigide de plusieurs centimètres, qui peut être sténosant.

**d. Les adénocarcinomes « minutes » .**

Ce sont de très petits cancers, généralement polypoïdes, parfois pratiquement plans.

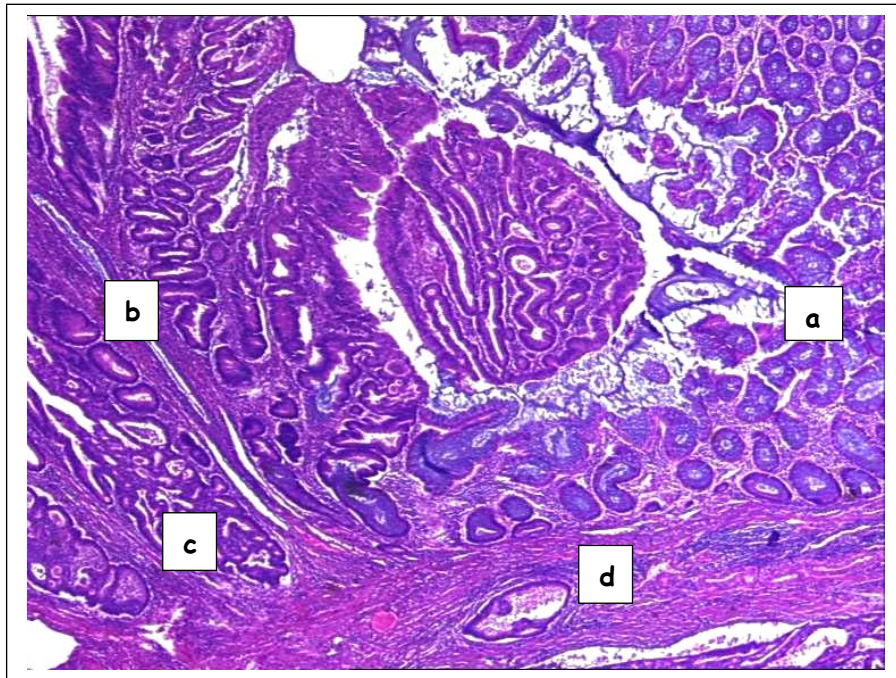
Toutes ces formes coexistent fréquemment avec des polypes adénomateux en nombre plus ou moins important.

### 2.1.2.2. Etude microscopique.

A l'échelon microscopique, il est souvent difficile, et parfois impossible, de faire la distinction entre les cancers issus de la transformation maligne d'une lésion préexistante, et les cancers « de novo ». En effet la lésion préexistante a très souvent disparu au bénéfice du cancer. Au plan histologique, le terme de « cancer de novo » doit être réservé aux cancers plans entourés de muqueuse strictement saine (en général, un cancer de moins de 5mm de diamètre infiltrant la sous-muqueuse). On individualise histologiquement 8 types d'adénocarcinomes.

#### a. Adénocarcinomes lieberkuhniens.

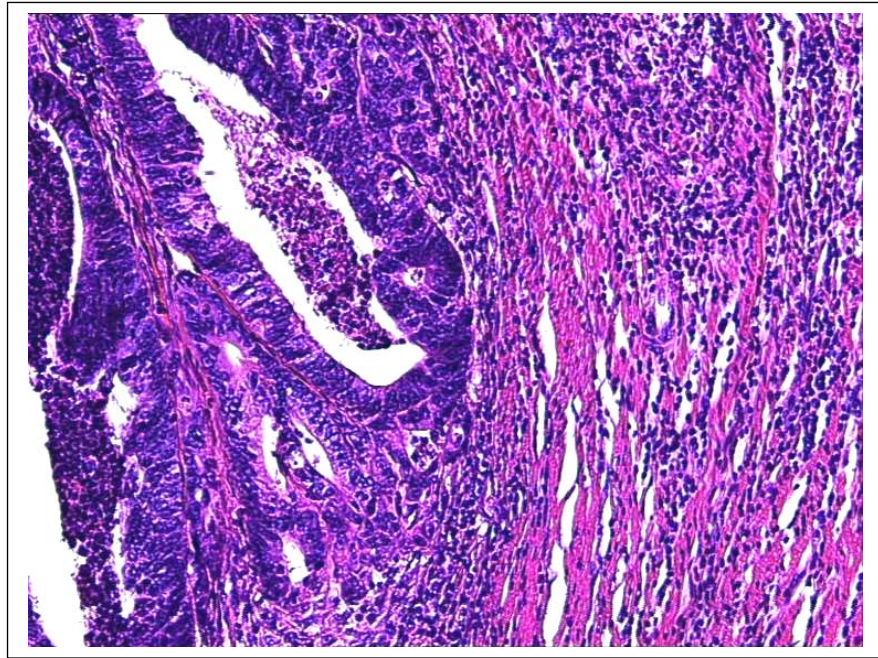
Ce sont les plus fréquents (figures 12, 13, 14, 15, 16). Les cellules sont cylindriques, hautes, accolées par leurs faces latérales; leur pôle apical présente des microvillosités; leur sécrétion est généralement très diminuée ou absente. Ils revêtent des architectures variées : tubuleux, tubulopapillaires, pseudo-acineux. Il n'est pas rare qu'ils comportent un contingent mucineux qui doit être quantifié et qui par ailleurs aggrave le pronostic.



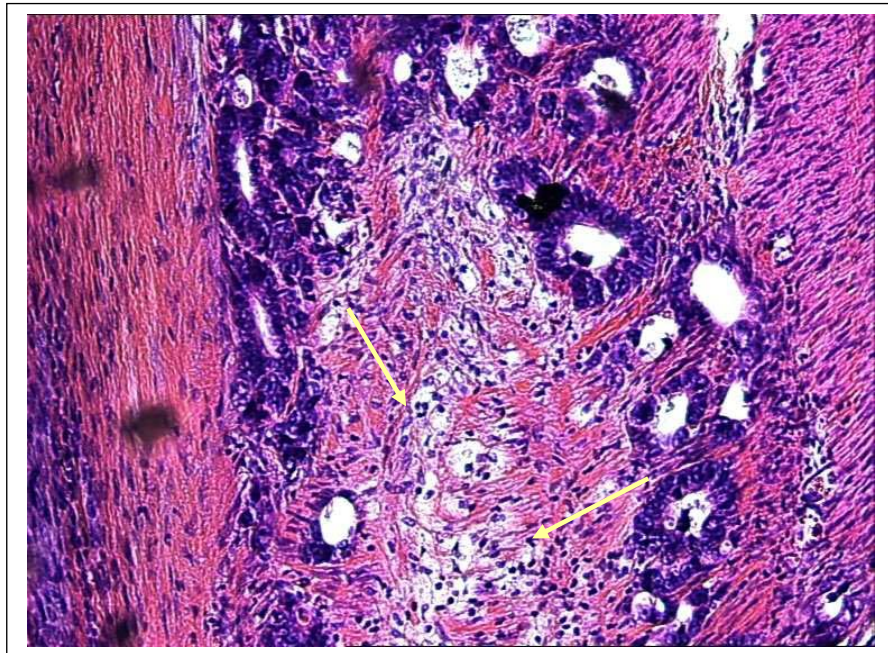
*Figure 12 : Adénocarcinome lieberkuhnien bien différencié sur adénome préexistant. HESx10.*

*a : muqueuse normale ; b : adénome ; c : cancer ; d : embole vasculaire.*



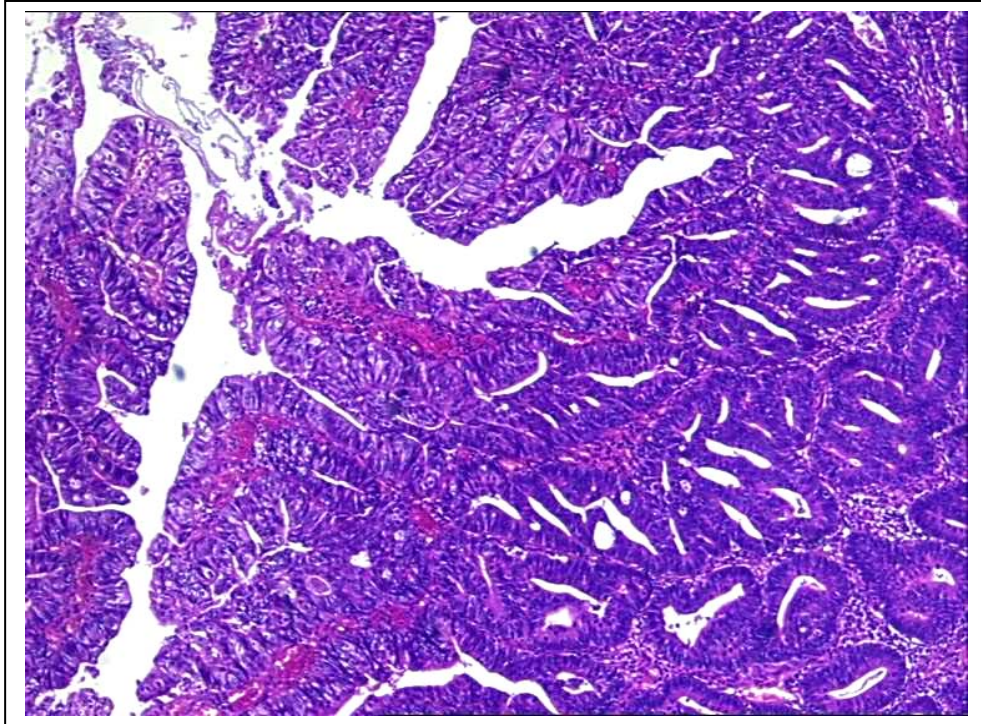


*Figure 13 : Adénocarcinome lieberkuhnien moyennement différencié.  
HESx20 : envahissement en profondeur.*

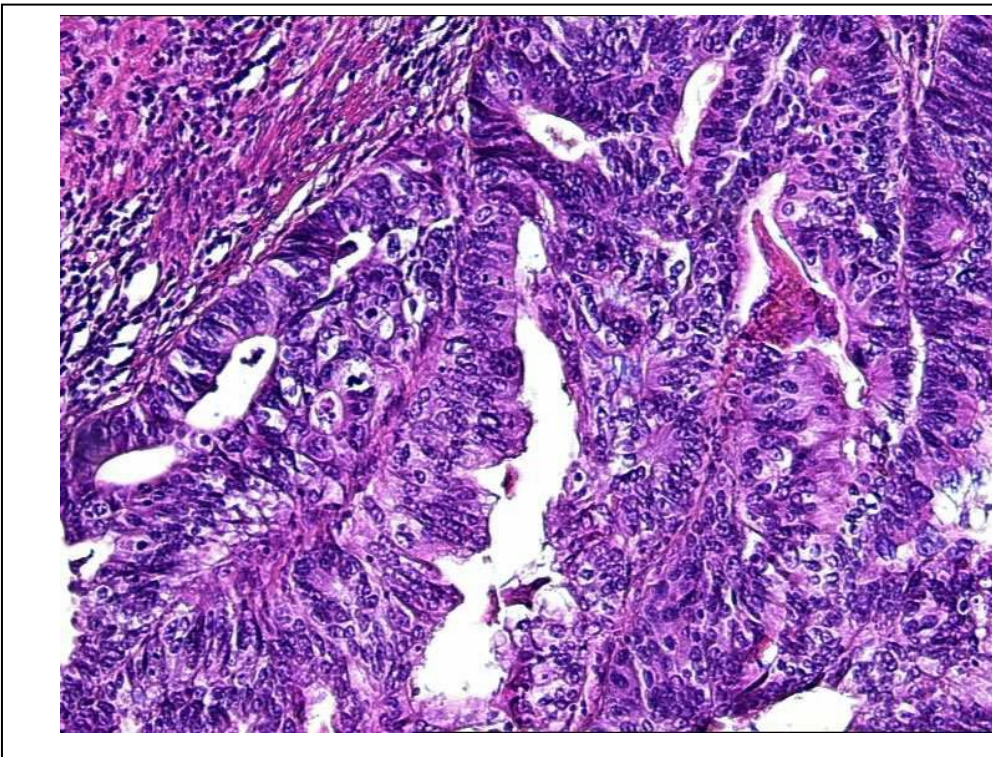


*Figure 14 : Adénocarcinome lieberkuhnien moyennement différencié.  
HESx20 : envahissement d'un filet nerveux (flèches).*





*Figure 15 : Adénocarcinome lieberkuhnien avec contingent peu différencié . HESx10*



*Figure 16 : Adénocarcinome lieberkuhnien avec contingent peu différencié . HESx20 :détail du contingent peu différencié*



**b. Adénocarcinomes coliques festonnés.**

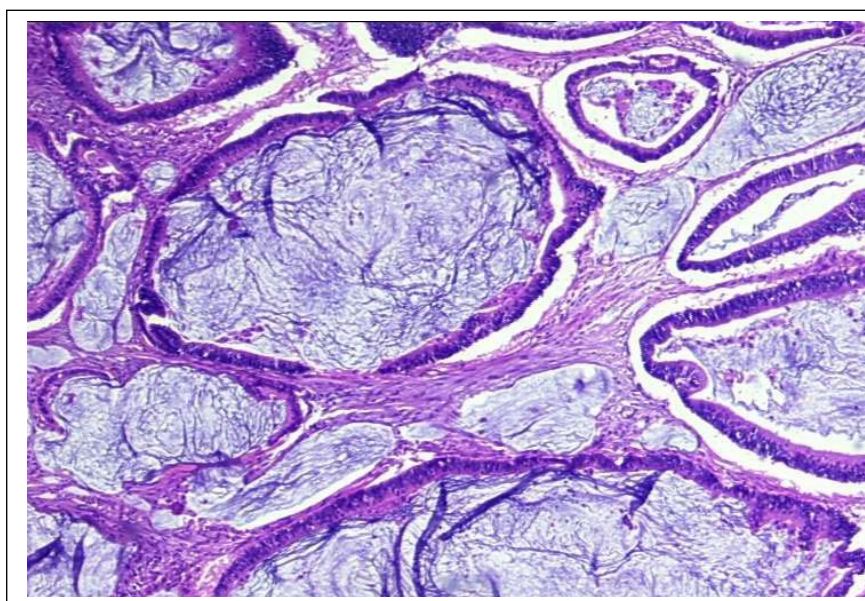
Cette appellation a été introduite en 1992 par Jass et Smith (59) à propos d'observations d'adénocarcinomes à architecture festonnée, le plus souvent de type lieberkuhnien, et comportant des foyers de cellules sécrétrices de mucines.. L'individualisation de cette entité n'est pour l'instant pas établie.

**c. Adénocarcinomes atypiques, non lieberkuhniens.**

Ils sont faits de petites cellules cubiques ou polygonales, très basophiles, regroupées en cordons, en travées, en petits massifs dans un stroma toujours abondant.

**d. Adénocarcinomes mucineux (colloïdes muqueux )** (figure 17).

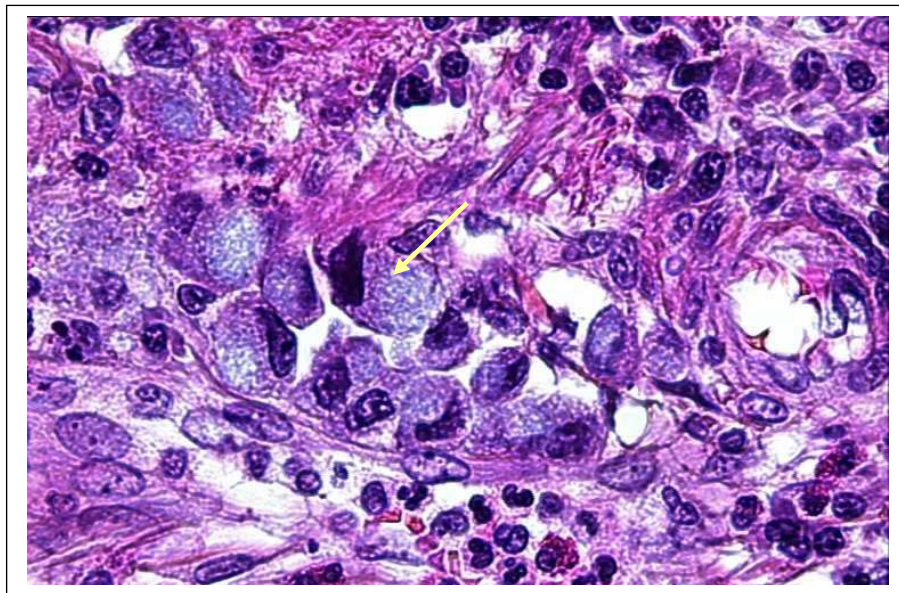
Les plus fréquents après les adénocarcinomes lieberkuhniens (15%). Macroscopiquement d'aspect plus ou moins gélatineux, ou contenant une substance visqueuse, ils sont faits de larges plages de substance mucoïde pâle, contenant des tubes glandulaires distendus, des cellules isolées en bague à chaton. Il existe des formes mixtes où des structures lieberkuhniennes coexistent avec des plages mucineuses. Pour être définie comme un carcinome mucineux, la tumeur doit être mucineuse à 50% au minimum; une tumeur qui est mucineuse à 25-50% est dite « avec composante mucineuse ». La plupart de ces tumeurs naissent à partir d'un adénome. Elles sont localisées préférentiellement au colon droit et au rectum. On attribue souvent un mauvais pronostic aux cancers mucineux ou à composante mucineuse.



*Figure 17 : adénocarcinome mucineux. HE5x40 : flaques de mucus*

**e. Carcinomes à cellules en bague à chaton** (à cellules indépendantes) (figure 18).

Rares (entre 1 et 4% de l'ensemble des CCR), et correspondant microscopiquement à l'entité macroscopique des limites plastiques, ils infiltrent toute la paroi sous forme de cellules en bague à chaton ou de cellules indifférenciées. Leur pronostic n'est pas bon. Les formes primitives sont souvent difficiles à distinguer des métastases de cancers en bague à chaton d'autres origines (estomac, sein, etc...).



*Figure 18 : cellules en bague à chaton (flèche). HESx40*

**f. Carcinomes adénoquameux.**

Très rares dans cette localisation, ils doivent, pour être classés dans cette catégorie, présenter plus que des foyers occasionnels de différenciation malpighienne.

**g. Carcinomes indifférenciés.**

Ces carcinomes ne montrent plus aucun signe de différenciation glandulaire.

**h. Les carcinomes à petites cellules**, bien qu'ils ne soient pas des adénocarcinomes, sont évoqués ici car la moitié d'entre eux environ est associée à ou naît à partir d'un adénome ou d'un CCR habituel. Ils partagent l'aspect morphologique, l'agressivité et le pronostic sombre des carcinomes à petites cellules du poumon.

### **2.1.2.3. Extension des lésions.**

Les cancers invasifs, dans leur progression, franchissent et détruisent les limites de l'organe qui leur a donné naissance. Ils vont envahir le voisinage selon des voies bien établies.

L'extension régionale se fait vers les ganglions péricoliques et périrectaux, ainsi que vers ceux situés le long des artères iléocoliques, colique droite, colique moyenne, colique gauche, mésentérique inférieure, rectale supérieure (hémorroïdale) et iliaques internes. Les métastases se font essentiellement dans les ganglions (50%), le foie (25%), les os (5%), les poumons (5%), le péritoine (5%), le cerveau (2%). Dans tous les cas, le pronostic est directement dépendant de l'extension de la tumeur, locale, régionale ou générale. D'où l'importance d'évaluer cette extension. Cette nécessité a donné naissance à de nombreux systèmes de classification et de stadification de la maladie cancéreuse colorectale. Nous ne parlerons ici que de ceux qui sont le plus communément utilisés à l'heure actuelle, en citant d'abord les systèmes qui évaluent l'extension locale, locorégionale et générale de la maladie, puis ceux qui ont pour ambition de donner un histo-pronostic.

## **2.2. Les différents systèmes de classification.**

La nécessité d'adopter des classifications ayant pour but de faire entrer les lésions, donc les patients, dans des groupes homogènes, s'est très vite imposée comme le préalable obligatoire à une prise en charge optimale des patients.

Il existe classiquement trois grands groupes de classifications en matière de tumeurs malignes du colon. Le premier groupe est purement histologique, il apprécie le type histologique et le degré de différenciation cellulaire d'une tumeur. Le système le plus utilisé dans ce groupe est la classification histologique de l'OMS . Nous l'aborderons en premier. Le deuxième groupe fait partie des classifications histopronostiques, il évalue les caractéristiques invasives de la tumeur sur le plan local ou locorégional, et on l'exprime en classes. Il a été très longtemps utilisé et l'est encore largement. L'exemple en est la classification de Dukes (7). Il fera l'objet du second paragraphe de ce chapitre. Le troisième groupe est anatomo-clinique, il intègre les données de la maladie cancéreuse dans son potentiel d'extension à tout l'organisme et s'exprime en stades. C'est le système TNM de l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) (146), qui est actuellement utilisé



comme référence pour mettre en œuvre la prise en charge thérapeutique du patient. Il sera vu en détails. On donnera enfin un exemple de tentative de transcodification d'une classification vers une autre (tableau 1).

### 2.2.1. Classification histologique de l'OMS.

L'OMS propose une classification purement histologique des carcinomes, d'après leur type, qui est complétée par la mention d'un grade suivant le degré de différenciation cellulaire .

La classification suivant les types est la suivante :

- ✓ Adénocarcinome<sup>1</sup> ;
- ✓ Carcinome médullaire<sup>2</sup> (peu différencié, avec stroma inflammatoire) ;
- ✓ Adénocarcinome mucineux (colloïde muqueux) (plus de 50% de composante mucineuse) ;
- ✓ Carcinome à cellules indépendantes<sup>3</sup> (plus de 50% de cellules indépendantes) ;
- ✓ Carcinome épidermoïde ;
- ✓ Carcinome adénosquameux ;
- ✓ Carcinome à petites cellules ;
- ✓ Carcinome indifférencié .

On identifie trois grades dans ce système:

- Grade 1 : bien différencié (comportant au minimum 95% de structures glanduliformes<sup>4</sup>) ;
- Grade 2 : modérément différencié, (50 à 95% de structures glanduliformes) ;
- Grade 3 : peu différencié (comportant moins de 50% de structures glanduliformes).

Cette classification histologique doit être complétée par les classifications appréciant l'extension de la tumeur.

---

<sup>1</sup> Inclut dans le colon les sous-types lieberkuhnien, colique festonné, atypique non lieberkuhnien.

<sup>2</sup> Non cité dans la description générale du fait de sa rareté dans le colon.

<sup>3</sup> Intitulé carcinome à cellules indépendantes dans la description histologique proposée ici.

<sup>4</sup> Structures réalisées par l'agencement de cellules tumorales autour d'une cavité ou d'une ébauche de cavité et tendant ainsi à imiter grossièrement une glande avec sa lumière.

### **2.2.2. Une classification histologique reposant sur l'extension locale de la tumeur : la classification « modifiée » de Dukes .**

Assez ancienne, cette classification a été la plus utilisée pendant des décennies. D'abord décrite par Dukes, elle a été modifiée par Astler et Coller (7). Elle repose sur l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire, à partir duquel elle donne l'extension locorégionale des lésions. Elle dépend essentiellement des conclusions de l'anatomopathologiste mais intègre également des données d'extension générale qui demandent une coopération clinique. Telle quelle, elle est fortement corrélée aux données sur la survie.

Elle reconnaît quatre stades, éventuellement divisés en sous-stades, suivant le niveau histologique d'envahissement de la paroi colique :

- ✓ A : extension limitée à la muqueuse ;
- ✓ B1 : extension atteignant la paroi musculaire propre, mais sans la pénétrer, et sans envahissement des ganglions lymphatiques locaux ;
- ✓ B2 : extension à travers toute la paroi sans envahissement ganglionnaire ;
- ✓ C1 : extension limitée à la paroi colique, avec envahissement ganglionnaire ;
- ✓ C2 : l'extension dépasse la paroi colique, et s'accompagne d'un envahissement ganglionnaire ;
- ✓ D : quelque soit l'extension en profondeur, présence de métastases à distance.

Le point faible de cette classification repose sur le caractère hétérogène à la fois sur le plan histologique et sur le plan évolutif, des patients au stade B malgré la présence des sous-stades B1 et B2. En effet, la ligne de partage entre les patients de bon pronostic et ceux de mauvais pronostic est généralement constituée par le passage du stade B1 au stade B2 (70% de survie à 5 ans au 1<sup>er</sup> stade A, 65% au stade B1, mais 43% au stade B2 et 15% au stade C2).

### **2.2.3. Une classification intégrant la tumeur dans la maladie cancéreuse : la classification TNM (pTNM).**

La classification TNM, qui évalue l'extension anatomique de la maladie, est aujourd'hui la plus communément et la plus universellement utilisée. Elle est plus précise que le Dukes modifié dans son évaluation de l'envahissement de la paroi colique.

Comme la classification de Dukes modifiée, elle repose sur la prise en compte de trois paramètres :

- ✓ T : l'extension de la tumeur primitive ;
- ✓ N : l'absence ou la présence d'un envahissement ganglionnaire lymphatique régional ;
- ✓ M : l'absence ou la présence de métastases à distance ;

Les trois lettres, assorties chacune d'un indice, constituent la codification de la tumeur.

Contrairement au Dukes modifié, la classification TNM comporte deux séquences, la première est une évaluation essentiellement clinique au moment du diagnostic, qui permet de proposer une approche des méthodes d'abord de la maladie; la seconde est la modification de cette évaluation en post-opératoire par les constatations anatomo-pathologiques. On parle ainsi de classification TNM pour l'évaluation par le clinicien de l'extension de la maladie; cette évaluation intervient lors d'un premier examen clinique et peut s'aider de l'imagerie médicale. Lorsque l'intervention chirurgicale aura permis de faire la preuve de la nature histologique définitive de la lésion et de ses caractéristiques précises, et qu'il aura été possible de vérifier l'état histologique des ganglions locorégionaux, le pathologiste établira le pTNM (p pour post-opératoire). C'est le pTNM qui sera le critère absolu de prise en charge du patient.

Le système TNM s'adapte à toutes les localisations des tumeurs solides primitives. Pour le colon, la classification ne s'applique qu'aux carcinomes .

En voici le détail :

- ✓ T (pT): tumeur primitive ;
- ✓ Tx (pTx) : renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive) ;
- ✓ T0 (pT0) : pas de signe de tumeur primitive) ;
- ✓ Tis (pTis): carcinome in situ (intraépithélial ou intramuqueux) ; ce stade inclut les carcinomes pouvant arriver jusqu'au contact de la musculaire muqueuse sans la dépasser. Il inclut donc les carcinomes intra-épithéliaux (à l'intérieur des basales glandulaires) et intramuqueux (dans la muqueuse).

Le statut T se décompose comme suit:

- ✓ T1 (pT1): envahissement de la sous-muqueuse ;
- ✓ T2 (pT2): envahissement de la musculature ;
- ✓ T3 (pT3): envahissement de la sous-séreuse et des tissus péricoliques et péirectaux extrapéritonéaux ;

- ✓ T4 (pT4) : envahissement des organes ou structures de voisinage (T4a, pT4a ) ou envahissement du péritoine viscéral (T4b, pT4b). Le stade pT4b comporte trois types d'envahissements :
  - cellules carcinomateuses proches de la séreuse en rapport avec une réaction inflammatoire mésothéliale accompagnée ou non d'une hyperplasie des cellules mésothéliales;
  - présence de cellules carcinomateuses sur la séreuse avec réaction inflammatoire, hyperplasie mésothéliale accompagnées ou non d'érosions ou d'ulcérations;
  - présence de cellules carcinomateuses au-delà de la séreuse avec ulcération du péritoine.

Ce stade comprend aussi l'invasion des autres segments du colorectum par le chemin de la séreuse.

Le statut de l'envahissement ganglionnaire N (pN) comporte les stades suivants:

- ✓ N (pN) : adénopathies régionales :
- ✓ Nx : renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales) ;
- ✓ N0 (pN0) : pas d'ADP régionale métastatique ;
- ✓ N1 (pN1) : 1 à 3 ADP régionales métastatiques ;
- ✓ N2 (pN2) : 4 ou plus ADP régionales métastatiques.

Quant au statut M (pM) concernant les métastases à distance, il se décompose en :

- ✓ M0 (pM0) : absence de métastase ;
- ✓ M1 (pM1) : présence d'au moins une métastase
- ✓ Mx (pMx) : renseignements insuffisants pour affirmer l'absence ou la présence d'une métastase.

Tout nodule tumoral identifié dans le tissu adipeux péri-tumoral sans structure ganglionnaire associée est à considérer comme une métastase ganglionnaire. L'envahissement métastatique d'un ganglion lymphatique à distance de la tumeur est à classer en pM1.

En outre, la classification TNM prend également en compte, pour le colon, l'évaluation de la tumeur résiduelle (R) sur la pièce opératoire après un traitement de première intention :

- ✓ R0 : Berges de résection microscopiquement indemnes de tumeur résiduelle ;
- ✓ R1 : Berges de résection microscopiquement envahies ;

✓ R2 :Tumeur résiduelle macroscopique (constatation chirurgicale).

Remarque : un nodule tumoral > 3 mm situé dans les tissus périrectaux ou péricoliques (avec ou sans tissu ganglionnaire résiduel) est classé comme un ganglion métastatique. Un nodule tumoral ≤ 3 mm est classé en T comme une extension discontinue.

La classification TNM permet un groupement des lésions par stades :

- ✓ Stade 0 : Tis N0 M0 ;
- ✓ Stade I : T1N0 M0, T2 N0 M0 ;
- ✓ Stade IIA : T3 N0 M0 ;
- ✓ Stade IIB : T4 N0 M0 ;
- ✓ Stade IIIA :T1 N1 M0, T2 N1 M0 ;
- ✓ Stade IIIC : T3 N1 M0, T4 N1 ;
- ✓ Tous T N2 M0 ;
- ✓ Stade IV tous T tous N M1;

La classification de Dukes modifiée reste encore très utilisée à côté de la classification TNM. On a donc jugé utile d'établir une correspondance entre ces deux systèmes (tableau 1).

**Tableau 1** : correspondances entre les stades de Dukes et les stades TNM.

Dukes A	TNM Stade I
Dukes B	TNM Stade II
Dukes C	TNM Stade III
Dukes C1	TNM Stade III
Dukes C2	TNM Stade III
Dukes D	TNM Stade IV

On constate donc qu'à la diversité des définitions des lésions histologiques, correspond la diversité des classifications de la maladie cancéreuse colorectale. Ceci donne tout son intérêt à la définition d'un vocabulaire et d'une syntaxe reconnus par l'ensemble des pathologistes.

## **2.3 Ontologie des modifications architecturales du CCR au cours de la transformation maligne.**

On a vu la diversité des syndromes, des entités nosologiques et histologiques des CCR, à laquelle répond la diversité des classifications. La mise en place d'un langage commun entre pathologistes devient ainsi fortement souhaitable. Elle peut être effectuée au travers d'une ontologie dédiée au CCR.

Dans les lignes qui suivent, le concept d'ontologie fera l'objet d'une tentative de définition. Puis nous envisagerons la nécessité d'élaborer une ontologie personnelle de la pathologie cancéreuse du colon. Le travail préliminaire du choix du vocabulaire sera ensuite abordé. Enfin, nous mettrons en place, à l'aide d'un schéma, l'ontologie à laquelle nous avons abouti.

### **2.3.1. Une définition, ou des définitions, du concept d'ontologie ?**

On pourra trouver dans la littérature de nombreuses définitions du concept d'ontologie, parfois contradictoires les unes avec les autres. Ces définitions varient en effet en fonction du domaine de connaissances qu'elles veulent recouvrir, et du type d'approche que l'on a décidé d'en donner. Cependant, la grande majorité ont en commun de mettre l'accent sur :

- la mise en place d'un vocabulaire standardisé et structuré ;
- le partage des connaissances à partir d'un groupe d'informations ;
- et, de façon non constante, une hiérarchisation du domaine de connaissance.

Ainsi, d'après Gruber (43), une ontologie, au travers de l'établissement d'un vocabulaire et de termes représentatifs, en établissant des classes ou des concepts sémantiques, des fonctions de relations, doit obéir à la nécessité d'utiliser un vocabulaire partagé de façon consensuelle. On peut également définir une ontologie comme la formalisation et la spécification consensuelle de conceptualisations qui permettent une compréhension partagée d'un domaine, compréhension qui peut être communiquée à d'autres et appliquée dans des systèmes (33).

Plus simplement, on peut définir une ontologie comme une organisation hiérarchique de la connaissance portant sur un ensemble d'objets regroupés en classes et catégories, et représentés au travers d'un vocabulaire consensuel et d'une syntaxe structurée. C'est cette dernière définition que nous avons adoptée dans notre travail.

### **2.3.2. Pourquoi élaborer une ontologie personnelle de la pathologie du CCR ?**

Il existe de très nombreuses ontologies de la cellule cancéreuse à l'échelon ultra-structural et de la biologie moléculaire, et même une ontologie publiée du colon normal (dont nous donnerons le lien à titre indicatif). En revanche, nous n'avons pas trouvé d'ontologie de la pathologie du tractus digestif à l'échelon tissulaire publiée et accessible à tous les spécialistes du domaine. Devant ce manque, nous avons décidé d'élaborer notre propre ontologie (figure 19).

### **2.3.3. Choix du vocabulaire et de la syntaxe.**

Dans la réalisation de cette ontologie, un travail préliminaire essentiel a été de choisir une syntaxe et un vocabulaire utilisés par le plus grand nombre. Nous avons vu au chapitre précédent qu'il existe en cancérologie, de nombreuses nomenclatures. Ces nomenclatures font appel à des thésaurus qui s'appliquent à un domaine particulier de la connaissance, en employant une liste exclusive de termes à utiliser obligatoirement dans le domaine étudié. Ce vocabulaire permet alors de désigner des termes ayant entre eux des relations sémantiques.

A ces nomenclatures on a fait correspondre divers systèmes de codage des tumeurs, certains utilisés internationalement par les pathologistes (SNOMED<sup>1</sup>, OMS/WHO<sup>2</sup>), d'autres appliqués uniquement entre pathologistes des Centres et Instituts de Lutte contre le Cancer dans le monde (CIM<sup>3</sup>, CIM-0), d'autres enfin en usage chez la plupart des pathologistes français (ADICAP<sup>4</sup>). Certains de ces systèmes apparaissent d'ailleurs très proches d'une ontologie (SNOMED en particulier).

Chacune de ces nomenclatures permet de codifier les lésions d'après un premier niveau (classification anatomique) puis un deuxième niveau (classification morphologique), les deux se combinant ensuite. Le troisième niveau est représenté par l'inclusion dans la classification d'un codage spécifique selon le grade histologique et selon le degré de

---

<sup>1</sup> SNOMED : *Systematised Nomenclature of Medicine*.

<sup>2</sup> OMS/WHO : *Organisation Mondiale de la Santé/World Health Organization*

<sup>3</sup> CIM : *Classification Internationale des Maladies ; encore appelée CIMO pour les versions antérieures à 1997, CIM-10 à partir de 1997.*

<sup>4</sup> ADICAP : *Association pour le développement de l'Informatique en Cytologie et Anatomie Pathologique.*

différenciation. Il existe des différences notables entre chaque codification morphologique quant à la précision du libellé morphologique. De même, le troisième niveau peut être plus ou moins développé suivant les classifications et, dans une même classification, suivant les organes. Il existe des trans-codifications permettant de passer d'un système à un autre.

Il convient de noter que certaines classifications s'adaptent mieux que d'autres à une finalité précise (étude épidémiologique, inclusion d'un malade dans un protocole thérapeutique etc...); notamment, la classification française de l'ADICAP est celle qui convient le mieux aux études anatomo-pathologiques par le degré de précision qu'elle permet d'atteindre dans le type de lésion étudiée.

La présente ontologie a été élaborée à partir de la classification du système TNM complété par la classification histologique de l'OMS et par les items définis dans la codification ADICAP. Pour les entités reconnues postérieurement à la validation de ces systèmes, nous nous sommes référés aux termes en usage dans la profession à ce jour. Cette ontologie nous a permis de relier les images histologiques sur lames des différentes altérations de la muqueuse colique au cours de la cancérogénèse, aux constatations immuno-histochimiques mises en évidence dans ce travail. Ce travail a été fait au moyen d'un système d'annotations des lames histologiques par le pathologiste, en utilisant le vocabulaire défini dans l'ontologie (annexe 1).

#### **2.3.4. Mise en place d'une ontologie du CCR (figure 19).**

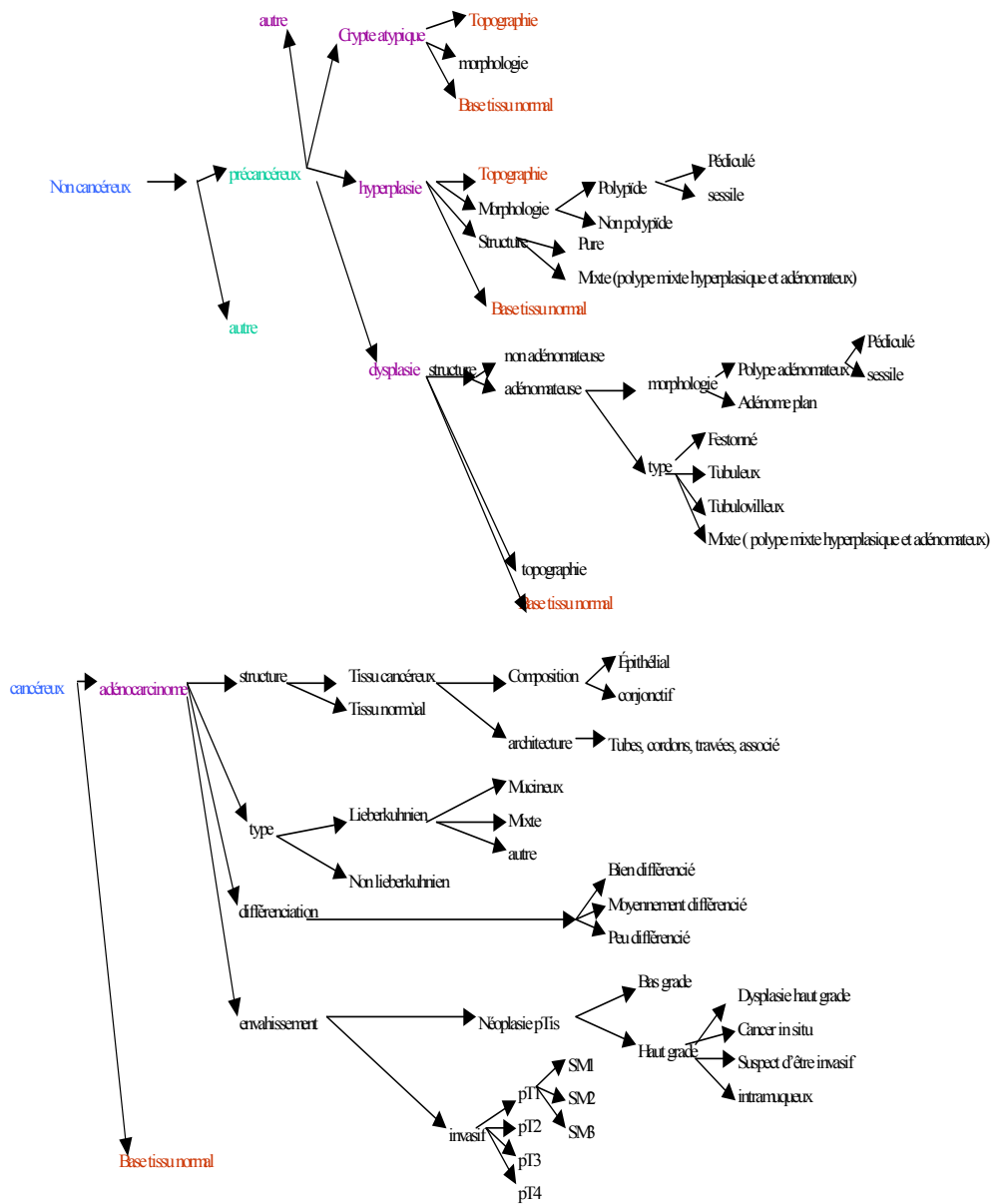
L'ontologie du CCR que nous avons élaborée est constituée d'une partie personnelle, représentée sur la figure 19, construite sur nos items. Ceux-ci sont destinés à être reliés, aux deux bouts de la chaîne, aux ontologies existantes sur le Web, c'est-à-dire en amont aux ontologies d'organes du tractus digestif, et en aval aux ontologies de la cellule cancéreuse et du génome. Nous suggérons, en amont de nos données, la liaison avec les ontologies regroupées par l'OBO<sup>1</sup>. Pour ces données d'aval, nous avons choisi le lien avec les ontologies du « Gene Ontology Consortium »<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup> OBO : *Open Biomedical Ontologies* ; regroupe, plusieurs groupes travaillant sur les ontologies. Son site est : <http://www.oboedit.org>

<sup>2</sup> Réunion de plusieurs groupes travaillant dans des domaines se rejoignant autour de trois grands axes, réalisant trois ontologies extensives pour décrire les fonctions moléculaires, les phénomènes biologiques, les composants cellulaires. Ce réseau est en constante extension et participe à l'OBO. voir le site : <http://geneontology.org>





**Figure 19 : ontologie du CCR.**

Cette ontologie, dans sa présentation, est essentiellement dédiée à un travail d'anatomopathologiste. Elle est destinée à servir à la constitution d'une base de données d'images à partir de l'observation et de l'annotation de lames histologiques. Elle doit donc renfermer tous les termes histologiques susceptibles de décrire les lésions observées.

Elle se présente sous la forme d'un arbre à deux branches principales, reliées au tronc, qui est constitué par l'item « colon pathologique ».

La branche « tissu non cancéreux » donne naissance à deux branches, l'une traitant des différentes lésions précancéreuses, l'autre n'étant qu'un rappel de l'existence d'autres pathologies (qui sortent du champ de cette étude).

La branche « précancéreux » donne elle-même naissance à des ramifications correspondant aux différentes entités.

La branche « cancéreux » et les branches issues de l'item « précancéreux », qui ne sont pas sur un même plan géographique sur le schéma, sont en fait au même niveau conceptuel . Chacune d'entre elles donne naissance, d'une part à une division « base tissu normal» qui est un rappel de la présence possible de tissu normal (en dehors du champ de cette étude) sur la lame observée et d'autre part à plusieurs ramifications correspondant aux différentes structures devant être décrites . Il existe en outre dans la branche « cancer », des ramifications spécifiques à la maladie cancéreuse (type, différenciation, envahissement).

L'extrémité terminale de chaque ramification s'arrête au niveau du tissu examiné et ne prend pas en compte la cellule : c'est à cet endroit qu'il convient de relier cette ontologie aux nombreuses ontologies prenant en compte les différents types cellulaires, puis à celles concernant le génome.

La complexité de cette architecture vient de ce que les lésions précancéreuses n'atteignent que la muqueuse colique, tandis que la maladie cancéreuse est destinée à toucher toutes les structures de la paroi colique. D'autre part, à chaque moment, en lésion cancéreuse comme en lésion précancéreuse, l'observateur peut se trouver en présence d'un fragment de tissu normal. Telle quelle cependant, elle est utilisable par l'anatomopathologiste au cours de son travail de routine comme d'éventuels travaux de recherche.

## **II. LE POINT DE VUE DU BIOLOGISTE : LA CANCEROGENESE COLORECTALE, UNE DEREGLATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT ?**

---

Nous avons vu que l'étude des lésions des familles présentant des CCR (29) a permis de faire des avancées notables dans la compréhension de la cancérogénèse colique mais également générale.

L'identification dans les familles de PAF du rôle du gène suppresseur de tumeur Adenomatous polyposis coli (APC) (35) puis de son rôle dans les cancers sporadiques (88), a été une avancée décisive. La découverte du fonctionnement intriqué du gène APC avec la  $\beta$ -caténine (86) a constitué un pas décisif dans l'identification des voies moléculaires de la cancérogénèse colique. C'est ensuite la découverte de la voie de signalisation Wnt chez la drosophile puis des gènes homologues chez les vertébrés qui a mis en évidence le lien entre le gène APC et la voie Wnt (22). Cette voie de signalisation joue un rôle capital tout au long du développement normal (134, 135). Sa dérégulation a très vite été impliquée dans les cancers (101, 102). Aujourd'hui elle apparaît comme le mécanisme majeur de la cancérogénèse rectale (13, 34, 75).

C'est l'acteur-clé de cette voie, la  $\beta$ -caténine, ainsi que la Cycline D1, sa cible privilégiée dans la voie Wnt, que nous avons choisies comme fils conducteurs de notre étude sur les bouleversements architecturaux au cours de la cancérogénèse colorectale.

C'est pourquoi nous allons exposer en détails, dans les lignes suivantes, la voie Wnt et ses implications connues dans la cancérogénèse colorectale. Les autres voies de signalisation impliquées dans la cancérologie colorectale selon le schéma de Vogelstein, ne seront pas abordées ici.

## **1. DU SCHEMA PRINCEPS DE VOGELSTEIN AUX CONCEPTIONS ACTUELLES.**

### **1.1. Le schéma princeps de Vogelstein.**

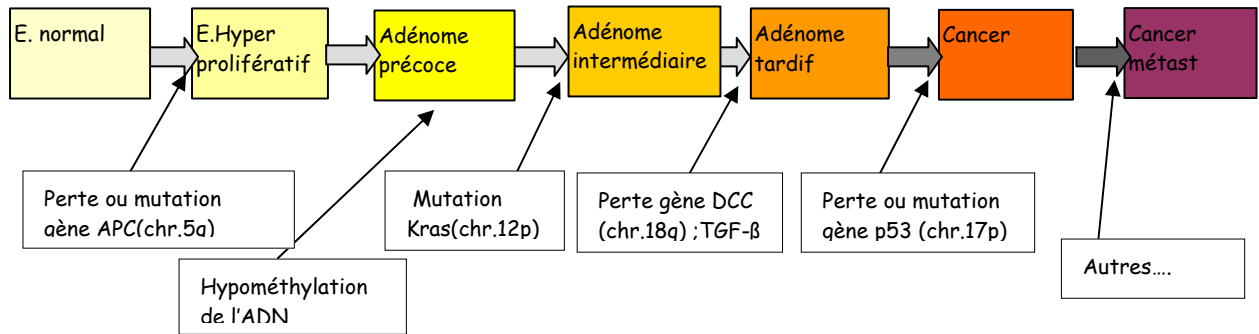
On admet actuellement que la plupart sinon tous les CCR surviennent à partir d'adénomes. L'importance et la réalité de cette séquence, qui se retrouve dans les 2/3 des histoires cliniques, reposent sur les arguments suivants :

- ✓ les patients à forte prévalence d'adénomes sont aussi ceux qui ont une forte prévalence de CCR, l'inverse étant vrai ;
- ✓ la distribution des adénomes dans le colon et le rectum est comparable à la distribution des CCR ;
- ✓ le pic d'incidence des polypes adénomateux précède de quelques années celui des CCR ;
- ✓ de petits foyers de transformation maligne sont fréquents dans les polypes adénomateux ;
- ✓ le risque de cancer est directement lié au nombre d'adénomes et atteint 100% chez les patients qui présentent une polypose familiale avec de multiples polypes ;
- ✓ chez les patients qui présentent des polypes adénomateux, l'ablation de ces lésions permet de prévenir l'apparition d'un CCR ;
- ✓ à l'échelon génétique, on retrouve les mêmes types de mutations avec une forte présomption pour que leur addition conduisent de l'adénome au cancer .

Ainsi, Vogelstein dès 1990, intégrant les mutations connues dans la cancérogénèse colorectale aux modifications architecturales observées lors de la transformation et de la

progression tumorale, a proposé un modèle moléculaire de CCR à travers une séquence adénome-carcinome.

Voici une représentation modifiée et complétée de ce modèle (figure 20) :



**Figure 20 : schéma de Vogelstein modifié : de l'épithélium normal au cancer.**

On retrouve d'après ce schéma les séquences suivantes :

- ✓ au stade de l'épithélium hyperprolifératif (stade des cryptes aberrantes et des polypes) , des mutations intervenant dans la voie majeure de signalisation de la cancérogénèse colique (voie APC/βcaténine/Wnt),
- ✓ au stade de l'adénome, des mutations de K-ras,
- ✓ et au passage adénome-cancer, des mutations de p53, dont on admet l'intervention tardive.

Ce schéma initial a par la suite été complété et critiqué, mais sa structure générale demeure valable et permet d'envisager la cancérogénèse colorectale comme l'aboutissement de plusieurs niveaux d'instabilités, génétique, chromosomique, microsatellitaire. Il implique la mise en jeu de 4 grandes voies de signalisation cellulaire dans la cancérogénèse colorectale : les voies APC/Wnt, K-ras, la voie du TGF-β, la voie de p53.

## **1.2. La voie canonique Wnt de signalisation intracellulaire et la cancérogénèse colorectale.**

Les voies de signalisation représentent tous les processus internes qui permettent à une cellule d'intégrer les signaux qui lui arrivent des autres cellules et/ou de son

environnement, et d'y répondre. L'activation inadéquate ou ininterrompue de certaines voies de signalisation lors du signal mitotique a pour conséquence une prolifération incontrôlée. En particulier, la dérégulation de la voie de signalisation Wnt joue un rôle capital dans la transformation maligne au cours de la cancérogénèse colorectale.

### **1.2.1. Le gène APC et la voie Wnt.**

#### **1.2.1.1. Voie de l'APC.**

Bien que l'on considère actuellement que le mécanisme d'action du gène APC dans la cancérogénèse colique passe par la voie Wnt, nous le décrivons en premier parce c'est lui qui a été impliqué en premier dans la cancérogénèse colique, dans une voie qui a été la première décrite dans les CCR, comme « voie de l'APC »..

Le gène APC a été découvert à partir des cancers coliques développés sur les lésions de PAF où on a démontré le rôle de ses mutations germinales. On a ensuite très vite rattaché des mutations du gène à la majorité (60 à 80%) des CCR sporadiques (107). Il a rapidement été classé dans la catégorie des gènes suppresseurs de tumeur (92). Il joue le rôle de « gène gardien du génome » (« »gatekeeper» ») (69) pour l'épithélium colique, en permettant le maintien d'un équilibre entre la prolifération cellulaire et la perte cellulaire ; une inactivation de ses deux allèles conduit à une rupture de cet équilibre en faveur de la prolifération. Il a été cloné en 1991 (68) .C'est un gène situé sur le chromosome 5 (5q21) et constitué de 15 exons. Il code pour une protéine de 312 kDa constituée de 2843 acides aminés. Cette protéine a des domaines de reconnaissance pour la  $\beta$ -caténine et l'axine, et assure à l'état normal un contrôle négatif sur le taux et l'activité de la  $\beta$ -caténine (113).

Dans la voie Wnt, APC participe au mécanisme fondamental de régulation des différents niveaux de  $\beta$ -caténine cellulaire. Il est en effet un composant d'un complexe multiprotéinique centré par l'Axine 1, où il est lié à la  $\beta$ -caténine, la glycogène synthétase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), la caséine kinase Ia (CK Ia), et la protéine phosphatase 2A (PP2A) (54). Ce complexe est stabilisé par la phosphorylation de l'APC et de l'Axine ; à l'intérieur de ce complexe, la GSK3 $\beta$  fonctionne en phosphorylant l'extrémité N-terminale de la  $\beta$ -caténine (dont elle reconnaît un motif situé entre les acides aminés 33 et 45). Une fois phosphorylée, suivant un ordre séquentiel bien défini, la  $\beta$ -caténine est reconnue par le  $\beta$ TrCP pour être ubiquitinée. La dégradation par ubiquitination de la  $\beta$ -caténine a pour fonction la régulation du niveau cellulaire de la protéine. Lorsque du fait de mutations

APC perd son site de liaison à l'Axine, la protéine tronquée qui en résulte va avoir pour conséquence l'altération du complexe multiprotéinique de liaison, et ceci aboutira à la perte de la fonction de régulation de la  $\beta$ -caténine. Or les mutations d'APC intervenant dans cette région du site de liaison avec l'Axine sont de loin les plus fréquentes (96%) (92). Les mutations du couple APC-  $\beta$ -caténine fonctionnent en s'excluant mutuellement : si APC est muté, la  $\beta$ -caténine ne le sera pas.

Dans l'épithélium intestinal normal, le marquage cytoplasmique d'APC est très important dans les cellules post-replicative de la portion supérieure des cryptes, tandis qu'il est pratiquement absent de la région où les cellules se divisent activement. A l'inverse, il existe un gradient du niveau d'expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine, élevé dans le compartiment prolifératif et très abaissé dans les 2/3 supérieurs des cryptes. En remontant le long de l'axe des cryptes, une augmentation de l'expression d'APC contrebalance la signalisation par la  $\beta$ -caténine et permet la différenciation cellulaire. Ainsi, une activation de la voie de signalisation par la  $\beta$ -caténine par une mutation d'APC est tout à fait susceptible d'aboutir à un accroissement du compartiment des cellules souches et à une diminution de la différenciation cellulaire (38).

Les mutations du gène APC ont lieu très tôt dans le développement des CCR. Des études chez l'animal ont montré qu'on peut induire une sorte de micro-poche à la frontière entre la crypte et la villosité, soit par la stabilisation d'une  $\beta$ -caténine tronquée en N-terminal, soit par la perte d'APC ; cette micro-poche va ensuite donner naissance à des polypes, polyclonaux, recouverts d'un épithélium prolifératif ; ceci a pour conséquence une grande augmentation de la surface cryptique, avec probabilité accrue de survenue d'un phénotype tumoral (99). Ainsi, si l'on reprend le schéma de Vogelstein, les mutations d'APC sont présentes dès le passage de l'épithélium normal à un épithélium de type prolifératif, et 4,6% des cryptes aberrantes présenteraient de telles mutations (132). Il n'est donc pas étonnant de trouver en pathologie humaine, dès les plus petits adénomes colorectaux analysés, une inactivation des deux allèles du gène APC (99). On estime que plus de 80% des adénomes sporadiques présentent une mutation du gène APC, taux équivalent à celui qui est rencontré dans les CCR sporadiques. Le gène APC n'intervient pas dans la cancérogénèse colique uniquement par sa participation à la voie Wnt, mais sans doute également par sa participation à différentes voies cellulaires (34). Il participe aux mécanismes d'adhésion des cellules épithéliales par son contrôle de la stabilité et de la

localisation intracellulaire de la  $\beta$ -caténine. En outre, il peut s'associer directement avec les microtubules du squelette par l'implication de son extrémité C-terminale, ce qui est totalement indépendant de ses interactions avec la voie Wnt (133). Il joue un rôle dans la migration cellulaire, elle-même impliquée dans la progression tumorale. Il est impliqué, par son extrémité C-terminale, dans la stabilité chromosomique lors de la mitose. Il remplit deux fonctions à ce niveau : il est responsable de l'attachement du fuseau mitotique aux chromosomes en division au niveau du kinétochore, et de la régulation de la duplication du centrosome par son interaction avec la tubuline et le centrosome (66, 35). La perte de la fonction APC peut donc induire une instabilité chromosomique.

Quelles sont les conséquences sur le colon lui-même d'une mutation du gène APC ? Tout d'abord, ces conséquences sont variables selon la localisation de la mutation : des mutations de type tronquantes à l'extrémité terminale du codon 157 sont associées à une forme atténuée de PAF (137) où les patients présentent un petit nombre seulement de polypes (135), tandis que celles présentes entre les codons 1250 et 1464 sont associées à un plus grand nombre de tumeurs (92). Ensuite, tous les patients porteurs d'une mutation germinale du gène ne développent pas obligatoirement un CCR : ils présentent simplement un risque accru de le développer par rapport à la population témoin : ainsi, alors que les patients atteints de PAF développent un très grand nombre de tumeurs coliques, on considère que parmi toutes les cellules impliquées dans ce processus, seulement  $1/10^5$  donneront naissance à une tumeur maligne. On sait, par les études menées à la fois chez la souris et chez l'homme, qu'une mutation germinale ne suffit pas, mais qu'il faut une seconde mutation du gène sur l'allèle sauvage hérité du parent sain, pour aboutir au CCR (71). Ceci est en accord avec l'hypothèse du « double ciblage » (two-hit) avancée par Knudson pour expliquer le fonctionnement de certains gènes (70).

Enfin, tant que le gène APC joue son rôle de « gardien du génome » les mutations des autres gènes impliqués dans la cancérogénèse colique ne semblent pas suffisantes pour initier le processus. Ceci suggère que dans la cancérogénèse colique, n'intervient pas seulement l'accumulation des mutations, mais aussi leur ordre. On peut cependant conclure schématiquement avec Fodde (34) sur le rôle essentiel du gène APC dans la cancérogénèse colique : son inactivation, responsable de l'activation de la voie Wnt, donne un avantage sélectif aux cellules en agissant sur la prolifération, la migration, l'apoptose et, de façon plus contestée, la différenciation des cellules souches intestinales ; par voie de conséquence, d'autres événements mutationnels synergiques pourront permettre au mutant



APC d'induire une instabilité chromosomique et d'accélérer la progression tumorale au cours de la séquence adénome-carcinome.

### **1.2.1.2. Signalisation Wnt.**

Seulement 80% des CCR présentent des mutations du gène de l'APC ; pour les 20% restants, d'autres altérations des voies de signalisation ont dû être envisagées. C'est ainsi que très vite on a décrit des mutations inactivantes du gène CTNNB1 de la  $\beta$ -caténine dans 12 à 15% des CCR. Ces mutations n'accompagnent pas celles du gène APC puisqu'elles s'excluent mutuellement (114). On a vu comment la  $\beta$ -caténine intervenait en couple avec l'APC au cours de la cancérogénèse colique. En l'absence de mutation de l'APC, il est actuellement acquis qu'elle peut déclencher une voie de signalisation aboutissant à la cancérogénèse colique. Cette voie a d'abord été nommée voie de la  $\beta$ -caténine, puis, avec la mise en place d'autres acteurs de cette signalisation, on l'a intégrée dans la voie canonique de signalisation Wnt, dont elle demeure l'acteur clé. La capacité pour la  $\beta$ -caténine mutée à générer une néoplasie intestinale, a été largement démontrée chez la souris (48, 47). Elle a ensuite été démontrée chez l'homme. Cette capacité à déclencher des tumeurs semble assez particulière à l'intestin et n'est pas vérifiée pour toutes les autres localisations tumorales. Il faut remarquer que, contrairement au gène APC qui demande au minimum deux mutations pour perdre son activité, une seule mutation du gène CTNNB1 est suffisante pour déclencher l'activité de la  $\beta$ -caténine sur la cancérogénèse colique.

#### **a. Rappel sur la $\beta$ -caténine.**

La  $\beta$ -caténine fait partie de la famille des caténines, protéines multifonctionnelles. Les caténines sont chez les mammifères les homologues cytoplasmiques de la famille des protéines armadillo chez la Drosophile, et comptent 4 représentantes,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ , diversement représentées dans l'organisme. Elles sont caractérisées par une série de répétitions incomplètes de 42 acides aminés impliqués dans les interactions protéine-protéine. Comme les autres caténines, la  $\beta$ -caténine, qui est très largement exprimée dans tous les tissus, a plusieurs fonctions (87). Elle est impliquée dans la différenciation cellulaire. Elle joue un rôle clé dans l'adhésion cellulaire et permet la formation du complexe d'adhésion avec la cadhérine, régulé par des phosphorylations. L'implication des altérations de ce complexe a été démontrée dans la transformation et la progression tumorale. Elle est l'acteur clé dans la transduction du signal dans les voies de signalisation Wingless-Wnt, et NOTCH, dont l'identification et l'implication dans la cancérogénèse

colorectale sont récentes, ces deux voies étant mutuellement inhibitrices l'une de l'autre. Ce rôle implique la navette de la  $\beta$ -caténine entre la membrane cytoplasmique, où elle est intégrée dans les tigh-junctions, et le noyau où elle joue le rôle de coactivateur de transcription de TCF. Avec les autres caténines, elle est une protéine structurale composant clé de l'adhésion cellule à cellule dans des complexes moléculaires avec l'E-cadhérine (CAC) : la  $\beta$ -caténine se lie à l'E-cathénine et à l' $\beta$ -caténine, qui à son tour se lie à la vinculine et à d'autres protéines associées à l'actine du cytosquelette. L'association de la  $\beta$ -caténine avec les différents composants moléculaires du CAC est régulée par un réseau complexe de phosphorylation de la tyrosine.

L'organisation moléculaire de la  $\beta$ -caténine reflète ses différentes fonctions, avec des sites de phosphorylation N-terminaux pour la GSK-3 $\beta$  (Glycogène Synthétases Kinase) dont la phosphorylation mène à la dégradation par le compartiment protéasome de l'ubiquitine. Il intervient ensuite un site de liaison pour l' $\beta$ -caténine et un recouvrement des sites d'interaction avec le complexe Axine-APC, le TCF et l'E-cadhérine (27). En plus, il existe un domaine de transactivation dans l'extrémité C-terminale de la molécule. Il y a équilibre dans la cellule entre les quantités de  $\beta$ -caténine affectées à la voie Wnt et celles affectées aux autres fonctions, notamment à l'adhésion cellulaire, tout changement dans l'une des fonctions pouvant retentir sur l'autre fonction.

#### **b. Fonction de transduction du signal par la $\beta$ -caténine.**

Un aspect important de la signalisation par la  $\beta$ -caténine est représenté par son transport de la membrane cytoplasmique, où elle est intégrée dans les tigh junctions, au noyau, où elle se comporte comme un cofacteur transcriptionnel du TCF. Dans la cellule normale au repos, le niveau de  $\beta$ -caténine libre dans le cytoplasme est bas. En effet, la  $\beta$ -caténine cytosolique forme un complexe protéinique avec l'axine et APC ; elle est ensuite rapidement dégradée par le système d'ubiquitylation du protéasome (1). L'absence de phosphorylation de la  $\beta$ -caténine ne permet plus sa participation au complexe multiprotéinique. La  $\beta$ -caténine non phosphorylée, libérée du complexe, s'accumule dans le cytoplasme puis on assiste à sa translocation nucléaire. Dans le noyau, la  $\beta$ -caténine s'associe au facteur de transcription TCF (Pangolin/Tcell factor) pour contrôler les gènes de la prolifération. La protéine GSK3 (Sgg/GSK3) intervient dans cette voie comme un effecteur négatif qui est inhibé dans certaines circonstances (activation de la voie Wnt). En l'absence de signal mitotique, la  $\beta$ -caténine est phosphorylée et immédiatement dégradée dans le cytoplasme par le processus d'ubiquitylation/protéasome 26S\*. C'est par le

processus d'ubiquitylation-protéasome que la  $\beta$ -caténine est éliminée. C'est la liaison des protéines à l'ubiquitine qui les désigne à la dégradation protéolytique par une structure cellulaire complexe, le protéasome. Ce mécanisme permet à la cellule de se débarrasser de protéines dénaturées ou altérées et d'assurer une régulation de certaines protéines comme les cyclines et quelques facteurs de transcription. La liaison de l'ubiquitine avec les protéines fait intervenir trois enzymes. Le protéasome-core 20S, constitué de 14 sous-unités attachées les unes aux autres, qui sont responsables de l'activité protéolytique, lie par ses extrémités un complexe régulateur, le PA700, pour former un protéasome 26S. Les protéines marquées par l'ubiquitine sont reconnues et liées par les sous-unités de la partie régulatrice, puis démasquées par un mécanisme ATP-dépendant, et insérées dans le protéasome-core, où des protéases dégradent les protéines, relarguant d'une part de petits peptides et libérant d'autre part l'ubiquitine intacte. Les niveaux intracellulaires de la  $\beta$ -caténine sont régulés d'une part à travers la voie Wnt par son couplage avec APC dans le complexe multiprotéinique centré par l'Axine, d'autre part, à travers sa participation aux tigh junctions dans un complexe avec l'E-cadhérine et l' $\alpha$ -cadhérine : ce mécanisme permet de détourner constamment une partie de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique vers la membrane plasmique-

### **c. Place de la $\beta$ -caténine dans la voie de signalisation Wnt.**

La balance entre un état phosphorylé qui permet à la molécule d'entrer dans un processus menant à sa dégradation, et un état déphosphorylé où la molécule stable va entrer dans le noyau et agir sur des gènes cibles de la prolifération, est le moteur du rôle de la  $\beta$ -caténine dans la transduction du signal. C'est l'activation de la voie de signalisation Wnt lors du signal mitotique qui va permettre le passage de la  $\beta$ -caténine de son état phosphorylé inactif à l'état déphosphorylé stable, actif.

### **1.2.2. Signalisation Wnt et cancérogénèse colique.**

La famille du gène Wnt comprend de nombreux membres, qui sont des protéines sécrétées intervenant dans des voies de signalisation intracellulaire bien définies actuellement. Le premier acteur défini, le gène Wnt1 (Wingless-Type MMTV integration site family member) a été identifié au site d'intégration du virus rétroviral MMTV dans des tumeurs mammaires de souris (94). Il comprend 4 régions codantes encadrant 3 introns ; il est localisé sur la région q13 du chromosome 12 . A l'heure actuelle, plus d'une dizaine de gènes Wnt ont été identifiés. Les protéines de la famille Wnt/Wingless (Wg) sont chez les

mammifères les analogues de la famille Hedgehog chez la drosophile. Elles sont conservées tout au long de l'évolution (22). Elles sont responsables de l'induction et de l'organisation de nombreux tissus au cours de l'embryogénèse. L'activation de leur voie de signalisation qui intervient lors d'un signal mitotique, débute par la fixation des protéines Wnt sur le récepteur à 7 domaines transmembranaires Frizzled (Fzd), ce qui provoque l'activation de complexes cytoplasmiques multiprotéiques.

On a recensé aujourd'hui plus d'une centaine de gènes intervenant dans la transmission du signal véhiculé par les voies Wnt. De l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, interviennent :

- des ligands : les ligands Wnt, les protéines régulatrices WISP (Wnt-induced secreted proteins), des antagonistes de fixation de Wnt sur les Fzd comme les SFRP (Secreted Frizzled-Related Proteins),
- des récepteurs : les récepteurs à 7 domaines transmembranaires Fzd et les co-récepteurs LRP5/6 ( LDL-Related Proteins) sur lesquels peuvent se fixer d'autres intermédiaires du signal ( par exemple, l'axine ou Dkk qui est un inhibiteur du signal) ;
- des relayeurs intracellulaires dont le principal est la  $\beta$ -caténine, mais également le régulateur Dishevelled (Dsh) et le suppresseur de tumeur APC ;
- des régulateurs post-traductionnels : la phosphatase PP2A, des kinases comme la GSK3, des protéines du complexe d'ubiquitination/dégradation comme la  $\beta$ -TrCP qui intervient dans la dégradation de la  $\beta$ -caténine ;
- des facteurs de transcription : principalement le complexe TCF/LEF mais aussi Fos, Jun, Myc.

### **1.2.3. Activation de la voie canonique Wnt** (figure 21).

La voie principale, ou voie canonique, par laquelle Wnt agit, utilise la  $\beta$ -caténine comme relayeur du signal. Mais il peut agir en utilisant d'autres relayeurs du signal, comme la protéine Dvl ( Dishevelled) ou des protéines GTPases monomériques dans une voie dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces voies sont des voies non canoniques.

La signalisation Wnt s'oppose à la phosphorylation et à la fixation de la  $\beta$ -caténine sur le complexe APC-GSK3 $\beta$  qui est de ce fait inactivé : il s'ensuit une activation des facteurs de transcription, l'inhibition de l'E-cadhérine, l'activation du gène c-myc et la prolifération.

En l'absence de la signalisation Wnt, la complexification APC- $\beta$ -caténine mène à la dégradation de la  $\beta$ -caténine. La voie Wnt peut être activée soit par mutation de la  $\beta$ -caténine soit par mutation de l'APC, soit encore par mutation de l'Axine. Dans tous ces cas, les mutations aboutissent à un défaut de phosphorylation de la  $\beta$ -caténine, qui ne peut plus être reconnue. En particulier, les mutations du gène de la  $\beta$ -caténine sont fréquemment retrouvées dans les cancers. La plupart des mutations rapportées intéressent l'exon 3 et sont responsables de la perte de la reconnaissance de la protéine par GSK3 $\beta$ . La  $\beta$ -caténine ainsi produite est active mais ne peut plus subir sa dégradation normale. Pour être reconnue, la  $\beta$ -caténine doit être phosphorylée ; cette phosphorylation intéresse un gros complexe multiprotéinique et est séquentielle : elle doit commencer par les résidus sérine 45, puis thréonine 41, sérine 37, sérine 33. La protéine phosphorylée est alors reconnue par le  $\beta$ TrCP et poly-ubiquinylée. Cette reconnaissance ne peut avoir lieu en cas de non phosphorylation d'un de ces résidus. En cas de mutation de l'APC ou de l'Axine, le défaut de phosphorylation de la  $\beta$ -caténine provient de la déstabilisation du complexe multiprotéique.

Les processus d'activation de la voie Wnt sont initiés par l'interaction des ligands Wnt avec les récepteurs Frizzled. Pour la voie canonique Wnt (relayée par la  $\beta$ -caténine), cette interaction doit survenir en présence des LRP5/6, le complexe trimoléculaire Wnt-Frizzled-LRP5/6 va alors recruter à la membrane la protéine cytoplasmique Dishevelled qui phosphorylée va se complexer avec Frat1 et GSK3 $\beta$ , ce complexe servant à inhiber l'activité de GSK3 $\beta$  ; un autre rôle du complexe trimoléculaire est de bloquer le complexe coiffé par l'Axine et de faciliter la dégradation de l'Axine. La  $\beta$ -caténine est alors libérée dans le cytoplasme où, n'étant pas phosphorylée, elle n'est plus éliminée par la voie de l'ubiquitinylation. Elle peut alors se transloquer au noyau, où elle intervient dans la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Dans le noyau elle doit se lier avec les membres de la famille LEF/TCF du groupe des protéines de haute mobilité (HMG). Les 4 protéines de cette famille (LEF1, TCF1, TCF3, TCF4) fournissent à l'ADN un domaine de liaison pour la  $\beta$ -caténine (162). Au total, l'activation de la voie de signalisation Wnt conduit à un défaut de phosphorylation de la  $\beta$ -caténine.

#### **1.2.4. Les gènes cibles de la $\beta$ -caténine dans la voie Wnt.**

Les premiers gènes identifiés comme cibles de la transduction du signal ont été C-myc et la cycline D1 ; ils sont directement impliqués dans la tumorigénèse de par leurs effets sur la prolifération cellulaire, l'apoptose et la progression du cycle cellulaire (136). D'autres

cibles de la voie Wnt ont été identifiées, certains gènes étant également des facteurs de transcription (c-Jun, Sox-9), d'autres, comme la matrilysine (3, 155), le PPAR $\gamma$  (57), le CD44, le récepteur de l'activateur de l'UTP, semblant plus impliqués dans la promotion tumorale que dans l'initiation. Ces gènes à leur tour vont altérer l'expression de leurs propres cibles.

### **1.2.5. Autres processus d'activation de la voie Wnt.**

Un autre mécanisme d'activation de la voie de signalisation Wnt est assuré par le contrôle du niveau de  $\beta$ -caténine cytoplasmique par l'intégration à la membrane plasmique du complexe  $\beta$ -caténine-cadhérines. La voie de signalisation des intégrines peut également activer la voie Wnt, ou en faciliter les effets, en favorisant la localisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine, à travers ses kinases.

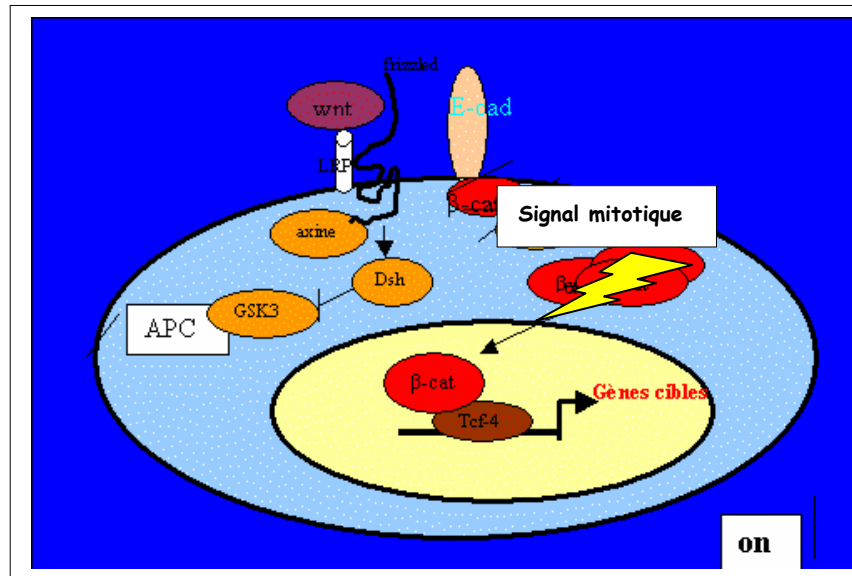
### **1.2.6. Quelques inhibiteurs de la voie Wnt.**

Outre deux mécanismes d'inhibition déjà vus (translocation constante de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique vers la membrane pour sa participation aux tigh-junctions, rôle de la protéine GSK3 qui est un effecteur négatif inhibé quand la voie Wnt est activée), la voie Wnt peut être inhibée, entre autres, par la signalisation via BMPR1A, qui code pour le récepteur de BMP (Bone Morphogenic Protein), un membre de la famille du TGF $\beta$ . BMPR1A agit ainsi comme un régulateur de l'entrée en cycle des cellules souches dans le fond des cryptes

### **1.2.7 Au total, on peut résumer ainsi le rôle de la $\beta$ -caténine dans la voie Wnt et la cancérogénèse colique :**

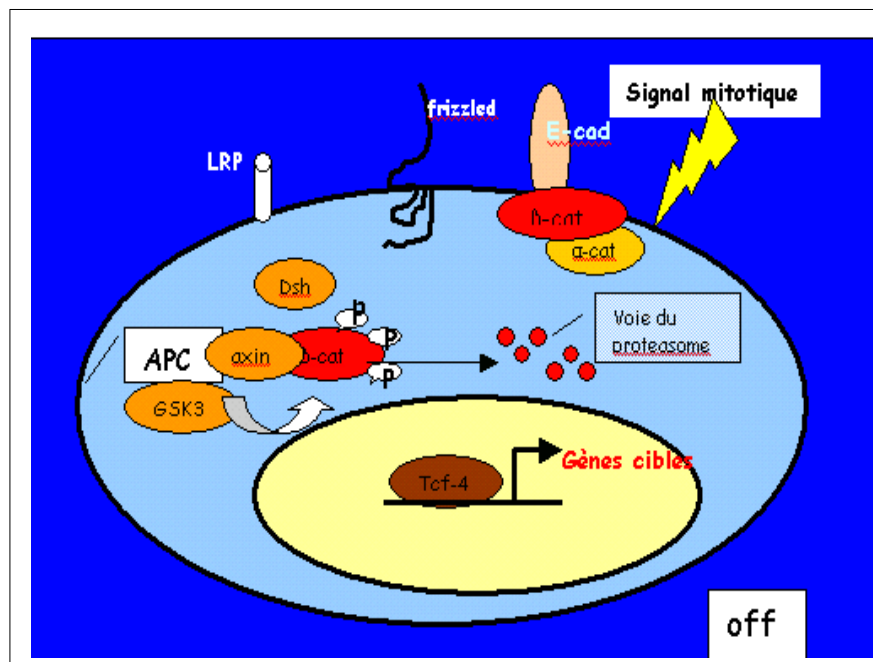
l'absence de régulation de la  $\beta$ -caténine par l'APC confère aux cellules intestinales un avantage sélectif qui permet leur expansion clonale. A ce stade, l'instabilité chromosomique des mutants APC est latente du fait des différents points de contrôle du cycle cellulaire. L'activation précoce de K-ras et de c-myc va agir en synergie avec APC pour promouvoir cette instabilité sur les chromosomes 17p et 18q D'autres oncogènes vont à leur tour agir en synergie avec les précédents pour conduire à la transformation maligne et aux métastases.

La figure 21 schématise la voie Wnt :



**Figure 21a : voie Wnt, état on, activée.**

Après avoir reçu le signal mitotique, la  $\beta$ -caténine quitte la membrane, s'accumule dans le cytoplasme puis dans le noyau où elle participe à l'activation des gènes cibles.



**Figure 21b : voie Wnt, état off, non activée.**

Lorsque la  $\beta$ -caténine quitte la membrane où elle est liée à l'E-cadhérine, elle est dégradée dans le cytoplasme par la voie du protéasome.

### **1.3. Mise en jeu de la voie de signalisation Wnt.**

#### **1.3.1. Critique du modèle des voies classiques de la cancérogénèse colorectale.**

Plusieurs travaux récents remettent cependant en cause la généralisation à tous les CCR du modèle classique de la cancérogénèse par étapes séquentielles à partir de mutations géniques spécifiques, tel qu'il a été développé par Vogelstein. On constate en effet dans les séries étudiées chez l'homme, la rareté des mutations des gènes incriminés, et plus encore la très grande rareté de leurs mutations simultanées, qui serait pour certains plutôt due au hasard qu'à une synergie menant à une voie bien spécifique (4, 133). Ainsi, d'une part les mutations du gène APC sont rarement retrouvées chez les patients atteints de colite ulcéreuse (moins de 10% des patients), et chez ces derniers les fréquentes mutations de p53 menant à une perte du contrôle apoptotique du cycle cellulaire pourraient expliquer le risque accru de cancer (19). D'autre part, de nombreux cancers n'ont pas perdu la fonctionnalité du gène APC : les modifications architecturales dues à la protéine APC dans les cryptes aberrantes ne seraient donc pas absolument nécessaires au passage à la dysplasie. Dans cette hypothèse, des mutations des gènes K-ras, p53 ou d'autres gènes encore pourraient mener de façon indépendante de l'adénome au cancer (133). On peut donc considérer que les altérations du gène APC ne sont pas obligatoires pour l'initiation de la cancérogénèse colique, dans la majorité des cas.

Par ailleurs, les lésions récentes de la PAF, comme les adénomes, comportent toujours des lésions du gène APC, soit par mutation somatique soit par perte de l'hétérozygotie au chromosome 5q. Au contraire, les adénomes sporadiques en comportent très peu au début. Dans les cas de lésions sporadiques, la fréquence des altérations du gène APC augmente selon le degré de dysplasie et l'apparition d'une architecture villose : pratiquement pas de mutations dans les lésions d'ACF, 7% dans les adénomes tubuleux plans, 36% dans les polypoïdes, mais 77% dans les adénomes vilieux). Ces altérations sont également fonction de la taille de la lésion. Ceci tendrait à prouver que dans ces cas de cancers sporadiques, le gène APC est davantage impliqué dans la progression tumorale que dans l'initiation (60, 164).



Un mécanisme alternatif pour inactiver APC pourrait être fourni par la méthylation du promoteur (63), mais on ne la trouve que dans 18% environ des cancers sporadiques y compris dans ceux qui ont une mutation APC (42).

Vu l'importance de la  $\beta$ -caténine dans la voie Wnt, immédiatement en aval d'APC, on pourrait penser que l'inactivation de la  $\beta$ -caténine serait susceptible de remplacer celle d'APC dans les cancers qui ont gardé la fonctionnalité d'APC. Ces cancers ont en fait peu de mutations de la  $\beta$ -caténine, qui n'est fréquemment mutée que dans les cancers survenant sur des lésions d'HNPCC. Des mutations de l'AXIN2 pourraient alors être un mécanisme de remplacement.

### **1.3.2 Mécanismes généraux de mise en jeu de la voie de signalisation Wnt.**

#### **3.2.1 Conceptions actuelles sur le modèle de cancérogénèse proposé par Kinzler et Vogelstein**

Dans ce modèle, deux grands groupes de gènes dominant par leur implication dans les mécanismes causals :

- gènes «caretaker» ou de maintenance de l'intégrité du génome : ce sont essentiellement les gènes de réparation ;
- gènes «gatekeeper» ou gardes-barrières, qui sont essentiellement représentés par les gènes suppresseurs de tumeur et les gènes pro-apoptotiques.

Selon ce modèle, l'inactivation d'un gène de maintenance induit une instabilité génomique qui favorise l'apparition de mutations dans tous les gènes ; si un gène garde-barrière est inactivé par une de ces mutations, la prolifération cellulaire s'emballe et l'instabilité génétique s'accroît, avec l'apparition de nouvelles mutations.

En cas de prédisposition génétique, lorsqu'un allèle de gène de maintenance est muté de façon héréditaire, la survenue d'une mutation sur l'allèle normal l'inactive, et il peut y avoir inactivation du gène garde-barrière si ce dernier subit une mutation sur chacun de ses deux allèles. La cancérogénèse aura alors débuté par le moyen de trois mutations. Dans le cas de cancers sporadiques, le gène de maintenance n'étant pas muté au départ, il faudra deux mutations sur ce gène de maintenance (une sur chaque allèle normal) puis encore deux mutations sur le gène garde-barrière, soit un total de quatre mutations, pour aboutir au même résultat. Chez les individus porteurs d'une mutation héritée d'un gène garde-barrière, une mutation sur l'allèle normal suffit à déréguler le système.

On considère à l'heure actuelle, selon ce modèle, que l'initiation de la cancérogénèse colorectale implique :

**a. dans la grande majorité des cas, des mutations du gène APC, selon deux modalités :**

α- Implication directe de mutations de l'APC (5q21-q22):

- dans les adénomes précoces, et dans 75% des cancers sporadiques, les mutations du gène APC aboutissent soit à une protéine tronquée, soit à une perte d'allèles ;
- dans le cas de la PAF, les mutations du gène APC sont héritées.

Le produit altéré du gène ne fonctionnera plus comme suppresseur de tumeur dans ses différentes actions (signalisation intracellulaire, interactions avec le cytosquelette, contrôle de la prolifération cellulaire).

β- Mécanisme indirect de mutation du gène de l'APC, par altération de gènes de réparation de l'ADN (Mismatch Repair, MMR). Lors d'altérations d'un gène de réparation de l'ADN (Mismatch Repair, MMR) il y a en effet augmentation générale du taux de mutations, et le gène de l'APC subit alors souvent une mutation. Ce sont ces altérations d'un gène du MMR qui sont l'événement causal de la cancérogénèse. Les conséquences sont les mêmes que dans le schéma précédent. Ce mécanisme par altération d'un gène du MMR intervient :

- dans les CCR Non Polypoïdes Héritaires (HNPCC) sur les cellules germinales ;
- dans certains cas de cancers sporadiques, sur les cellules somatiques, après mutation de l'APC (mais il a alors un rôle dans la progression et non pas directement dans l'initiation du processus).

Les gènes du MMR les plus souvent en cause sont : MSH2 sur le chromosome 2p, MLH1 (3p) et MSH6 (2p16). La conséquence de ces mutations est l'installation d'un phénotype MSI (Microsatellite Instability), une forme d'erreur de réplication (RER). Son mode d'action passe par l'augmentation du taux de mutations.

**b. L'implication d'autres gènes initiateurs a pu être montrée :**

- dans le syndrome de Peutz-Jeghers : le gène muté est LKB1 ;
- dans la polypose Juvénile, implication de mutations de SMAD4 ;
- dans le syndrome de Cowden (séquence hamartome-cancer), implication de mutations de PTEN.

**c. Les CCR sur colite ulcéreuse semblent représenter des cas particuliers :**

- ils comportent peu de mutations APC ;
- ils ne passent pas par la séquence adénome-cancer ;

- le gène APC ne joue pas de rôle initiateur ;

La progression vers la malignité , le pouvoir d’envahissement et de métastases, impliquent la mise en jeu d’autres voies de signalisation (K-ras, p53).

### **3.2.2. Les deux grands phénotypes de cancers coliques.**

Lorsqu’on étudie la fréquence des mutations dans les cancers coliques, on se trouve face à deux grands tableaux. D’un côté, dans 85% des CCR sporadiques et chez les patients porteurs de PAF, on observe avec une grande fréquence des pertes alléliques, essentiellement sur les chromosomes 17p, 18q, 5q, 8p, 22q, ainsi que des mutations fréquentes des gènes p53, APC et K-ras ; ces tumeurs sont hyperploïdes . De l’autre côté, 50% des HNPCC et 15% des CCR sporadiques ne présentent pas de pertes alléliques et pas ou peu de mutations des gènes APC et p53. Chez ces patients par contre, on trouve avec une grande fréquence des mutations d’autres gènes comme BRAF, ou des récepteurs du TGFβII, de BAX, du TCF4, de la caspase 5, et surtout l’altération de certains gènes qui ont pour fonction de reconnaître des appariements incorrects dans l’ADN (gènes du Mismatch Repair, ou de Réparation de l’ADN) : hMSH2, hMLH1, hMSH6, hMSH3 (23). Les tumeurs de ces patients sont diploïdes. Le phénotype « methylator » (CIMP+) y est fréquent : îlots CpG dans les régions promoteurs des gènes, avec pour conséquence inactivation épigénétique par méthylation du DNA. En dehors de hMLH1 et similaires, peuvent être méthylés : ER, p16, p14, HPP1/TPEF, MGMT, THBS1 (thrombospondine 1), APC, COX-2, CDH1, E-cadhérine, RIZ1 (interagissant avec Rb), RASSF1A.

L’identification de ces deux grands groupes de patients a permis la distinction de deux phénotypes pour les CCR, à l’origine de deux mécanismes dans la pathogénie de l’affection (80,88). Le premier phénotype, lié aux fréquentes mutations APC, p53 et K-ras, aux délétions chromosomiques et à la diploïdie des tumeurs, définit l’instabilité chromosomique (LOH) que l’on retrouve dans 85% des CCR sporadiques et dans la PAF (51). Le second phénotype comporte des altérations des gènes du mismatch repair mais pas de pertes alléliques ni de mutations APC et p53, et s’accompagne d’une hyperploïdie tumorale (30) ; il définit l’instabilité microsatellitaire (MIN)<sup>1</sup>, retrouvée dans 15% des CCR sporadiques et dans 95% des HNPCC.

---

<sup>1</sup> Les microsatellites sont des séquences de quelques nucléotides répétés en tandem et répartis de façon ubiquitaire au niveau du génome. Ces séquences répétitives dans les régions codantes sont génétiquement instables ou susceptibles d’être copiées incorrectement pendant la phase de synthèse de l’ADN, avec mise en jeu normalement du système de réparation de l’ADN et des gènes MMR. Une inactivation somatique bi-allélique (dans les cas sporadiques) ou constitutionnelle par mutation terminale d’un allèle et inactivation

La présence de mutations germinales de gènes MMR est désormais bien documentée dans les CCR héréditaires type HNPCC. Les individus développant ces tumeurs sont hétérozygotes pour un gène MMR, une mutation étant héritée, tandis que l'allèle normal va être inactivé par délétion, méthylation ou mutation ponctuelle, à un stade précoce du processus dysplasique, alors que le tissu adjacent conservera cet allèle normal. Les gènes MMR mutés sont principalement hMLH1, hMSH2, hMSH6, hMSH3, hPMS2 ; cependant, la description de familles HNPCC où aucune mutation germinale n'a été trouvée dans les régions codantes de ces gènes parle peut-être en faveur de l'implication possible d'autres gènes. Le phénotype associé aux altérations des gènes MMR est le phénotype MSI (MicroSatellite Instability) par opposition au phénotype MSS (MicroSatellite Stability).

Quelle est la place des phénotypes LOH et MSI dans la mise en jeu des voies de signalisation impliquées dans la cancérogénèse colique ? Les voies de signalisation impliquées dans la cancérogénèse colique (la voie Wnt, la voie de K-ras, la voie du TGFβ, la voie de p53) sont les mêmes dans les deux types tumoraux. Cependant, les gènes impliqués dans ces voies diffèrent selon le phénotype de la tumeur. En particulier la voie Wnt est altérée du fait d'une mutation du gène APC dans les cancers LOH ; elle est affectée par une mutation stabilisatrice de la β-caténine dans les cancers MSI(+).

Le tableau 2 résume les deux grands phénotypes de cancer colique quant aux mécanismes moléculaires mis en jeu :

**Tableau 2 : les deux grands phénotypes de CCR. (d'après Laurent-Puig) (79).**

<i>Tumeur LOH (85%)</i>	<i>Tumeur MSI+ (15%)</i>
<i>INSTABILITE CHROMOSOMIQUE</i>	<i>INSTABILITE GENETIQUE</i>
<i>Hyperploïdie</i>	<i>Diploïdie</i>
<i>Pertes alléliques (17p,18q,5q,8p 22q)</i>	<i>Pas de perte allélique sur 17p,18q,5q</i>
<i>Mutations fréquentes des gènes p53 et APC</i>	<i>Mutations rares des gènes p53 et APC</i>
<i>Mutations de l'oncogène K-RAS2 (40%)</i>	<i>Mutations du gène BRAF</i>
	<i>Mutations de récepteur TGFβII, BAX, TCF4, caspase 5</i>
<i>Mise en jeu voie Wnt : par mutation gène APC</i>	<i>Altérations des gènes hMSH2, hMLH1, hMSH6, hMSH3</i>
	<i>Mise en jeu voie Wnt : par mutation β-caténine</i>

*surajoutée de l'autre allèle, intéressant des gènes MMR du DNA Mismatch serait dûe aux mutations de type insertion-délétion au niveau des séquences microsatellites*

Ces deux types se distribuent suivant des localisations privilégiées dans le colon. Le colon gauche comporte 40% de tumeurs MSI, 30% de tumeurs LOH+, 30% de tumeurs MSS/LOH-. Le colon droit compte 90% de tumeurs LOH+, 5% de tumeurs MSI+, 5% de tumeurs MSS/LOH-.

### **3.2.3. Mécanismes d'inactivation génique par hyperméthylation .**

Une autre modalité d'inactivation du gène APC est sa méthylation (62, 155). Alors que la cancérogénèse s'accompagne généralement d'hypométhylation, on décrit à l'origine d'une inactivation génique un mécanisme épigénétique d'hyperméthylation, présentés par des tumeurs se répartissant sur les deux colons.(161, 63). Chez les mammifères, la méthylation des îlots CpG<sup>1</sup> chevauchant des séquences régulatrices en 5' des gènes conduit à l'inactivation transcriptionnelle des gènes qui en sont le siège. Dans les conditions normales, elle intervient au cours de deux phénomènes essentiels, l'inactivation du chromosome X et le phénomène d'empreinte parentale qui joue un rôle important dans le développement au cours de la vie embryonnaire. Le phénotype qui en découle est appelé « Méthylateur d'Ilot CpG » (CIMP)

Le lien entre la méthylation et certains cancers se manifeste principalement à deux niveaux. L'inactivation par méthylation de gènes suppresseurs de tumeurs est amplement démontrée.

Dans les CCR, un premier type d'instabilité génomique touche 15% des tumeurs et est trouvé dans des cellules MMR et MET+ ; le deuxième type apparaît dans des cellules MMR+, est constitué par des pertes et gains de matériel chromosomique et implique des anomalies de méthylation (23, 30).

---

<sup>1</sup> Les îlots CpG sont constitués par des agrégats dans des sites de séquence cytosine-guanine dinucléotide dans les régions des promoteurs.

## **2. CARACTERISATION MOLECULAIRE DES GRANDS SYNDROMES CLINIQUES.**

### **2.1. La PAF.**

De transmission autosomique dominante, elle représente 13% des CCR,. Une mutation du gène APC est héritée, l'autre est une mutation somatique de l'allèle sauvage APC du parent non affecté. Seule une petite proportion des adénomes se cancérisent.

### **2.2. Les syndromes HNPCC.**

Ils représentent 2 à 4% des CCR. Le ratio adénome/cancer est proche de 1 ; la progression tumorale est accélérée par les désordres des gènes du DNA Mismatch Repair (MMR) ; une mutation hMLH1 ou hMSH2 est le plus souvent en cause. Le phénotype est de type MSI.

### **2.3. Les CCR sporadiques.**

Ils constituent plus de 80% des CCR. On y détecte des altérations génétiques comparables à celles décrites dans les formes congénitales. Beaucoup de cancers de phénotype « mutator » (MSI) ne sont pas héréditaires mais résultent d'une inactivation somatique d'un gène MMR. (15% de ces CCR sporadiques sont de phénotype MSI ). Le gène le plus souvent impliqué est hMLH1. Le plus souvent, on ne trouve dans ces cancers pas d'anomalie de la  $\beta$ -caténine ni de p53. Le mécanisme d'inactivation invoqué est une hyperméthylation de la région promoteur du gène.

### **III. ASPECTS DYNAMIQUES DE LA SEQUENCE HYPERPLASIE - ADENOME – CANCER.**

---

On vient de voir que les aspects moléculaires qui accompagnent les modifications architecturales de la séquence menant de l'hyperplasie au cancer, font depuis déjà un certain temps l'objet de travaux abondants.

Ils sont à l'origine d'une avancée décisive dans la compréhension des mécanismes biologiques de la cancérogénèse dans son ensemble.

Par contraste, les aspects dynamiques de ces bouleversements ne commencent à être envisagés que depuis peu. On comprend donc que les publications encore assez peu nombreuses sur le sujet aient abouti à des conclusions parfois contradictoires.

Les aspects dynamique de la séquence muqueuse normale- hyperplasie- adénome- cancer nous paraissent cependant essentiels à la compréhension de l'histogénèse des lésions coliques précancéreuses et cancéreuses.

# **1. HISTOGENESE DES LESIONS DANS LA SEQUENCE HYPERPLASIE-ADENOME-CANCER.**

A partir de la séquence hyperplasie-adénome-cancer, on peut envisager l'histogénèse des lésions précancéreuses et cancéreuses coliques en rapport avec la mise en jeu de la voie de signalisation Wnt (100).

## **1.1. Histogénèse des lésions.**

### **1.1.1. Foyers de Cryptes Aberrantes (ACF).**

On considère ces lésions épithéliales microscopiques comme les plus petites lésions individualisables dans le colon précancéreux (98). Elles sont dysplasiques dans 5% des cas (micro-adénomes) (112). Dans les PAF, elles sont accompagnées par des mutations APC, par lesquelles on admet qu'elles seraient initiées ; en dehors des PAF, on a fait jouer le rôle d'initiateur aux mutations de la  $\beta$ -caténine. Ces deux lésions ne sont pas toujours retrouvées, mais on note la grande fréquence des altérations de l'expression de la  $\beta$ -caténine. Elles évoluent en adénomes.

Lorsqu'elles ne sont pas dysplasiques, on parle de polypes hyperplasiques. Ils seraient initiés souvent mais non toujours par une mutation de K-ras et pourraient progresser de l'ACF à la transformation adénomateuse.

Cependant, il existe une grande hétérogénéité moléculaire dans ces lésions. Ainsi, à côté de ces voies classiques, les phénomènes d'inactivation génique par méthylation du promoteur semblent très importants pour le passage des ACF vers les stades ultérieurs de la cancérogénèse ; on trouve en effet des sous-groupes caractérisés par la méthylation de hMLH1, avec ou sans perte de fonction du gène MGMT (25) avec ou sans mutation de K-ras.

### **1.1.2. De la Crypte Aberrante à l'adénome et au polype hyperplasique : le modèle des lésions de PAF.**

Si on considère que la crypte aberrante est la première lésion identifiable lors de la cancérogénèse colorectale, comment se fait le passage de la muqueuse normale à la crypte aberrante et à l'adénome ? Des travaux récents (17) menés dans des adénomes de PAF, ont



montré que des cellules possédant des marqueurs communs à ceux des cellules souches intestinales du fond des cryptes<sup>1</sup>, connaissent une prolifération et une expansion particulièrement considérables, qui les conduisent vers la surface des cryptes<sup>2</sup>; parallèlement, les cellules qui expriment des marqueurs spécifiques de la surface des cryptes<sup>3</sup> se déplacent vers le bas des cryptes sans que leur nombre augmente. Ce phénomène d'expansion des cellules de la base des cryptes, et donc, des cellules souches se ferait sous l'effet de mutations APC (15). Ce serait donc cette surpopulation de cellules souches qui serait à l'origine du déplacement des cellules proliférantes de la base des cryptes vers la superficie (77). Ainsi, à la base de la formation de l'adénome et du polype, il y aurait non seulement des modifications dans le compartiment de prolifération, mais également un accroissement de la proportion de certains types cellulaires, notamment ceux qui ont le phénotype des cellules de la base des cryptes. Un argument en faveur du rôle régulateur de l'APC sur la population épithéliale est l'existence d'un gradient décroissant de sa concentration de l'épithélium de surface vers le fond de la crypte. L'expansion des cellules prolifératives qui auraient migré vers la surface peut donc être limitée.

Ceci est en accord avec la présence maintenant bien documentée de cellules prolifératives tout le long de la crypte dans les adénomes, y compris dans la région supérieure de la crypte et dans l'épithélium de revêtement (105, 108). Quels seraient les mécanismes moléculaires à l'origine de cette prolifération particulière ? Si l'on admet avec les auteurs que le gène APC non muté régule le nombre des cryptes du colon, il pourrait le faire par la voie  $\beta$ -caténine/Tcf4. Il participe en effet au complexe qui dégrade la  $\beta$ -caténine. Or, on a vu qu'en l'absence de dégradation, la  $\beta$ -caténine s'accumule dans le cytoplasme, puis va dans le noyau, où elle va stimuler la prolifération par son actions sur ses gènes cibles, parmi lesquels la Cycline D1, c-myc et la survivin. Lorsque des mutations sur le gène APC l'empêchent de jouer son rôle, il n'y a plus dégradation de la  $\beta$ -caténine. Un autre mécanisme de contrôle de la prolifération au travers du rôle de l'APC sur la régulation de la  $\beta$ -caténine pourrait faire intervenir la survivin, molécule anti-apoptotique cible de la  $\beta$ -caténine. A l'état normal, la survivin se trouve exprimée dans la partie basse des cryptes, permettant l'accroissement de la population de cette partie basse tandis que les cellules des zones plus élevées qui ne sont plus sous l'influence de la survivin subissent l'apoptose; en cas de mutation du gène APC la régulation de la population cellulaire n'a pas lieu, et

---

<sup>1</sup> Dans le travail cité : MSH2, Bcl-2, survivin..

<sup>2</sup> Il y aurait donc accroissement de la population proliférative, et son expansion la mènerait dans la partie supérieure des cryptes, puis en surface dans l'épithélium de revêtement.

<sup>3</sup> Dans le travail cité : p27<sup>kip1</sup>

parallèlement on observe la présence de survivin dans la partie moyenne des cryptes (c'est ce qu'on trouve dans des cryptes de PAF et dans les cryptes des adénomes, où la survivin est même exprimée particulièrement abondamment en surface).

Mais d'autres facteurs peuvent jouer un rôle important dans la migration cellulaire et la régulation de la population. Il a ainsi été observé (128) que l'expression de p27<sup>kip1</sup> est importante dans la partie supérieure des cryptes dans l'épithélium normal, mais se déplace dans la partie basse des cryptes dans les adénomes. De même l'expression du TGF- $\beta$  est importante en haut des cryptes de la muqueuse normale et se déplace vers le bas dans les adénomes. On peut en inférer que dans les adénomes les cellules migrent vers la base des cryptes, tandis que dans la crypte normale elles migrent vers la surface. Ceci suggère aux auteurs l'importance du rôle régulateur de p27<sup>kip1</sup> et du TGF- $\beta$  non mutés dans le cycle cellulaire où ils inhibent la progression de G1 à S (16). Ceci suggère également la possibilité que le TGF- $\beta$  ralentisse le taux de prolifération des cellules dans la partie basse des cryptes. Cependant ce type de croissance est controversé. En effet, si l'on s'en réfère à ces observations, on explique mal la présence de cellules apoptotiques dans le fond des cryptes normales, et le sens de la différenciation cellulaire le long des cryptes, qui se fait vers le haut.

### **1.1.3. De la prolifération cellulaire à la formation des adénomes et des polypes hyperplasiques : fission et bourgeonnement.**

On vient de voir que l'anomalie majeure au début de la cancérogénèse rectocolique réside dans le développement excessif de la population des cellules des cryptes. A la fois dans des lésions prénéoplasiques de PAF chez l'homme et dans des lésions de néoplasie intestinale multiple (MIN) chez la souris porteuse de mutations APC, il a été montré qu'il en résulte un taux élevé de fission des cryptes (16, 154). Le processus débute par une bifurcation à la base de la crypte (159), qui est suivie par une division longitudinale de la crypte. Dans la PAF comme dans la MIN, ce processus de fission est accru aussi bien dans les cryptes normales que dans les cryptes aberrantes. Le processus est particulièrement important dans l'intestin néonatal chez l'animal, où il aboutit à l'accroissement du nombre des cryptes et permet la formation de cryptes secondaires totalement mutées à partir de cryptes partiellement mutées<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> après injection de carcinogènes (94)

## **1.2. Quelques points singuliers dans la séquence hyperplasie-adénome-cancer de certaines lésions.**

C'est à partir de l'étude des polypes que la séquence hyperplasie – adénome – cancer avec les mutations correspondantes, a été établie par Vogelstein. De façon générale, dans le modèle séquentiel qui mène de l'épithélium normal à l'hyperplasie, à la dysplasie puis à la dysplasie de haut grade et à l'état précancéreux, on considère actuellement que les mutations de la voie APC/ $\beta$ -caténine, à l'origine de la séquence, peuvent être remplacées par l'intervention d'autres protéines Wnt ; les mutations K-ras sont impliquées au stade de l'adénome. Les mutations p53 sont un événement tardif.

Les lésions non polypoïdes décrivent la même séquence adénome-cancer en passant par des stades précurseurs, mais ne semblent pas déterminées par les mêmes mutations : ainsi, la mutation K-ras, précoce dans les lésions polypoïdes, ne se rencontre pas dans les lésions planes, alors qu'inversement la mutation p53 y semble précoce.

Sur la base de ces données, on en est arrivé à la conception prônée par l'école japonaise, de deux voies que nous appellerons morphogénétiques, de la cancérogénèse colorectale (118). On décrira ici quelques mécanismes biologiques de la séquence hyperplasie-dysplasie-cancer particuliers à certains types de lésions.

### **1.2.1. Adénomes « en dents de scie » (serrated adenomas).**

La formation de ces lésions précurseurs du cancer fait intervenir deux étapes : une inhibition de l'apoptose, puis une altération du mécanisme de DNA repair. D'où le spectre évolutif suivant : ACF non dysplasique-polype hyperplasique- polype mixte- adénome en dents de scie.

Dans leur mécanisme de survenue on privilégie actuellement un mécanisme par méthylation des promoteurs avec inactivation épigénique des gènes, analogue à celui observé dans les ACF, dont ils seraient donc directement issus (49) Des associations entre la méthylation de MGMT et les mutations ras, ont été observées (117).

### **1.2.2. De l'adénome « en dents de scie » au CCR MSI-H.**

Cette séquence a pu être retrouvée essentiellement dans les CCR sporadiques, de phénotype MSI, avec perte d'expression de hMLH1, ou méthylation de hMLH1, ou mutation de TGF $\beta$ RII, IGFR2R, BAX.

Cette séquence est évoquée sur les faits suivants :

- démonstration dans des polypes hyperplasiques de sous-clones dysplasiques avec le profil MSI-H ;
- fréquence accrue de polypes hyperplasiques dans les CCR MSI-H ;
- phénotypes mucineux similaires ;
- les adénomes traditionnels n'ont pas le profil MSI-H ;
- on ne trouve pas le spectre mutationnel classique dans les CCR MSI-H.

### **1.2.3. De l'adénome « en dents de scie » au CCR MSI-L.**

On peut trouver, dans l'adénome « en dents de scie », comme on les trouve dans le CCR MSI-L, des altérations sur le chromosome 1p, une grande fréquence de mutations du gène K-ras, une inactivation par méthylation du gène MGMT.

### **1.2.4. Adénomes modèle « de haut en bas ».**

Il s'agit morphologiquement d'un bouton latéral sur une crypte parentale. Il naît à partir d'un tubule d'épithélium immature et proliférant qui va migrer pour « tomber » à partir de l'épithélium de surface. Il donne naissance à partir de sa base à un microadénome par croissance latérale. La répétition de cette séquence conduit à une croissance exophytique ou polypoïde. Ce modèle est fréquent dans les PAF. Il implique la mise en jeu de la voie de l'APC, mais également une dysrégulation de la prolifération et une inhibition de l'apoptose.

### **1.2.5. Adénomes modèle « de bas en haut ».**

Ce modèle est retrouvé dans les adénomes « en dents de scie ». La zone proliférative reste dans la partie inférieure, les cellules mûrissent et cessent de se diviser dans leur migration vers le haut. Le mécanisme principal est l'inhibition de l'apoptose et le défaut d'exfoliation superficielle des cellules (ou anoïkis). On peut déjà à ce stade trouver des anomalies moléculaires (méthylation de hMLH1 et HPP1, MSI-L ou H, perte d'expression de hMLH1 etc...). Cette séquence est fréquente dans les CCR sporadiques, MSI-H ou MSI-L.

## **2. LA CANCEROGENESE COLIQUE D'UN POINT DE VUE DYNAMIQUE.**

On a vu que l'épithélium de surface de l'intestin est renouvelé en 5 jours environ chez l'homme. Ce renouvellement comporte plusieurs enchaînements et est conditionné par la prolifération des cellules souches au fond des cryptes de Lieberkühn. Leur division donne naissance à des cellules de transit qui migrent vers la surface en acquérant une différenciation croissante ; celle-ci est terminée à la surface, où les cellules totalement différenciées vont être éliminées, avec l'entrée en jeu du phénomène d'anoïkis.

C'est ce mécanisme que nous allons brièvement aborder dans le paragraphe qui suit.

### **2.1. Le renouvellement de l'épithélium intestinal, un modèle qui repose sur une organisation cellulaire complexe.**

Le déroulement des événements qui permettent le renouvellement de l'épithélium intestinal est conditionné par les signaux reçus par les différentes cellules en fonction de leur positionnement le long de l'axe de la crypte. On a en effet déjà vu qu'il existe un gradient de concentration de la protéine APC le long de l'axe de la crypte, avec une concentration croissante du fond de la crypte vers la surface, en opposition avec le gradient de concentration de la  $\beta$ -caténine nucléaire, qui est maximale au fond des cryptes pour ne plus être exprimée dans l'épithélium de surface.

L'architecture normale de la muqueuse intestinale (cryptes et épithélium de revêtement) est ainsi conditionnée par le bon déroulement et le bon enchaînement de ces séquences coordonnées par les signaux fournis aux cellules d'après leur positionnement. On obtient alors des cryptes allongées et relativement peu sinueuses s'ouvrant par un orifice unique à l'épithélium de revêtement.

Un dérèglement modéré de ce schéma aboutit à une déformation des cryptes, qui peuvent être sinueuses, plus longues, avec quelques angulations. Un dérèglement du cycle cellulaire des cellules du fond des cryptes, avec une augmentation des divisions cellulaires, donne naissance à des fissions du fond des cryptes, qui peuvent aboutir suivant certains modèles à la formation de polypes.

Différents modèles mathématiques ont été proposés sur la dynamique de renouvellement cellulaire des cryptes, qui ont pu intégrer les nombreux paramètres intervenant, parmi

lesquels on peut citer : la variabilité de la durée des cycles cellulaires, le taux de mortalité des cellules tout au long de leur parcours, les taux de mutation, etc...

Certains d'entre eux ne prennent en compte que les évènements moléculaires sans intégrer les facteurs de positionnement des cellules individuelles, d'autres s'intéressent à la situation des cellules en transition par rapport aux cryptes, d'autres enfin étudient le positionnement individuel des différents types de cellules (40, 96, 131) .

On relève dans la littérature deux modèles principaux de renouvellement de l'intestin, développés essentiellement dans le grêle: un modèle initial assez simple (discrete 2D-grid models) dans lequel les cellules se meuvent au cours de leur migration suivant des colonnes définies, et le modèle de Meineke et collaborateurs (83), où la prolifération cellulaire mène à des réarrangements cellulaires essentiellement locaux (89).

## **2.2. De la cellule isolée à l'organisation tissulaire : un schéma multiparamétrique.**

A côté de ces modèles simples reposant sur l'organisation cellulaire , on a récemment proposé un schéma multiparamétrique se voulant plus exhaustif et intégrant les interactions des différents paramètres locaux et environnementaux menant de la cellule au tissu et à son organisation (152). Ce sont ces derniers que nous développerons ici (figure 22).

On arrive ainsi à définir un modèle « évolutionniste » de la carcinogénèse colique, en intégrant la dynamique de la prolifération cellulaire à un phénomène complexe non linéaire dans le temps et dans l'espace. Ceci a fait l'objet de travaux spécifiques (RA Gatenby et TL Vincent (39)). Les auteurs proposent une dynamique cellulaire normale dans laquelle les populations cellulaires à l'équilibre occupent une disposition spatiale aux limites bien définies, qui autorise la coexistence et la coopération de types cellulaires différents. Ces types différents n'entrent pas en compétition. D'une part ceci nécessite des interactions entre les cellules et l'environnement, qui seront développées à partir de stratégies différentes par les différents types cellulaires, mais sans compétition. D'autre part cela implique des mécanismes de contrôle à partir de facteurs environnementaux. Cet état d'équilibre est nécessaire à la formation de tissus et d'organismes fonctionnels. Il va être modifié par l'apparition d'une population mutante qui va déformer cette architecture adaptative avec pour conséquence de faire occuper aux populations normales un minimum local. C'est le premier stade de la transformation maligne. A ce stade il existe des contrôles de la prolifération redondants avec les contrôles normaux, et faisant intervenir pour chaque

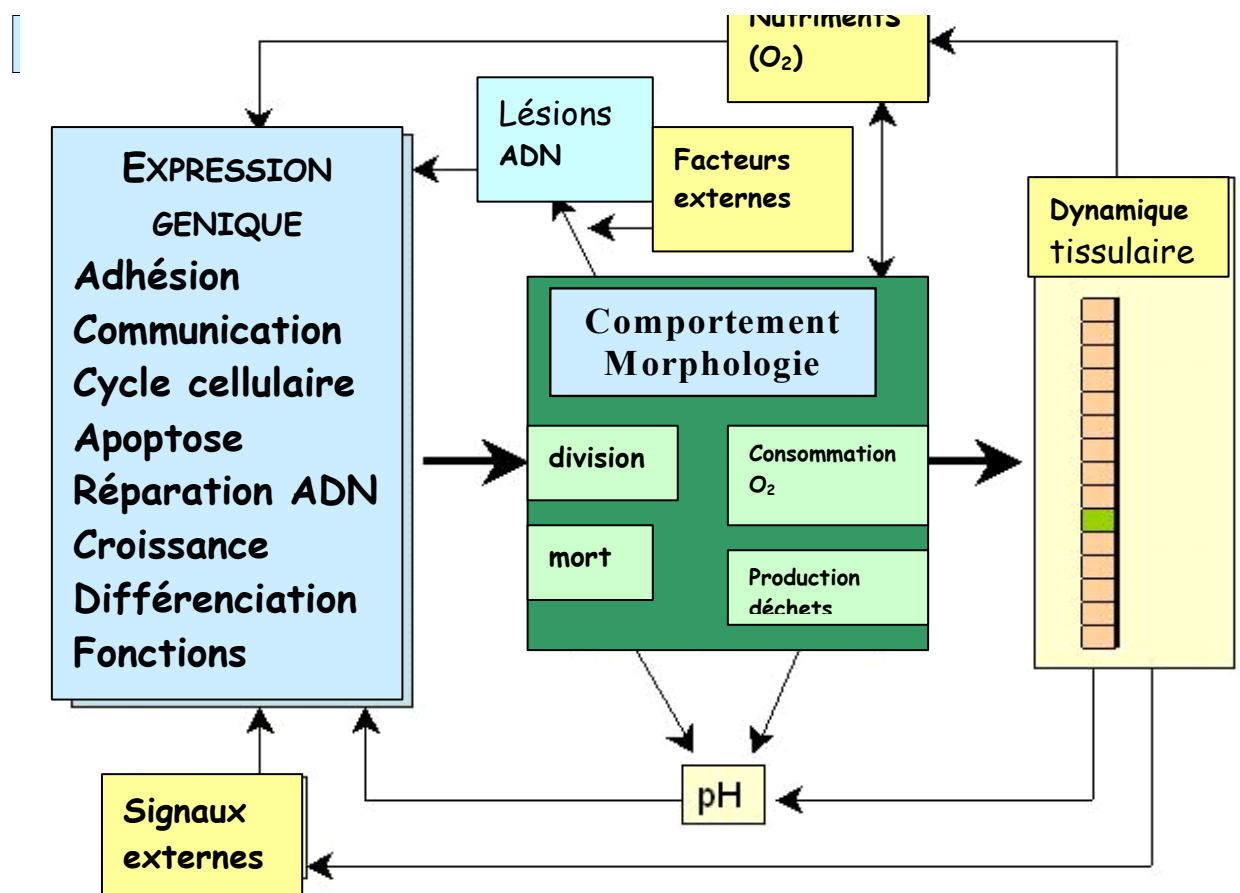
type cellulaire un panel important de gènes suppresseurs de tumeur et d'oncogènes. L'étape suivante est celle de l'installation du cancer invasif, où la population mutante va remplacer la population normale. Dans le cas du cancer colorectal, les gènes intervenant sur le contrôle de la prolifération et qui incluent la voie Wnt avec APC, et le gène K-RAS, ont des fonctionnalités qui suggèrent une transmission de l'information concernant les contacts cellulaires et des aspects environnementaux. Ils peuvent ainsi diminuer le contrôle environnemental de la prolifération et l'inhibition de contact entre les cellules. Ils vont alors favoriser la capacité des cellules tumorales à s'inclure entre les cellules normales et à les remplacer. Tant que le taux de mutations est faible dans la population tumorale et que celle-ci obéit à des contraintes environnementales fortes, elle ne pourra avoir qu'un développement local et auto-limité, du fait des modifications de la dynamique dues à l'entassement cellulaire qui augmente les besoins en substrat. Cet état permettra une coexistence stable entre les populations cellulaire normale et mutée.

A l'étape suivante les contraintes évolutives de la population tumorale sont dépassées du fait d'un taux de mutations plus important qui peut être dû à des mécanismes variés incluant la possibilité de facteurs environnementaux mutagéniques. La population tumorale peut alors acquérir une « Stratégie Evolutionnaire Stable » (ESS) conduisant à l'extinction des cellules normales et au cancer invasif. Cette évolution peut se faire de deux façons. La première voie permet la diminution des contraintes locales en augmentant les capacités migratoires des cellules tumorales, ou en augmentant l'approvisionnement en substrat, ou encore en diminuant les phénomènes de sénescence cellulaire. L'autre voie passe par des mutations géniques que l'on retrouve dans les lésions préneoplasiques avancées et dans les cancers coliques ( p53, DCC, télomérase etc...).

Au cours de cette étape, les paramètres adaptatifs permettant la croissance des cellules tumorales varient avec le temps ; les cellules transformées consomment plus de ressources qu'il ne leur en est fourni par le microenvironnement altéré qui est le leur. Elles doivent donc appliquer de nouvelles stratégies compatibles avec une architecture locale dominée par la limitation en substrat. Au premier rang de ces stratégies se trouve la néoangiogénèse. Un équilibre est alors atteint où la population tumorale a optimisé ses capacités à capter le substrat ; la diminution de concentration de ce substrat dans l'environnement sera alors essentiellement nuisible aux cellules normales, qui iront vers l'extinction.

Ce modèle, on le voit, diffère des précédents en ce qu'il fait jouer un rôle majeur à la fois aux modifications phénotypiques spécifiques des cellules mais aussi aux paramètres de sélection environnementaux qui contrôlent la dynamique de la prolifération et de

l'envahissement au cours de la cancérogénèse. Ainsi, lors de la cancérogénèse colorectale, de petites tumeurs non malignes vont survenir à partir d'une mutation isolée d'un oncogène ou d'un gène suppresseur de tumeur. Du fait du terrain mutagène qui leur a donné naissance, elles vont s'accroître en nombre avec le temps, comme certains travaux de microdissection le montrent. Dans cette hypothèse chaque tumeur se rattache à une population monoclonale montrant une mutation stable unique (37). Ce modèle correspond bien à l'évolution des adénomes de petite taille, très nombreux dans la PAF (55). Ces petites lésions vont ensuite progresser vers la malignité, à la condition qu'elles subissent un phénomène permissif : ceci est en accord avec le fait que le phénotype mutateur se rencontre aux phases précoces de la cancérogénèse et semble nécessaire pour son développement (80, 127). Il faut noter dans ce cas, qu'une mutagénèse environnementale peut se substituer au départ au phénotype mutateur. Ceci permet la transformation d'un petit adénome soumis à un environnement mutagénique (infection chronique etc). Des altérations des mécanismes de contrôles locaux de la croissance tissulaire peuvent également jouer ce rôle (97).



*Projet « Integrative Biology : Colorectal Cancer Modelling », 2005 (96)  
 Dans ce schéma, la dynamique de l'épithélium et l'expression génique interagissent avec les facteurs environnementaux externes*



Ce schéma permet de pressentir une autre grande phase incontournable dans la cancérogénèse, qui est dominée par la compétition pour le substrat. De nombreuses études tant expérimentales que cliniques sur la captation et le transport du glucose au cours de la progression maligne vont dans ce sens et montrent ainsi l'acquisition progressive d'un phénotype adapté dans la progression des lésions pré malignes avancées au cancer invasif (164).

Ce modèle permet également de pressentir un phénomène apparemment paradoxal, qui est que les lésions pré malignes devraient montrer une plus grande hétérogénéité phénotypique que les cancers invasifs qui en découlent. En effet, on a vu qu'une lésion précancéreuse a une croissance auto-limitée qui aboutit à un état où elle peut coexister de façon stable avec les autres populations. Il y aura alors une mosaïque de phénotypes et de génotypes dans cette lésion précancéreuse. A l'intérieur de cette lésion, un génotype pouvant évoluer vers un ESS pourra alors envahir et détruire les populations adjacentes non ESS. Ceci s'accompagne d'interactions avec le micro-environnement. Finalement, la transition d'une lésion précancéreuse vers un cancer invasif devrait donc s'accompagner d'une transition d'une population cellulaire hétérogène à une population moins hétérogène ; ceci a pu être montré dans certains types de tumeurs (11).

# **IV. ETUDE MORPHOLOGIQUE DES BOULEVERSEMENTS ARCHITECTURAUX INDUITS PAR LA PROGRESSION TUMORALE DANS LES CANCERS COLIQUES.**

---

Ce chapitre est consacré à l'étude expérimentale des modifications architecturales qui surviennent au cours de la cancérogénèse de la muqueuse colique. Ces modifications intéressent bien évidemment en premier lieu la muqueuse cancérisée, au cours de la séquence qui aboutit de l'hyperplasie au cancer et qui est directement induite par les évènements moléculaires à l'origine de la transformation et de la progression tumorale.

Elles surviennent également au contact immédiat de la muqueuse transformée, en tissu considéré comme non cancéreux. Nous avons montré que certaines d'entre elles permettent de discriminer entre muqueuse au contact de la tumeur et muqueuse à distance. Ceci tendrait à identifier ces deux types de muqueuses. Or, si les descriptions des transformations induites par le cancer en muqueuse non transformée sont nombreuses, elles n'ont pour le moment pas abouti à une identification spécifique.

Pour établir les modifications architecturales induites par la cancérisation en muqueuse tumorale et en muqueuse non tumorale, nous nous sommes donc intéressés à trois territoires:

- ✓ la tumeur ;
- ✓ la muqueuse supposée non cancéreuse au contact immédiat de la tumeur (zone à cheval entre tumeur et tissu présumé sain) ;
- ✓ la muqueuse supposée saine à distance de la tumeur (berges distales de résection des pièces opératoires).

Nous avons voulu paramétrer de façon objective les perturbations architecturales observées, afin de pouvoir répondre aux questions suivantes :

- ✓ la cancérisation a-t-elle une influence sur la muqueuse saine au contact et à proximité de la tumeur?
- ✓ Quelle est l'importance du contrôle des cellules en cycle par la voie Wnt, dans les tissus non tumoraux au contact de la tumeur, et dans la tumeur elle-même ?
- ✓ Quel est l'impact de l'hétérogénéité de distribution des cellules en cycle sur les remaniements architecturaux de la cancérogénèse colique ?
- ✓ Quelle est la zone d'influence d'une cellule en cycle ?
- ✓ Peut-on définir un ordre dans les structures biologiques ici étudiées ?
- ✓ Est-ce que les caractéristiques spatiales des cellules sont corrélées avec leurs propriétés fonctionnelles (ici, avec leur implication dans la progression tumorale) ?

L'étude histologique dite de routine des lames nous a permis d'appréhender les modifications de la muqueuse colique normale induites par la cancérisation à proximité immédiate et à distance.

Par les techniques d'immuno-histochimie nous avons distingué les cellules en cycle des cellules hors cycle ; nous avons également étudié l'influence des altérations de la voie Wnt (à travers les modifications d'expression de la  $\beta$ -caténine et de la Cycline D1, une de ses cibles les plus importantes dans la voie Wnt) sur le compartiment des cellules en cycle. Nous avons ensuite étudié l'hétérogénéité de marquage induite par la topographie des cellules dans les tumeurs, au moyen d'un processus spécifique que nous avons intitulé le « spot virtuel ». Ceci nous a conduits à établir un index objectif d'hétérogénéité du marquage des tumeurs, et nous avons pour cela utilisé un outil mathématique spécifique

développé et publié par certains d'entre nous. La Sociologie Cellulaire a été utilisée au dernier stade de notre travail, pour établir les relations spatiales des cellules entre elles et les rapports de ces relations de voisinage avec leurs propriétés fonctionnelles.

Ces différentes approches ont été établies sur une série d'échantillons de cancers coliques que nous avons comparés à des échantillons de lésions dysplasiques. C'est ce que nous allons développer dans les paragraphes qui suivent, en définissant tout d'abord le choix des patients dont les échantillons ont été sélectionnés, puis le choix des méthodologies utilisées, enfin la mise en oeuvre de ces méthodologies. Nous exposerons ensuite les résultats obtenus.

## **1. MATERIEL ET METHODES.**

### **1.1. Choix des patients et recueil des données.**

#### **1.1.1. Choix des patients.**

57 patients, opérés d'un carcinome colorectal invasif au CRLCC de Montpellier entre 1998 et 2002, ont été sélectionnés sur les critères suivants :

- ✓ l'opérabilité du patient ;
- ✓ l'absence de chimiothérapie préopératoire ;
- ✓ la possibilité d'obtenir un matériel d'archives (bloc de paraffine) de bonne qualité ;
- ✓ l'existence d'un dossier clinique convenablement documenté ;
- ✓ la non-éligibilité aux critères d'Amsterdam (élimination des formes familiales de la maladie).

Dans cette population de 57 patients, 10 porteurs d'un carcinome rectal ont eu une lésion irradiée avant l'acte chirurgical. Ces lésions irradiées ont été exclues de l'étude et feront l'objet d'un travail ultérieur. Par ailleurs, 11 patients opérés au CRLCC durant la même période, d'une lésion colique bénigne dysplasique, ont été recrutés en tant que groupe témoin. Pour ces patients le critère d'inclusion retenu a été la possibilité d'obtenir un matériel d'archives (bloc de paraffine) de bonne qualité et quantitativement suffisant compte tenu de la taille exiguë fréquente de ces lésions). Certains patients, présentant à la fois une lésion non invasive et une lésion invasive (qu'elles soient de sièges distincts ou de chronologies différentes) ont été susceptibles de se retrouver dans les deux groupes.

### **1.1.2. Recueil des données cliniques.**

A partir du dossier ont été extraites les données cliniques suivantes :

- ✓ Pour tous les patients :
  - âge (date de naissance) et sexe ;
  - localisation de la tumeur ;
  - date de l'intervention chirurgicale (considérée comme date d'entrée dans la maladie) ;
  - antécédents personnels et familiaux (rappelons que ces patients par définition ne répondent pas aux critères d'Amsterdam).
- ✓ Pour les patients porteurs d'un cancer invasif
  - notion de traitement préopératoire (en règle générale pour cette localisation, radiothérapie) ;
  - pT (évaluation post-opératoire de la taille de la tumeur : pT dans la classification pTNM).
  - nombre de ganglions envahis par rapport au nombre de ganglions examinés (statut pN dans la classification pTNM) ;
  - grade histologique ;
  - notion de métastase synchrone et, si oui, localisation de la métastase (statut pM du pTNM) ;
  - autre localisation tumorale éventuelle ;
  - autre pathologie colorectale éventuelle.

Les caractéristiques anatomocliniques des patients sont résumées dans l'annexe 2.

### **1.1.3. Collecte des blocs et des lames.**

Pour chaque patient ont été collectés :

- ✓ au minimum le bloc d'inclusion en paraffine de la tumeur ou d'un fragment de tumeur ;
- ✓ dans les cas d'exérèse chirurgicale large (pour cancer invasif), un bloc de tissu colique non tumoral prélevé à distance de la tumeur (limite d'exérèse présumée saine lors de la chirurgie) ;
- ✓ éventuellement, un bloc contenant l'inclusion d'une lésion précancéreuse prélevée lors du même acte chirurgical, à proximité ou à distance de la tumeur principale.

Le contenu de chaque bloc a été contrôlé au moyen de la lame histologique, colorée à l'H.E.S., réalisée à partir de ce bloc pour l'étude histologique initiale.

Chez tous les patients, les diagnostics histologiques retenus pour l'inclusion dans l'étude ont été ceux portés initialement par des pathologistes différents, sur les lames histologiques colorées à l'Hématéine-Eosine-Safran (HES) après fixation des échantillons opératoires au formol à 5%, inclusion en paraffine et coupe à 4 microns suivant la technique de routine habituelle. La notion d'envahissement ganglionnaire ainsi que la classification pTNM de la tumeur retenues sont celles qui figurent sur le compte-rendu opératoire produit lors de l'examen anatomopathologique initial, et n'ont pas fait l'objet de modifications. Au total, on a disposé de 47 échantillons de cancers, de 11 échantillons de lésions dysplasiques (6 de degré bas de dysplasie, 5 de degré élevé dont 2 chez le même patient), et de 57 fragments de tissu normal à distance de la tumeur ; dans 50 cas ce tissu normal comportait une zone adjacente à la tumeur sur une extrémité éloignée. Une lésion de dysplasie mixte chez un deuxième patient dysplasique n'a pas été prise en compte pour des raisons de difficulté technique et d'intrication des signes.

## **1.2. Choix des méthodologies.**

### **1.2.1. Approches histologique et immuno-histochimique.**

L'étude histologique de routine nous a permis d'analyser les remaniements architecturaux en tissu « sain » au contact et à une certaine distance de la tumeur. Les lectures ont été faites sur les lames entières, et complétées par des mesures micrométriques permettant une analyse morphométrique objective.

Pour la détermination des cellules en cycle et l'impact de la voie Wnt sur celles-ci, nous avons eu recours en premier lieu au compte des mitoses dans les tumeurs. Ce compte, qui donne lieu à l'établissement d'un index, permet de reconnaître les cellules ayant parcouru tout le cycle cellulaire jusqu'à la mitose, et son caractère pronostique est bien établi (150). Puis nous avons utilisé l'immuno-histochimie. Le marquage par le Ki-67, anticorps maintenant bien connu, nous a permis de déterminer les cellules en cycle. On a vu dans un chapitre précédent le rôle joué par la dérégulation de la voie de signalisation Wnt sur

l'activité proliférative des tumeurs. En utilisant le marquage des tissus par des anticorps dirigés contre la  $\beta$ -caténine et contre la Cycline D1, nous avons pu investiguer in situ l'impact de sa dérégulation sur le contingent de cellules en cycle des tumeurs. En outre, l'emploi d'un anticorps dirigé contre l'antigène anti-apoptotique Bcl-2, nous a donné un reflet sommaire de la localisation d'une activité apoptotique dans les différents tissus. Ces analyses ont été effectuées à la fois sur les lames entières et sur des zones d'intérêt particulières de ces lames, déterminées de façon précise et appelées « spots virtuels ».

Nous avons ensuite voulu apprécier l'impact de l'hétérogénéité de la distribution du marquage dans les tumeurs, sur l'interprétation des résultats. En effet, l'hétérogénéité tumorale est une notion maintenant bien admise en pathologie cancéreuse. Elle est reconnue à plusieurs niveaux : hétérogénéité des échantillonnages, hétérogénéité de distribution d'un marqueur, hétérogénéité clonale des cellules. Dans ce but, nous avons sélectionné sur les lames immuno-marquées des spots choisis dans des zones d'intérêt. Leur marquage a été étudié séparément. Puis nous avons estimé la concordance des résultats avec ceux obtenus à partir de la lame entière. Cette technique, que nous avons appelée « des spots virtuels », reproduit l'échantillonnage obtenu par la technique des Tissue-MicroArrays (21, 50). Elle a l'avantage de s'assurer que les spots étudiés ont subi de bout en bout le même traitement que celui de la lame entière. Elle constitue un simple outil d'évaluation de l'échantillonnage.

L'approche immuno-histochimique, sur lame entière et sur « spots virtuels », nous a ainsi permis de déterminer dans les tumeurs le pool des cellules en cycle ainsi que leurs corrélations avec les différents niveaux d'expression de la  $\beta$ -caténine et de la Cycline D1, témoins d'une éventuelle dérégulation de la voie de signalisation Wnt.

La détermination des cellules en cycle et de l'impact de la dérégulation de la voie Wnt sur le potentiel prolifératif des tumeurs a été notre première étape. Elle nous a permis de définir les populations cellulaires (cellules en cycle et cellules hors cycle) dont nous voulions étudier la distribution spatiale et les relations de voisinage. Pour cette étude précise nous avons fait appel aux outils de morphométrie mathématique développés dans la sociologie cellulaire.

## 1.2.2. La Sociologie Cellulaire.

Pour reproduire à partir d'un modèle en 2D l'environnement des cellules en cycle et hors cycle, et ainsi pouvoir étudier leurs relations de voisinages, nous nous sommes appuyés sur la théorie des graphes. Rappelons qu'un graphe permet, en intégrant une métrique définie, de décrire une topographie, d'y intégrer les informations qui lui sont associées et donc, de caractériser la topographie d'une population cellulaire à partir de notions relativement simples (par exemple, dans le modèle choisi ici, type moyen d'occupation de l'espace, homogénéité des formes de l'espace propre à chaque cellule au sein de sa population, hétérogénéité de surface de ces régions). On peut ainsi relier l'ordre à la forme. Le modèle princeps de ce type de graphes est le diagramme de Voronoï. Un diagramme de Voronoï (encore appelé décomposition de Voronoï, ou partition de Voronoï) est une décomposition particulière d'un espace métrique déterminé par les distances à un ensemble discret d'objets de l'espace.

Pour construire un tel diagramme, on se place dans un espace euclidien  $E$  ; soit  $S$  un ensemble fini de  $n$  points de  $E$ ; les éléments de  $S$  sont appelés centres, ou germes. On appelle région de Voronoï associée à un élément  $p$  de  $S$  l'ensemble des points qui sont plus proches de  $p$  que de tout autre point de  $S$ . Voici comment on définit ce lieu: étant donné deux points  $p_i$  et  $p_j$ , le lieu des points le plus près de  $p_i$  que de  $p_j$  est le demi-plan contenant  $p_i$  qui est défini par la médiatrice de  $p_i p_j$ . Soit  $H(p_i p_j)$  ce demi-plan; le lieu des points plus proches de  $p_i$  que de n'importe quel autre point, qui est noté  $(V_i)$ , est l'intersection de  $N-1$  demi-plans. Il représente une région polygonale convexe n'ayant pas plus que  $N-1$  côtés. On le note:

$$(V_i) = \bigcap_{j \neq i} H(p_i p_j).$$

Le diagramme de Voronoï est constitué de l'ensemble de ces polygones.

Dans un diagramme de Voronoï, il existe deux types de polygones: des polygones fermés, et des polygones ouverts dont les bords ne sont pas contenus dans la fenêtre de l'échantillonnage. Comme il n'est pas possible de déterminer les relations de voisinage des cellules qui se trouvent sur les bords, on corrige les effets de bord en éliminant ces polygones de nos mesures.



A partir de cette partition de l'espace, on peut mesurer la topographie d'une population en mesurant l'aire des polygones, la forme moyenne, le désordre géométrique et le désordre surfacique. On obtient ainsi une description spécifique d'une population, qui prend en compte la disposition des cellules les unes par rapport aux autres, l'hétérogénéité des distributions locales au sein de la population et l'hétérogénéité d'occupation de l'espace.

En effet, les polygones peuvent varier entre eux par leur taille, par leur forme, par leur régularité, ils peuvent être plus ou moins homogènes entre eux pour ces différents paramètres : ce sont toutes ces spécificités que l'on peut quantifier à partir d'un diagramme de Voronoï, et l'on obtient alors l'information sur les relations de voisinage des cellules entre elles. Celle-ci est spécifique d'une population donnée.

Chaque polygone est caractérisé par son aire  $A$  et son facteur de forme  $RF$ . Ce facteur de forme dépend du périmètre et de la surface ; il est minimal (égal à 1) pour un cercle ; il augmente avec la complexité de l'objet. Connaissant l'aire et le facteur de forme des polygones, on peut mesurer le désordre intrinsèque de la population des polygones selon deux composantes principales, le désordre concernant les hétérogénéités de surface et celui concernant les propriétés géométriques. Ils sont quantifiés par deux paramètres,  $AD$  pour le désordre de surface et  $RFH$  pour l'homogénéité du facteur de forme. Ces deux paramètres sont bornés sur l'intervalle  $[0,1]$  et donnés par les formules:

$$AD = 1 - (1 + \sigma_A / A_{av})^{-1} \quad \text{et} \quad RFH = (1 + \sigma_{RF} / RF_{av})^{-1}$$

Dans ces formules  $\sigma_A$  représente l'écart type sur la surface,  $\sigma_{RF}$  l'écart type sur le facteur de forme,  $A_{av}$  la surface moyenne,  $RF_{av}$  le facteur de forme moyen.

$AD$ , qui mesure le désordre surfacique des polygones, informe sur la variation de la surface des polygones les uns par rapport aux autres, et décrit donc l'hétérogénéité d'occupation de l'espace par les cellules. Il varie dans l'intervalle  $[0,1]$  et augmente parallèlement au désordre.

$RFH$ , qui mesure l'homogénéité géométrique des polygones, informe sur la variation de la forme des polygones les uns par rapport aux autres, et décrit donc l'homogénéité des distributions locales au sein de la population.

$RFH$  varie dans l'intervalle  $[0,1]$  et diminue quand le désordre augmente.

Un autre paramètre obtenu à partir des polygones de Voronoï est la forme moyenne d'occupation de l'espace. Les polygones du diagramme de Voronoï étant strictement convexes, ils remplissent l'inégalité iso-périmétrique suivante:  $L(X)^2 - 4\pi A(X) \geq 0$  concernant un ensemble convexe  $X$  d'aire  $A(X)$  et de périmètre  $L(X)$ . On peut alors

caractériser la forme moyenne d'occupation de l'espace de la population par son facteur de forme moyen  $R_{fav}$  donné par la formule:

$$R_{Fav} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [ 4\pi A(X_i) / L(X_i) ]$$

et on a  $0 < R_{fav} \leq 1$ .

$R_{fav}$  mesure la forme moyenne des polygones, et informe sur la disposition moyenne des cellules les unes par rapport aux autres. Il vaut 1 pour une forme ronde de chaque polygone et se rapproche de 0 quand le polygone se déforme.

Ces trois paramètres, bornés sur l'intervalle  $[0,1]$ , sont indépendants de la taille de l'échantillon.

On peut également extraire, à partir des données du diagramme de Voronoï, d'autres informations qui ne sont plus directement liées aux notions de voisinage : connaissant l'aire moyenne  $A$  des polygones de Voronoï, on en déduit la cellularité des tissus ; il existe en effet un rapport inverse entre la taille des polygones et la cellularité, les zones les plus cellulaires générant les polygones d'aire la plus petite. La densité cellulaire est égale à  $1/A$  (en effet, un polygone et la cellule qui l'a généré n'ont pas les mêmes limites, le polygone du fait de son architecture débordant les limites cytoplasmiques de la cellule). La polarisation de l'architecture est déduite du facteur de forme  $R_{fav}$ , par la mesure  $1/R_{Fav}$ .

La figure 23 montre un exemple de pavage de l'espace par les polygones de Voronoï.



**Figure 23 : exemple de diagramme de Voronoï constitué par les différents polygones de Voronoï**

Il existe une autre manière de définir les relations de voisinage, la triangulation de Delaunay . Elle a été définie à partir du diagramme de Voronoï. Le diagramme de Voronoï et la triangulation de Delaunay sont très fortement liés, ils sont « duaux ». Le point à l'intersection de trois zones d'influence de Voronoï se trouve exactement à l'aplomb du centre de la sphère utilisée pour construire la triangulation de Delaunay.

Le diagramme de Voronoï et la triangulation de Delaunay s'intéressent à l'organisation spatiale d'un tissu au niveau de sa topographie globale (14). Un autre outil de la Sociologie Cellulaire est représenté par l'arbre d'Ulam. Contrairement aux deux précédents, l'arbre d'Ulam est un outil d'analyse de l'environnement de chaque cellule. Il s'agit d'un « objet mathématique qui grandit dans l'espace et dans le temps. La triangulation de Delaunay et le diagramme de Voronoï servent de support à la croissance de l'arbre. » (89).

Notre étude actuelle s'intéressant à la topographie globale du tissu cancéreux lors de sa transformation, nous ne ferons pas appel à l'arbre d'Ulam. Le diagramme de Voronoï s'étant révélé dans la littérature comme l'outil mathématique le plus informatif pour étudier la topographie globale d'un tissu, c'est lui que nous utiliserons dans notre étude.

### **1.2.3. L'index d'hétérogénéité des tumeurs.**

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que l'étude immuno-histochimique des tumeurs nous confronte à la notion d'hétérogénéité tumorale.. Cette hétérogénéité intervient à plusieurs niveaux. Elle peut être due aux différents traitements subis par l'échantillonnage avant ou pendant le marquage (aléas de fixation des tissus, mauvaise conservation des blocs de paraffine du matériel archivé, inégalité d'épaisseur des coupes, artéfacts de manipulations lors du marquage) : l'automatisation grandissante des méthodes d'inclusion, de coupe et de marquage est aujourd'hui en mesure de minimiser de façon relativement acceptable ces aléas. Elle est plus généralement due à l'hétérogénéité de taille, de forme et de distribution des différents clones de cellules tumorales; il s'agit d'un paramètre incontournable, dont on doit tenir compte dans l'interprétation des résultats. Cette hétérogénéité, qui peut être source de fausses interprétations, est cependant intéressante à considérer pour elle-même, car elle peut être utilisée comme un marqueur discriminant entre différentes catégories de cellules. L'évaluation des marquages sur

« spots virtuels » nous a permis d'appréhender un premier niveau d'hétérogénéité, qui est celui de l'hétérogénéité de distribution du marquage dans les différentes zones sur toute la surface de la coupe. Un deuxième niveau est celui de l'hétérogénéité du marquage due aux différences de différenciation des cellules. C'est ce dernier que nous avons quantifié en établissant un index d'hétérogénéité de tumeurs. Cet index, qui repose sur les statistiques spatiales (82, 110) a été développé dans le travail de thèse de V. Sharifi-Salamatian (121, 122) avec qui nous l'avons appliqué à l'étude des cancers du sein (123). Celle-ci est fournie dans l'annexe 4. Nous allons donner, en quelques lignes, le principe général sur lequel repose le calcul de cet index d'hétérogénéité.

Les phénomènes biologiques observés sont généralement modélisés par un processus aléatoire ergodique (76),  $Z(x)$  :

soit  $Z(S) = 1/|S| \int Z(x)dx$  la moyenne spatiale sur un domaine  $S$  (d'aire ou de volume  $|S|$ ) : en raison de l'ergodicité, la variance  $\text{var}(Z(S))$  tend vers zéro quand  $|S|$  tend vers l'infini. Quand  $|S| \cdot \text{var}(Z(S))$  a une limite finie, on l'appelle « integral range » du processus, et on la note  $A$ . Elle donne l'ordre de grandeur des domaines qu'il faut étudier pour pouvoir faire des estimations correctes du processus. Mais  $A$  n'est pas toujours finie (quand  $\text{var}(Z(S))$  ne tend pas vers zéro assez vite). C'est notamment le cas des processus modélisant les tissus cancéreux, c'est pourquoi le processus observé apparaît hétérogène à toutes les échelles ( en fait il est toujours ergodique, mais cette ergodicité est masquée à l'échelle à laquelle on fait l'analyse). Il se trouve alors que  $\text{var}(Z(S))$ , au lieu de tendre vers zéro comme  $1/|S|$ , tend vers zéro comme  $1/|S|^\beta$ , avec  $0 < \beta < 1$ . On décide de donner à  $\beta$  le nom d'index d'hétérogénéité spatiale. Cet index peut être calculé en utilisant une transformation en ondelettes (143) dont le caractère redondant permet une analyse multirésolution. Il permet de calculer l'intervalle de confiance en fonction de l'échelle d'observation. Le calcul de  $\beta$  est donné dans les formules 6, 7 et 8 de l'article fourni annexe 4 (124).

Comme cet index dépend de la direction des mesures, sauf en cas d'isotropie de l'objet analysé, les données, qui sont ici constituées par les coordonnées spatiales des centres des noyaux des cellules marquées, vont être décomposées selon trois axes choisis arbitrairement, un axe horizontal, un axe vertical, un axe selon la diagonale. On aura ainsi

pour chaque objet examiné trois index d'hétérogénéité. L'index d'hétérogénéité global est ensuite calculé en effectuant une moyenne simple des trois index précédents.

### 1.2.4. Etude Statistique.

En dehors de l'étude histologique de routine, purement descriptive, toutes les études décrites ci-dessus ont fait l'objet de tests statistiques.

L'analyse univariée a pris en compte les variables quantitatives au moyen de la moyenne, la variance, l'écart-type, le minimum, le maximum, la médiane, avec mise en pratique du test de Kruskal-Wallis (seuil de significativité :  $p < 0.05$ ). Les variables quantitatives (effectifs et pourcentages) ont été étudiées par le test du Chi-2 ou le test exact de Fisher en cas de non validité des conditions d'application du test du Chi-2 ; les couples de données ont fait l'objet du test de Wilcoxon apparié (seuil de significativité :  $p = 0,05$ ). Les mesures de corrélation entre deux variables d'un même tissu ont été étudiées par le coefficient de corrélation de Spearman (significativité :  $-1 < \rho < +1$ , selon tables). Les concordances entre les différents spots d'un même échantillon ont été évaluées en utilisant le coefficient de corrélation de Spearman et le test de Wilcoxon apparié. L'index d'hétérogénéité et les données de la sociologie cellulaire ont été étudiés au moyen du test de Wilcoxon. Les données ont été analysées sous le logiciel STATA 9.0.

Le récapitulatif de l'ensemble du protocole d'étude figure dans le tableau 3.

**Tableau 3 : récapitulatif du protocole d'étude.**

Méthode	Support	outil	Données obtenues	Résultats attendus	Tests statistiques
Histologie de routine	Lame diagnostique (HES)		Type histologique; pTNM ; grade ; mitoses	Classification, stadification (au moment du diagnostic)	
Etude morphométrique	Relecture lame diagnostique (HES)	Muqueuse adjacente Muqueuse à distance	Epaisseur muqueuse Densité cryptes Cryptes anormales	Influence tumeur/voisinage ; remaniements de voisinage	Wilcoxon apparié
IMH	Lame entière	Ki-67 ; $\beta$ -caténine ; Cycline D1 ; Bcl-2.	Distribution du marquage	Discrimination tumeur/tissu adjacent/tissu normal/dysplasies	Spearman Kruskal-Wallis Chi-2/ Fisher Wilcoxon apparié
Spots virtuels	Lames entières après immunomarquages	Niveaux R1, (surface), R2 (centre), R3 (profondeur)	Comparaison concordance niveaux/lame entière	Hétérogénéité du marquage suivant les niveaux dans une même tumeur	Spearman Kruskal-Wallis Chi-2/ Fisher Wilcoxon apparié
Index d'hétérogénéité	Lame marquée Ki-67 acquisition numérique logiciel dédié	algorithme original (statistiques spatiales-théorie des ondelettes)	Hétérogénéité de distribution des cellules en cycle	Hétérogénéité dépendant de la différenciation cellulaire	Wilcoxon
Sociologie cellulaire	Lame marquée Ki-67 acquisition numérique logiciel dédié	Diagramme de Voronoï	Distribution dans l'espace des cellules tumorales	Comparaison désordre tumeur/désordre tissu non tumoral	Kruskal-Wallis

## **1.3. Mise en oeuvre des méthodologies.**

### **1.3.1. Histologie de routine.**

Les lames colorées à l'Hématéine-Eosine-Safran (HES) ayant servi au diagnostic histologique initial ont été systématiquement relues par un pathologiste unique. Celui-ci a plus particulièrement vérifié le type histologique de la tumeur et son grading suivant l'OMS.<sup>1</sup>. Le diagnostic initial a pu ainsi être confirmé dans tous les cas, tandis que la classification TNM initiale a été modifiée selon la dernière version en cours (41). Au cours de la relecture des lames faite lors de ce travail, l'étude histologique de la muqueuse non tumorale adjacente à la tumeur et à distance de la tumeur, a été reprise de façon détaillée, et l'index mitotique a systématiquement été réévalué suivant un protocole défini précisément au moment de l'étude.

#### **1.3.1.1. Muqueuse non tumorale adjacente et à distance de la tumeur.**

Pour chacun des 57 patients atteints d'un CCR, la muqueuse non tumorale a fait l'objet d'une étude histologique classique sur lame entière, d'une part en contiguïté avec la tumeur, d'autre part à distance de la tumeur.

Au moyen d'un oculaire micrométrique monté sur le microscope, nous avons mesuré un fragment de 12 mm de long à partir de la tumeur. Cette longueur correspond, avec l'objectif x20, à 800 graduations de l'oculaire micrométrique. Ce fragment a été divisé en 3 séquences consécutives de 4mm. Sur chacune de ces séquences nous avons pratiqué 5 mesures de l'épaisseur moyenne de la muqueuse, et compté le nombre d'abouchements des cryptes et le nombre de cryptes anormales. Pour les lames comportant une tumeur, la première séquence a été choisie au contact de la tumeur, en prenant soin de ne considérer que les lames comportant un plan de coupe longitudinal le plus parfait possible ; 25 lames, seulement répondaient à ces critères et ont pu être mesurées ; pour ces lames, la séquence au contact de la tumeur nous a permis d'établir l'aspect de la muqueuse au contact immédiat de la tumeur, l'analyse de la séquence intermédiaire et de la séquence terminale nous ont permis d'observer un retour progressif éventuel à l'état de muqueuse normale.

---

<sup>1</sup> Pour rappel :

*grade 1 : bien différencié, contenant plus de 95% de structures glanduliformes ; grade 2 : modérément différencié, contenant de 50 à 95% de structures glanduliformes ; grade 3 : peu différencié, contenant moins de 50% de structures glanduliformes.*

Pour les lames ayant intéressé la muqueuse à distance de la tumeur, la première séquence a été déterminée de façon à intéresser obligatoirement un segment de coupe parfaitement longitudinal<sup>1</sup>. 25 lames satisfaisant à ces critères ont également pu être examinées.

### **1.3.1.2. Détermination de l'index mitotique.**

L'index mitotique, déterminé par le compte des mitoses, a été considéré comme le marqueur des cellules en prolifération (ou cellules proliférantes), par opposition au Ki-67, marqueur des cellules en phase active du cycle cellulaire. Les mitoses apparaissent comme des images d'extensions chevelues représentant les chromosomes, ou en boules lorsque les chromosomes sont en début de métaphase, en deux boules lors de la télophase, ou encore de façon très caractéristique, plus ou moins étalés sur un plan (plaque équatoriale lors de la métaphase; ces images s'observent dans des cellules ayant perdu leur membrane nucléaire et comportant un cytoplasme classiquement basophile (critères de Van Diest et Baak, (149)). Les mitoses ont été comptées pour chaque échantillon de façon indépendante dans chaque zone d'intérêt (zone de spotting virtuel qui fait l'objet par ailleurs d'une description détaillée) sur 10 champs successifs au grossissement x40. Le chiffre le plus élevé a été retenu comme représentatif du compte des mitoses de la lame entière, en se rapportant à la pratique usuelle de compter les mitoses sur lame entière dans la zone la plus riche en mitoses lors de l'observation au grossissement x25. L'index mitotique a ensuite été établi en reportant le nombre des mitoses sur des abaques prenant en compte la surface du champ du microscope au grossissement x40<sup>1</sup>.

### **1.3.2. Etude Immuno-histochimique.**

Pour l'étude immuno-histochimique, quatre marqueurs, l'antigène Ki-67, la  $\beta$ -caténine, la Cycline D1 et le Bcl-2 ont été choisis pour évaluer le cycle cellulaire.

#### **1.3.2.1. Choix des marqueurs.**

L'antigène Ki-67, exprimé par les noyaux des cellules en phase G1 tardive, et dans les phases G2, S et M mais absent de la phase G0, est un marqueur des cellules en phase active du cycle et susceptibles de proliférer (cellules prolifératives). C'est à ce titre qu'il a été retenu dans ce travail. Il a été déterminé au moyen de l'anticorps Mib1 dirigé contre lui.

Les autres marqueurs ont été choisis en fonction de leur importance dans le processus de cancérogénèse colique : la  $\beta$ -caténine a été retenue comme premier marqueur du fait de son rôle-clé dans la voie Wnt de la cancérogénèse colique, et pour son implication dans la différenciation cellulaire ; la Cycline D1 a été retenue comme cible privilégiée de la  $\beta$ -caténine dans l'activation de la prolifération cellulaire. Ces deux marqueurs ont été détectés au moyen d'anticorps spécifiques contre la  $\beta$ -caténine et la Cycline D1. L'antigène anti-apoptotique Bcl-2 a également été étudié, comme témoin indirect de l'apoptose. Le tableau des différents anticorps et de leurs concentrations figure en annexe (annexe 3).

#### **1.3.2.2. Réalisation du marquage immuno-histochimique sur coupes de tissus.**

L'étude immuno-histochimique a été pratiquée sur coupes entières de la tumeur, de la région à cheval entre tumeur et tissu non tumoral, et du tissu sain à distance de la tumeur. Le marquage immuno-histochimique des coupes a été fait suivant les méthodes classiques, sur les coupes entières de tumeurs, sur les coupes intéressant la muqueuse à cheval entre tumeur et tissu sain, et sur la muqueuse normale à distance de la tumeur.

#### **1.3.2.3. Lecture des marquages.**

Chaque lame a fait l'objet d'une lecture « classique » champ après champ, de la lame entière.

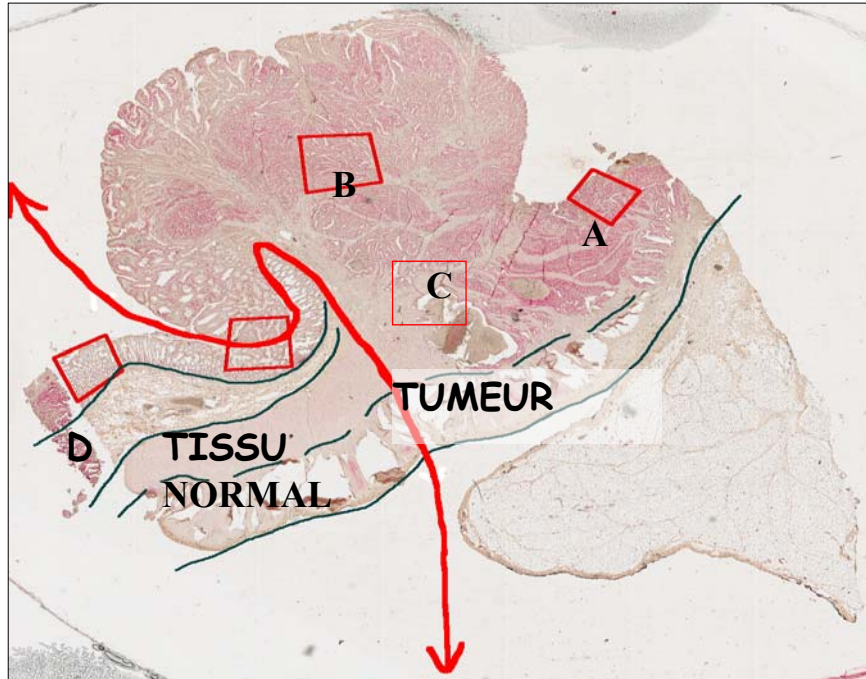
En outre les lésions dysplasiques et cancéreuses ont bénéficié d'une lecture indépendante de trois zones réduites correspondant chacune approximativement à 10 champs contigus du microscope Polyvar au grossissement 400 et choisies par le pathologiste en fonction de leur topographie particulière dans la lésion.

Ces zones ont été arbitrairement appelées « zones de spotting virtuel ». Les zones de spotting virtuel ont été déterminées comme suit sur la lame entière (figure 24) :

---

<sup>1</sup>sur le microscope à grand champ Polyvar de Reichert-Jung sur lequel l'étude a été faite, le diamètre est de 0,63 mm et la surface, de 0,620 mm<sup>2</sup>.





**Figure 24 : zones de « spotting virtuel » sur lame HES.**

*A : spot en surface de la tumeur; B : spot en plein développement tumoral;  
C : spot profond ; D : spot à la jonction entre tissu cancéreux et muqueuse non cancéreuse.*

Pour chaque lame entrée dans ce protocole, quatre zones d'intérêt, de 2 mm de diamètre environ chacune, ont été définies sur la lame HES : une zone en surface de la lésion (A), une zone en plein développement de la lésion (B), une zone en profondeur (C), une zone non tumorale à la jonction entre tissu sain et tissu malin (D). Chacune de ces zones a été reportée par transparence sur la lame immuno-marquée, qui a ainsi comporté quatre «spots virtuels» individualisés A, B, C et D.

### **1.3.3. Calcul de l'index d'hétérogénéité des cellules.**

Les mesures se font sur des coupes de tissus marqués au Ki-67. Pour chaque échantillon, on recueille les coordonnées spatiales des centres approximatifs des noyaux marqués par le Ki-67, cellule par cellule. Dans chaque échantillon, de 972 à 1950 cellules ont ainsi été prises en compte dans notre étude, selon la densité cellulaire du champ. En pratique, on a utilisé les coordonnées spatiales des centres des noyaux marqués obtenues lors de l'étude en sociologie cellulaire. Le protocole d'acquisition de ces coordonnées sera donc détaillé dans le paragraphe consacré à l'étude de cette dernière. Puis un logiciel développé par V.

Sharifi (122) a permis d'obtenir à partir des coordonnées spatiales des cellules, trois graphes représentant les diagrammes des index d'hétérogénéité dans les trois dimensions, horizontale, verticale et diagonale. Les trois graphes sont grossièrement parallèles dans les trois directions pour un même index d'hétérogénéité.

#### **1.3.4. Sociologie Cellulaire.**

Les outils mathématiques de la Sociologie Cellulaire ont été utilisés pour établir les relations de voisinage des cellules en cycle et hors cycle, et pouvoir ainsi appréhender leur distribution spatiale. Ainsi qu'il a été exposé au début de ce chapitre, un polygone de Voronoï a été généré à partir de chaque cellule d'un spécimen tissulaire ; l'ensemble des polygones de Voronoï d'un spécimen a représenté le diagramme de Voronoï de ce spécimen.

##### **1.3.4.1. Paramètres retenus pour l'étude.**

A partir des données des diagrammes obtenus pour chaque échantillon, on a retenu les paramètres décrits en début de chapitre :

- ✓ l'aire moyenne  $A$  des polygones de Voronoï ;
- ✓ la densité cellulaire  $1/A$  ;
- ✓ la mesure de la forme moyenne d'occupation de l'espace : caractérisée par le facteur de forme moyen  $RFav$  ;
- ✓ les mesures des hétérogénéités surfaciques et géométriques, quantifiées respectivement par les facteurs  $AD$  et  $RFH$ .

##### **1.3.4.2. Acquisition des images à partir des lames marquées au Ki-67.**

Pour l'étude en sociologie cellulaire, il a été nécessaire d'obtenir des images numérisées à partir des lames lues au microscope. Les acquisitions ont été faites à haut débit au moyen du système Samba2050<sup>TM</sup> (société Samba Technologies). Ce système remplace le microscope par un outil de navigation sur lame virtuelle. Il comporte un microscope Olympus Bx-40f à lumière transmise sur lequel a été montée une camera CCD Spot Insight 1600x1200 avec un focus permettant une vitesse d'acquisition de 2000  $\mu\text{m}/\text{sec}$ , et une résolution de 0,5  $\mu\text{m}$ . Le microscope reçoit les lames d'un chargeur d'une capacité de 50 lames relié à une platine automatisée, le tout permettant l'encodage des positions des

lames. La précision du pas de navigation est supérieure à 5  $\mu\text{m}$  . Le tout est relié à un ordinateur (figure 25 ).

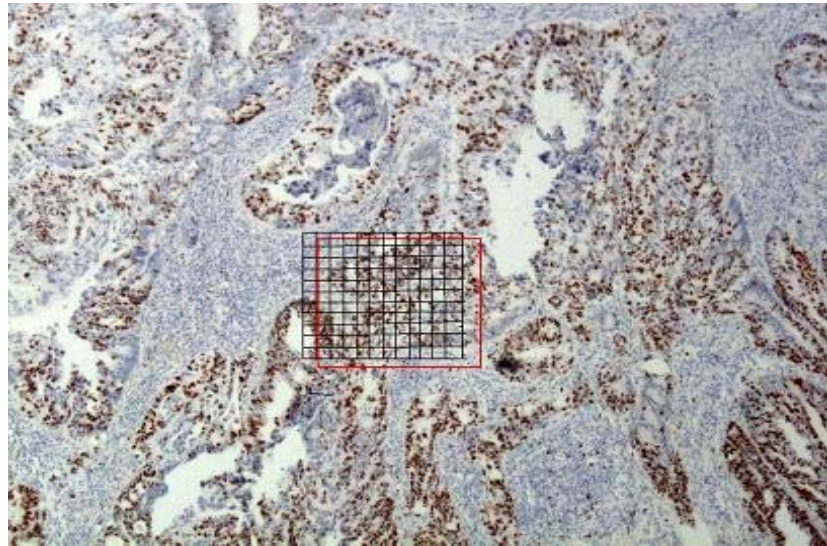


**Figure 25 : Station de travail pour l'acquisition des images et la navigation sur lame virtuelle . Le chargeur automatique de lames est sur la gauche (flèche).**

Après acquisition, la navigation sur la lame virtuelle se fait aux différents grossissements au moyen du logiciel Navicap (Samba Technologies).

L'acquisition a débuté en scannant les lames entières marquées au Ki-67 au grossissement x10. A partir de ces lames entières le pathologiste a retrouvé les zones d'intérêt correspondant aux spots virtuels définis précédemment. Parmi ces dernières, celles qui ont été jugées le plus représentatives de la tumeur (en général en plein développement de la tumeur, correspondant au spot B) ont été scannées au grossissement x20 ; pour une même tumeur comportant plusieurs contingents morphologiquement très différents (correspondant à des zones de différenciations histologiques différentes), plusieurs zones d'intérêt ont pu être choisies. En outre, des zones de même taille en tissu sain adjacent à la tumeur (spots virtuels D) ont également été retenues. Sur les zones sélectionnées l'utilisation du logiciel TMACrop (Samba technologies) a permis de mettre en place une grille virtuelle, composée de vignettes carrées de 600  $\mu\text{m}$  de côté dont le nombre est adaptable à la taille de la zone choisie (figure 26). Chaque vignette est répertoriée avec sa

cote dans un fichier et pourra ainsi être rappelée pour être analysée. La suite des opérations s'est faite en travaillant sous un logiciel libre de traitement et d'analyse d'images ( ImageJ, programme adapté par par Paul Chew [-chew@c.s.cornell.edu](mailto:chew@c.s.cornell.edu). Revised : August 2005).



*Figure 26 : exemple de positionnement de la grille virtuelle sur une zone d'intérêt (carré rouge). Marquage au Ki-67.*

#### **1.3.4.3. Positionnement des germes**

Le positionnement des centres approximatifs des noyaux marqués par Ki-67 (colorés en rouge) a été fait de façon manuelle par le pathologiste sur l'image des vignettes récupérées dans leur répertoire spécifique, copiée puis renommée pour pouvoir être ouverte sous ImageJ. Puis le positionnement des centres des noyaux non marqués par Ki-67 (colorés en bleu) a été obtenu en procédant de la même façon.

Chaque vignette a été considérée comme une population de cellules.

Les données recueillies, concernant entre autres la taille des structures marquées et le positionnement des germes dans le plan, ont été enregistrées. 972 à 1950 cellules ont été étudiées par vignette, ce nombre qui représente la totalité des cellules de chaque vignette étant fonction de la densité cellulaire de la zone tumorale concernée.

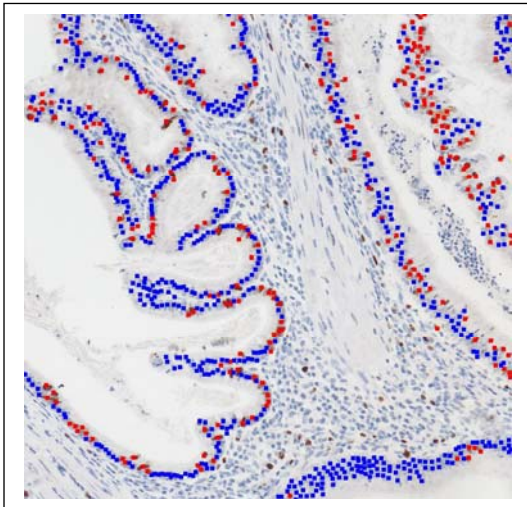
#### **1.3.4.4. Calcul des paramètres .**

Un applet développé au laboratoire pour cette étude par Redha Heus a permis de construire les polygones de Voronoï à partir des données enregistrées des cellules. Ces données concernent :

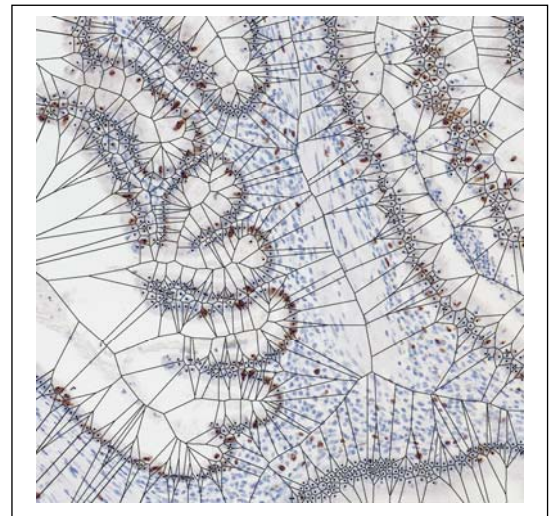


- ✓ le statut marqué ou non de la cellule ;
- ✓ la surface ;
- ✓ les coordonnées par rapport à deux axes X et Y du noyau (où un germe a été déposé par le pathologiste);
- ✓ les coordonnées par rapport à ces axes du centre de gravité des polygones ;
- ✓ le périmètre moyen de chaque polygone ;
- ✓ le facteur de forme ;
- ✓ le nombre de cellules marquées proches voisines ;
- ✓ le nombre de cellules négatives proches voisines ;
- ✓ la distance à la plus proche voisine marquée et la distance à la plus proche voisine négative.

On a effectué une correction des effets de bord en éliminant les polygones marginaux, qui ne possèdent pas une information complète sur leur voisinage. On a ainsi constitué une fenêtre d'échantillonnage qui contient la population des cellules analysées (figures 27 et 28)



**Figure 27: marquage des germes sur une vignette de lame marquée par le Ki-67. Les noyaux marqués par le Ki-67 sont représentés par des germes rouges, les noyaux négatifs sont représentés par des germes bleus.**



**Figure 28: construction d'un diagramme de Voronoï à partir de noyaux marqués par le Ki-67. Les noyaux marqués par le Ki-67 apparaissent bruns**

## **1.4. Expression des résultats.**

### **1.4.1. Etude histologique.**

L'évaluation de l'index mitotique a été faite sur le microscope Polyvar de Reichert-Jung utilisé lors de la relecture des lames, et l'index mitotique a été évalué comme suit :

- ✓ de 1 à 25 mitoses : 1 ;
- ✓ de 26 à 50 mitoses : 2 ;
- ✓ plus de 50 mitoses : 3.

### **1.4.2. Evaluation des marquages immunohistochimiques.**

La lecture des résultats s'est faite dans tous les cas au microscope optique, et a évaluée de façon semi-quantitative, les seuils étant différents pour chaque anticorps, déterminés soit par les travaux antérieurs quand cela était possible (Ki-67), soit de façon arbitraire par comparaison avec un tissu non tumoral ( $\beta$ -caténine, Cycline D1). Pour le Ki-67, seul un marquage nucléaire était considéré comme positif ; une lecture globale de la lame entière a permis d'évaluer la distribution du marquage, généralement hétérogène, et de sélectionner 10 zones correspondant chacune à la surface couverte par 10 champs consécutifs au grossissement 400,<sup>1</sup> comme représentatives du marquage de l'ensemble de la lame, le résultat définitif étant représenté par le pourcentage moyen de cellules marquées. Ce pourcentage a permis de constituer un index comme suit :

- ✓ absence de marquage : 0 ;
- ✓ de 1 à 15% de cellules marquées : 1 ;
- ✓ de 16 à 29% de cellules marquées : 2 ;
- ✓ 30% et plus de cellules de cellules marquées : 3.

Par ailleurs pour ce marquage, deux classes ont été constituées, en séparant les marquages faibles, modérés ou forts mais inférieurs à 60%, et les très forts marquages (égaux ou supérieurs à 60%). Un témoin positif interne, généralement un groupe de lymphocytes marqués sur la coupe, était exigé pour prendre en considération ce marquage. Les autres marqueurs ont également été lus suivant la même méthodologie que le Ki-67, l'appréciation de la représentativité du marquage se faisant marqueur par marqueur (les zones choisies pouvant donc différer pour chaque marqueur). Pour la  $\beta$ -caténine, trois types d'expression de la protéine (nucléaire, cytoplasmique, membranaire), chacun ayant

une signification biologique spécifique reconnue, ont été pris en compte. Le pourcentage de cellules marquées a servi à l'établissement d'un index analogue à celui du Ki-67 ; il n'a pas été tenu compte de l'intensité du marquage lors de l'étude statistique ; celle-ci a cependant été analysée de façon purement descriptive ; il n'a pas été réalisé de index en croisant le pourcentage des cellules marquées avec l'intensité du marquage. Un échantillon de cancer du sein comportant du tissu non tumoral et de positivité connue pour les trois types d'expression de la protéine, a constitué un témoin positif externe après avoir fait l'objet d'un marquage lors de la même séance et avec les mêmes lots de réactifs. Pour la Cycline D1, une évaluation similaire à celle de la  $\beta$ -caténine a été effectuée : établissement sur 10 champs consécutifs au grossissement 400, du pourcentage des cellules présentant un marquage cytoplasmique ou/et un marquage nucléaire, puis d'un index avec les mêmes seuils que pour la  $\beta$ -caténine ; l'intensité des marquages a fait l'objet d'une analyse purement descriptive ; il n'a pas été effectué de index avec l'intensité du marquage. Ici encore, un échantillon de cancer du sein comportant du tissu non tumoral et de positivité connue pour la Cycline D1, a constitué un témoin positif externe après avoir été marqué en même temps. Pour Bcl-2, un marquage cytoplasmique a été considéré comme positif, le témoin positif interne étant représenté par la population lymphocytaire au cytoplasme marqué, au contact de la tumeur.

Pour chaque échantillon, la valeur de l'immunomarquage a été établie en tenant compte des pourcentages de marquage d'une part, et des index de marquage d'autre part. Chaque spot a été lu individuellement, l'évaluation se faisant au moyen des index de marquage, cet index nous semblant plus pertinent par rapport à notre problématique (qui était l'étude de concordance entre les lectures des spots et des lames entières). La valeur des index de la lame entière a ensuite été comparée aux valeurs individuelles des 3 spots, puis à la valeur de la moyenne du marquage des trois spots.

En outre, le marquage par Ki- 67 sur muqueuse non tumorale (adjacente à la tumeur et à distance de la tumeur) a été apprécié sur lame entière en divisant la crypte en trois zones, basale (tiers profond), intermédiaire, luminale (tiers superficiel) ainsi que dans la zone intercryptique.

---

<sup>1</sup> 1 champ au grossissement 400 correspond sur le microscope utilisé à  $620 \mu^2$ .

### **1.4.3. Index d'hétérogénéité.**

Les paramètres pris en compte ont été les coordonnées spatiales des centres approximatifs des noyaux des cellules positifs pour le Ki-67. Les résultats ont été exprimés en échelle logarithmique sur les trois graphes dans trois dimensions générées par les coordonnées spatiales.

### **1.4.4. Sociologie Cellulaire.**

Chaque observation, cellule par cellule, a pris en compte les renseignements concernant chaque cellule, définie par l'aire du polygone généré, son marquage au Ki67, le nombre de cellules voisines positives, la distance aux cellules positives voisines, son facteur de forme et son périmètre. On peut donc dire que chaque observation a correspondu à une cellule. L'analyse s'est faite selon le marquage positif ou négatif au Ki-67 et a consisté en mesures du nombre moyen de cellules voisines positives et négatives, la distance moyenne à ces cellules, ainsi qu'en fonction des variables quantitatives suivantes (indice résumant l'information décrite ci-dessus par patient):

- ✓ le désordre surfacique des polygones (AD) qui décrit l'hétérogénéité d'occupation de l'espace par les cellules ;
- ✓ l'homogénéité géométrique des polygones (RFH) qui décrit l'homogénéité des distributions locales au sein de la population ;
- ✓ la forme moyenne des polygones (RFav) qui décrit la population en spécifiant la disposition moyenne des cellules les unes par rapport aux autres.
- ✓ La densité cellulaire moyenne déduite de l'aire des polygones.

Les 3 premiers paramètres ont permis la mesure de la topographie, en mesurant la forme moyenne, le désordre géométrique et le désordre surfacique des formes élémentaires du pavage de l'espace de Voronoi.



## **2. RESULTATS**

La relecture des lames, qui a confirmé dans tous les cas le diagnostic initial de la tumeur, a permis de focaliser sur des points précis, peu exploités lors de l'examen initial, tel l'état de la muqueuse non tumorale. C'est à partir des résultats de cette relecture qu'a été appréhendé le profil de prolifération de la muqueuse au cours de la progression tumoral, et qu'on a pu y intégrer les bouleversements architecturaux observés.

Les modifications observées en muqueuse normale au contact de la tumeur font l'objet de la première partie de ce chapitre. Elles permettent d'individualiser la zone immédiatement adjacente à la tumeur comme ayant sa propre spécificité. Nous avons donc établi son profil immuno-histochimique en tant qu'entité propre.

Nous avons ensuite établi les profils immuno-histochimiques des lésions dysplasiques et des cancers. Nous avons ainsi pu comparer le profil des cancers à celui des tissus normaux et des tissus dysplasiques. La synthèse de ces résultats est fournie sous forme graphique.

L'étude du marquage immuno-histochimique soulève le problème de l'hétérogénéité de distribution du marquage dans les tissus cancéreux : nous avons évalué l'hétérogénéité de ce marquage à l'échelon tissulaire par la méthode des « spots virtuels », et l'hétérogénéité du marquage à l'échelon de la différenciation cellulaire des cancers, en établissant un index d'hétérogénéité des tumeurs.

Enfin, les résultats de l'étude en Sociologie cellulaire nous ont permis de quantifier les désordres architecturaux et de distribution spatiale des cellules dans les cancers, et de les comparer aux résultats obtenus sur tissu normal.

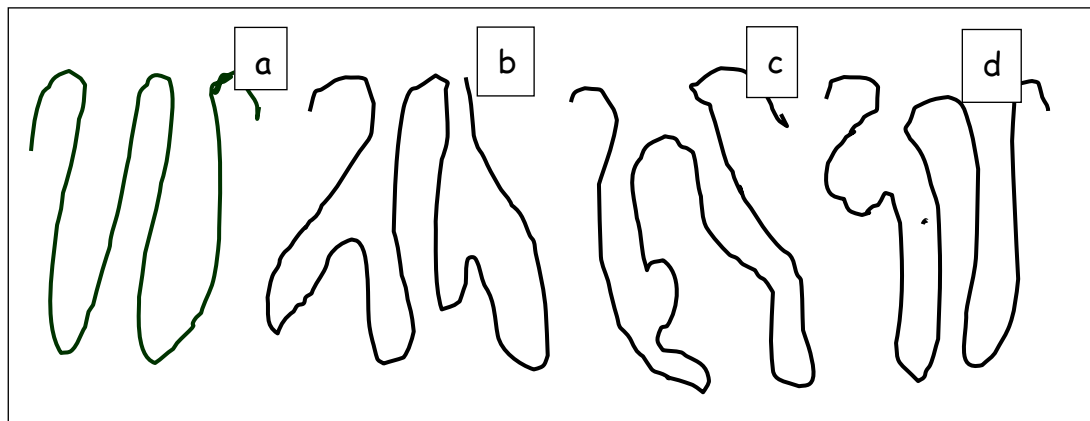
### **2.1. Etat de la muqueuse au voisinage de la tumeur.**

#### **2.1.1. Aspects histologiques : existence de gradients d'épaisseur et de densité des cryptes , de la muqueuse adjacente à la muqueuse à distance de la tumeur**

L'architecture générale des cryptes ainsi que l'épaisseur de la muqueuse, varient en fonction de la distance plus ou moins grande de la tumeur.

Les cryptes ont différents aspects (figure 29) :

- ✓ normales et droites, plus ou moins longues suivant l'épaisseur de la muqueuse, avec un abouchement individuel à la lumière (a) ;
- ✓ déformées et tortueuses, avec un abouchement élargi, mais toujours individuel (c) ;
- ✓ soit encore incomplètement fissurées, avec un abouchement unique, souvent très élargi, pour plusieurs fonds de cryptes se regroupant à hauteur variable en un corps unique (b) ;
- ✓ plus rarement, on trouve des bourgeonnements latéraux d'une crypte unique (d).



**Figure 29: diverses formes de cryptes observées en muqueuse non tumorale.**

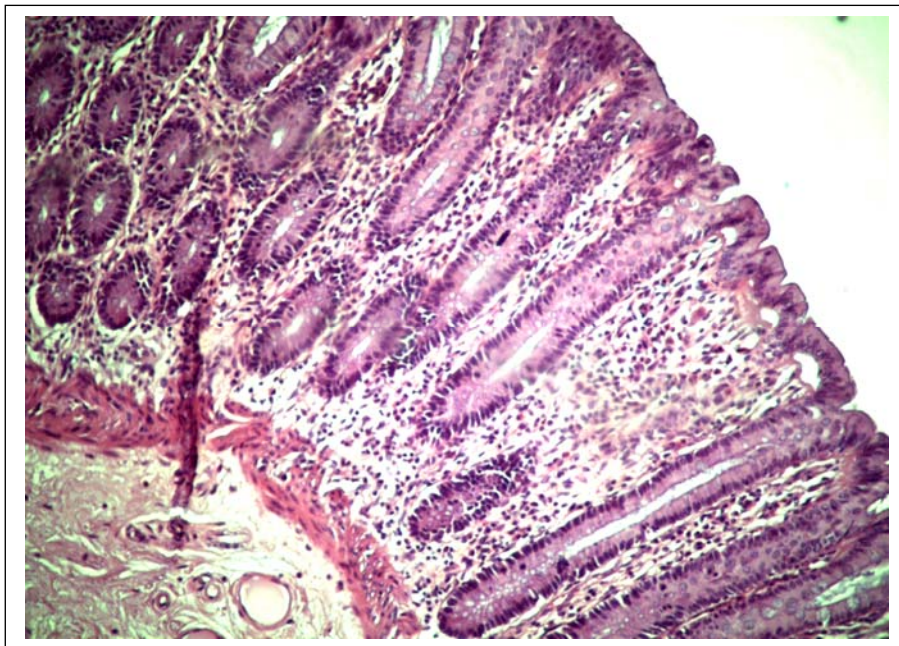
*a : cryptes normales ; b : fissions basales incomplètes ; c : déformations ; d : bourgeonnements.*

On observe ces diverses formes tout au long de la muqueuse, mais avec une distribution qui varie en fonction de leur topographie.

La muqueuse immédiatement adjacente à la tumeur montre un nombre particulièrement important de fissions incomplètes, le plus souvent doubles mais parfois triples, voire multiples. La muqueuse à distance comporte également des fissions, mais beaucoup plus rares, et quelques déformations simples. En muqueuse intermédiaire la distribution des cryptes anormales est proche de celle observée en zone adjacente à la tumeur. Les images de bourgeonnements latéraux sont extrêmement rares et leur distribution est indépendante de leur distance à la tumeur (figure 30). L'épaisseur de la muqueuse est également modifiée en fonction de la distance à la tumeur.

La muqueuse non tumorale adjacente à la tumeur a une épaisseur à peu près double de celle de la muqueuse à distance. Elle compte en revanche une densité de cryptes totales bien inférieure (environ 8 cryptes par mm contre 10 cryptes par mm de muqueuse à distance), avec un nombre de cryptes anormales augmenté (plus d'une crypte anormale par mm, contre 0,5 crypte anormale par mm de muqueuse à distance).

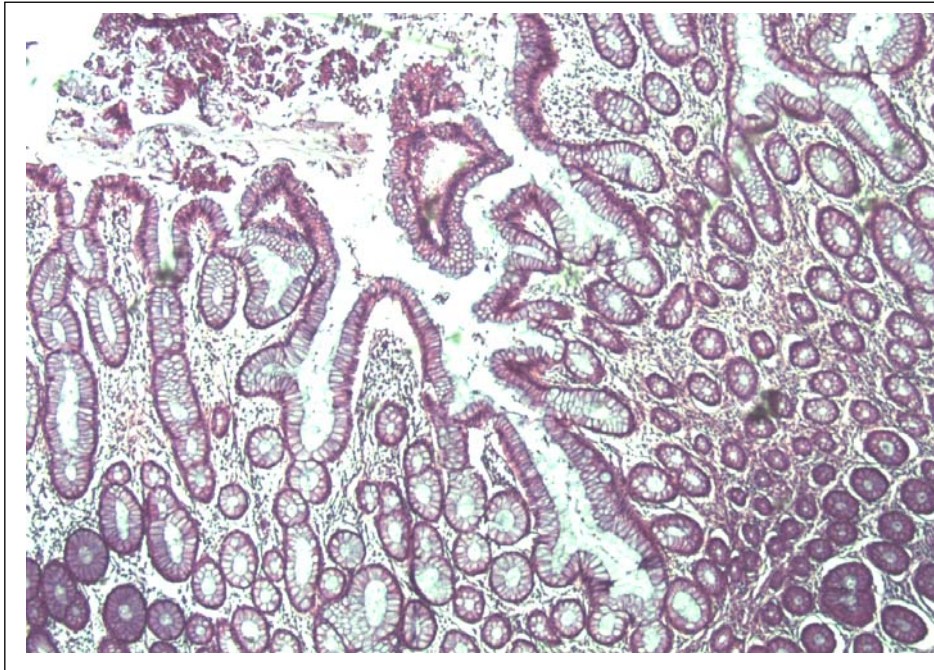
La muqueuse intermédiaire a une épaisseur intermédiaire entre les deux, avec une densité en cryptes (normales et anormales) sensiblement analogue à celle de la muqueuse à distance (moyenne de 34 cryptes, soit environ 8 cryptes par mm de muqueuse, dont 4 cryptes anormales, soit environ 1 crypte anormale par mm de muqueuse) (figures 31, 32 et 33).



*Figure 30 : muqueuse à distance de la tumeur. HESx20.*



*Figure 31: muqueuse adjacente à la tumeur :vue d'ensemble.  
HESx20. Fissions basales incomplètes (flèche).*



*Figure 32 : muqueuse adjacente à la tumeur. HESx20.  
Abouchement unique pour plusieurs cryptes.*





**Figure 33 : muqueuse adjacente à la tumeur. bourgeoisements latéraux (flèche).(HESx40).**

La comparaison du nombre des cryptes normales et anormales et de l'épaisseur de la muqueuse selon la localisation considérée a utilisé un test de Wilcoxon apparié. Il montre une diminution progressive significative de l'épaisseur de la muqueuse ainsi qu'une augmentation progressive significative du nombre total des cryptes, lorsqu'on s'éloigne de la tumeur. Le nombre de cryptes anormales est significativement augmenté dans la muqueuse adjacente à la tumeur par rapport à la muqueuse à distance ( $p < 0.00001$ ) mais non par rapport à la muqueuse intermédiaire) (tableau 4)

**Tableau 4: épaisseur moyenne de la muqueuse non tumorale et nombre de cryptes par séquences de 4 mm.**

	<i>Épaisseur moyenne (mm)</i>	<i>Nombre moyen de cryptes par séquence de 4mm</i>	<i>Nombre moyen de cryptes anormales pour 4 mm</i>
<i>Muqueuse adjacente à la tumeur n=25</i>	0.915	25	5
<i>Muqueuse intermédiaire n=25</i>	0.740 (M :	34	4
<i>Muqueuse à distance n=25</i>	0.480	39	2

**Tableau 5 : l'épaisseur de la muqueuse et le nombre des cryptes sont statistiquement corrélées à la distance par rapport à la tumeur (test de Wilcoxon).**

	<i>Nb cryptes</i>	<i>Nb cryptes anormales</i>	<i>Epaisseur</i>
<i>muqueuse adjacente</i> / <i>muqueuse intermédiaire</i> <i>muqueuse intermédiaire</i>	$p = 0.0005$	$p = 0.0812$	$p = 0.0003$
<i>muqueuse à distance</i> / <i>muqueuse adjacente</i>	$p = 0.0001$	$p = 0.0010$	$p < 0.00001$
<i>muqueuse à distance</i> / <i>muqueuse à distance</i>	$p < 0.00001$	$p = 0.0001$	$p < 0.00001$

## **2.1.2. Evaluation des marqueurs du cycle cellulaire.**

### **2.1.2.1. Dans la muqueuse à distance de la tumeur ,**

le Ki-67 marque les noyaux des cellules du tiers inférieur des cryptes, avec une moyenne de 27% de cellules marquées (de 2 à 60% selon les échantillons). Dans huit cas le marquage remonte jusqu'à la moitié de la crypte, mais il est alors bien moins important (de 2 à 10%) ; dans trois cas cette remontée est occasionnelle avec de 2 à 10% de cellules marquées sur la moitié de la crypte.

La  $\beta$ -caténine a une expression principalement membranaire, avec un fort niveau dans l'épithélium de revêtement et intercryptique mais avec un niveau plus faible dans le tiers inférieur des cryptes, y compris deux cryptes fissurées. Il existe une remontée du marquage membranaire au-delà du tiers inférieur dans deux cas. Un marquage cytoplasmique est associé dans trois cas à ce marquage membranaire, dans l'épithélium intercryptique et superficiel. Elle n'a pas d'expression nucléaire dans cette région.

La Cycline D1 a une expression principalement nucléaire, et assez faible, réduite à 2 à 3 noyaux isolés le long des cryptes et de l'épithélium superficiel et intercryptique, dans la plupart des cas. Cependant dans 6 cas on observe un marquage nucléaire plus important, de 2 à 10% des noyaux : il se localise alors au fond des cryptes. Il n'y a pas de marquage cytoplasmique.

Bcl-2 montre un marquage cytoplasmique dans tous les cas sauf deux. Il intéresse uniquement quelques groupes de cellules au fond des cryptes. 10% à 100% des cryptes sont marquées suivant les échantillons, avec une moyenne de 65% de cryptes marquées.

L'intensité du marquage est assez faible, sauf pour le cas où toutes les cryptes sont marquées.

#### **2.1.2.2. Dans la muqueuse adjacente à la tumeur,**

le Ki-67 a le même profil de marquage dans la zone immédiatement adjacente à la tumeur et dans la muqueuse intermédiaire, avec une moyenne de 33% de cellules marquées (de 2 à 70% selon les échantillons). Ce marquage est cantonné au fond des cryptes dans 84% des échantillons, tandis que dans 6% des cas il intéresse toute la moitié inférieure de la crypte.

La  $\beta$ -caténine a une expression principalement membranaire dans 20 à 90% des tumeurs. Le marquage intéresse l'épithélium de surface et le fond des cryptes, mais également dans 40% des cas les côtés de la crypte (région médiane). Il est d'intensité modérée à forte dans la région intercryptique et l'épithélium de surface des cryptes (avec à ce niveau quelques recrudescences en « coup d'ongle »), modérée à faible au fond des cryptes et faible, le cas échéant, quand les cellules de la région médiane des cryptes sont marquées. La  $\beta$ -caténine a également une expression cytoplasmique dans 72% des cas. Cette expression est faible à modérée, distribuée essentiellement dans l'épithélium intercryptique de revêtement (42% des cas), et pour une part moindre au fond des cryptes (30% des cas). Les deux localisations sont associées dans 30% des cas. En revanche l'expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine est rare : 8% des cas ont un marquage de moins de 2% de noyaux au fond des cryptes, 4% des cas ont un marquage d'environ 10% de noyaux au fond des cryptes, et dans 4% des cas le marquage intéresse seulement quelques noyaux (<2%) dans l'épithélium intercryptique.

La Cycline D1 a une expression nucléaire soit absente ( 48% des cas) soit réduite à quelques noyaux isolés au fond des cryptes (moins de 2% des noyaux dans 42% des cas) ; ce marquage remonte parfois tout le long de l'épithélium cryptique (2% des cas avec 5% de noyaux marqués). Seuls 8% des cas montrent un marquage conséquent de 10 à 20% des noyaux, strictement localisé au fond des cryptes. Son expression cytoplasmique est rare, de faible à très faible intensité le long de tout l'épithélium (22% des cas), d'intensité modérée au fond des cryptes (10% des cas).

Le marquage par Bcl-2 intéresse environ 25% des cryptes et est réduit à quelques groupes de cellules au fond des cryptes.

### 2.1.2.3. Marquage des cryptes anormales.

Aussi bien dans la muqueuse adjacente à la tumeur que dans la muqueuse à distance et dans la muqueuse intermédiaire, les cryptes anormales présentent un marquage analogue à celui des cryptes normales.

Dans ces structures le marquage moyen par Ki-67 est d'environ 20% des cellules du fond des cryptes. L'expression de la  $\beta$ -caténine est essentiellement membranaire, localisée à l'épithélium de surface et au fond des cryptes. Le marquage nucléaire d'une cellule isolée peut s'observer occasionnellement. On ne retrouve pas d'expression de la Cycline D1. On n'observe pas de marquage par Bcl-2.

Dans quelques cas de cryptes à fissions basales multiples et incomplètes et à bourgeonnements latéraux, la  $\beta$ -caténine membranaire conservée se retrouve non seulement en surface et au fond des bourgeonnements et fissions, mais également dans les zones d'aboutissement de ces bourgeonnements et fissions, colocalisant avec la cycline D1 cytoplasmique et avec le marquage par Ki-67 ; il n'y a alors pas d'expression de Bcl-2.

Le tableau 6 montre les valeurs en pourcentages de cellules marquées en muqueuse normale, à distance, adjacente et intermédiaire à la tumeur. Ces résultats ne sont pas statistiquement discriminants entre les différentes populations.

**Tableau 6 : valeurs moyennes en pourcentages de cellules marquées dans la muqueuse non tumorale, à distance et adjacente à la tumeur.**

*Les résultats en muqueuse intermédiaire n'ont pas été pris en compte dans ce tableau.*

	<i>muqueuse à distance de la tumeur n=25</i>	<i>muqueuse adjacente à la tumeur n=25</i>
<i>Ki-67</i>	<i>27.00</i>	<i>33.35</i>
<i><math>\beta</math>-caténine membranaire</i>	<i>75.71</i>	<i>52.27</i>
<i><math>\beta</math>-caténine cytoplasmique</i>	<i>0.71</i>	<i>9.56</i>
<i><math>\beta</math>-caténine nucléaire</i>	<i>0.00</i>	<i>1.94</i>
<i>Cycline D1 nucléaire</i>	<i>1.00</i>	<i>1.17</i>
<i>Cycline D1 cytoplasmique</i>	<i>0.00</i>	<i>4.58</i>
<i>Bcl-2</i>	<i>2.00</i>	<i>3.30</i>



## **2.2. Profil de prolifération des cellules dysplasiques et cancéreuses.**

La prolifération à l'intérieur des lésions dysplasiques et cancéreuses a été appréciée d'une part par le nombre des cellules en mitose (cellules proliférantes) et d'autre part en appréciant les cellules en cycle et les cellules engagées dans la voie Wnt (cellules prolifératives).

### **2.2.1. L'activité mitotique est importante, mais non discriminante entre cancers et dysplasies.**

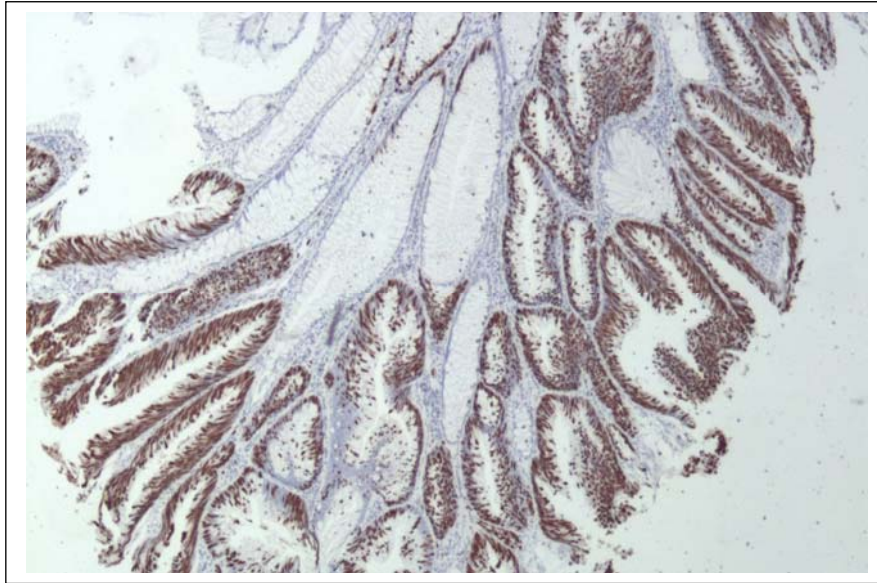
Les 11 lésions dysplasiques étudiées ont un compte de mitoses allant de 1 à 52 avec une médiane à 29 (index mitotique 2). Les cancers ont de 3 à 70 mitoses, avec une médiane de 34 (index mitotique 3). Il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre les deux populations quant au nombre de mitoses.

### **2.2.2. Evaluation des marqueurs du cycle cellulaire.**

**2.2.2.1. Profil de marquage des lésions dysplasiques : une hétérogénéité intra-lésionnelle importante, une activité proliférative marquée, la conservation de l'expression membranaire de la  $\beta$ -caténine caractérisent ces lésions** (tableau 7).

Dans ces lésions, les marqueurs de la prolifération cellulaire montrent une très grande hétérogénéité intra-tumorale, tant dans le nombre des cellules marquées selon les régions, que dans l'intensité du marquage et dans sa distribution. Par contre il existe dans ce groupe de lésions une certaine homogénéité inter-lésionnelle.

L'antigène Ki-67 (figure 34) est fortement exprimé. Il comporte une distribution très hétérogène, pouvant varier dans la même lésion entre 20% et 80% de cellules marquées. Il est localisé dans le tiers inférieur des cryptes dans tous les cas sauf 2 où il se retrouve préférentiellement dans le tiers supérieur de cryptes et l'épithélium intercryptique.

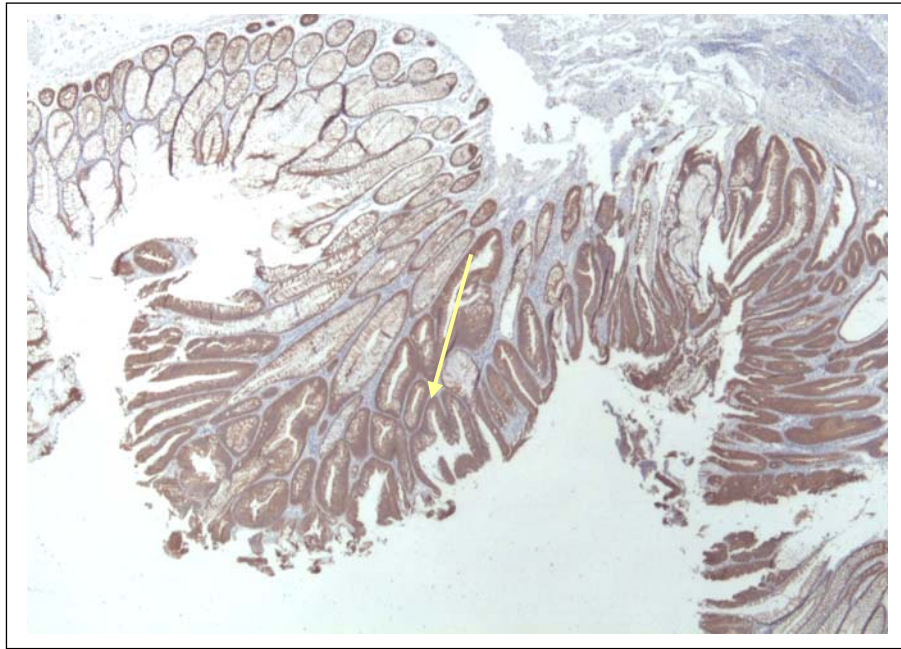


**Figure 34 : Adénome tubulovilleux en dysplasie.**

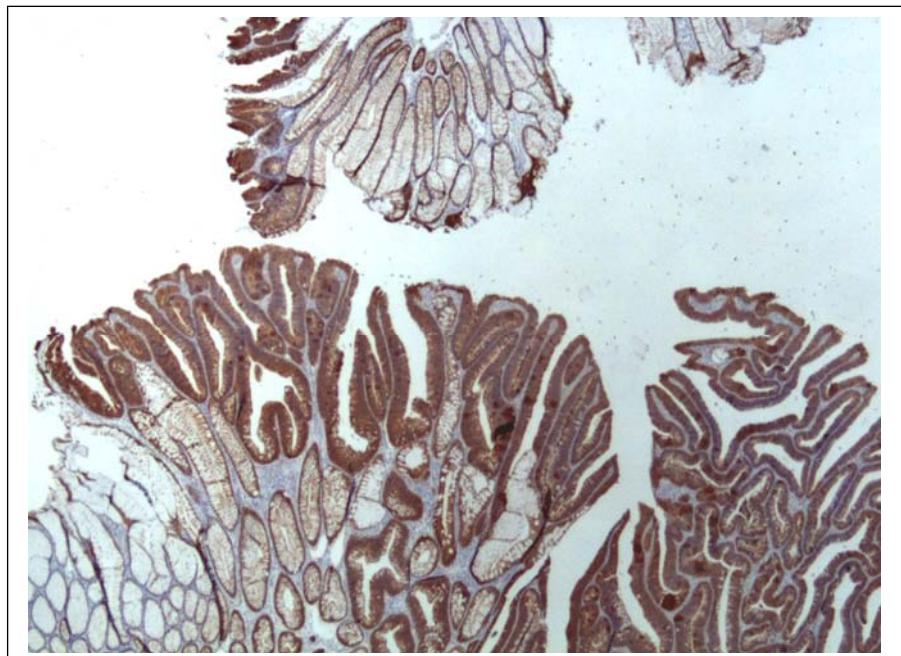
*Ki-67x20 : topographie du marquage*

La  $\beta$ -caténine a une expression membranaire prédominante (figures 35, 36, 37), toujours présente et très importante dans les lésions dysplasiques quel que soit leur degré, où elle marque complètement de 30 à 100% des membranes (avec un index égal ou supérieur à deux). Sa distribution et son intensité sont hétérogènes, avec quelques recrudescences « en coup d'angle » autour de cellules isolées, souvent dans l'épithélium intercryptique. La  $\beta$ -caténine comporte également une expression nucléaire dans ces lésions. Cette expression est d'importance moyenne (index inférieur à 2). Seuls six cas l'expriment de façon notable (index égal ou supérieur à 2). Ce marquage intéresse essentiellement l'épithélium intra-cryptique dans deux cas.

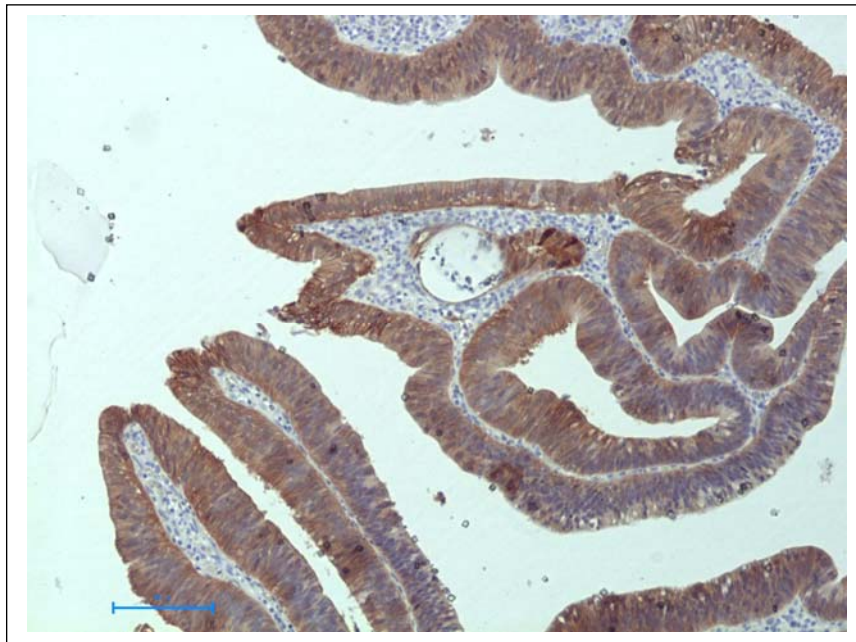
Les expressions membranaire et nucléaire de la  $\beta$ -caténine coexistent parfois dans la même cellule. L'expression cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine n'est présente que dans 50% des lésions dysplasiques, et est alors faible à modérée. Seuls 2 cas (un dysplasie de bas degré, une dysplasie de haut degré) l'expriment fortement, avec un index supérieur ou égal à 2. Sa distribution et son intensité sont assez homogènes.



**Figure 35 : Adénome tubulovilleux en dysplasie de degré bas et de degré élevé.**  
 *$\beta$ -caténine x4: le marquage est faible dans la zone de dysplasie de degré bas (flèche)*



**Figure 36 : Adénome tubulovilleux. : jonction dysplasies bas degré-degré élevé.**  
 *$\beta$ -caténine x20 : zone de jonction marquage fort-marquage faible*

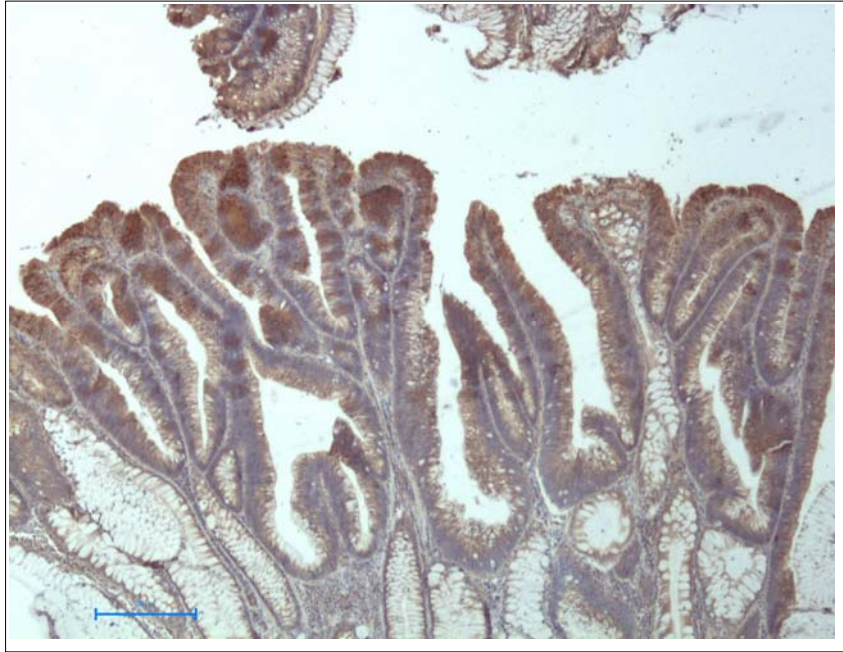


**Figure 37 : Adénome tubulovilleux en dysplasie de degré élevé.**

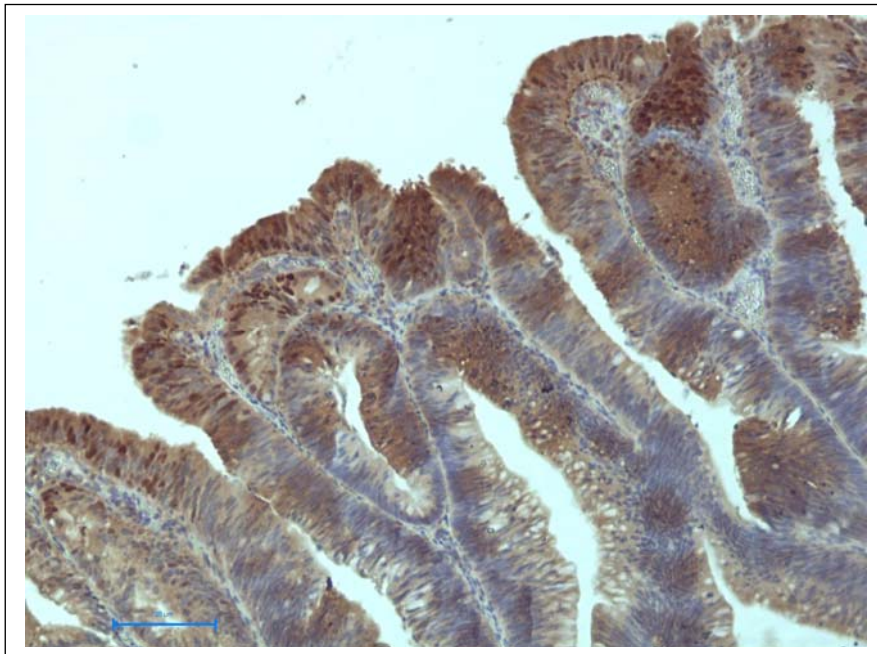
*$\beta$ -caténine x10 : marquage cytoplasmique intense,  
marquage nucléaire et conservation des membranes  
en zone de dysplasie intense.*

La Cycline D1 a une expression nucléaire forte dans la moitié des lésions dysplasiques, tous degrés confondus. Deux cas (une dysplasie de bas degré, une dysplasie de haut degré) l'expriment fortement (figures 38 et 39). Elle n'est pas exprimée dans les autres lésions. Sa topographie recouvre en la débordant la zone d'expression de la  $\beta$ -caténine nucléaire. Elle se localise également dans des cellules isolées. Son expression cytoplasmique est présente dans 30% environ des lésions, et y est faible. Une dysplasie de bas degré et une dysplasie de degré élevé l'expriment cependant fortement. Elle n'est pas retrouvée dans les autres cas. Sa distribution est hétérogène, sans topographie particulière.





**Figure 38 : Adénome tubulovilleux en dysplasie de degré élevé.**  
*cycline D1 x4 : topographie du marquage, intense en surface  
 et dans l'épithélium de revêtement.*



**Figure 39 : Adénome tubulovilleux en dysplasie de degré élevé.**  
*Cycline D1x10 : marquage nucléaire dans l'épithélium de revêtement  
 et la partie superficielle des glandes de surface*



L'antigène Bcl-2 est faiblement exprimé dans le fond des cryptes dans moins de la moitié des lésions dysplasiques (4 cas). Un cas de dysplasie de degré élevé montre une forte expression de cet antigène. Ailleurs il n'est pas exprimé.

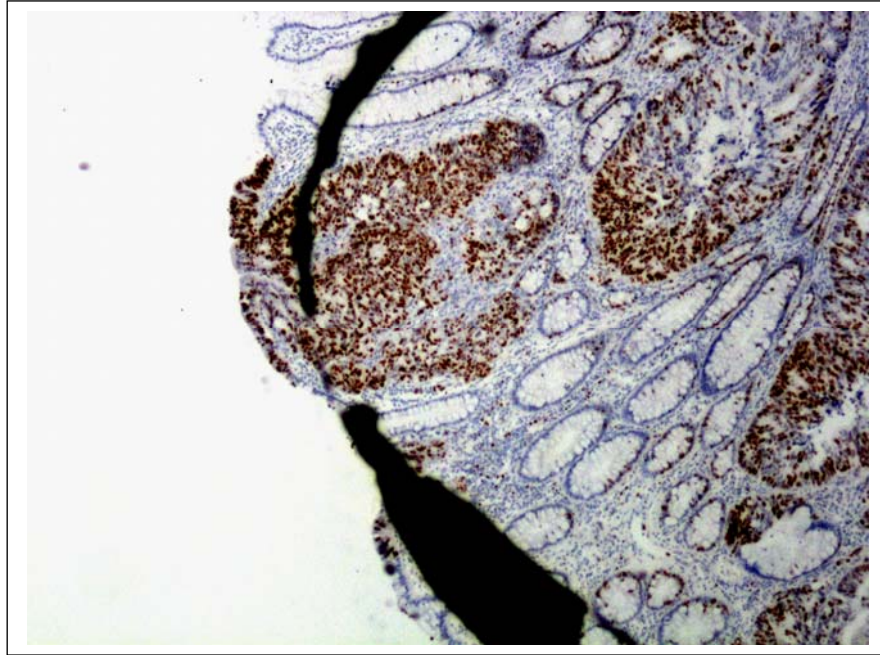
Au total, les lésions dysplasiques, tous degrés confondus, s'individualisent des tissus normaux dont le marquage a été détaillé ci-dessus, par une élévation significative des cellules en cycle marquées par le ki-67 ( test de Wilcoxon :  $p=0.0422$  ), tandis qu'il existe seulement une tendance à plus forte concentration en  $\beta$ -caténine cytoplasmique ( $p=0.0556$ ).

#### **2.2.2.2. Profil de marquage des cancers invasifs.**

Ils sont caractérisés par une activité proliférative élevée, la disparition de la  $\beta$ -caténine membranaire, l'accentuation des localisations nucléaires des marqueurs (tableau 7).

On retrouve dans les cancers invasifs, comme dans les lésions dysplasiques, une forte tendance à l'hétérogénéité du marquage intra-tumoral. Cette hétérogénéité concerne les pourcentages de cellules marquées, l'intensité du marquage et sa distribution. Cependant, elle est ici moins importante que dans les lésions dysplasiques, dans la mesure où beaucoup de marqueurs peuvent avoir un fort niveau d'expression, notamment en pourcentages de cellules, ce qui lisse les irrégularités. Par ailleurs, contrairement aux lésions dysplasiques, il existe dans ce groupe une grande hétérogénéité inter-tumorale.

L'antigène Ki-67 (figure 40) est de façon générale exprimé à un niveau très élevé, avec un marquage supérieur à 60% des cellules dans 41 cancers. Parmi les 34 cas où il est moyen, 6 tumeurs ont un marquage bas, inférieur à 20% des cellules. Sa distribution est caractérisée par une très grande hétérogénéité intra-tumorale (dans une même tumeur, le marquage peut intéresser de 10 à 80% des cellules selon la zone). Il a parfois une surexpression localisée à la surface de la tumeur (11 cas), rarement une surexpression dans la région contiguë à la muqueuse non tumorale (2 cas). Il n'a été exprimé en surface que dans le reste de la tumeur, et 2 fois cette surexpression s'est localisée latéralement, dans la région contiguë à la muqueuse non tumorale.



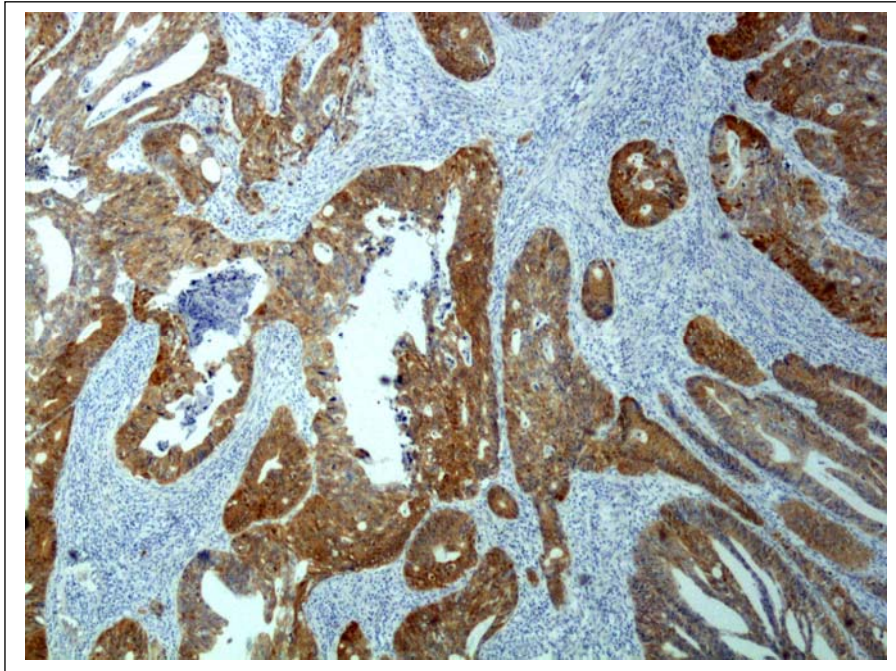
**Figure 40 : Adénocarcinome lieberkuhnien peu différencié**

*Ki67x4 : marquage très important dans la zone de dysplasie de degré élevé*

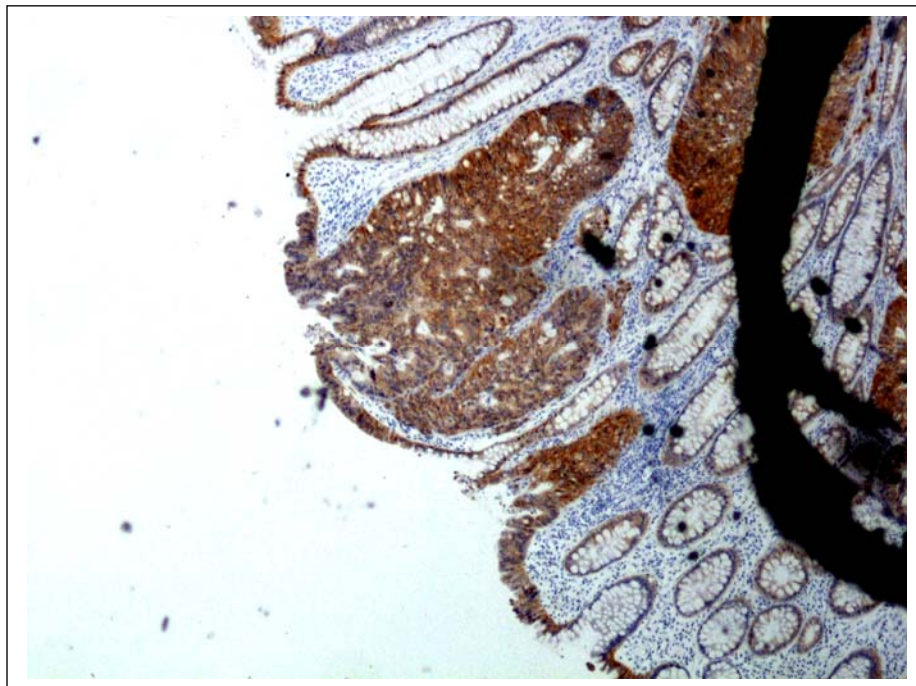
La  $\beta$ -caténine a une expression variable (figures 41, 42 et 43). La  $\beta$ -caténine membranaire est conservée dans tous les cas sauf 4. Son expression est forte dans 40 tumeurs, avec un index égal ou supérieur à 2, avec cependant un marquage incomplet des membranes dans plus d'un cas sur trois. Sa localisation est très hétérogène, avec des zones de perte totale du marquage, notamment en surface. Son intensité est forte ; elle souligne souvent des cellules isolées ou en petits groupes. L'expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine est le cas le plus fréquent, elle est soit importante (19 cas), soit faible à modérée (26 cas). Elle marque préférentiellement les zones les moins différenciées dans une même tumeur. Dans trois cas elle est localisée en surface, dans trois cas elle prédomine dans les zones contiguës à la muqueuse non envahie. L'expression cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine est retrouvée dans une majorité de cas (40 tumeurs), elle est forte dans 8 cas, modérée dans 20, faible dans 12. Elle ne présente pas de distribution particulière.

La Cycline D1 (figures 44 et 45) montre une expression nucléaire fréquente, le plus souvent modérée (33 cas) mais parfois forte (10 cas). Elle recouvre, en les débordant largement, les zones de marquage de la  $\beta$ -caténine, ainsi que du Ki-67. Elle est accentuée dans 2 cas au contact de la muqueuse non tumorale, dans 7 cas en surface. L'expression cytoplasmique de la Cycline D1 est moins fréquente : forte dans 3 cas, faible à modérée dans 9 cas, et sans distribution préférentielle. L'antigène Bcl-2 est modérément exprimé dans 4 tumeurs.

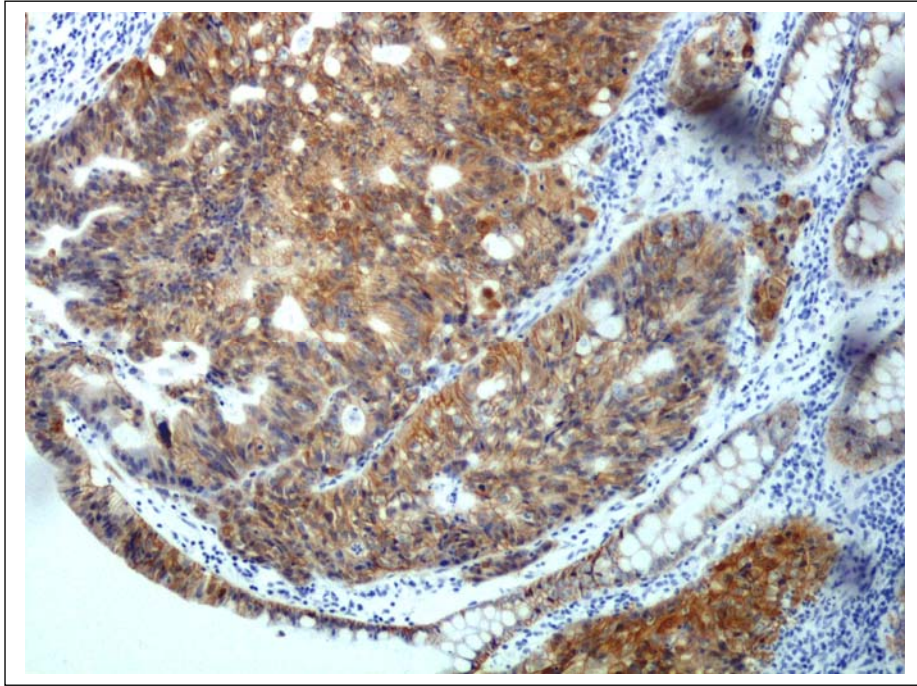




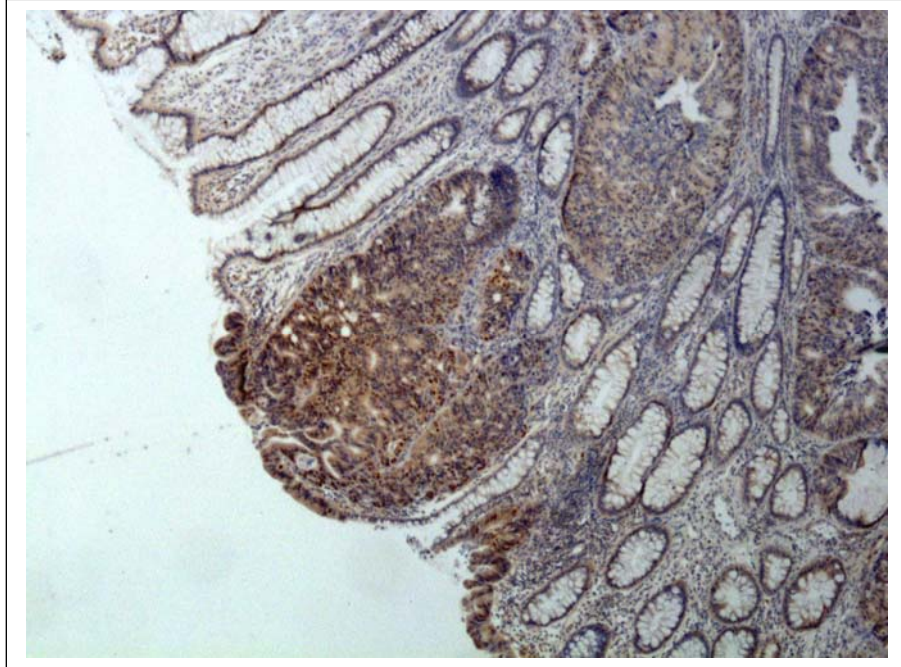
**Figure 41 : Adénocarcinome lieberkuhnien peu différencié**  
 *$\beta$ -caténin ex4 : marquage cytoplasmique et nucléaire fort dans une zone carcinomateuse ;  
disparition du marquage membranaire.*



**Figure 42 : Adénocarcinome lieberkuhnien peu différencié;**  
 *$\beta$ -caténine x4 : marquage cytoplasmique et nucléaire fort en surface  
sur dysplasie de grade élevé*

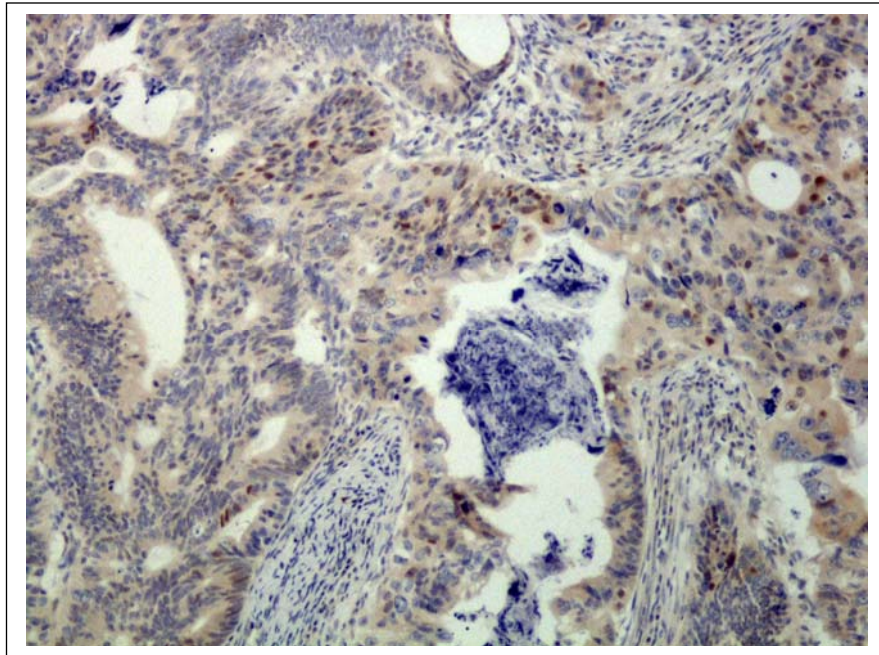


*Figure 43 : Adénocarcinome lieberkuhnien peu différencié.  
 $\beta$ -caténine x10 : même zone que figure 42.*



*Figure 44 : Adénocarcinome lieberkuhnien peu différencié.  
Cycline D1x4 : marquage nucléaire et cytoplasmique fort dans la dysplasie  
de grade élevé en surface.*





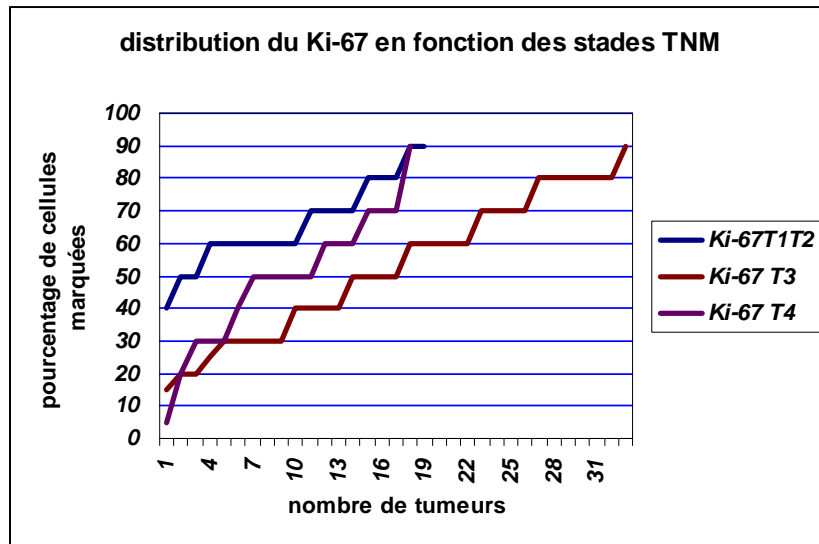
**Figure 45 : Adénocarcinome lieberkuhnien peu différencié.**  
*Cycline D1x10 : marquage nucléaire fort .*

La Cycline D1 cytoplasmique est fortement exprimée dans 3 cancers, et faiblement à fortement exprimée dans 9 cas. La distribution de la Cycline D1 nucléaire a tendance à recouvrir, en la débordant largement, celle de la  $\beta$ -caténine, ainsi que celle du Ki-67, et a été trouvée 2 fois accentuée au contact de la muqueuse non tumorale et 7 fois en surface ; la distribution de la Cycline D1 cytoplasmique ne montre pas de particularité.

Dans le tissu cancéreux, il existe une élévation significative, confirmée par le test de Kruskal-Wallis, à la fois de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique et de la Cycline D1 nucléaire dans la population tumorale ayant un Ki-67 élevé, supérieur ou égal à 60% de marquage cellulaire, par rapport aux tumeurs ayant un Ki-67 inférieur (respectivement  $p = 0.030$  et  $p = 0.005$ ). Il y a donc bien un lien entre l'importance des cellules en cycle d'une part, l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme d'autre part, et l'importance de la Cycline D1 nucléaire dans ces lésions.

L'expression des marqueurs du cycle cellulaire est largement en corrélation avec le statut pTNM des tumeurs, qui est un indicateur d'agressivité. En effet, le Ki-67 est très élevé dans le groupe des tumeurs T1-T2, puis diminue en gradient descendant dans les T3, puis les T4 (Kruskal-

Wallis :  $p = 0.044$ ). Si l'on isole dans les dysplasies le groupe des dysplasies élevées ou cancers in situ, c'est là que le Ki-67 a les valeurs les plus faibles. Les Ki-67 supérieurs à 60% se retrouvent préférentiellement dans les tumeurs T1-T2 (test de Pearson,  $p=0.024$ ) (figure 46). Ceci doit être mis en relation avec l'importance des mitoses dans ces mêmes tumeurs T1-T2 ( Pearson  $p = 0.025$ ).



**Figure 46: distribution du Ki-67 en fonction des stades pTNM.**  
*Le Ki-67 des tumeurs T1-T2 se situe dans la zone des valeurs élevées, ce qui est statistiquement significatif par rapport aux deux autres groupes*

Parallèlement, plus il y a de mitoses dans ces tumeurs, plus le Ki-67 augmente (Kruskal-Wallis:  $p=0.014$ ). En revanche, la  $\beta$ -caténine cytoplasmique est faible dans les tumeurs comportant peu de mitoses (Kruskal-Wallis:  $p = 0.020$ ).

Les marqueurs du cycle permettent dans une grande mesure de discriminer les cancers des tissus normaux d'une part, des dysplasies d'autre part. Dans l'ensemble, les marqueurs du cycle sont plus fortement exprimés dans les cancers que dans les tissus normaux. Ainsi, le test de Wilcoxon révèle une élévation significative du Ki-67 dans les cancers par rapport aux tissus normaux, ainsi que de la  $\beta$ -caténine nucléaire, de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique, de la Cycline D1 nucléaire et de la Cycline D1 cytoplasmique (avec pour toutes ces variables,  $p = 0.0001$ ). Seule l'expression membranaire de la  $\beta$ -caténine ne montre pas de différence significative entre les deux populations. Les tissus cancéreux, invasifs et in situ, se différencient des dysplasies par une expression plus élevée de  $\beta$ -caténine cytoplasmique ( $p = 0.037$ ), tandis que l'expression des autres

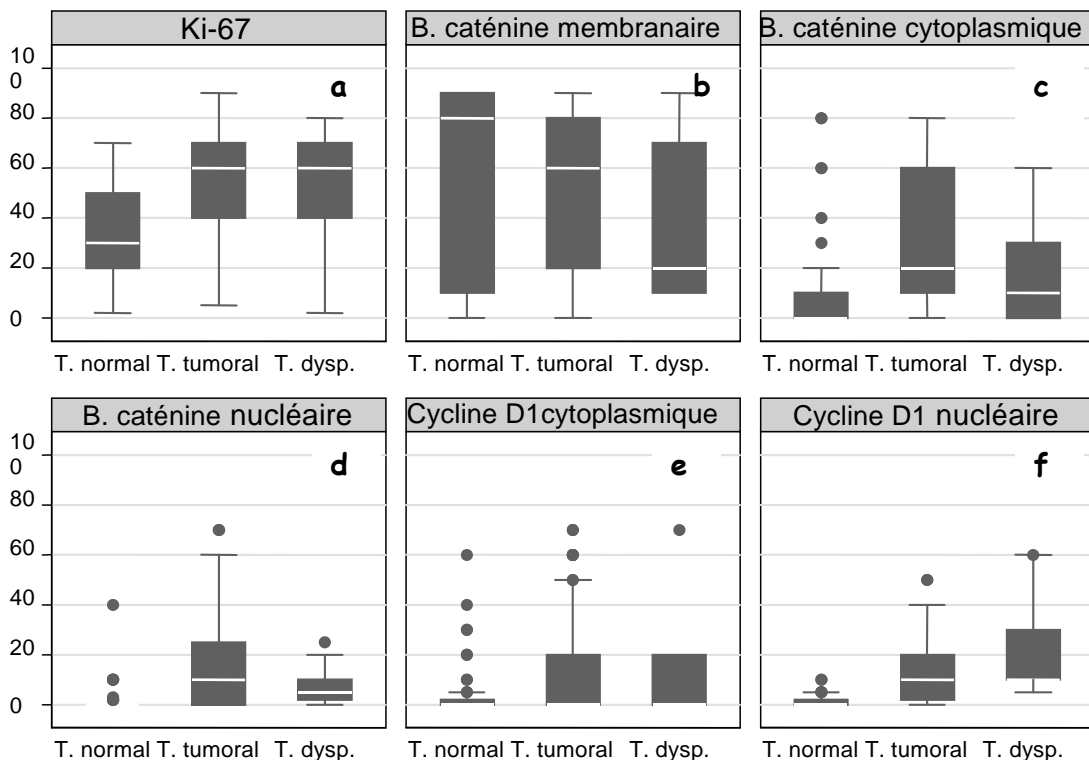
marqueurs n'est pas discriminante entre les deux populations. L'accumulation cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine semble donc être un point clé dans l'évolution des lésions.

Ces résultats sont récapitulés dans le tableau 7.

**Tableau 7 : valeurs moyennes en pourcentages de cellules marquées dans la muqueuse dysplasique et dans les cancers invasifs**

	<i>Dysplasies n=11</i>	<i>Cancers invasifs n=47</i>
<i>Ki-67</i>	63.00	54.87
<i><math>\beta</math>-caténine membranaire</i>	32.00	48.73
<i><math>\beta</math>-caténine cytoplasmique</i>	22.00	30.96
<i><math>\beta</math>-caténine nucléaire</i>	7.40	14.68
<i>Cycline D1 nucléaire</i>	19.00	14.51
<i>Cycline D1</i>	8.40	12.99
<i>Bcl-2</i>	0.00	5.00

La figure 47 donne une synthèse des résultats et les comparaisons des niveaux des différents marqueurs pour les populations examinées.



**Figure 47 : comparaison des niveaux d'expression des différents marqueurs .**

**a :** le marqueur Ki-67 a globalement un haut niveau d'expression dans les cancers et dans les lésions dysplasiques, où il présente cependant une limite supérieure plus basse. Ce sont les hautes valeurs de cette limite supérieure, égales et supérieures à 60%, qui seront discriminantes pour les différentes populations ( $p = 0.0001$ ), entre tissu cancéreux et tissu normal ( $p = 0.0422$ ) et entre dysplasie et tissu normal ( $p = 0.0000$ ) mais non entre dysplasies et cancers.

**b :** la  $\beta$ -caténine membranaire a un très haut niveau d'expression dans les lésions bénignes mais également dans la population cancéreuse.

**c :** la  $\beta$ -caténine cytoplasmique a un niveau d'expression nettement plus élevé dans les cancers que dans les autres conditions. Ceci est statistiquement significatif entre tissu cancéreux et tissu non tumoral ( $p = 0.0001$ ), tissu cancéreux et dysplasie ( $p = 0.037$ ) mais pas entre tissu normal et dysplasie (tendance :  $p = 0.0556$ ).

**d :** la  $\beta$ -caténine nucléaire est rarement exprimée en tissu non tumoral, a un niveau d'expression très bas pour les lésions dysplasiques et nettement plus élevé pour les cancers. Ceci est statistiquement significatif entre tissu cancéreux et tissu normal ( $p = 0.0001$ ) mais non entre tissu cancéreux et dysplasie ni entre tissu normal et dysplasie.

**e :** la Cycline D1 cytoplasmique est très rarement exprimée dans le tissu normal, à des taux variables ; son niveau d'expression est analogue dans le tissu tumoral et le tissu dysplasique. Ceci discrimine les populations normale et dysplasique ( $p = 0.0038$ ) et les populations normales et cancéreuses ( $p = 0.0422$ ), mais non les populations cancéreuses et dysplasiques.

**f :** la Cycline D1 nucléaire n'est qu'occasionnellement exprimée dans le tissu non tumoral, son expression est maximale dans le tissu dysplasique. Elle a un pouvoir discriminant entre les populations normale et cancéreuse ( $p = 0.0001$ ), normale et dysplasique ( $p = 0.0422$ ) mais non entre les populations cancéreuse et dysplasique.

L'expression de Bcl-2, faiblement exprimé dans tous les cas de figure, n'est pas prise en compte dans l'expression des résultats.

Les résultats fournis par la lecture classique des lames immunomarquées n'ont pas pris en compte l'hétérogénéité du marquage : nous l'avons évaluée par deux protocoles séparés, l'un sur

spots virtuels suivant la technique exposée au chapitre « matériels et méthodes », l'autre au moyen de l'index d'hétérogénéité spatiale, exposé dans le même chapitre.

## **2.3. Hétérogénéité de l'échantillonnage .**

### **2.3.1. Approche par la méthode des spots virtuels.**

L'hétérogénéité du marquage soulève la question de la validité de l'échantillonnage pour les marqueurs étudiés ici, et singulièrement, lors des études sur lames de tissu-micro-arrays (TMAs). Pour répondre à cette question, nous avons choisi de travailler sur des « spots virtuels ». La surface de ces spots correspond globalement à la surface d'un spot de TMA de 2 mm de diamètre (diamètre supérieur des spots courants de TMA). Cette méthodologie garantit l'homogénéité du traitement entre lame entière et spots, puisqu'il s'agit de la même lame. Pour la même raison elle permet de certifier que les cellules marquées et non marquées sur les spots correspondent aux mêmes cellules marquées et non marquées lues sur la lame entière.

#### **2.3.1.1. Appréciation des mitoses sur « spots virtuels »<sup>1</sup>.**

La zone de surface A des lésions de dysplasie basse a un compte de mitoses allant de 1 à 29 avec une médiane à 14 (index mitotique 1) tandis que dans les lésions de dysplasie élevée ce compte va de 8 à 47 avec une médiane à 20 ( index 2).

Dans les cancers invasifs la zone A comporte de 1 à 70 mitoses avec une médiane à 24 (index 2). La zone centrale B des lésions de dysplasie basse comporte de 1 à 35 mitoses avec une médiane à 14 (index 1). La zone B des lésions de dysplasie élevée comporte de 13 à 52 mitoses avec une médiane à 33 (index 2). La zone B des cancers invasifs comporte de 1 à 70 mitoses avec une médiane à 24 (index 2). La zone profonde C des lésions de dysplasie basse comporte de 6 à 40 mitoses avec une médiane à 23 (index 2). La zone C des lésions de dysplasie élevée comporte de 6 à 40 mitoses avec une médiane à 23 (index 3). La zone C des cancers invasifs comporte de 1 à 69 mitoses avec une médiane à 18 (index 1).

#### **2.3.1.2. Profil immuno-histochimique des spots virtuels.**

---

<sup>1</sup> Pour rappel: spot A: surface de la tumeur; spot B: plein développement; spot C: zone profonde; la zone D à la jonction entre tumeur et tissu sain, n'est pas triatée ici et sera exploitée lors de l'étude en Sociologie Cellulaire.

Dans les dysplasies de bas degré, tous les spots observés ont conservé l'expression membranaire de la  $\beta$ -caténine. L'expression la plus forte, égale ou supérieure à 20% de cellules marquées (index 2 et 3), s'est retrouvée en profondeur (spot C). L'expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine a été sensiblement similaire dans les trois spots, assez faible à modérée, égale ou inférieure à 20% (index 1 et 2). La distribution du marquage par la  $\beta$ -caténine cytoplasmique est analogue pour les trois niveaux, superficiel, de plein développement des lésions et profond. La Cycline D1, tant nucléaire que cytoplasmique, est plus exprimée en superficie (spot A). C'est également en superficie que le Ki-67 a été le plus exprimé.

Dans les lésions de degré élevé de dysplasie, la superficie et la région de plein développement des lésions (spots A et B) montrent un index très faible d'expression membranaire de la  $\beta$ -caténine, tandis que la profondeur (spot C) ne l'exprime pas. L'expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine, assez faible dans les trois spots, a cependant été trouvée élevée en superficie pour une lésion. La distribution du marquage par la  $\beta$ -caténine cytoplasmique est analogue dans les 3 régions. La Cycline D1 nucléaire et cytoplasmique a également eu une expression analogue, avec une localisation nucléaire très faible voire nulle, dans les trois régions (à l'exception d'une lésion qui l'a assez fortement exprimée en superficie). Comme dans les lésions de degré bas de dysplasie, c'est dans la région superficielle que le Ki-67 a été le plus élevé.

Ces différences de distribution des marqueurs ne sont cependant pas statistiquement significatives.

Environ 40% des cancers invasifs (23, 22 et 23 cancers en A, B et C respectivement) n'expriment pas la  $\beta$ -caténine membranaire. Pour ceux qui l'expriment, il n'y a pas de différence significative entre les trois régions. En revanche plus de la moitié d'entre eux (38, 36 et 29 cancers en A, B et C respectivement) expriment la  $\beta$ -caténine nucléaire, sans différence significative d'expression entre les trois niveaux étudiés.

Comme pour les dysplasies de degré bas ou élevé, la distribution du marquage par la  $\beta$ -caténine cytoplasmique ne montre pas de différence significative selon les niveaux.

Il n'y a pas non plus de différence significative entre les spots dans l'expression de la Cycline D1, tant nucléaire que cytoplasmique, importante dans 18 cas (superficie, spot A), 16 cas (plein développement de la tumeur, spot B) et 15 cas (profondeur, spot C). Les mêmes similitudes se retrouvent dans l'expression du Ki-67, élevée dans 45 cas (spot A), 46 cas (spot B) et 43 cas (spot C).



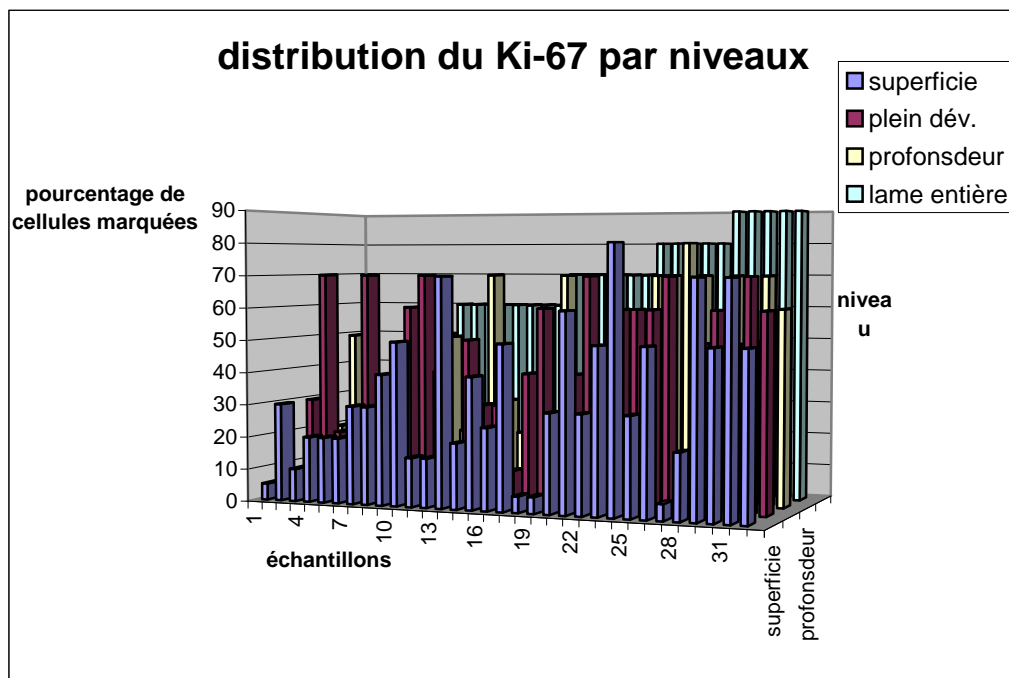
### 2.3.1.2. Concordances des lectures sur spots virtuels.

La distribution des trois marqueurs étudiés dans les différentes populations ne montre donc pas de différence statistiquement significative selon les trois niveaux, superficiel, de plein développement des lésions, et profond, étudiés. Cependant cette homogénéité globale de marquage n'est pas retrouvée lorsqu'on étudie la concordance des marquages des spots d'une même lame entre eux et lorsqu'on les compare à l'estimation du marquage sur la lame entière.

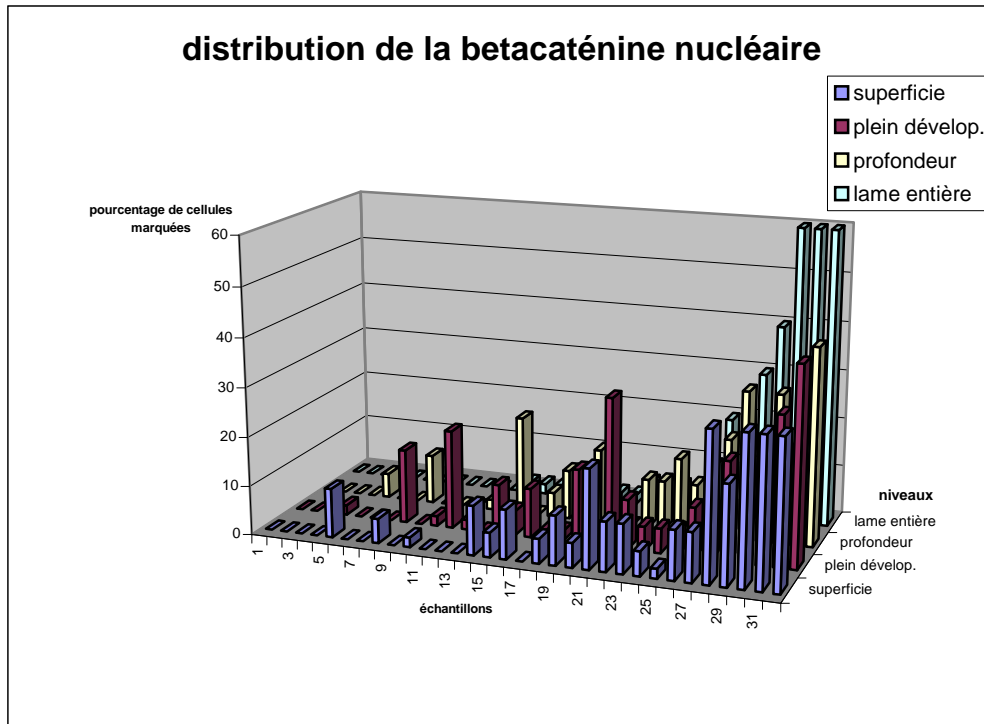
La lecture des spots virtuels montre que la  $\beta$ -caténine nucléaire est assez homogène dans les divers spots, comme l'atteste le test de Wilcoxon apparié, qui montre une bonne concordance de l'expression de chaque spot avec l'expression moyenne du marqueur appréciée sur la lame entière (le coefficient de concordance est supérieur à 0.8). L'expression du Ki-67 du spot intéressant le plein développement de la tumeur concorde avec l'expression moyenne du Ki-67 lue sur la lame entière (avec un bon coefficient de concordance, de l'ordre de 0.919). Il n'y a pas d'autre concordance avec les autres marqueurs, ni des spots entre eux ni des spots avec la lame entière, ce qui montre une importante hétérogénéité du marquage entre les spots.

(coefficient de concordance inférieur ou égal à 0.4).

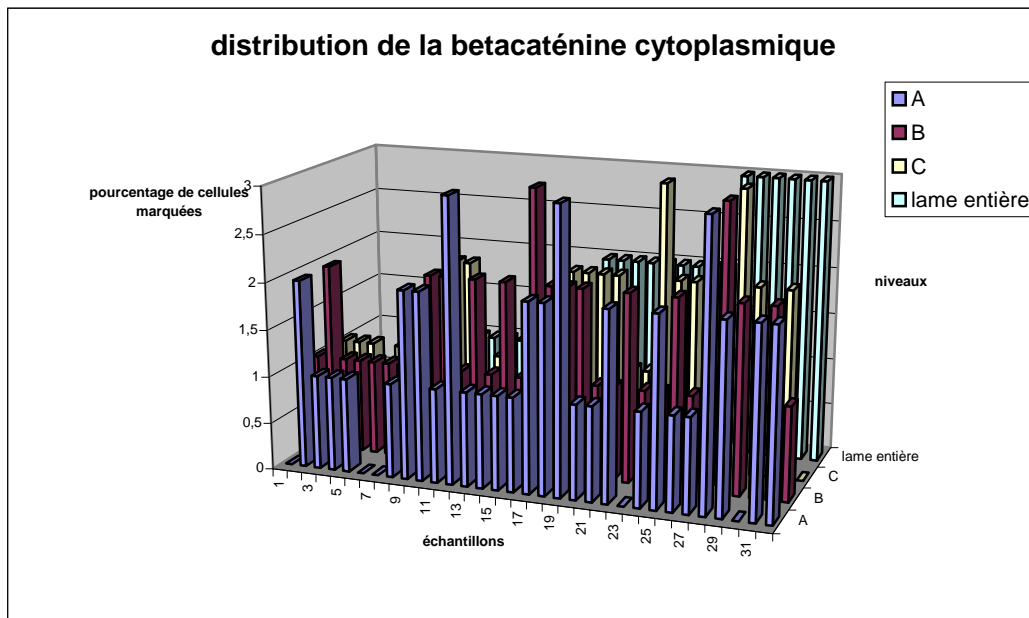
La distribution des différents marqueurs selon les niveaux est représentée dans les histogrammes des figures 48 à 51.



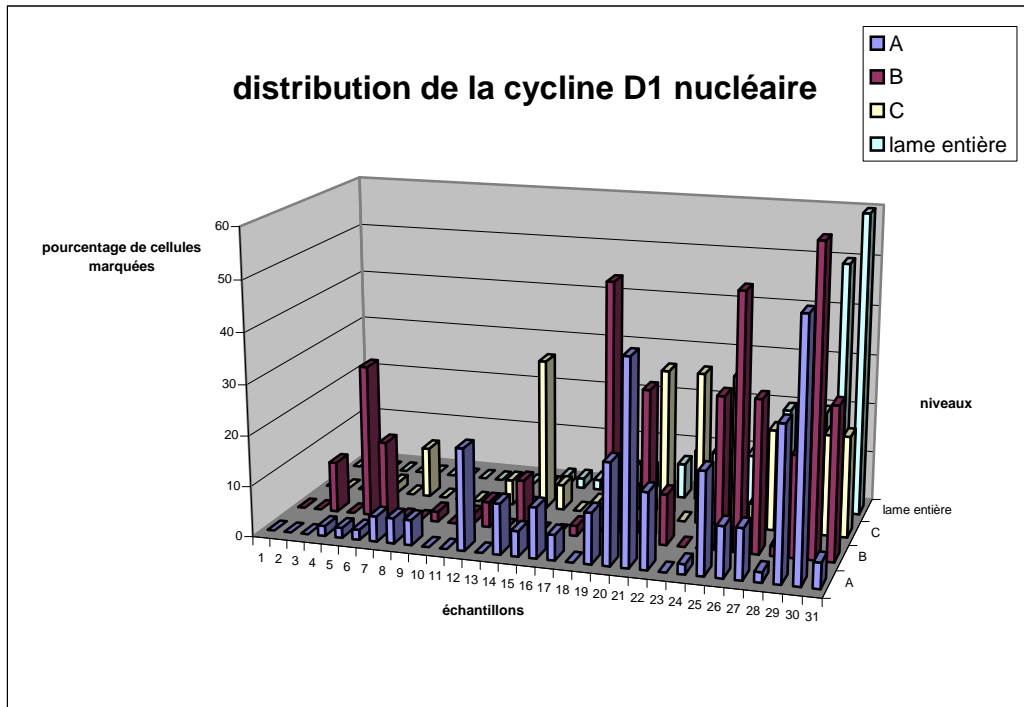
**Figure 48: histogramme de distribution du Ki-67 suivant les niveaux, dans les cancers. Seul le niveau de plein développement est en concordance avec la lame entière (coefficient de concordance : 0,919)**



**Figure 49:** histogramme de distribution de la  $\beta$ -caténine nucléaire suivant les niveaux. Il existe une bonne concordance des trois niveaux étudiés avec la lame entière (coefficients de concordance : 0,8485 en superficie ; 0,9212 en plein développement ; 0,8526 en profondeur).



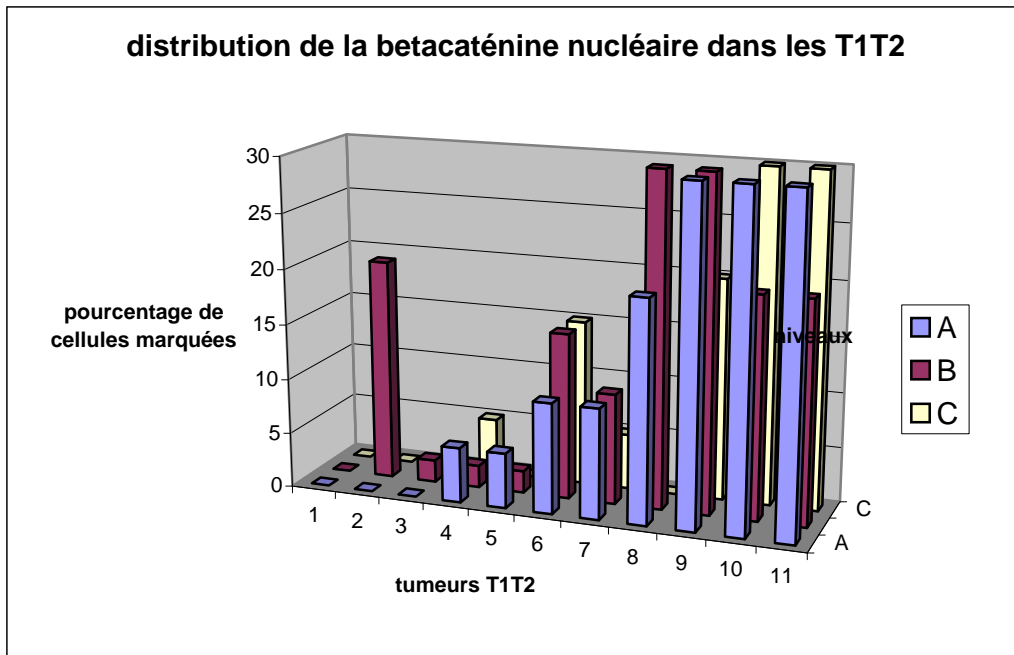
**Figure 50:** histogramme de distribution de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique suivant les niveaux. Malgré une expression élevée similaire du marqueur dans les trois niveaux et sur la lame entière, il n'y a pas concordance.



**Figure 51 : histogramme de distribution de la Cycline D1 nucléaire suivant les niveaux**  
*Les trois niveaux étudiés ne montrent pas de concordance entre eux ni avec les résultats de la lame entière.*

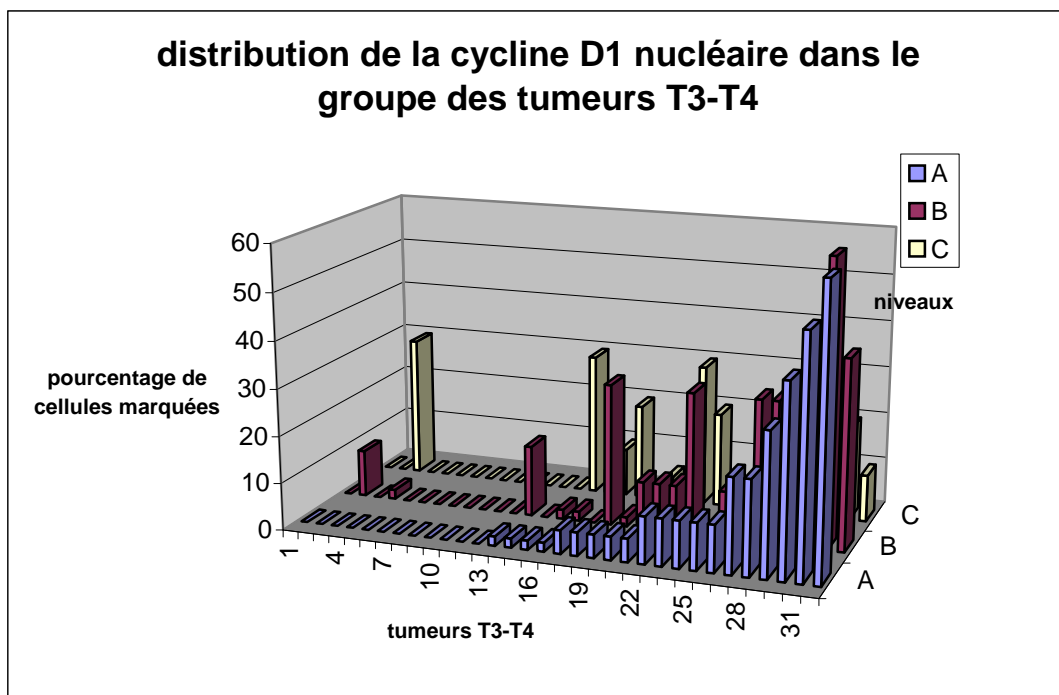
Lorsqu'on étudie la distribution des différents marqueurs dans les spots et qu'on la relie au statut tumoral, le test de Kruskal-Wallis confirme que le marqueur  $\beta$ -caténine nucléaire est significativement augmenté dans la région de plein développement de la tumeur pour les tumeurs T1-T2 ( $p = 0.043$ ), alors que sur la lame entière cette corrélation n'existe qu'à l'état de tendance (figure 52).

De la même façon, l'expression nucléaire de la Cycline D1 dans le spot intéressant la région profonde de la tumeur est significativement plus élevée pour les tumeurs T3-T4 ( $p=0.002$ ), corrélation qui n'existe pas sur la lame entière (figure 53).



**Figure 52 : histogramme de distribution de la  $\beta$ -caténine nucléaire suivant les niveaux, dans le groupe des tumeurs T1-T2.**

*Le niveau du marqueur est significativement plus élevé dans la région de plein développement de la tumeur (B) ( $p=0,043$ ).*



**Figure 53: histogramme de distribution de la Cycline D1 nucléaire suivant les niveaux, dans le groupe des tumeurs T3-T4.**

*Le niveau du marqueur est significativement plus élevé dans la région profonde des tumeurs (C) ( $p=0,002$ ).*

### 2.3.2. Hétérogénéité de distribution des cellules en cycle engendrée par le degré de différenciation des tumeurs.

L'étude de l'index d'hétérogénéité du marquage par Ki-67 a donc essentiellement porté sur l'observation de bouleversements à l'échelon cellulaire, alors que l'immuno-histochimie montrait des bouleversements à l'échelon tissulaire. C'est pourquoi, bien que le traitement des données statistiques ait globalement reposé sur les mêmes regroupements que ceux établis lors de l'étude statistique des résultats des marquages immuno-histochimiques, nous avons insisté sur le regroupement des cancers par degrés de différenciation (tableau 8). La différenciation cellulaire des cancers est en effet un bon témoin de la progression tumorale à l'échelon cellulaire. Les observations ont porté exclusivement sur les cellules en cycle, marquées par le Ki-67, d'après les coordonnées acquises lors de l'étude en sociologie cellulaire ; on a donc éliminé les échantillons de tissus ne comportant pas, ou trop peu, de cellules marquées dans la zone d'observation, ce qui explique un nombre d'échantillons inférieur à celui qui a fait l'objet de l'enregistrement des données lors de l'acquisition des images.

**Tableau 8 : groupement des patients selon le degré de malignité <sup>2</sup> exprimé par la différenciation cellulaire.**

*Grade 1 : tumeurs bien différenciées ; grade 2 : tumeurs moyennement différenciées ; grade 3 : tumeurs peu différenciées.*

<i>pathologie</i>	<i>nombre</i>	<i>pourcentage</i>
<i>Bénins dysplasiques</i>	<i>9</i>	<i>10.71</i>
<i>Bénins non dysplasiques</i>	<i>13</i>	<i>15.48</i>
<i>Malins grade 1</i>	<i>8</i>	<i>9.52</i>
<i>Malins grade 2</i>	<i>21</i>	<i>25.00</i>
<i>Malins grade 3</i>	<i>33</i>	<i>39.29</i>

Les résultats obtenus pour l'index d'hétérogénéité des échantillons, tant normaux que dysplasiques et cancéreux, montrent un niveau d'hétérogénéité du marquage globalement très élevé, les valeurs moyennes des différentes populations étant toujours inférieures à 0,8.

Ils sont regroupés dans le tableau 9.

---

<sup>2</sup> certaines tumeurs comportant plusieurs zones de différenciations différentes, elles ont fait l'objet d'une analyse de plusieurs vignettes; ce tableau comporte ainsi plus de cas qu'il n'y a eu de patients.

**Tableau 9 : distribution de l'index d'hétérogénéité suivant les populations étudiées.<sup>3</sup>**

*grade 1: tumeurs bien différenciées ; grade 2 : tumeurs moyennement différenciées ; grade 3 : tumeurs peu différenciées.*

<i>Population</i>	<i>Moyenne Index hétérogénéité</i>	<i>Min-Max</i>	<i>Ecart-type</i>
<i>Tissus normaux n=12</i>	<i>0,68</i>	<i>0,53-0,84</i>	<i>0,1</i>
<i>dysplasies n=9</i>	<i>0,63</i>	<i>0,45-0,70</i>	<i>0,08</i>
<i>Cancers grade1 n=5</i>	<i>0,695</i>	<i>0,565-0,915</i>	<i>0,11</i>
<i>Cancers grade2 n=27</i>	<i>0,68</i>	<i>0,53-0,99</i>	<i>0,12</i>
<i>Cancers Grade 3n=20</i>	<i>0,715</i>	<i>0,56-0,92</i>	<i>0,09</i>

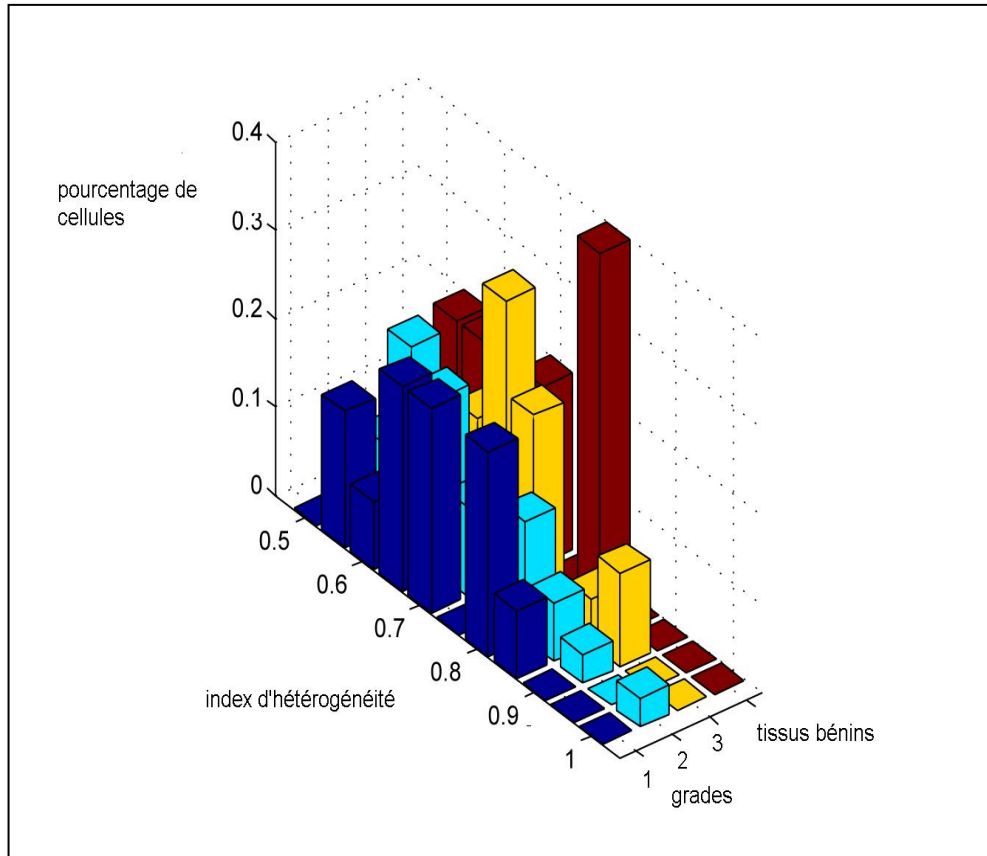
On constate que les dysplasies sont très hétérogènes, avec un index d'hétérogénéité moyen de 0.63. Les lésions peu différenciées apparaissent comme plus homogènes, avec un index moyen de 0.715. Les tissus normaux, les lésions de grade1 et les lésions de grade 2 ont des résultats intermédiaires, avec des index moyens respectifs de 0.68, 0.695 et 0.68. Les cancers de grade 3, les moins différenciés, montrent ainsi une hétérogénéité nettement plus faible que les autres lésions, qui s'accompagne d'une moins grande dispersion dans l'espace des cellules marquées. Ces résultats peuvent paraître paradoxaux à première vue, ils sont en contradiction avec les résultats observés sur d'autres tumeurs solides, notamment les cancers du sein (101) : ils seront envisagés dans la discussion sous l'angle de la dynamique d'occupation de l'espace d'une population cellulaire en expansion.

Nous avons axé notre étude sur l'hétérogénéité de distribution dans l'espace des cellules positives au Ki-67 des trois groupes de cancers.

La figure 54 donne une représentation graphique de la distribution de l'index d'hétérogénéité dans les populations cellulaires des 3 groupes de tumeurs.

---

<sup>3</sup>Même remarque que pour le tableau 8.



**Figure 54 : histogramme montrant la distribution de l'index d'hétérogénéité dans les populations cellulaires des cancers des 3 grades ; les tissus bénins (normaux et dysplasiques) figurent à l'arrière-plan, à titre comparatif.**

On voit sur cette figure que les valeurs des index d'hétérogénéité sont plus proches de 1 pour les hauts grades que pour le grade 1. De même l'histogramme présente une plus grande dispersion des valeurs pour le grade 1, le grade 3 montrant les valeurs les plus regroupées.

Le test de Wilcoxon révèle que l'index d'hétérogénéité sépare très bien les lésions bien différenciées et les lésions peu différenciées ( $p=0,003$ ) ; il ne peut séparer deux grades morphologiquement proches (grades 1 et 2, ou grades 2 et 3).

## 2.4. Bouversements architecturaux engendrés lors de la prolifération cellulaire.

Les données de la sociologie cellulaire nous ont permis d'appréhender l'impact des modifications de l'agencement des cellules entre elles au cours de la transformation maligne et de la progression tumorale, ces modifications aboutissant aux bouleversements architecturaux qui génèrent l'aspect de tumeur. Ces données ont reposé sur les observations cellule par cellule.

De même que l'étude de l'index d'hétérogénéité du marquage par Ki-67, l'étude en sociologie cellulaire a donc essentiellement porté sur l'observation de bouleversements à l'échelon cellulaire, alors que l'immuno-histochimie montrait des bouleversements à l'échelon tissulaire. Nous avons donc regroupé les lésions par degrés de différenciation, de la même façon que pour l'étude de l'index d'hétérogénéité (se reporter au tableau 8). Comme toutes les cellules, marquées ou non marquées par le Ki-67, étaient concernées par l'étude, nous avons pu travailler sur un plus grand nombre d'échantillons que précédemment.

Nous avons tenu compte de la mauvaise discrimination des cancers en trois groupes lors de l'étape de l'index d'hétérogénéité, ainsi que du petit nombre de certaines populations (dysplasiques notamment) et avons eu recours au regroupement des échantillons en trois grandes classes représentatives de la gravité des altérations cellulaires.

C'est ce qui figure dans le tableau 10.

### **Tableau 10 : regroupement en classes homogènes pour les degrés de différenciation<sup>1</sup>.**

*Bénins : dysplasiques et non dysplasiques ; malins grades 1 et 2 : tumeurs bien et moyennement différenciés ; malins grade 3 : tumeurs peu différenciée*

<i>Pathologie</i>	<i>nombre</i>	<i>pourcentage</i>
<i>Bénins</i>	<i>22</i>	<i>26.19</i>
<i>Malins grades 1-2</i>	<i>29</i>	<i>34.52</i>
<i>Malins grade 3</i>	<i>33</i>	<i>39.29</i>

<sup>1</sup> *Même remarque que pour le tableau 8, page précédente.*

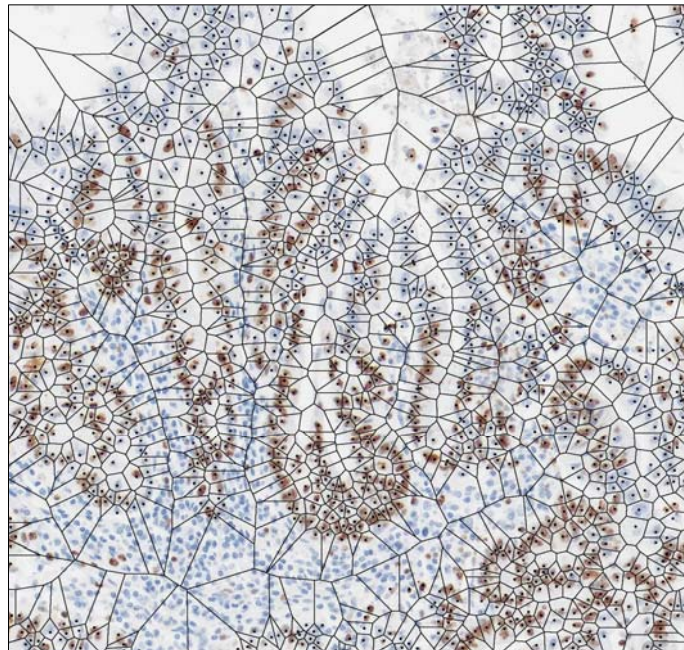


Pour chaque patient, les cellules ont été classées en deux groupes, selon qu'elles présentaient ou non un marquage nucléaire par le Ki-67 : les cellules en cycle ( positives au Ki-67) et les cellules hors du cycle cellulaire. Chacune de ces classes a fait l'objet d'une étude distincte.

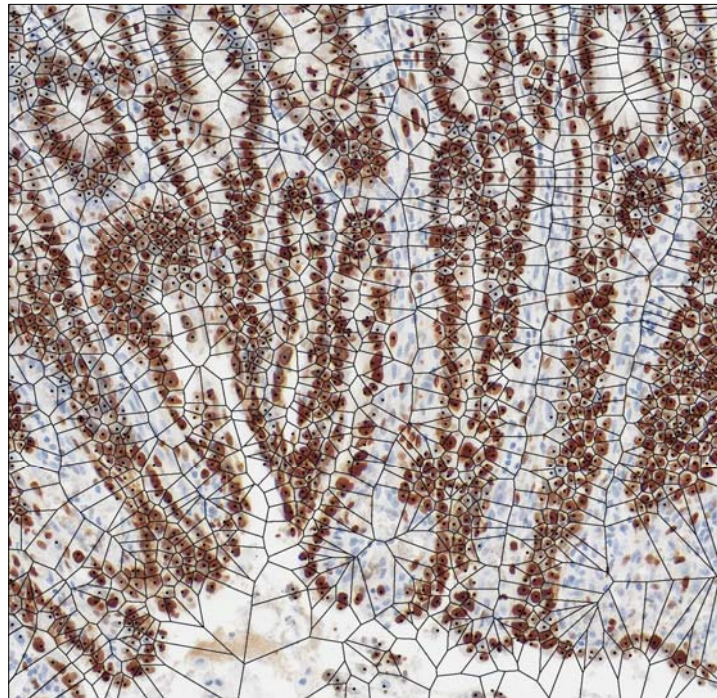
#### **2.4.1. Variation de l'aire des polygones de Voronoï avec le degré de différenciation tumorale.**

Il existe une variation de l'aire des polygones de Voronoï suivant le degré de différenciation de la tumeur. En muqueuse non cancéreuse, la valeur moyenne des aires des polygones de Voronoï est de 1796,60 en muqueuse bénigne et de 1682,60 en muqueuse dysplasique. Pour les cancers bien différenciés, elle est de 1667,71. Elle s'élève à 1933,52 lorsqu'on s'intéresse aux cancers moyennement différenciés, et à 2906,70 pour les cancers peu différenciés. Ces différences ne sont cependant pas statistiquement significatives (elles n'indiquent qu'une tendance).

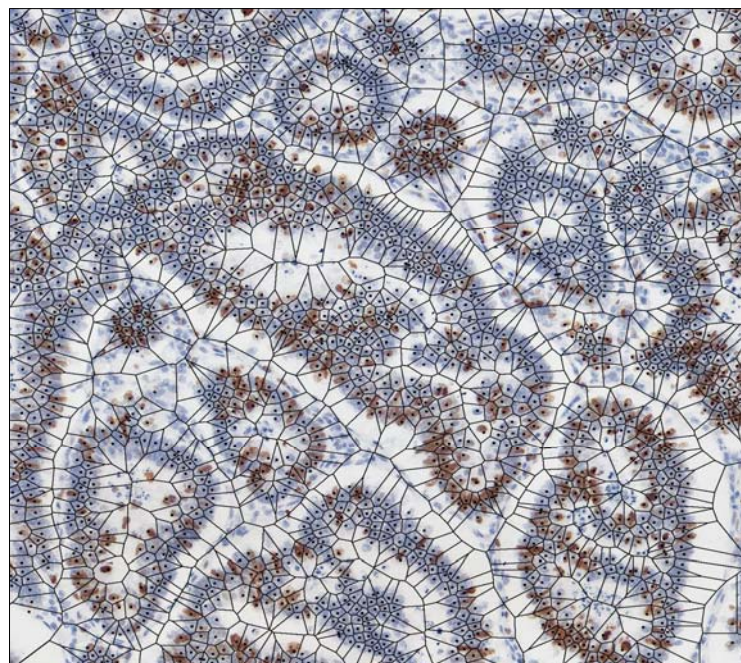
Les figures 55 à 58 montrent des exemples de diagrammes de Voronoï que nous avons construits pour différents types cellulaires en muqueuse normale, en muqueuse dysplasique, dans un cancer bien différencié et dans un cancer peu différencié.



*Figure 55: diagramme de Voronoï dans une zone de muqueuse normale : les polygones sont de tailles assez inhomogènes.*

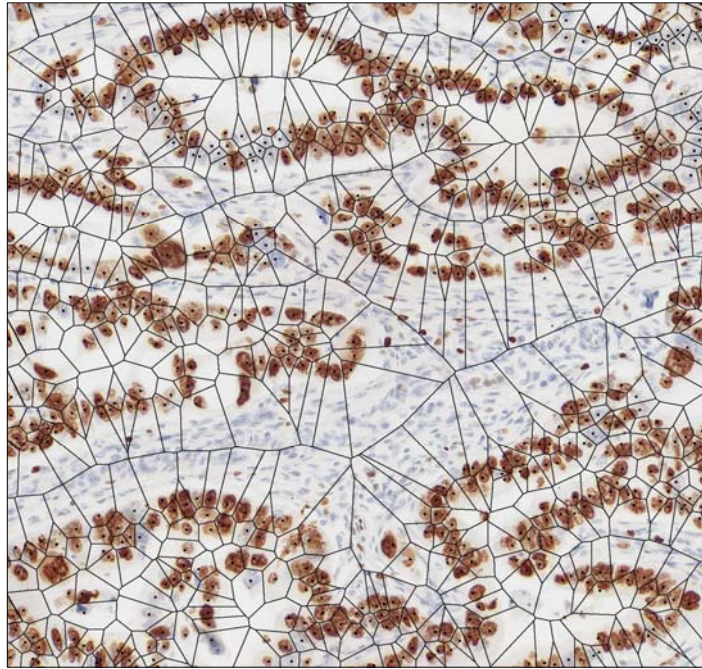


*Figure 56 : diagramme de Voronoï dans une lésion dysplasique :  
les polygones sont assez réguliers, mais de petite taille.*



*Figure 57 : diagramme de Voronoï dans une tumeur bien différenciée :  
relative régularité des polygones.*





*Figure 58: diagramme de Voronoï d'un cancer peu différencié : polygones de grande taille.*

Parallèlement à cette augmentation de la taille des polygones pour les tumeurs les moins différenciées, la densité cellulaire diminue sensiblement : elle est de  $57.10^{-3}$  en muqueuse normale, de  $58.10^{-3}$  en muqueuse dysplasique et pour les cancers bien différenciés, mais elle s'abaisse à  $52.10^{-3}$  pour les cancers moyennement différenciés et à  $33.10^{-3}$  pour les cancers peu différenciés. Ici encore cependant, ces différences ne sont pas statistiquement significatives et n'indiquent qu'une tendance.

## **2.4.2. Modifications de voisinage.**

Les cellules en cycle induisent des modifications de voisinage.

### **2.4.2.1. Diminution du facteur de forme $R_{fav}$ dans les hauts grades.**

La diminution du facteur de forme  $R_{fav}$  dans les hauts grades montre une plus grande déformation des polygones des lésions de haut grade.

Le facteur moyen de rondeur des polygones, ou facteur de forme, a été en moyenne de 0.63 (médiane: 0.65) pour les lésions bénignes ; il était de 0.65 (médiane: 0.66) pour les grades 1 et 2, mais n'était plus que de 0.62 (médiane: 0.60) pour les grades 3. Cette diminution du

facteur de forme entre d'une part les lésions bénignes et les cancers de grades 1 et 2, et d'autre part les cancers de grade 3, est statistiquement significative ( Kruskal-Wallis :  $p=0.009$ ). Les hauts grades malins se sont donc montrés les plus déformés pour les cellules marquées au Ki-67.

#### **2.4.2.2. Stabilité relative du facteur d'hétérogénéité d'occupation de l'espace par les cellules (AD).**

L'étude du facteur d'hétérogénéité d'occupation de l'espace par les cellules (AD) ne montre pas de différence significative d'occupation de l'espace entre les différents grades . Ce facteur n'a pas montré de différence statistiquement significative entre les trois groupes (sa moyenne était respectivement de 0.57 (médiane: 0.57), 0.55 (médiane: 0.55), et 0.54 (médiane: 0.54) pour les lésions bénignes, malignes grades 1 et 2, et malignes grade 3).

#### **2.4.2.3. Diminution du facteur d'homogénéité géométrique des polygones (RFH) dans les hauts grades.**

La diminution du facteur d'homogénéité géométrique des polygones (RFH) dans les hauts grades montre que ceux-ci sont les plus désordonnés.

Le facteur d'homogénéité géométrique des polygones est en moyenne de 0.84 (médiane 0.84) pour les lésions bénignes, 0.85 (médiane 0.86) pour les grades 1-2, et de 0.84 (médiane 0.80) pour les grades 3. Il diminue donc significativement (comme le montre la valeur médiane) en fonction du degré de différenciation de la cellule ( $p=0.019$ ). Les hauts grades malins se montrent donc les plus désordonnés.

La conséquence en est que, comme le facteur AD d'occupation de l'espace varie peu en fonction des différentes populations au contraire du facteur RFH, le désordre est plus grand pour une même occupation de l'espace dans les hauts grades.

#### **2.4.2.4. Stabilité du nombre moyen de cellules positives voisines.**

Le nombre moyen de cellules positives voisines varie peu selon les grades.

Le nombre moyen de cellules positives voisines, de 3.45 (médiane: 4) pour les lésions bénignes, 3.90 (médiane: 4) pour les grades 1-2 et de 3.43 (médiane: 4) pour les grades 3, ne s'est pas montré statistiquement discriminant.

#### 2.4.2.5. Augmentation de la distance médiane aux cellules positives avec le grade.

La distance médiane aux cellules positives voisines augmente considérablement quand le grade s'élève.

La distance médiane (c'est-à-dire la médiane des distances moyennes) aux cellules positives voisines a été en moyenne de 35.66 (médiane: 36.36) pour les lésions bénignes, 37.25 (médiane: 37.28) pour les grades 1-2 et 42.35 (médiane: 42.8) pour les grades 3. Elle a donc augmenté significativement en fonction du degré de différenciation de la cellule ( $p=0.008$ ).

Ces résultats sont résumés dans les tableaux 11 et 12.

#### **Tableau 11 : résultats des données de la sociologie cellulaire pour les cellules en cycle (Ki-67 positives)<sup>2</sup>.**

Ce tableau montre les corrélations statistiquement significatives qui existent entre les différentes populations cellulaires.

*Muqueuse non cancéreuse : muqueuse adjacente à la tumeur ; cancers grades 1-2 : cellules malignes moyennement à bien différenciées ; cancers grades 3 : cellules malignes peu différenciées. n = nombre de vignettes examinées pour chaque population (une vignette par lame). Les valeurs moyennes exprimées en pourcentages sont les moyennes des médianes pour chaque paramètre. Les valeurs médianes figurent entre parenthèses.*

	<i>Muqueuse non cancéreuse (n=22)</i>	<i>cancers Grades 1-2 (n=41)</i>	<i>cancers Grades 3 (n=21)</i>	<i>Kruskal-Wallis</i>
<i>Ki-67</i>	<i>0.46 (0.44)</i>	<i>0.57 (0.56)</i>	<i>0.54 (0.50)</i>	<i>NS</i>
<i>AD</i>	<i>0.57 (0.57)</i>	<i>0.55 (0.55)</i>	<i>0.54 (0.50)</i>	<i>NS</i>
<i>RFav</i>	<i>0.63 (0.65)</i>	<i>0.65 (0.66)</i>	<i>0.62 (0.60)</i>	<i>p=0.009</i>
<i>RFH</i>	<i>0.84 (0.84)</i>	<i>0.85 (0.86)</i>	<i>0.84 (0.80)</i>	<i>p=0.019</i>

<sup>2</sup> Même remarque que pour le tableau 8.

**Tableau 12 : données morphométriques associées à la sociologie cellulaire<sup>3</sup>.**

La moyenne des distances médianes aux cellules positives voisines isole de façon statistiquement significative le groupe des cellules malignes bien ou moyennement différenciées.

Nb cel positives voisines : moyenne du nombre médian des cellules Ki-67 positives voisines ; distance aux cellules positives voisines : moyenne des distances médianes aux cellules Ki-67 positives voisines en unités arbitraires; nb cel négatives voisines : moyenne du nombre médian de cellules Ki-67 négatives voisines ; distance aux cel négat. voisines : moyenne des distances médianes au cellules Ki-67 négatives voisines.

Les valeurs médianes figurent entre parenthèses.

	<i>Muqueuse non cancéreuse (n=22)</i>	<i>cancers Grades 1-2 (n=41)</i>	<i>cancers Grades 3 (n=21)</i>	<i>Kruskal-Wallis</i>
<i>nb cel. positives voisines</i>	3.45 (4)	3.90 (4)	3.43 (4)	NS
<i>Distance aux cel positives voisines</i>	35.66 (36.36)	37.25 (37.28)	42.35 (42.80)	p=0.008
<i>nb cel. négatives voisines</i>	2.32 (2)	1.83 (2)	2.14 (2)	NS
<i>Distance aux cel négat. voisines</i>	30.03(29.80)	28.02 (32.93)	32.92 (37.40)	NS

### 2.4.3. Stabilité des cellules hors cycle.

#### Les cellules hors cycle participent peu à ces bouleversements.

En effet, ni le Facteur de forme Rfav, ni le Facteur d'hétérogénéité d'occupation de l'espace par les cellules AD, ni le Facteur d'homogénéité géométrique des polygones RFH ni le nombre moyen de cellules positives voisines ne se sont révélés statistiquement significatifs entre les 3 groupes. Seule la distance médiane aux cellules positives voisines a significativement augmenté en fonction du degré de différenciation de la cellule. Les valeurs moyennes trouvées, de 28.18 (médiane : 29.84) pour les lésions bénignes, 34.76 (médiane : 35.50) pour les grades 1-2 et 39.53 (médiane : 40.30) pour les grades 3, ont en effet été significativement discriminantes (p = 0.001).

<sup>3</sup> Même remarque que pour le tableau 8.

Les tableaux 13 et 14 résument les résultats des paramètres de la sociologie cellulaire pour les cellules en dehors du cycle.

**Tableau 13: résultats des données de la sociologie cellulaire pour les cellules en dehors du cycle (Ki-67 négatives)**( valeurs moyennes des différents paramètres de la sociologie cellulaire pour les cellules en dehors du cycle)<sup>4</sup>.

Ce tableau montre l'absence de corrélations statistiquement significatives entre les différentes populations cellulaires en dehors du cycle (Ki-67 négatives) et les paramètres de la sociologie cellulaire.

*Muqueuse non cancéreuse* : muqueuse adjacente à la tumeur ; cancers grades 1-2 : cellules malignes moyennement à bien différenciées ; cancers grades 3 : cellules malignes peu différenciées. Les valeurs moyennes exprimées en pourcentages sont les moyennes des médianes pour chaque paramètre. n= nombre de vignettes examinées pour chaque population (une vignette par lame). Les valeurs médianes figurent entre parenthèses.

	<i>Muqueuse non cancéreuse</i> (n=22)	<i>cancers Grades 1-2</i> (n=41)	<i>cancers Grades 3</i> (n=21)	<i>Kruskal-Wallis</i>
<i>nombre</i>	22	41	21	
<i>Ki-67</i>	46 (44)	57 (56)	54 (50)	NS
<i>AD</i>	58 (57)	55 (55)	54 (50)	NS
<i>RFav</i>	61 (63)	63 (65)	62 (60)	NS
<i>RFH</i>	82 (83)	84 (84)	84 (80)	NS

**Tableau 14: données morphométriques associées à la sociologie cellulaire pour les cellules en dehors du cycle (Ki-67 négatives)**<sup>5</sup>.

La distance médiane aux cellules positives et négatives voisines est ici discriminante pour le groupe des cellules malignes bien ou moyennement différenciées.

*Nb cel positives voisines* : moyenne du nombre médian des cellules Ki-67 positives voisines ; *distance aux cellules positives voisines* : moyenne des distances médianes aux cellules Ki-67 positives voisines, en unités arbitraire ; *nb cel négatives voisines* : moyenne

<sup>4</sup> Même remarque que pour le tableau 8.

<sup>5</sup> Même remarque que pour tableau 8.

du nombre médian de cellules Ki-67 négatives voisines ; distance aux cel négat. voisines : moyenne des distances médianes au cellules Ki-67 négatives voisines. Les valeurs médianes figurent entre parenthèses.

	<i>Muqueuse non cancéreuse (n=22)</i>	<i>cancers Grades 1-2 (n=41)</i>	<i>cancers Grades 3 (n=21)</i>	<i>Kruskal-Wallis</i>
<i>nb cel. positives voisines</i>	1.91 (2)	2.36 (2)	2.25 (2)	NS
<i>Distance aux cel positives voisines</i>	28.18 (29.84)	34.76 (35.50)	39.53 (40.30)	p=0.001
<i>nb cel. négatives voisines</i>	3.73 (4)	3.20 (3)	3.52 (4)	NS
<i>Distance aux cel négat. voisines</i>	31.34 (29.08)	32.70 (32.78)	37.26 (37.90)	p=0.000

### 3. DISCUSSION.

Nos observations confirment qu'au cours de la cancérogénèse colique, la muqueuse au contact immédiat de la tumeur subit des modifications suffisamment importantes pour qu'elle puisse constituer une entité individualisable d'une muqueuse normale telle qu'on peut la trouver à distance du cancer. Ces modifications architecturales importantes s'accompagnent d'une modification beaucoup plus discrète du profil immuno-histochimique, qui distingue formellement cette muqueuse de proximité de la muqueuse transformée, et la rattache fonctionnellement à la muqueuse normale. Cette dissociation entre la morphologie et les données de l'immuno-histochimie doit être intégrée dans l'histogénèse générale de la muqueuse à la lumière des évènements moléculaires qui l'accompagnent. En effet, la muqueuse transformée a un profil immuno-histochimique caractéristique, qui évolue au cours de la progression tumorale. L'une des conséquences les plus visibles de ces bouleversements moléculaires réside dans l'augmentation nette de la population des cellules en cycle; cette augmentation évolue elle-même au cours de la transformation tumorale, et montre un pic au début de la progression tumorale (tumeurs T1-T2). Elle s'accompagne de modifications du niveau d'expression et de la distribution



intracellulaire des autres marqueurs, qui permettent de séparer la muqueuse transformée de la muqueuse normale mais également de la muqueuse dysplasique. Ces modifications seront discutées à la lumière du rôle de la  $\beta$ -caténine, acteur clé de la voie Wnt, et de sa cible la Cycline D1. Dans le même temps l'impact de l'hétérogénéité du marquage sur la topographie des marqueurs sera évalué et l'hétérogénéité sera quantifiée au moyen d'un index spécifique. Puis le réarrangement dans le plan des cellules tumorales, en cycle et hors cycle, entraîné par la cancérogénèse, sera envisagé.

### **Les tumeurs cancéreuses se développent au contact d'une muqueuse non tumorale remaniée.**

Plusieurs travaux font état de modifications de la muqueuse colique au contact de la tumeur. Ils reposent sur l'étude de la prolifération cellulaire en muqueuse saine. Les plus anciens ont été effectués au moyen des techniques d'autoradiographie à la Thymidine Tritiée ou en utilisant l'incorporation de BrdU, qui toutes deux donnent une évaluation des cellules en phase S. Les travaux récents utilisent le marquage immuno-histochimique des cellules en cycle par les anticorps Ki-67 et MIB1, dirigés contre l'antigène Ki-67 présent dans le noyau des cellules en phases G1, S, G2 et M. Il n'y a donc pas d'analogie totale des compartiments cellulaires détectés dans les différents travaux, ce qui peut expliquer des résultats parfois quelque peu divergents. Terpstra avait décrit une modification de toute la muqueuse colique chez des patients porteurs d'adénomes et de cancers coliques (144). Après lui, Ponz de Léon et collaborateurs (103) par autoradiographie de la muqueuse saine chez des patients atteints d'adénomes et de cancers colorectaux, constatent une prolifération cellulaire accrue dans la portion superficielle des cryptes normales par rapport à des témoins sains, sans mettre en évidence de différences significatives en fonction de la distance à la tumeur. De même, Wilson (156) trouve un index de marquage (LI) après incorporation de BrdU, augmenté, avec une expansion du compartiment prolifératif des cryptes, dans la muqueuse saine de ces mêmes types de patients. Ces deux études cependant se réfèrent à des standards de prolifération différents pour la muqueuse normale. Elles suggèrent toutes deux un mécanisme d'accroissement de la prolifération cellulaire pouvant intéresser toute la muqueuse supposée normale chez les malades atteints d'adénomes ou de cancers colorectaux. Mills et son équipe (85) arrivent à des conclusions analogues en comptant les mitoses de façon séquentielle sur des cryptes normales après microdissection de la muqueuse colique supposée saine chez ces patients.

Les résultats montrés ici sont quelque peu différents. En premier lieu, l'examen histologique et les mesures morphométriques faits en muqueuse adjacente à la tumeur, en muqueuse intermédiaire et en muqueuse à distance montre des remaniements significativement corrélés à la distance de la tumeur. On constate une muqueuse fortement épaissie au contact de la tumeur par rapport à la muqueuse normale ; parallèlement, la densité des cryptes est fortement diminuée, avec une augmentation significative des cryptes anormales par rapport à la muqueuse à distance. Dans nos observations, ces anomalies sont maximales dans la zone immédiatement adjacente à la tumeur, puis diminuent progressivement avec l'éloignement de la tumeur, pour laisser la place à une muqueuse quasiment normale à distance de la tumeur. Dans cette muqueuse remaniée le compartiment prolifératif est augmenté dans les cryptes essentiellement par allongement des glandes tandis que la remontée de ce compartiment au-delà du tiers inférieur de la crypte est un événement rare. Ceci est attesté par l'absence de remontée significative du marquage au Ki-67 au-delà de la limite du tiers inférieur de la crypte. Ainsi on peut considérer que malgré la baisse de densité des cryptes, leur allongement lié à l'épaississement de la muqueuse maintient une stabilité relative du nombre de cellules en cycle au contact de la tumeur. Il ne s'agit donc pas mode d'accroissement des cryptes tel qu'on peut le voir dans certains états prolifératifs, comme dans la formation d'adénomes par accroissement des cryptes. Dans ce cas en effet on peut observer des cellules prolifératives, marquées par le Ki-67, tout au long de la crypte y compris dans la région superficielle et dans l'épithélium de revêtement (90, 108, 126). Ces faits d'observation ont fait suggérer comme mécanisme d'accroissement des cryptes dans les adénomes, une expansion du compartiment prolifératif par remontée de cellules ayant les attributs des cellules souches tandis que les cellules exprimant les marqueurs de surface descendraient au fond des cryptes (67). Ce n'est pas le cas dans la muqueuse au contact de la tumeur, puisque l'activité proliférative reste contenue dans la partie inférieure de la crypte.

Par ailleurs nous avons trouvé dans cette même muqueuse de proximité avec la tumeur des fissions incomplètes des cryptes qui rappellent morphologiquement le mode de formation de cryptes à la fois normales et aberrantes décrit dans des lésions préneoplasiques de PAF et des lésions de néoplasie intestinale multiple (81, 85). Cependant, en muqueuse péritumorale ces fissions incomplètes n'aboutissent pas à la formation de cryptes

secondaires, et l'aboutissement du processus n'est pas un accroissement du nombre des cryptes, mais simplement un maintien relatif de leur nombre, à un niveau inférieur à ce qu'il est en muqueuse normale. Ces cryptes fissurées, de même que les cryptes ramifiées et interconnectées que l'on trouve dans cette localisation, expriment du reste des niveaux relativement faibles de Ki-67.

Des constatations allant dans le même sens ont été apportées par d'autres équipes. Ainsi Kristt et collaborateurs (72) retrouvent dans une étude histo-morphométrique et immunohistochimique sur des fragments de muqueuse à proximité de cancers, les mêmes altérations morphologiques que celles que nous avons observées, mais localisent leur amplitude maximale non pas au contact de la tumeur mais dans une zone intermédiaire, ce que nous n'avons pas constaté dans nos échantillons. Leurs observations, qui reposent essentiellement sur l'intensité et la topographie du marquage par Ki-67, les mènent à suggérer que ces modifications ne sont pas liées à une intensification de l'activité de prolifération de la muqueuse, mais plutôt à une réaction de la muqueuse subissant des stress inflammatoires ou mécaniques de la part d'une population cellulaire en expansion continue à son contact. De même que nous, ils soulignent que les cryptes anormales qui constituent une des spécificités de la muqueuse à proximité de la tumeur, ont un faible niveau d'expression du Ki-67 .

Ces résultats comme les nôtres plaident en faveur d'atteintes localisées (mais qui peuvent être disséminées) du colon lors de la maladie cancéreuse, et non pas d'anomalies généralisées à toute la muqueuse.

La distribution de la  $\beta$ -caténine et de la Cycline D1 au contact immédiat de la tumeur montre dans notre étude une conservation de la  $\beta$ -caténine membranaire et une élévation modérée des marqueurs dans leurs expressions nucléaire et cytoplasmique, cependant sans valeur significative par rapport aux niveaux d'expression trouvés dans la muqueuse à distance. En effet la  $\beta$ -caténine membranaire est toujours exprimée, avec des zones privilégiées comme le fond des cryptes mais également l'épithélium de revêtement des cryptes et de la zone intercryptique, où elle peut montrer une intensité accrue, en « coup d'ongle ». Cette localisation avec une recrudescence d'intensité de coloration en surface a été retrouvée dans les cryptes normales (121). Elle ne présente pas, en dehors de cellules isolées, d'expression nucléaire ni cytoplasmique. L'absence de localisation nucléaire de la

$\beta$ -caténine ainsi que l'absence ou le très faible niveau d'expression cytoplasmique de la molécule sont des constatations générales en muqueuse normale (91). L'absence d'accumulation extramembranaire de la protéine est par ailleurs en accord avec l'absence de prolifération accrue, si l'on s'en réfère aux travaux de Sellin (120) conduits sur le modèle murin d'hyperprolifération-hyperplasie transmise (TMCH) . Il montre en effet que les modifications quantitatives dans l'expression de la  $\beta$ -caténine précèdent dans ce modèle d'hyperprolifération l'augmentation de longueur des cryptes, et qu'elles produisent des modifications dans la distribution immunocytochimique de la molécule avec une relocalisation différente dans les jonctions membranaires, une accumulation dans le cytoplasme et dans le noyau, et une augmentation concomitante du niveau d'expression de la Cycline D1.

Nos observations dans la muqueuse adjacente à la tumeur de très rares localisations nucléaires de la Cycline D1 dans des cellules situées près de l'épithélium de surface, et d'un très discret marquage cytoplasmique par la protéine, sont en accord avec les données de la littérature. On observe en effet la rareté ou l'absence du marquage nucléaire par la Cycline D1 des cellules supposées saines, ainsi que la présence relativement fréquente d'un marquage cytoplasmique discret dans ces mêmes cellules. Arber notamment (6) , dans une étude immuno-histochimique dans des adénomes, des cancers colorectaux et des échantillons de muqueuse normale au contact des tumeurs, ne trouve jamais de marquage nucléaire de la Cycline D1 dans les cellules en muqueuse saine adjacente à la tumeur, mais un marquage cytoplasmique discret des cellules dans un tiers des cas. La présence de Cycline D1, à un niveau toujours très bas, a été signalée dans la muqueuse colique normale. On a en effet montré qu'elle est nécessaire à une prolifération cellulaire normale en permettant la progression au cours du cycle la progression de la cellule en phase G1, ce qui laisse penser qu'elle pourrait avoir une localisation nucléaire dans l'épithélium colique normal mais à un niveau trop bas pour être détecté (9).

La distribution normale de la  $\beta$ -caténine et de la Cycline D1 dans la muqueuse normale adjacente à la tumeur ne s'accorde pas avec l'hypothèse de lésions préneoplasiques telles que les lésions préneoplasiques de PAF et de MIN, où les mutations et les inactivations de la voie de la  $\beta$ -caténine conduisent à une accumulation de la protéine dans le noyau et le cytoplasme. Or, si les aspects morphologiques de fissions incomplètes observés dans la muqueuse au contact de la tumeur ressemblent à ceux qu'on observe dans ce type de

lésions préneoplasiques (17), ils en diffèrent parce qu'ils n'aboutissent pas à une prolifération vraie de la muqueuse, qui ne pourrait se produire qu'en présence des mutations et inactivations décrites dans les PAF et MIN et dont ils sont dépourvus. Il faut cependant noter que, bien que les cryptes anormales ne ressemblent pas morphologiquement aux foyers de cryptes aberrantes (ACF), il faut cependant noter qu'une telle absence d'accumulation de  $\beta$ -caténine nucléaire et cytoplasmique peut se voir dans ces lésions chez des malades porteurs de formes sporadiques de cancers et d'adénomes, alors que l'accumulation nucléaire et cytoplasmique de la protéine est très fréquente dans les ACF chez les malades présentant une PAF (142).

Le profil prolifératif ainsi que la distribution de la  $\beta$ -caténine et de la Cycline D1 en muqueuse adjacente à la tumeur, tels que nous avons pu les observer, nous semblent donc en accord avec les hypothèses de Kristt. On peut suggérer que les modifications de la muqueuse à proximité de la tumeur peuvent être interprétées, soit dans le sens d'un accroissement de la surface cryptique tendant à compenser la diminution de la densité cryptique, soit comme l'effet mécanique de la pression exercée par les cellules tumorales adjacentes qui prolifèrent à un taux supérieur. Dans tous les cas, qu'il s'agisse de simples déformations ou de fissions incomplètes, le taux des cellules en cycle dans ces déformations est relativement normal.

Au total, la muqueuse adjacente à la tumeur s'apparente par son profil immunohistochimique à ce que Murphy (91) définit comme un « colon moléculairement normal », tandis que son aspect histologique particulier permet de l'identifier comme une entité à part entière, et d'introduire à son propos le concept de « muqueuse péri-tumorale ».

**Les lésions cancéreuses et la muqueuse sur laquelle elles se développent sont bien discriminées par les marqueurs de la prolifération étudiés.**

Le marqueur le plus discriminant entre muqueuse normale, muqueuse dysplasique et muqueuse cancéreuse, est le Ki-67, dont le niveau d'expression est significativement élevé dans les cancers et dans les dysplasies par rapport au tissu normal. Cet accroissement qui reflète une augmentation des cellules en cycle et donc susceptibles de proliférer, n'a été significatif dans notre étude qu'à partir d'un pourcentage très élevé de cellules marquées par le Ki-67 (60%).

L'étude de la littérature montre que les travaux sur la prolifération cellulaire dans les adénomes et les cancers colorectaux (61), qui vont globalement dans le même sens, aboutissent cependant parfois à des conclusions divergentes quand on les analyse de façon plus ciblée. En particulier, il n'y a pas concordance quant à la localisation des populations cellulaires proliférantes. Les observations initiales à partir d'études avec la Thymidine tritiée ou le BrdU, comme celles de Wilson ou de Risio, montrent un maximum de prolifération cellulaire au fond des cryptes, où on trouve un LI très élevé (111, 156). Cependant d'autres travaux sont plus ou moins discordants avec ces données. Pour Bjerknes (15, 16) comme ensuite pour Boman qui étudie les cryptes des adénomes de patients porteurs de PAF (17), lors de la formation des adénomes et des cancers, les cellules souches mutantes à la base de cryptes ont une expansion clonale qui cause une surpopulation à l'origine d'un décalage vers le haut du compartiment des cellules prolifératives. Dans les adénomes, Boman trouve des cellules marquées par le Ki-67 tout le long de la crypte, avec une augmentation du marquage au sommet de celle-ci. Commentant ces divergences d'appréciation de l'importance et de la localisation du marquage par le Ki-67, Boman incrimine d'une part les différences dans les techniques utilisées, d'autre part la confusion qui peut survenir entre les termes de cellules prolifératives et de cellules proliférantes. Les cellules prolifératives sont les cellules susceptibles de proliférer car entrées dans le cycle cellulaire, et elles sont en grande partie reconnues par la positivité du marquage nucléaire avec les anticorps Ki-67 et MIB1. Les cellules proliférantes sont celle qui accomplissent réellement leur potentiel prolifératif, elles sont reconnues par l'incorporation de BrdU et la Thymidine tritiée, et également pour une partie d'entre elles par les figures de mitoses qu'elles présentent. Moss (90) puis Shih (126) non seulement dans des adénomes survenus au cours de PAF, mais aussi dans des adénomes sporadiques trouvent également une augmentation du marquage par Ki-67 au sommet des cryptes. Shih montre en outre qu'au début de la transformation maligne, dans les dysplasies, les cellules du sommet des cryptes sont dysplasiques et ont un marquage par Ki-67 très élevé, analogue à celui trouvé dans les cancers, tandis que les cellules du fond des cryptes sont relativement normales. Pour lui, les cellules dysplasiques vont ensuite proliférer vers l'orifice des cryptes. Il en fait le fondement de la théorie de croissance du haut vers le bas (top-down) des tumeurs colorectales, opposée à la théorie de croissance du bas des cryptes vers le haut (bottom-up) admise généralement après Bach et collaborateurs (8). Il propose deux explications : soit les cellules dysplasiques sont réellement situées dans l'épithélium

intercryptique de surface plutôt qu'au fond des cryptes ; elles vont migrer ensuite le long de la crypte et vers le fond. Soit encore les cellules néoplasiques viennent bien des cellules souches, mais les cellules transformées migrent dès l'origine vers le sommet de la crypte et deviennent ensuite des cellules de l'épithélium de surface.

Dans nos observations, les dysplasies comme les cancers invasifs montrent un nombre élevé de mitoses et des valeurs importantes du marqueur Ki-67, qui ne les discriminent pas entre eux, mais sont significativement plus hauts que dans les tissus normaux. Ceci nous semble en accord avec les faits observés par Shih quant aux capacités prolifératives des dysplasies. Dans les dysplasies quel que soit le grade, nous avons cependant préférentiellement retrouvé ces valeurs élevées au fond des cryptes sans que cela soit statistiquement significatif, et avons constaté une très forte hétérogénéité du marquage.

Dans les cancers invasifs, l'expression du Ki-67 est presque toujours très élevée, et distribuée de façon très hétérogène dans la tumeur. Certains travaux, contradictoires, font état d'un marquage particulier du front d'invasion latéral ou profond de la tumeur, soit pour le trouver augmenté (3), soit au contraire (64) pour identifier une zone de basse prolifération. Pour notre part, nous n'avons pas trouvé de particularité du marquage par Ki-67 dans ces régions. Dans notre série de cancers invasifs, nous avons trouvé une corrélation du marquage avec le statut pTNM des tumeurs. Le groupe des tumeurs T1-T2 s'est distingué par un taux de tumeurs présentant un marquage au Ki-67 supérieur à 60% de cellules marquées significativement plus élevé que dans les autres groupes étudiés, avec un gradient descendant des tumeurs T3, aux tumeurs T4 puis aux dysplasies élevées ou cancers in situ qui ont été les moins proliférants. Ceci s'accompagnait d'un taux de mitoses significativement plus élevé dans le groupe des T1-T2. La forte corrélation entre le taux des mitoses dans les cancers invasifs et l'importance du marquage au Ki-67 montre que dans ces tumeurs il y a bien corrélation entre le nombre des cellules prolifératives et le nombre des cellules qui prolifèrent réellement en atteignant la mitose.

L'élévation du niveau d'expression de la Cycline D1, qui accompagne l'élévation du niveau de marquage par Ki-67, est également discriminante entre d'une part les tissus cancéreux et dysplasiques qui l'expriment à un niveau notable dans le cytoplasme et le noyau, et d'autre part les tissus normaux où son expression est exceptionnelle .

On a vu lors de la discussion des résultats obtenus en muqueuse adjacente à la tumeur, que la littérature montre la rareté, voire l'absence de localisation nucléaire de la Cycline D1, et

son expression cytoplasmique présente mais à un niveau très bas, dans la muqueuse colique normale (6). Les données de la littérature montrent également l'accroissement important des niveaux de Cycline D1 et l'apparition de sa localisation nucléaire dès le début de la transformation maligne et tout au long de la progression tumorale. Arber (6) ne trouve pas d'expression nucléaire de la protéine dans les états hyperprolifératifs bénins non précancéreux comme les polypes hyperplasiques, où elle a cependant dans deux tiers des cas une expression cytoplasmique. Il la trouve en revanche exprimée dans le noyau des cellules dans 34% des polypes adénomateux, donc dès le début de la transformation maligne, et dans 30% des cancers avérés. Baldin (9) retrouve ces résultats, il observe que dans la cellule la Cycline D1 cytoplasmique a une localisation préférentiellement supranucléaire, tandis que la Cycline D1 nucléaire est le plus souvent localisée dans l'épithélium superficiel dans les adénomes ; il ne trouve pas de corrélation entre l'importance de l'expression de la Cycline D1 et le stade de Dukes. Bartkova (12) trouve également une expression nucléaire de la Cycline D1 dans 30% des cancers colorectaux. Wong en revanche, dans une étude comportant un fort taux de cancers colorectaux au stade C de Dukes (158), relève une expression nucléaire de la Cycline D1 dans 64% de ses cas, avec une localisation préférentielle dans les berges des tumeurs ; lui trouve une corrélation entre l'expression de la Cycline D1 nucléaire et le stade de Dukes, et il attribue le fort taux de tumeurs exprimant la Cycline D1 dans son étude au fait que la population qu'il a étudiée se compose à 83% de stades C de Dukes. Il ne trouve en revanche pas de corrélation entre l'expression de la Cycline D1, nucléaire et cytoplasmique, et la prolifération cellulaire. Cette absence de corrélation est également notée par Sutter (140).

Nous avons pour notre part trouvé une élévation significative de l'expression de la Cycline D1 cytoplasmique dans les cancers et dans les dysplasies par rapport aux tissus normaux ; par contre elle ne permet pas de discriminer entre cancers et dysplasies. La Cycline D1 nucléaire, qui n'est qu'exceptionnellement exprimée dans les tissus normaux, est élevée de façon significative dans les cancers et les dysplasies par rapport aux tissus normaux, mais ici encore n'est pas discriminante entre cancers et dysplasies. Elle a une distribution hétérogène dans les cancers et les dysplasies, sans site préférentiel. L'élévation importante de la Cycline D1 dans ses deux expressions, tant dans les cancers que dans les dysplasies, que nous avons observée dans nos séries, s'accorde avec les travaux montrant que la Cycline D1 a une expression précoce dès les premiers stades de la transformation maligne (6). Bien que dans les dysplasies comme dans les cancers nous ayons noté une expression



de la Cycline D1 essentiellement dans les zones de Ki-67 élevé, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation dans ces lésions de corrélation entre Cycline D1 et prolifération cellulaire. En revanche, dans les cancers, nous avons trouvé une corrélation statistiquement significative entre l'expression nucléaire de la Cycline D1 et un marquage par Ki-67 supérieur à 60% de cellules marquées. Le fait que ces corrélations n'apparaissent qu'à partir d'un certain seuil de marquage par le Ki-67 explique peut-être les données contradictoires de la littérature.

Les séries d'échantillons normaux, dysplasiques et cancéreux que nous avons étudiés montrent que l'expression membranaire de la  $\beta$ -caténine est prédominante dans les tissus normaux, mais elle reste importante dans les lésions dysplasiques et même cancéreuses, où elle a tendance à ne marquer que des fragments de membranes, mais avec une forte intensité. L'expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine est significativement plus élevée dans les cancers et dans les dysplasies que dans les tissus normaux.

La  $\beta$ -caténine cytoplasmique est au total le seul marqueur de notre panel qui nous a permis de séparer les cancers des dysplasies : elle est en effet significativement plus élevée dans ces derniers que dans les dysplasies ; dans ces dernières elle a un niveau d'expression qui la rapproche des tissus normaux.

Par opposition à l'absence totale d'expression nucléaire de la protéine et à sa rareté d'expression cytoplasmique dans les tissus normaux, l'importance de l'expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine dans les cancers et dans les dysplasies est une donnée constante de la littérature (52, 142, 160, 162), avec selon les séries étudiées, une fréquence de 85% à 100% de tumeurs exprimant le marqueur nucléaire. La démonstration par immunohistochimie d'une accumulation cytoplasmique de la molécule dans plus de 50% des lésions dysplasiques d'ACF chez l'homme en fait pour certains auteurs (46) l'une des altérations les plus précocément observables dans la transformation maligne. Ces mêmes auteurs montrent qu'il existe un rapport entre l'importance de l'expression nucléaire et cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine et le degré de dysplasie. Ils établissent un lien de réciprocity entre l'expression normale, membranaire de la  $\beta$ -caténine et ses expressions cytoplasmique et membranaire, la quantité de protéine membranaire diminuant avec l'augmentation des deux autres localisations de la protéine. Cependant une même cellule peut présenter à la fois une expression cytoplasmique et une expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine, ce qui se voit avec une grande fréquence dans les polypes adénomateux (56). La

présence d'une  $\beta$ -caténine mutée n'est pas nécessaire ni suffisante pour produire son accumulation cytoplasmique et nucléaire (116, 160). En particulier Yamada, étudiant la carcinogénèse colique chez le rat (160), qui comporte un excès dans la voie de signalisation de la  $\beta$ -caténine, montre par immuno-histochimie la présence de deux types de cryptes histologiquement anormales, les uns semblables aux ACF, comportant 20% de mutations du gène et ne s'accompagnant pas d'accumulation de la protéine, les autres, d'aspect très proche de celui des cryptes normales, comportant 67% de mutations du gène et présentant une accumulation cytoplasmique de la molécule. La présence de la protéine dans le cytoplasme et dans le noyau est liée à une anomalie de sa régulation par la voie de dégradation de l'ubiquitine-protéasome (95). La séquence de l'accumulation de la protéine, avec en premier accumulation cytoplasmique puis translocation au noyau (162) ou au contraire passage du cytoplasme au noyau, n'est pas définitivement tranchée (153).

Les dysplasies que nous avons étudiées présentent, quel que soit leur degré, une expression membranaire prédominante dans la majorité des lésions, souvent importante, intéressant la totalité de la membrane, tandis que l'expression nucléaire de la protéine est également présente dans plus de la moitié des cas, souvent faible, ce qui correspond bien au balancement entre l'importance des deux localisations décrit dans la littérature. Le marquage nucléaire est souvent situé vers le fond des cryptes. Seules 50% des lésions dysplasiques montrent un marquage cytoplasmique, souvent faible. Lorsque ce marquage est intense, il est le plus souvent situé en surface, ce qui correspond aux premières descriptions (121). Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence, sur une série il est vrai de petite taille, de lien entre la distribution des différents types d'expression de la  $\beta$ -caténine et le degré de dysplasie.

Notre série de cancers montre une expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine prédominante, de l'ordre de celles retrouvées dans la littérature (plus de 90% des cas), avec des intensités variées. Cette expression se trouve avec prédilection dans les zones les moins différenciées des tumeurs, comme cela a parfois été décrit (46), et ce qui souligne par ailleurs le rôle de la  $\beta$ -caténine normale dans la différenciation cellulaire (157). L'expression cytoplasmique de la protéine est également très fréquente, intéressant près de 80% des tumeurs, avec souvent une intensité assez forte. Une constatation intéressante est la persistance du marquage membranaire, avec une intensité importante, exagérée par rapport au marquage des membranes normales, qui le plus souvent n'intéresse qu'une partie des membranes de la cellule, et siège surtout en surface. La persistance de cette expression est sans doute à

mettre en rapport avec l'importance de la  $\beta$ -caténine dans le maintien de la cohésion cellulaire et la mobilité des cellules, nécessaire à une certaine homéostasie. Elle est mise en évidence dans le travail de Sellin (120) sur son modèle de TMCH chez la souris : il montre que pendant la formation de l'hyperplasie, la localisation normale de la  $\beta$ -caténine à la jonction apico-latérale des cellules diminue au profit d'une accumulation dans les zones baso-latérales, où elle forme des plaques ; on voit apparaître une hyperprolifération avec la détection, par Western-blot, d'une augmentation de la fraction cytosolique de la  $\beta$ -caténine, et par immuno-histochimie, d'une accumulation de la  $\beta$ -caténine nucléaire ; il n'y a pas dans ce modèle de modification de la fraction de  $\beta$ -caténine liée au cytosquelette, bien que la localisation à la membrane de la protéine ait changé et qu'elle se soit déplacée de la zone apico-latérale à la zone baso-latérale. Pour Sellin, cette redistribution de la  $\beta$ -caténine liée au squelette pourrait représenter un phénomène naturel d'homéostasie pour faire échec au signal mitogène de la  $\beta$ -caténine sur les cellules ; elle pourrait également constituer une tentative des cellules des cryptes pour réguler à un niveau plus bas les effets du signal mitogène de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique libre. Il est possible que le maintien partiel mais fréquent et d'intensité exagérée, du marquage membranaire de la  $\beta$ -caténine dans les tumeurs, reflète un mécanisme similaire à ceux évoqués par Sellin.

Le rôle de l'accumulation de la  $\beta$ -caténine induite par les modifications du gène APC, sur la prolifération et la différenciation des cellules de l'intestin, est solidement démontré (98, 105). Par ailleurs, on a également pu démontrer sur l'intestin grêle de souris (5), que l'activation de la  $\beta$ -caténine induite par des altérations du gène APC a une action différente sur la prolifération et la différenciation suivant le compartiment cellulaire envisagé : à l'intérieur des cryptes, où la  $\beta$ -caténine semble avoir pour cible préférentielle c-myc, il y a augmentation du compartiment des cellules prolifératives, apoptose et entrave à la migration cellulaire, tandis que dans le compartiment des cellules différenciées la  $\beta$ -caténine qui a pour cible privilégiée la Cycline D1, a peu d'effets sur la prolifération, mais a une influence sur la différenciation et la migration. Ces constatations complexes peuvent rendre compte du fait que les rapports entre les localisations anormales de la protéine et l'activité prolifératrice des tissus observés ont souvent donné lieu à des conclusions contradictoires. Sutter (140) trouve que ces expressions sont corrélées avec une prolifération cellulaire augmentée, tandis que Jung (64) et Brabletz (18) par des techniques

immuno-histochimiques, n'en trouvent pas. Notre série montre une corrélation très forte dans les cancers entre l'activité mitotique et l'expression cytoplasmique (mais non nucléaire) de la  $\beta$ -caténine, avec à l'inverse une très faible expression cytoplasmique de la protéine dans les tumeurs pauvres en mitoses.

Les rapports entre les niveaux d'expression de la  $\beta$ -caténine et ceux de la Cycline D1 sont étroits. On admet que l'expression de la Cycline D1 est contrôlée par la  $\beta$ -caténine (145), notamment dans les cellules cancéreuses (158); certaines observations (157) montrent que la Cycline D1 nucléaire ne serait exprimée qu'en présence de la  $\beta$ -caténine nucléaire. Cependant, bien qu'on trouve les deux protéines dans les mêmes régions des tumeurs, elles ne semblent pas colocaliser dans les mêmes cellules. On a vu dans le paragraphe précédent que lorsque la  $\beta$ -caténine avait pour cible privilégiée dans le compartiment des cellules différenciées des cryptes la Cycline D1 il se pouvait qu'elle n'ait que peu d'effets sur la prolifération. Ainsi, bien qu'il y ait des rapports étroits entre  $\beta$ -caténine et Cycline D1, elles pourraient avoir des actions indépendantes sur la prolifération suivant leur localisation dans la cellule.

Aussi bien dans les dysplasies de tous degrés que dans les cancers des séries que nous avons étudiées, les zones marquées par la  $\beta$ -caténine cytoplasmique et nucléaire recouvrent en les dépassant largement les zones marquées par la Cycline D1 et le Ki-67. Nous n'avons pas mis en évidence de colocalisation entre  $\beta$ -caténine et Cycline D1. Ceci est concordant avec les résultats cités. Nous n'avons cependant pas mis en évidence de corrélation entre l'expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine et l'expression de la Cycline D1. Mais il existe un lien indirect entre l'expression de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique et la Cycline D1 nucléaire, qui toutes deux sont significativement plus élevées dans les tumeurs exprimant un pourcentage de cellules marquées par le Ki-67 égal ou supérieur à 60%. Ce lien parle en faveur du rapport entre l'expression de ces protéines et la prolifération cellulaire dans les cancers.

L'expression cytoplasmique du marqueur anti-apoptotique Bcl-2, présente mais à un niveau de base très faible, et cantonnée dans les tissus normaux dans quelques cellules du fond des cryptes, ne nous a pas permis une étude statistique satisfaisante dans un échantillonnage qui reste faible. Nos observations sont cependant globalement en accord avec les données de la littérature. La plupart des auteurs en effet trouvent une expression importante de Bcl-2 dans la muqueuse colique normale, où il est localisé au fond des cryptes, et la possibilité également d'une expression importante de l'antigène dans certains cancers (65, 84). Cette localisation au fond des cryptes en muqueuse normale lui permettrait de réguler l'entrée en apoptose des cellules prolifératives (31, 36, 115).

**Au total, l'analyse des différents marqueurs du cycle utilisés ici montre, à l'intérieur de la population tumorale maligne, l'existence d'un gradient dans l'augmentation de la prolifération.**

Le compartiment des cellules en cycle est nettement augmenté lorsqu'on passe du groupe constitué par les lésions de dysplasie sévère et de cancer in situ au cancer invasif. Cet accroissement subit une évolution : il connaît un pic dans la population des tumeurs T1 et T2, puis diminue au cours de la progression tumorale vers les tumeurs T3 et T4. Ce même gradient existe pour les cellules en mitose. Il y aurait donc une forte augmentation de la prolifération cellulaire au début de la progression tumorale, qui accompagnerait le passage au cancer invasif. Puis après un pic cette activité décroît. Ceci doit être mis en parallèle avec des travaux déjà anciens qui montrent qu'après la transformation maligne la progression tumorale peut s'accompagner d'une diminution des cellules prolifératives détectées par le marquage au PCNA ( Proliférative Cell Nuclear Antigen : antigène nucléaire de prolifération cellulaire (130). Les variations de la prolifération cellulaire au cours de la progression tumorale donnent cependant lieu à des résultats contradictoires, comme l'observation d'un continuum de l'accroissement des cellules en cycle au cours de la progression tumorale. Pour expliquer ces contradictions, on a pu invoquer les problèmes posés par la haute variabilité du taux des cellules en cycle dans ce panel de lésions dans la séquence qui mène de la muqueuse hyperplasique au cancer (111, 147).

**Il existe au cours de la transformation et de la progression tumorale une distribution assez homogène dans les cellules en cycle, de la  $\beta$ -caténine protéine-clé de la voie Wnt, mais non de sa cible la Cycline D1.**

On soulignera pour mémoire que d'une façon générale l'hétérogénéité tumorale du marquage est un fait établi en pathologie cancéreuse (26). La prise en compte de ce paramètre a été mise en exergue quand la technique des Tissue-MicroArrays (TMA) s'est imposée jusqu'à entrer dans les pratiques de semi-routine (151, 125), notamment en immuno-histochimie. Cette technique substitue à la lame classique comportant une coupe tissulaire unique de plusieurs millimètres de diamètre, provenant d'un seul bloc tissulaire, une lame unique pouvant comportant plusieurs dizaines à quelques centaines de coupes de quelques microns de diamètre, provenant de fragments de tissus prélevés sur des blocs différents qui correspondent à des échantillons de tissus différents (21, 50). Chaque coupe de petite taille est désignée sous le terme de "spot". On voit l'importance de la question de la représentativité de l'échantillonnage dans des spécimens de tailles aussi exiguës. Le problème a trouvé une solution avec la pratique de triplets, c'est-à-dire de triples prises de matériel pour chaque échantillon, ce qui revient à multiplier par trois la taille des tissus examinés, mais introduit une hétérogénéité due à des niveaux différents dans le bloc entre la première coupe (superficielle) et la dernière (plus profonde). La technique a donc obtenu sa validation, au long de multiples publications (24), qui font état de sa fiabilité pour des marqueurs immuno-histochimiques de plus en plus nombreux, pour de multiples types de tumeurs. Cependant, de façon récurrente, des travaux se font jour qui, s'ils ne remettent pas en cause sa validité, soulignent les limites de la méthode. Ces travaux montrent que la plus grande concordance des résultats sur spots de TMAs avec ceux obtenus par la lecture classique sur lame entière, est obtenue lorsque les résultats sont exprimés en catégories simples (par exemple, positif/négatif) et non de façon semi-quantitative (32, 53); cette concordance peut alors atteindre un taux de 91% à 98%, suivant les séries et les anticorps testés. Une autre limite vient de l'état de la tumeur elle-même : on a ainsi montré que la concordance avec la lame entière peut être mauvaise lorsque les spots intéressent certaines régions particulières de la tumeur, comme par exemple des zones mal vascularisées, voire nécrosées (32).

Nous avons testé dans notre série de dysplasies et de cancers coliques, l'impact de l'hétérogénéité du marquage des anticorps Ki-67,  $\beta$ -caténine et Cycline D1, avec une technique qui reproduit l'échantillonnage des TMAs (3 spots de très petite taille par échantillon de tissu), mais en s'affranchissant des artéfacts dûs aux différences de niveau des coupes. Par ailleurs la position de chaque "spot virtuel" généré par cette technique est parfaitement déterminée sur la coupe entière, et la technique immuno-histochimique est

faite en un seul temps. Le but de cette technique est d'obtenir un outil de validation très homogène pour les TMAs.

Par cette technique, nous trouvons une prédominance du marquage de la Cycline D1 et du Ki-67 dans les spots superficiels de dysplasies mais non de cancers, ce qui correspond bien aux lectures sur lame entière. Cette différence de marquage selon les niveaux n'est pas statistiquement significative. La  $\beta$ -caténine dans ses trois expressions s'avère homogène pour les trois niveaux de spots. Malgré l'absence de significativité des différences entre les spots, la concordance des spots entre eux et avec la lame entière est mauvaise, le coefficient de concordance étant aux environs de 0,4. Seuls les marquages par la  $\beta$ -caténine dans les trois niveaux d'une part, et par le Ki-67 en plein développement de la tumeur, d'autre part, atteignent une très bonne concordance avec les marquages sur lame entière, le taux de concordance étant supérieur à 0,8. Lorsque les résultats, comme ici, sont exprimés de façon semi-quantitative, il existe donc bien un problème d'hétérogénéité de l'échantillonnage, lié essentiellement à la position du spot dans la tumeur.

Cependant, cette hétérogénéité même peut constituer un intérêt supplémentaire de la technique des TMAs. La lecture sur spots est en effet susceptible d'affiner les résultats en focalisant les études sur une région tumorale précise : ainsi, dans ce travail le haut niveau d'expression de la Cycline D1 nucléaire dans la région profonde des tumeurs T3 et T4 n'a pu être mis en évidence que sur spots et non sur lame entière.

Il semble donc bien que la lecture sur spots, même si ces spots sont répétés pour chaque échantillon n'est pas strictement représentative de la lecture sur lame entière, du moins pour le panel de marqueurs étudiés ici et dans cette localisation particulière. Ce type de lecture des marquages par zone (équivalent aux marquages sur TMAs) devrait à notre sens être considéré comme complémentaire de la lecture sur lame entière.

Cette réflexion repose sur les observations faites à partir de l'expression des protéines, et n'est pas transposable aux observations faites à partir de l'expression des gènes eux-mêmes.

**Il est possible de quantifier de façon objective cette hétérogénéité de marquage. Nous l'avons fait dans la population des cancers de grades histologiques différents, pour le marqueur Ki-67, à l'aide de l'index d'hétérogénéité spatiale.**

En effet, une fois reconnu le concept d'hétérogénéité, la difficulté réside dans la mesure de ce paramètre (26).

L'index d'hétérogénéité spatiale, tel que nous l'avons calculé, ne dépend pas des niveaux de coupe et est une caractéristique propre à la globalité de la tumeur (122). Sa mesure objective donne des valeurs d'autant plus basses que l'hétérogénéité est plus grande.

Nous avons ainsi pu observer que le cancer colique est particulier par un très fort niveau d'hétérogénéité, qui le différencie d'autres tumeurs comme le sein, par exemple (122). De façon paradoxale, nous avons observé que l'index d'hétérogénéité, bas dans toutes les situations, s'élève significativement dans les hauts grades, avec une diminution de la dispersion de ses valeurs moyennes. Ces résultats sont en contradiction avec ceux que nous avons observés dans les cancers du sein (121) où l'hétérogénéité croît de façon significative avec le grade de la tumeur. L'hétérogénéité pourrait donc être un paramètre dépendant du type et de la localisation tumoraux. Les résultats obtenus dans les cancers coliques peuvent s'expliquer par une très forte augmentation du nombre des cellules marquées dans les grades élevés, qui tendrait à masquer le niveau d'hétérogénéité de la tumeur, puisque cela aboutirait à un marquage d'une proportion importante de la tumeur. Il en résulterait une perte d'information. Cette interprétation sera évoquée à nouveau (11) en Sociologie Cellulaire devant des cas dont les résultats montrent une modification concomitante de tous les paramètres.

L'outil que nous avons utilisé pour cette étude est robuste et permet de s'affranchir des problèmes liés à la dispersion de l'échantillonnage et à sa taille. Les résultats obtenus ne sont que partiellement concordants avec ceux de la sociologie cellulaire, que nous allons discuter dans le paragraphe qui suit. Ils montrent cependant eux aussi une plus grande homogénéité des lésions peu différenciées, qui va dans le sens de l'atteinte d'un certain équilibre par ces lésions. Ils mettent également en évidence le pouvoir discriminant de l'index d'hétérogénéité vis à vis de deux populations souvent difficiles à différencier ( les cancers in situ et les cancers bien différenciés).

**A l'échelon cellulaire, les bouleversements architecturaux dans les cancers se traduisent par un réarrangement dans l'espace qui est discriminant par rapport à la muqueuse non tumorale adjacente.**

Certains bouleversements sont apportés à la fois par les cellules en cycle et les cellules hors cycle. Les cellules malignes génèrent des polygones de tailles plus importantes,



accompagnés d'une plus grande dispersion cellulaire, au cours de leur progression vers la dédifférenciation. Ceci peut paraître paradoxal dans la mesure où on s'attendrait à une augmentation de la densité cellulaire. En fait, on voit que pour une même occupation de l'espace, quantifiée par le facteur AD qui reste assez stable dans tous les groupes de populations, elles génèrent un plus grand désordre, marqué par la diminution du facteur d'homogénéité géométrique des polygones, tandis que les polygones qu'elles génèrent sont eux-mêmes plus déformés. Ces constatations permettent de séparer de façon significative les lésions cancéreuses de grades élevés des autres cancers et des tissus non cancéreux. La dédifférenciation cellulaire semble donc s'accompagner, à partir d'un certain seuil, d'un comportement spécifique des cellules dans l'espace: elles "occupent leur territoire"(89).

Les cellules hors cycle ne participent pas à ces bouleversements dans l'ordre et le désordre de l'occupation de l'espace, et cette stabilité est partagée par les populations cellulaires cancéreuses et non cancéreuses. Les cellules qui sont sorties du cycle tendent donc vers une certaine régularité dans l'occupation de l'espace.

Ces constatations rejoignent globalement les données de la littérature sur les résultats de la sociologie cellulaire dans les tumeurs cancéreuses. Il a ainsi été démontré que les résultats obtenus par l'utilisation du diagramme de Voronoï sont susceptibles d'être discriminants pour différents types d'une même tumeur, en pathologie pulmonaire neuro-endocrine (14), en pathologie prostatique (11), dans les tumeurs de la tête et du cou (138, 139) où ils apparaissent comme un facteur pronostique. Elles trouvent leur originalité d'une part dans le fait qu'il s'agit des premières études en sociologie cellulaire intéressant les cancers coliques, d'autre part dans la prise en compte à la fois des populations cellulaires marquées et non marquées.

**Ainsi, la sociologie cellulaire permet de distinguer des comportements différents entre deux populations cellulaires, bénigne et maligne, et d'isoler au sein de la population maligne deux groupes de cellules, selon leur degré de différenciation.**

La méthode est cependant peu utilisée car très lourde, le marquage des germes jusqu'à présent doit être fait manuellement par le pathologiste. Des avancées vers une automatisation du marquage des germes se dessinent cependant (Redha HEUS, thèse en cours au Laboratoire TIMC-IMAG).

# CONCLUSION

---

L'objet de cette thèse est l'étude des bouleversements architecturaux générés par la cancérogénèse colique, dans l'architecture spatiale des cellules, en muqueuse transformée mais également en muqueuse non transformée à proximité immédiate de la tumeur.

Nous avons pour cela utilisé les outils de l'histologie de routine, de l'immuno-histochimie et de la morphométrie mathématique.

Dans un premier temps nous avons pu établir que les modifications architecturales subies par la muqueuse au contact de la tumeur en font une entité à part. Elles consistent en une augmentation de l'épaisseur de la muqueuse avec une raréfaction du nombre de cryptes et une augmentation des cryptes anormales. Par contraste, elles montrent un profil immuno-histochimique normal pour le Ki-67, la  $\beta$ -caténine et la Cycline D1. Elles ne semblent donc pas liées à un emballement de la prolifération cellulaire mais plutôt à des mécanismes homéostatiques de maintien de la population cellulaire des cryptes normales dans une zone confrontée à l'accroissement continu de la masse tumorale contigüe, qui tend à détruire et à remplacer le tissu normal.

Dans un deuxième temps nous avons étudié au sein de tissus cancéreux et non cancéreux le comportement de la population des cellules en cycle marquées par le Ki-67. Nous avons retrouvé leur augmentation significative dans les dysplasies et les tumeurs. L'augmentation

de leur pool se fait dans un environnement dominé par l'accumulation de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique et nucléaire dans les cancers, tandis que dans les dysplasies cette augmentation est plus en corrélation avec l'accumulation de Cycline D1 nucléaire. Dans toutes ces situations, la présence de  $\beta$ -caténine cytoplasmique est directement corrélée avec l'activité mitotique du tissu, une baisse de niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine s'accompagnant d'une baisse du nombre des mitoses. Par ailleurs, nous soulignons le maintien d'une expression membranaire de la  $\beta$ -caténine dans la plupart des cancers. Cette expression coexiste avec les localisations nucléaire et cytoplasmique de la protéine. Ceci atteste l'importance des multiples rôles qui lui sont dévolus dans la croissance cellulaire, et notamment dans la prolifération, la différenciation et la mobilité cellulaire. Le maintien de son expression membranaire constitue ainsi un frein à la mobilité cellulaire, donc à la fois à l'apoptose et aussi à la dissémination métastatique. Ce frein persiste longtemps dans la progression tumorale.

Nos observations soulignent une activité proliférative importante en surface dans tous les types de populations cellulaires étudiés. Ceci reflète les données générales de la littérature. Il serait cependant intéressant de considérer cette activité en surface en fonction de la topologie particulière du côlon. En effet le colon est un organe où l'épithélium de surface, bénin ou malin, en contact avec la lumière intestinale, est en prise avec le milieu extérieur et soumis à de nombreux facteurs environnementaux, notamment externes et de transit. Leur rôle dans le modelage des lésions, la transformation et la progression tumorale ne devrait donc pas être occulté au profit des facteurs micro-environnementaux susceptibles d'agir sur les niches cellulaires où se trouvent les cellules souches.

L'activité proliférative de surface représente dans les lésions coliques un élément de l'hétérogénéité du marquage à l'échelon tissulaire. Cette hétérogénéité pourrait avoir un impact sur les résultats. Elle est situation-dépendante : le niveau de concordance entre les lectures sur la lame entière et les lectures sur des zones sélectionnées est mauvais. Elle est marqueur-dépendante: ainsi la distribution du marquage par la  $\beta$ -caténine semble relativement homogène. Elle permet de mettre en évidence des topographies préférentielles de certains marqueurs et d'en tirer des corrélations avec d'autres paramètres.

L'évaluation de l'hétérogénéité du marquage reste cependant subjective. Nous avons voulu la quantifier au moyen d'un outil mathématique robuste et fiable, que nous avons appliqué pour la première fois à l'étude des cancers coliques. L'index d'hétérogénéité qu'il génère montre que les cancers coliques ont un très haut niveau d'hétérogénéité mais que cependant cette hétérogénéité diminue quand la tumeur progresse dans la voie de la dédifférenciation. Ceci est peut-être dû au fait que le nombre des cellules marquées par le Ki-67 atteint un pourcentage par rapport aux cellules négatives qui « homogénéise » le marquage. Ce résultat préliminaire mérite d'être étendu à des échantillons plus importants au cours d'études de corrélations cliniques.

Enfin, nous avons montré que les paramètres de la sociologie cellulaire permettent d'identifier une population de cancers coliques de haut grade dont les cellules génèrent une occupation particulière de l'espace avec une augmentation du désordre spatial. Comme pour l'index d'hétérogénéité, il s'agit d'un résultat préliminaire sur les cancers coliques, qui devrait être complété par des études de survie.

Les résultats obtenus dans ce travail essentiellement morphologique ne sont pas que théoriques.

Au contraire, ils devraient à terme permettre d'apporter une aide au diagnostic anatomopathologique et au pronostic de certains états pathologiques cancéreux et précancéreux. En effet, en soulignant et en précisant les modifications de la muqueuse au contact d'une tumeur colique, nous voudrions introduire la notion de "**muqueuse colique pérítumorale**": la reconnaissance de cette entité pourrait fournir au pathologiste des arguments pour évoquer une pathologie maligne de proximité, sur des prélèvements biopsiques et endoscopiques de petite taille qui n'ont pas toujours pu intéresser des fragments de tumeur.

Par ailleurs, l'hétérogénéité de distribution du marquage immuno-histochimique de certains marqueurs dans la pathologie cancéreuse est bien connue. On a souvent suggéré qu'elle puisse avoir une valeur pronostique, ce qui n'a jamais été validé sur de grandes séries de patients. On a vu qu'elle a pu être utilisée, notamment en Sociologie Cellulaire, pour obtenir une meilleure classification des tumeurs, avec pour conséquence une meilleure prise en charge thérapeutique du patient. Le problème majeur pour faire de cette hétérogénéité du marquage un outil au service du patient, est d'obtenir des résultats objectifs, reproductibles et quantifiables. L'utilisation de l'index d'hétérogénéité de

distribution spatiale du marquage, qui a ici été testé dans un petit nombre de cancers coliques, devrait pouvoir répondre à cet objectif. Il reste encore à le rendre praticable en routine, c'est-à-dire en pratique à simplifier les protocoles d'acquisition et de marquage des centres des cellules, qui à l'heure actuelle sont semi-automatiques et nécessitent un temps de travail du pathologiste peu compatible avec une pratique journalière.

Enfin, l'hétérogénéité du marquage pour le même marqueur sur des spots différents d'une même lame , si elle ne remet pas en cause la validité reconnue des méthodes de TMAs , montre les limites de la méthode: Elle met également en évidence son intérêt en tant que complément de la lecture sur lame entière, pour souligner la spécificité éventuelle de tel ou tel marqueur.



# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. ABERLE H, BAUER A, STAPPERT J et al.  $\beta$ -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO*, 1997, 16, p.3797-3804.
2. ADACHI M, OKINAGA K, MUTO T. Flat adenoma of the large bowel : reevaluation with special reference to central depression. *Dis Colon Rectum*, 2000, 43, p.7872-787.
3. ADACHI Y, YAMAMOTO H, ITOH F et al. Clinicopathologic and prognostic significance of Matrilysin expression at the invasive front in human colorectal cancer. *Int J Cancer* (Pred. Oncol.), 2000, 95, p.290-294 .
4. ANDREYEV HJN, NORMAN AR, CUNNINGHAM D et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl.Cancer Inst*, 1998, 90, p.675-684.
5. ANDRIEU P., COLNOT S., GODARD C. et al. Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development*, 2005, 132, p.1443-1451.
6. ARBER N, HIBSHOOSH H, MOSS SF et al. Increased Expression of Cyclin D1 Is an Early Event in Multistage Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 1996, p. 669-674.
7. ASTLER VB, COLLER FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg*, 1954, 139, p.846-864.
8. BACH SP, RENEHAN AG, POTTEN CS. Stem cells: The intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis*, 2000, 21, p.469-476.
9. BALDIN V, LUKAS J, MARCOTE MJ et al. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev*, 1993, 7, p.812-821.
10. BARIOL C, HAWKINS NJ, TURNER JJ et al. Histopathological and clinical evaluation of serrated adenomas of the colon and rectum. *Mod Pathol*, 2003,16, p.417-423.
11. BARTELS PH., MONTIRONI R., HAMILTON PW. et al. Nuclear chromatin texture in prostatic lesions. II. PIN and malignancy associated changes. *Anal Quant Cytol Histol*, 1998, 20, p.389-396.
12. BARTKOVA J, LUKAS J, STRAUSS M et al. The PRAD-1/cyclin D1 oncogene product accumulates in a subset of colorectal carcinoma. *Int J Cancer*, 1994, 58, p.568-573.
13. BIENZ M, CLEVERS H. Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling. *Cell*, 2000, 103, p. 311-320,.
14. BIGRAS G., MARCELPOIL R., BRAMBILLA E., BRUGAL G. Cellular sociology applied to neuroendocrine tumors of the lung : Quantitative model of neoplastic architecture. *Cytometry*, 1996, 24, p.74-82.
15. BJERKNES M. Expansion of mutant stem cell population in the human colon. *J Theor Biol*, 1996, 178, p.381-385.



16. BJERKNES M, CHENG H, HAY K et al. APC mutation and the crypt cycle in murine and human intestine. *Am J Pathol*, 1997 ;150 p.833-839.
17. BOMAN BM., WALTERS R., FIELDS JZ. et al. Colonic Crypt Changes during Adenoma Development in Familial Adenomatous Polyposis. *Am J Pathol*, 2004, 165, p.1489-1498.
18. BRABLETZ T, HERMANN K, JUNG A et al. Expression of nuclear  $\beta$ -catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas. *Am J Pathol*, 2000, 156, p.865-870.
19. BRETNALL TA, CRISPIN DA, RABINOVITCH PS et al. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 1994, 107, p.369-378.
20. BRITTAN M, WRIGHT NA. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol*. 2002 ,197, p.492-509.
21. BUBENDORF L, NOCITO A, MOCH H et al. Tissue microarray (TMA) technology : miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*, 2001, 195, p. 72-79.
22. CADIGAN KM, NUSSE R. Wnt signaling : a common theme in animal development. *Genes Dev*, 1997, 11, p.3286-3305.
23. CALIN GA, GAFA R, TIBILETTI MG et al. Genetic progression in microsatellite instability high (MSI-H) colon cancers correlates with clinico-pathological parameters : a study of the TGF $\beta$ RII, BAX, hMSH3, hMSH6, IGFIR and BLM genes. *Int J Cancer (Pred. Oncol.)*, 2000, 89, p.230-235.
24. CAMP RI, CHARRETTE LA, RIMM DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, 2000, 80, p.1943-1949.
25. CHAN I.OO, BROADDUS R.R, HOULIHAN PS et al. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol*, 2002, 160, p.1823-1830.
26. CHAPMAN JW, WOLMAN E, WOLMAN SR et al. Assessing genetic markers of tumour progression in the context of intratumour heterogeneity. *Cytometry*, 1998, 31, p.67-73.
27. CROIX BST, SHEEHAN C, RAK JW et al. E-Cadherin-dependent Growth Suppression is Mediated by the Cyclin-dependent inase Inhibitor 27<sup>KIP1</sup>. *J. Cell Biol*, 1998, 142, p.557-571.
28. CROSNIER C, STAMATAKI D, LEWIS J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet*, 2006, 7 , p.349-359.
29. DE LA CHAPELLE A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4, p.769-780.

30. DUESBERG P, RAUCH C, RASNICK D et al. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95, p.13692-13697.
31. . ELKABLAWY MA, MAXWELL P, WILLIAMSON K et al. Apoptosis and cell-cycle regulatory proteins in colorectal carcinoma : relationship to tumour stage and patient survival. *J Pathol*, 2001, 4, p.435-442.
32. ENGELLAU J, PERSSON A, BENDAHL PO. Expression profiling using tissue microarray in 211 malignant fibrous histiocytomas confirms the prognostic value of Ki-67. *Virchows Arch*, 2004, p.224-230.
33. FENSEL D. Ontologies : A Silver Bullet for knowledge Management and Electronic Commerce. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 2004.
34. FODDE R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 2002, 38. p. 867-871.
35. FODDE R, KUIPERS J, ROSENBERG C et al. Mutations in the APC gene tumor suppressor gene cause chromosomal instability . *Nat Cell Biol*, 2001, 3, p. 433-438.
36. GALLE J, LOEFFLER M, DRASDO D. Modeling the effect of deregulated proliferation and apoptosis on the growth dynamics of epithelial cell populations in vitro. *Biophys J*, 2006, 88, p.62-75.
37. GARCIA SB., NOVELLI M., WRIGHT NA. The clonal origin and clonal evolution of epithelial tumours. *Int J Exp Patho*, 2000, 81, p. 89-115.
38. GASPAR C, FODDE R. APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *Int J Dev Biol*, 2004, 48, p.377-386.
39. GATENBY RA, VINCENT TL. An Evolutionary Model Of Carcinogenesis. *Cancer Res*, 2003, 63, p. 6212-6220.
40. GERIKE TG, PAULUS U, POTTEN CS et al. A dynamic model of proliferation and differentiation in the intestinal crypt based on a hypothetical intraepithelial growth factor. *Cell Prolif*, 1998, 31, p.93-110.
41. GREENE FL, PAGE DL, FLEMING ID, et al. AJCC Cancer Staging Manual, 6<sup>th</sup> Edition. New York, NY: Springer Verlag, 2003.
42. GRODEN J, THLIVERIS A, SAMOWITZ W et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 1991, 66, p.589-600.
43. GRUBER T. Interactive Acquisition of Justifications: Learning “Why” by Being Told “What”. *IEEE Expert*, 1991, 6, p. 65-75.
44. HAMILTON SR. Origin of Colorectal Cancers in Hyperplastic Polyps and Serrated Adenomas : Another Truism Bites the Dust. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93, p. 593-607.

45. HAMILTON SR, AALTONEN LA. WHO Histological classification of tumours of the colon and rectum. In : SR. Hamilton and LA Aaltonen (eds), World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of the Digestive System. Lyon, France : IARC Press, 2000.
46. HAO X, TOMLINSON I, ILYAS M et al. Reciprocity between membranous and nuclear expression of beta-catenin in colorectal tumours. *Virchows Arch*, 1997, 431, p.167-172.
47. HARADA N, MIYOSHI H, MURAI N et al. Lack of tumorigenesis in the mouse liver after adenovirus-mediated expression of a dominant stable mutant of beta-catenin. *Cancer Res* 2002, 62, p.1971-1977.
48. HARADA N, TAMAI Y, ISHIKAWA T et al. Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO*, 1999, 18, p. 5931-5932.
- 49 HAWKINS NJ, WARD RL. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J. Natl. Cancer Inst*, 2001, 93, p.1307-1313.
- 50 HENSHALL S. Tissue Microarrays. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2003, 8, p.112-124.
51. HERMSEN M, POSTMA C, BAAK J et al. Colorectal Adenoma to Carcinoma Progression Follows Multiple Pathways of Chromosomal Instability. *Gastroenterology* 2002,123, p.1109-1119.
52. HERTER P, KUHNEN C, MULLER KM et al. Intracellular distribution of beta-catenin in colorectal adenomas, carcinomas and Peutz-Jeghers polyps. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1999, 125, p.297-304.
53. HOOS A, URIST MJ, STOJADINOVIC S et al. Validation of Tissue Microarrays for Immunochemical Profiling of Cancer Specimens Using the Example of Human Fibroblastic Tumors. *Am J Pathol*, 2001, 158, p.1245-1251.
54. ILYAS M. : Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol* 2005, 205, p.130-144.
55. ILYAS M., TOMLINSON IPM. Genetic pathways in colorectal cancer. *Histopathology*, 1996, 28, p.389-399.
56. IWAMOTO M, AHNEN DJ, FRANKLIN WA et al. Expression of  $\beta$ -catenin and full-length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues. *Carcinogenesis*, 2000, 21, p. 1935-1940.
57. JANSSON EA, ARE A, GREICIUS G et al. The Wnt/beta-catenin signaling pathway targets PPARgamma activity in colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102, p. 1460-1465.

58. JASS JR. Serrated route to colorectal cancer : back street or super highway ? *J. Pathol.* 2001, 193, p.283-285.
59. JASS JR, SMITH M. Sialic acid and epithelial differentiation in colorectal polyps and cancer-a morphological, mucin and lectin histochemical study. *Pathology*, 1992, 24, p.233-242.
60. JEN J, POWELL SM, PAPADOPOULOS N et al. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res*, 1994, 54, p.5523-5526.
61. JOHNSTON PG, O'BRIEN MJ, DERVAN PA et al. Immunohistochemical analysis of cell kinetic parameters in colonic carcinomas, adenomas and normal mucosa. *Hum Pathol*, 1989, 20, p. 696-700.
62. JONES PA, GONZALGO ML. Altered DNA methylation and genome instability : a new pathway to cancer ? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94, p. 2103-2105.
63. JUBB AM, BELL SM, QUIRKE P. Methylation and colorectal cancer. *J Pathol*, 2001, 195, 1, p.111-134.
64. JUNG A, SCHRAUDER M, OSWALD U et al. The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows colocalization of nuclear  $\beta$ -catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *Am J. Pathol*, 2001, 159, p.1613-1617.
65. KAPITANOVIC S, SPAVENTI R, LJILJANA P et al. High c-erbB-2 Protein Level in Colorectal Adenocarcinomas Correlates with Clinical Parameters. *Cancer Detect Prev*, 1994, 18, 2, p.97-102.
66. KAPLAN KB, BURDS AA, SWEDLOW JR et al. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol*, 2001, 3, p.429-432.
67. KIM KM., SHIBATA D. Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene*, 2002, 21, p.5441-5449.
68. KINZLER KW, NILBERT MC, SU LK et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 1991, 253, p.661-665.
69. KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell*, 1996, 87, p.159-170.
70. KNUDSON AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Gen*, 2001, 1, p.157-162.
71. KOMAROVA NL, WANG L. Initiation of colorectal cancer: Where do the two hits hit? *Cell Cycle*, 2004, 3, p.1558-1565.
72. KRISTT D, WINSTON GJ, MELLOV MM et al. Patterns of Proliferative Changes in Crypts Bordering Colonic Tumors : Zonal Histology and Cell Cycle Marker Expression. *Pathol Oncol Res*, 1999, 5, P. 297-303.

73. KUDO S, KASHIDA H. Superficial types of colon cancer. Focus on the differences between depressed carcinoma and the so-called flat adenoma. *Dig Endosc*, 1996, 8, p.87-92 .
74. KUDO S, KASHIDA H, TAMURA T. Early colorectal cancer : flat depressed type. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000, 15, D-66-70.
75. KUHNERT F., DAVIS C.R., WANG H.T. et al. (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, p.266-271.
76. LAMBERT R, CHAVAILLON A. Adénomes plans du colon et du rectum. *Acta Endoscopica*, 2002, 32, p. 208-213.
77. LAMPRECHT SA, LIPKIN M. Migrating colonic crypt epithelial cells : Primary targets for transformation. *Carcinogenesis*, 2002, 23, p.1777-1780.
78. LANTUEJOUL C. Ergodicity and integral range. *J Microsc*, 1991, 161, p.387-403.
79. AURENT-PUIG P, BLONS H, CUGNENC PH. Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev*, 1999, 8, p.539-547.
80. LOEB LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*, 2001, 61, p.3230-3239.
81. LYNCH HT, SMYRK T, MCGINN T et al. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer*, 1995, 76, 2427-2433.
82. MATHERON G. Estimating and Choosing, Berlin: Springer-Verlag, 1989.
83. MEINEKE FA, POTTEN CS, LOEFFLER M. Cell migration and organization in the crypte using a lattice-free model. *Cell Prolif*, 2001, 34, p.253-266.
84. MERRITT AJ, POTTEN CS, WATSON AJM et al. Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Science*, 1995, 108, p. 2261-2271.
85. MILLS SJ., MATHERS JC., CHAPMAN PD. et al. Colonic crypt cell proliferation state assessed by whole crypt microdissection in sporadic neoplasia and familial adenomatous polyposis. *Gut*, 2001, 48, p.41-46 .
86. MIYASHIRO I, SENDA T, MATSUMINE A et al. Subcellular localization of the APC protein : immunoelectron microscopic study of the association of the APC protein with catenin. *Oncogene*, 1995, 11, p.89-96.
87. MIYOSHI K, HENNINGHAUSEN L.  $\beta$ -Catenin : a transforming actor on many stages. *Breast Cancer Res*, 2003, 5, p.63-68.

88. MIYOSHI Y, NAGASE H, ANDO H et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation clusters region in the APC gene. *Hum Mol Genet*, 1992, 1, p.229-233.
89. MOREL D, MARCELPOIL R, BRUGAL G. A proliferation control network model: The simulation of two-dimensional epithelial homeostasis. *Acta Biotheor*, 2001, 49, p.219-234.
90. MOSS SF, LIU TC, PETROTOS A et al. Inward growth of colonic adenomatous polyps. *Gastroenterology*, 1996, 111, p.1425-1432.
91. MURPHY KJ, NIELSON KR, ALBERTINE KH. Defining a Molecularly Normal Colon. *J Histochem Cytochem*, 2001, 49, p.667-668.
92. NAGASE H, ET NAKAMURA Y. Mutations of the APC (Adenomatous Polyposis coli) gene. *Hum. Mutat*, 1993, E, p. 425-434.
93. NUCCI MR, ROBINSON CR, LONGO P et al. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum Pathol*, 1997, 28, p.1396-1407.
94. NUSSE R, VARMUS HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 1982, 31, p.99-109.
95. ORFORD K, CROCKETT C, JENSEN J et al. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of  $\beta$ -catenin. *J Biol Chem*, 1997, 272, p.24735-24738.
96. OXFORD UNIV et CCLR. Modelling Colorectal Cancer. *Integrative Biology Project* [en ligne].2005.Disponible sur :<http://integrativebiology.ox.ac.uk/develvre.htm>
97. PARK CC, BISSELL MJ, BARCELLOS-HOFF MH. The influence of the microenvironnement on the malignant phenotype. *Mol Med*, 2000, 6, p.324-329.
98. PARK HS, GOODLAD RA, WRIGHT NA et al. Crypt fission in the small intestine and colon : A mechanism for the emergence of G6PD locus-mutated crypts after treatment with mutagens. *Am J Pathol*, 1995,147, p.1416-1422.
99. PAULSEN JE., STEFFENSEN IL., LOBERG EM. Qualitative and Quantitative Relationship between Dysplastic Aberrant Crypt Foci and Tumorigenesis in the Min/+ Mouse Colon. *Cancer Res*, 2001, 61, p. 5010-5015.
100. PINTO D, CLEVERS H : Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol Cell*, 2005, 97, p.185-196.
101. PINTO D, GREGORIEFF A, BEGTHEL H et al. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epitheliul. *Genes Dev*, 2003, 17, p.1709-1713.
102. POLAKIS P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 2000; 14, p.1837-1851.

103. PONZ DE LEON M, RONCUCCI L, DIDONATO P et al. Pattern of epithelial cell proliferation in colorectal mucosa of normal subjects and of patients with adenomatous polyps or cancer of the large bowel. *Cancer Res*, 1988, 48, p.4121-4126.
104. POTET F., SOUILLARD J. Polyps of the rectum and colon, *Gut*, 1971, 12, p.468-482.
105. POTTEN CS, ROBERTS SA, CWALINSKI S et al. Scoring mitotic activity in longitudinal sections of crypts of the small intestine. *Cell Tissue Kinet*, 1988, 21, p.231-246.
106. POTTER JD. Colorectal cancer: Molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91, p.916-932.
107. POWEL SM, ZILZ N, BEAZER-BARCLAY Y et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 1992, 359, p.235-237.
108. PRESTON S, WONG WM, CHAN O. et al. Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas : origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res*, 2003, 63, p.3819-3825.
109. PRETLOW TP, BARROW BJ, ASHTON WS et al. Aberrant crypts. Putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res*, 1991, 51, p.1564-1567.
110. RIPLEY BD. Spatial Statistics. New-York: Wiley, 1987.
111. RISIO M, ROSSINI FP. Cell proliferation in colorectal adenomas containing carcinomas. *Anticancer Res*, 1993, 13, p.43-48.
112. RONCUCCI L, STAMP D, MELINE A et al. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol*, 1991, 2, p.387-394..
113. RUBINFELD B, SOUZA B, ALBERT I et al. Association of the APC gene product with  $\beta$ -catenin. *Science*, 1993, 262 , p.1731-1734.
114. RUBINFELD B, ALBERT I, PORFIRI E et al. Loss of  $\beta$ -catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res*, 1997, 57, p. 4624-4630.
115. RUPNARAIN C, DLAMINI Z, NAICKER S, BHOOLA K. Colon cancer : genomics and apoptotic events. *Biol Chem*, 2004, 385, p. 449-464.
116. SAMOWITZ WS, POWERS MD, SPIRIO LN et al. Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Res*, 1999, 59, p.1442-1444.
117. SAWYER EJ, CERAR A, HANBY AM et al. Molecular characteristics of serrated adenomas of the colorectum. *Gut*, 2002, 51, p.200-206.
118. SCHEMPER RJ, ITABASHI M, KATO Y et al. Differences in the diagnostic criteria used by Japanese and Western pathologists to diagnose colorectal carcinoma. *Cancer*, 1998, 82, p.60-69.

119. SCHEMPER RJ, RIDDELL RH, KATO Y et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*, 2000, 47, p.251-255.
120. SELLIN JH, UMAR S, XIAO J. Increased  $\beta$ -Catenin Expression and Nuclear Translocation Accompany Cellular Hyperproliferation in vivo. *Cancer Res*, 2001, 61,p.2899-2906.
121. SENDA T, MIYASHIRO I, MATSUMINE A et al. The tumor suppressor protein APC colocalizes with  $\beta$ -catenin in the colon epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 223, p.329-334.
122. SHARIFI-SALAMATIAN V. Approche statistique de l'hétérogénéité intra-tumorale et application aux grades histopathologiques du cancer du sein. Thèse Université Paris Diderot, Paris 7, 2002.
123. SHARIFI-SALAMATIAN V, PESQUET-POPESCU B, SIMONY-LAFONTAINE J et al.: Index for spatial heterogeneity in breast cancer. *J Microsc*, 2004, 216, p.110-122.
124. SHARIFI-SALAMATIAN V, SIMONY-LAFONTAINE J. On stereological estimation in the presence of spatial heterogeneity. *Image Analysis in Medical Microscopy and Pathology*; Wu HS and Einstein AJ eds., Keraia, 2007, p. 153-165 (sous presse).
125. SHERGILL IS, SHERGILL NK, ARYA M, PATEL HRH. Tissue Microarrays : a current medical research tool. *Current Medical Research and Opinions*, 2004, 20, 2004, p.707-712
126. SHIH I-M, WANG T-L, TRAVERSO G et al : Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98, p. 2640-2645.
127. SHIH TM., ZHOU W., GOODMAN SN .et al. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 2001, 61, p. 818-822,
128. SHIN I, YAKES FM, ROJO F et al. Akt/PKB mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27<sup>Kip1</sup> on threonin 157 and modulation of its cellular localization. *Nature Med*, 2002, 8, p.1145-1152
129. SHPITZ B, BORNSTEIN Y, MEKORI Y et al. Aberrant crypt foci in human colons : distribution and histomorphologic characteristics. *Hum Pathol*,1998, 29, p.469-475.
130. SHPITZ B, BORNSTEIN Y, MEKORI Y et al. Proliferating Cell Nuclear Antigen as a Marker of Cell Kinetics in Aberrant Crypt Foci, Hyperplastic Polyps, Adenomas, and Adenocarcinomas of the Human Colon. *Am J Surg*, 1997, 174, p.425-430.
131. SMALLWOOD RH, HOLCOMBE WML, WALKER DC. Development and validation of computational models of cellular interaction. *J Mol Histol*, 2004, 35, p.659-665.
132. SMITH AJ, STERN HS, PENNER M et al. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res*, 54, 1994, p. 5527-5530.



133. SMITH G, CAREY FA, BEATTIE J et al. Mutations in APC, Kirsten-ras and p53 – alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99,14, p. 9433-9438.
134. SMITH KJ, JOHNSON KA, BRYAN TM et al . The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*,1993, 90, p.2846-2850.
135. SMITH KJ, LEVY DB, MAUPIN P et al. Wild-type but not mutant APC associates with the microtubule cytoskeleton. *Cancer Res*,1994, 54, p.3676-3681.
136. SOENGAS MS, CAPODIECI P, POLSKY D et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 2001, 409, p. 207-211.
137. SPIRIO L, OLSCHWANG S, GRODEN J, et al. Alleles of the APC gene : an attenuated form of familial polyposis. *Cell*, 1993, 75, p. 951-957.
138. SUDBØ J., BANKFALVI A., BRYNE M. et al. Prognostic Value of Graph Theory-Based Tissue Architecture Analysis in Carcinomas of the Tongue. *Lab Invest*, 2000, 80, p.1881-1889.
139. SUDBØ J, MARCELPOIL R, REITH A. New algorithms based on the Voronoi Diagram applied in a pilot study on normal mucosa and carcinomas. *Anal Cell Pathol*, 2000, 21, p.71-86.
140. SUTTER T, DOI S, CARNEVALE KA et al. Expression of Cyclin D1 and E in human colon adenocarcinomas. *J Med*, 1997, 28, p.285-309.
141. TAKAYAMA T, KATSUKI S, TAKAHASHI Y et al. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med*, 1998, 339, p.1227-1284.
142. TAKAYAMA T, OHI M, HAYASHI T et al. Analysis of K-ras, APC and  $\beta$ -catenin in Aberrant Crypt Foci in Sporadic Adenoma, Cancer, and Familial Adenomatous Polyposis. *Gastroenterology*, 2001, 121, p.599-611.
143. TEICH MC, HENEGHAN C, LAVEN SB et al. Estimating the fractal exponent of point processes in biological systems using wavelet - and Fourier- transform methods. In: Aldrouby A and Unser M (eds), *Wavelets in Biology and Medicin*. p.383-412. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, 1996.
144. TERPSTRA OT, VAN BLANKENSTEIN M, DEES J et al. Abnormal pattern of cell proliferation in the entire colonic mucosa of patients with colon adenoma or cancer. *Gastroenterology*, 1987, 92, p. 704-708.
145. TETSU O , MCCORMICK F. Beta-catenin regulates expression of Cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 1999, 398,p. 422-426.
146. *TNM classification des tumeurs malignes*, 6<sup>o</sup> éd. Paris : Cassini ; 2003.p.63-106
147. TOMITA T. DNA ploidy and proliferative cell nuclear antigen in colonic adenomas and adenocarcinomas. *Dig Dis Sci*,1995, 40, p.996-1004.

148. TORLAKOVIC E, SKOVLUND E, SNOVER DC et al. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol*, 2003, 27, p.65-81.
149. VAN DIEST PJ, BAAK JP, MATZE-COK P et al. Reproducibility of mitosis counting in 2,469 breast cancer specimens: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Hum Pathol*, 1992, 23, p.603-607.
150. VAN DIEST PJ, BRUGAL G, BAAK JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol*, 1998, 51, p.716-24.
151. VAN DE RIJN M, GILKS CB. Applications of microarrays to histopathology *Histopathology*, 2004, 44, p.97-108.
152. VAN LEEUWEN IMM, BYRNE HM, JENSEN OE et al. Crypt dynamics and cancer : advances in mathematical modelling. *Cell Prolif*, 2006, 39, 3, p.157-81.
153. VIGLIETTO G, MOTTI ML, BRUNI P et al. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup> by Akt/PKB-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature Med*, 2002, 8, p.1136-1144.
154. WASAN HS, PARK HS, LIU KC. APC in the regulation of intestinal crypt fission. *J Pathol*, 1998, 185, 3, p.246-255.
155. WILLIAMS JL, NATH N, CHEN J et al. Growth Inhibition of Human Colon Cancer Cells by Nitric Oxide (NO)-Donating Aspirin Is Associated with Cyclooxygenase-2 Induction and  $\beta$ -Catenin/T-Cell Factor Signaling, Nuclear Factor- $\kappa$ B, and NO Synthase 2 Inhibition : Implications for Chemoprevention. *Cancer Res*, 2003, 63, p.7613-7618.
156. WILSON RG, SMITH AN, BIRD CC. Immunohistochemical detection of abnormal cell proliferation in colonic mucosa of subjects with polyps. *J Clin Pathol*, 1990, 43, p.744-747.
157. WONG AST, GUMBINER BM. Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *J Cell Biol*, 2003, 161, p.1191-1203.
158. WONG NACS, MORRIS PG, McCONDOCHIE AM et al. Cyclin D1 overexpression in colorectal carcinoma in vivo is dependent on  $\beta$ -catenin protein dysregulation, but not K-ras mutation. *J Pathol*, 2002, 197, p.128-135.
159. WONG W-M, MANDIR N, GOODLAD et al. Histogenesis of human colorectal adenomas and hyperplastic polyps : the role of cell proliferation and crypt fission. *Gut*, 2002, 50, p.212-217.
160. YAMADA Y, YOSHIMI N, HIROSE Y et al. Frequent  $\beta$ -catenin gene Mutations and Accumulations of the Protein in the Putative Preneoplastic Lesions Lacking Macroscopic Aberrant crypt Foci Appearance, in Rat Colon carcinogenesis. *Cancer Res*, 2000, 60, p.3323-3327.

161. YASUYUKI M, KOKICHI S, FUMIO K et al. Extensive Methylation of hMLH1 Promoter Region Predominates in Proximal Colon Cancer with Microsatellite Instability. *Gastroenterology*, 2001, 121, P. 1300-1309.
162. YOUNG C, KITAMURA M, HARDY S et al. Wnt-1 induces growth, cytosolic  $\beta$ -catenin, and Tcf/Lef transcriptional activation in Rat-1 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 1998, 18, p.2474-2485.
163. YOUNÈS M., LECHAGO LV., LECHAGO J. Overexpression of the human erythrocyt glucose transporter occurs as a late event in human colorectal carcinogenesis and is associated with an increased incidence of lymph node metastases. *Clin Cancer Res*, 1996, 2, p.1151-1154.
164. ZUKERBERG L. The Molecular Basis of Dysplasia. *Sem Diagn Pathol*, 2002,19, p.48-55.

## TABLE DES FIGURES

- FIGURE 1 : LES DIFFERENTES REGIONS DU COLON
- FIGURE 2 : MUQUEUSE COLIQUE NORMALE : SECTION TRANSVERSALE
- FIGURE 3 : MUQUEUSE COLIQUE NORMALE : SECTION LONGITUDINALE
- FIGURE 4 : SCHEMA DE MISE EN PLACE FONCTIONNELLE DE LA MUQUEUSE INTESTINALE
- FIGURE 5 : ZONE DE NEOPLASIE EPITHELIALE DE HAUT GRADE
- FIGURE 6 : ADENOME PLAN "SERRATED"
- FIGURE 7 : ADENOME PLAN "SERRATED" : DETAIL DE LA MUQUEUSE
- FIGURE 8 : ADENOME TUBULOVILLEUX : VUE D'ENSEMBLE
- FIGURE 9 : ADENOME TUBULOVILLEUX : VUE D'ENSEMBLE
- FIGURE 10 : ADENOME TUBULOVILLEUX : ZONE VILLEUSE
- FIGURE 11 : DE LA MUQUEUSE NORMALE AU CANCER
- FIGURE 12 : ADENOCARCINOME LIEBERKUHNEN BIEN DIFFERENCIE SUR ADENOME PREEXISTANT
- FIGURE 13 : ADENOME LIEBERKUHNEN MOYENNEMENT DIFFERENCIE : ENVAHISSEMENT EN PROFONDEUR
- FIGURE 14 : ADENOCARCINOME MOYENNEMENT DIFFERENCIE : ENVAHISSEMENT D'UN FILET NERVEUX
- FIGURE 15 : ADENOCARCINOME LIEBERKUHNEN AVEC CONTINGENT PEU DIFFERENCIE
- FIGURE 16 : ADENOCARCINOME LIEBERKUHNEN AVEC CONTINGENT PEU DIFFERENCIE DETAIL
- FIGURE 17 : ADENOCARCINOME MUCINEUX
- FIGURE 18 : CELLULES EN BAGUE A CHATON
- FIGURE 19 : ONTOLOGIE DU CCR
- FIGURE 20 : SCHEMA DE VOGELSTEIN MODIFIE : DE L'EPITHELIUM NORMAL AU CANCER
- FIGURE 21 : LA VOIE CANONIQUE WNT

FIGURE 22 : INTERACTIONS ENVIRONNEMENTALES ET COMPORTEMENT CELLULAIRE

FIGURE 23 : EXEMPLE DE DIAGRAMME DE VORONOÏ

FIGURE 24 : ZONES DE "SPOTTING VIRTUEL" SUR LAME H.E.S.

FIGURE 25 : STATION DE TRAVAIL POUR L'ACQUISITION DES IMAGES ET LA NAVIGATION SUR LAME VIRTUELLE

FIGURE 26 : MARQUAGE AU KI-67 : EXEMPLE DE POSITIONNEMENT DE LA GRILLE VIRTUELLE SUR UNE ZONE D'INTERET

FIGURE 27 : MARQUAGE DES GERMES

FIGURE 28 : CONSTRUCTION D'UN DIAGRAMME DE VORONOÏ

FIGURE 29 : DIVERSES FORMES DE CRYPTES OBSERVEES EN MUQUEUSE NON TUMORALE

FIGURE 30 : MUQUEUSE A DISTANCE DE LA TUMEUR

FIGURE 31 : MUQUEUSE ADJACENTE A LA TUMEUR : VUE D'ENSEMBLE

FIGURE 32 : MUQUEUSE ADJACENTE A LA TUMEUR : ABOUCHEMENT UNIQUE POUR PLUSIEURS CRYPTES

FIGURE 33 : MUQUEUSE ADJACENTE A LA TUMEUR : BOURGEONNEMENTS LATERAUX

FIGURE 34 : ADENOME TUBULOVILLEUX EN DYSPLASIE : MARQUAGE PAR KI-67

FIGURE 35 : ADENOME TUBULOVILLEUX EN DYSPLASIE MIXTE, DEGRE BAS ET DEGRE ELEVE : MARQUAGE PAR  $\beta$ -CATENINE

FIGURE 36 : ADENOME TUBULOVILLEUX : JONCTION DYSPLASIE BAS DEGRE-DEGRE ELEVE : MARQUAGE PAR  $\beta$ -CATENINE

FIGURE 37 : ADENOME TUBULOVILLEUX EN DYSPLASIE DE DEGRE ELEVE : MARQUAGE PAR  $\beta$ -CATENINE

FIGURE 38 : ADENOME TUBULOVILLEUX EN DYSPLASIE DE DEGRE ELEVE : MARQUAGE PAR CYCLINE D1

FIGURE 39 : ADENOME TUBULOVILLEUX EN DYSPLASIE DE DEGRE ELEVE : MARQUAGE PAR CYCLINE D1

FIGURE 40 : ADENOCARCINOME LIEBERKUHNEN PEU DIFFERENCIE : MARQUAGE PAR KI-67

FIGURE 41 : ADENOCARCINOME LIEBERKUHNEN PEU DIFFERENCIE : MARQUAGE PAR  $\beta$ -CATENINE

FIGURE 42 : ADENOCARCINOME LIEBERKUHNEN PEU DIFFERENCIE : MARQUAGE PAR  $\beta$ -CATENINE

FIGURE 43 : ADENOCARCINOME LIEBERKUHNEN PEU DIFFERENCIE : MARQUAGE PAR  $\beta$ -CATENINE

FIGURE 44 : ADENOCARCINOME LIEBERKUHNEN PEU DIFFERENCIE : MARQUAGE PAR CYCLINE D1

FIGURE 45 : ADENOCARCINOME LIEBERKUHNEN PEU DIFFERENCIE : MARQUAGE PAR CYCLINE D1

FIGURE 46: DISTRIBUTION DU KI-67 EN FONCTION DES STADES TNM

FIGURE 47 :COMPARAISON DES NIVEAUX D'EXPRESSION DES DIFFERENTS MARQUEURS

FIGURE 48 : HISTOGRAMME DE DISTRIBUTION DU KI-67 PAR NIVEAUX DANS LES CANCERS

FIGURE 49 : HISTOGRAMME DE DISTRIBUTION DE LA BETA-CATENINE NUCLEAIRE PAR NIVEAUX DANS LES CANCERS

FIGURE 50: HISTOGRAMME DE DISTRIBUTION DE LA BETA-CATENINE CYTOPLASMIQUE PAR NIVEAUX DANS LES CANCERS

FIGURE 51: HISTOGRAMME DE DISTRIBUTION DE LA CYCLINE D1 PAR NIVEAUX DANS LES CANCERS

FIGURE 52: HISTOGRAMME DE DISTRIBUTION DE LA BETA-CATENINE NUCLEAIRE PAR NIVEAUX DANS LE GROUPE DES TUMEURS T1-T2.

FIGURE 53: HISTOGRAMME DE DISTRIBUTION DE LA CYCLINE D1 PAR NIVEAUX DANS LE GROUPE DES TUMEURS T3-T4

FIGURE54:HISTOGRAMME MONTRANT LA DISTRIBUTION DE L'INDEX D'HETEROGENEITE DANS LES POPULATIONS CELLULAIRES DES TROIS GRADES

FIGURE 55 : DIAGRAMME DE VORONOÏ DANS UNE ZONE DE MUQUEUSE NORMALE

FIGURE 56: DIAGRAMMA DE VORONOÏ DANS UNE ZONE DYSPLASIQUE

FIGURE 57 : DIAGRAMME DE VORONOÏ DANS UN CANCER BIEN DIFFERENCIE

FIGURE 58 : DIAGRAMME DE VORONOÏ DANS UN CANCER PEU DIFFERENCIE

## TABLE DES TABLEAUX

- TABLEAU 1 : CORRESPONDANCE ENTRE LES STADES DE DUKES ET LES STADES TNM
- TABLEAU 2 : LES DEUX GRANDS PHENOTYPES DE CCR
- TABLEAU 3 : RECAPITULATIF DU PROTOCOLE D'ETUDE
- TABLEAU 4 : EPAISSEUR MOYENNE DE LA MUQUEUSE NON TUMORALE ET NOMBRE DE CRYPTES PAR SEQUENCE DE 4 MM
- TABLEAU 5 : L'EPAISSEUR DE LA MUQUEUSE ET LES NOMBRE DE CRYPTES SONT STATISTIQUEMENT CORRELEES A LA DISTANCE PAR RAPPORT A LA TUMEUR
- TABLEAU 6 : VALEURS MOYENNES EN POURCENTAGES DE CELLULES MARQUEES DANS LA MUQUEUSE NON TUMORALE ADJACENTE A LA TUMEUR ET ADJACENTE A CELLE-CI
- TABLEAU 7 : VALEURS MOYENNES EN POURCENTAGES DES CELLULES MARQUEES DANS LA MUQUEUSE DYSPLASIQUE ET DANS LES CANCERS INVASIFS
- TABLEAU 8 : REGROUPEMENT DES PATIENTS SELON LA PROGRESSION TUMORALE ET LE DEGRE DE MALIGNITE
- TABLEAU 9 : DISTRIBUTION DE L'INDEX D'HETEROGENEITE SUIVANT LES POPULATIONS ETUDIEES
- TABLEAU 10 : REGROUPEMENTS EN CLASSES HOMOGENES POUR LES DEGRES DE DIFFERENCIATION
- TABLEAU 11 : RESULTATS DES DONNEES DE LA SOCIOLOGIE CELLULAIRE POUR LES CELLULES EN CYCLE
- TABLEAU 12 : DONNEES MORPHOMETRIQUES ASSOCIEES A LA SOCIOLOGIE CELLULAIRE POUR LES CELLULES EN CYCLE
- TABLEAU 13 : RESULTATS DES DONNEES DE LA SOCIOLOGIE CELLULAIRE POUR LES CELLULES HORS DU CYCLE
- TABLEAU 14 : DONNEES MORPHOMETRIQUES ASSOCIEES A LA SOCIOLOGIE CELLULAIRE POUR LES CELLULES HORS DU CYCLE





# ANNEXES

## ANNEXE 1: LEXIQUE

**Adénocarcinome** : tumeur maligne développée aux dépens d'un épithélium glandulaire (= carcinome glandulaire).

**Adénocarcinome lieberkuhnien** : adénocarcinome (généralement bien différencié) dont l'architecture reproduit la structure des glandes de Lieberkuhn de la muqueuse intestinale.

**Adénocarcinome peu différencié** : sans aucune différenciation, ni cellulaire, ni tissulaire, ni fonctionnelle, et donc d'architecture peu reconnaissable (= peu différencié)

**Adénocarcinome moyennement différencié** : adénocarcinome dont l'architecture conserve un certain degré de différenciation, qui rend sa nature identifiable.

**Adénocarcinome bien différencié** : adénocarcinome dont l'architecture présente un haut degré de différenciation, rendant sa nature parfaitement identifiable (= différencié).

**Adénocarcinome non lieberkuhnien** : adénocarcinome intestinal dont l'architecture ne reprend pas la structure des glandes de Lieberkuhn.

**Adénocarcinome à cellules en bague à chaton** : adénocarcinome mucosécrétant dont les cellules, isolées ou en plages sans groupement glanduliforme, présentent une volumineuse vacuole occupant tout le cytoplasme et rejetant le noyau en périphérie.

**Adénocarcinome à cellules indépendantes** : adénocarcinome mucosécrétant dont les cellules sont isolées dans le stroma.

**Adénocarcinome mucineux** : adénocarcinome mucosécrétant, dont les cellules présentent une sécrétion de mucus.

**Adénocarcinome colloïde muqueux** : adénocarcinome mucosécrétant dont l'aspect est celui de vastes flaques de mucus contenant des cellules tumorales isolées ou groupées en petites travées.

**Adénocarcinome atypique** : adénocarcinome dont l'aspect n'est celui d'aucun des adénocarcinomes intestinaux habituels.

**Adénocarcinome infiltrant** : adénocarcinome dont les cellules ont traversé les basales et ont un pouvoir invasif (= adénocarcinome, carcinome, invasif).

**Adénocarcinome végétant** : adénocarcinome dont l'extension se fait par projection en hauteur, vers la lumière.

**Adénocarcinome ulcéré** : adénocarcinome dont la surface présente une ulcération ou une érosion.

**Adénocarcinome ulcérovégétant** : adénocarcinome à la fois végétant et ulcéré.

**Adénome** : tumeur bénigne développée aux dépens d'un tissu glandulaire, et constituée par une prolifération épithéliale bénigne présentant des degrés variés de dysplasie.

**Adénome festonné** : lésion comportant les aspects microscopiques intriqués d'un polype hyperplasique et d'un adénome avec des signes de dysplasie de grade variable.

**Adénome en dents de scie** = adénome festonné.

**Adénome dysplasique** : adénome présentant des degrés variés de dysplasie, par trouble de l'organogénèse ou du développement (= adénome).

**Adénome plan** : adénome dont l'épaisseur est inférieure au double de celle de la muqueuse saine adjacente.

**Adénome précoce** : adénome apparu dans l'histogénèse immédiatement après l'hyperplasie épithéliale, selon la séquence adénome-cancer de la carcinogénèse colique définie par Vogelstein et collaborateurs.

**Adénome tubuleux** : prolifération de tubes épithéliaux séparés par un tissu conjonctif peu important (= adénome tubuleux, polyadénome, polype adénomateux). Son extension se fait de la surface vers la profondeur.

**Adénome plan tubuleux** : adénome tubuleux qui, par son architecture plane, ne se distingue pas du relief de la muqueuse épithéliale normale.

**Adénome villeux** : constitué d'axes conjonctifs digitiformes, et dont l'extension se fait vers la lumière colique (= tumeur villeuse, papillome villeux).

**Adénome tubulovilleux** : associe des structures tubuleuses et villeuses. (= polyadénome villeux, adénome glandulovilleux).

**Adénome tubulaire** : voir « polype adénomateux ».

**Basale** : structure définie comme une « basale » et traçant les limites des différents territoires du système intercellulaire. Les membranes basales, prenant au microscope optique l'aspect d'une

bande anhiste plus ou moins épaisse, sont en fait des structures complexes de plusieurs types, présentant le plus souvent deux lames, l'une, la lamina rara ou lamina lucida, située au contact des membranes cellulaires, l'autre, la lamina densa, l'isolant du tissu conjonctif). En outre, il existe souvent une troisième couche, ou lamina reticularis.. Elle peut cependant être monolamellaire (cristallin) ou comporter une couche supplémentaire (glomérule rénal, alvéole pulmonaire).

**Carcinome** : tumeur épithéliale maligne (= epithelioma).

**Carcinome in situ** : carcinome dont les cellules sont encore contenues par la basale de l'épithélium qui leur a donné naissance.

**Carcinome intraépithélial** = carcinome in situ.

**Carcinome intramuqueux** : carcinome dont les cellules ont franchi les basales épithéliales et envahissent le chorion en restant contenues dans la muqueuse, sans franchir la muscularis mucosae.

**Carcinome invasif** : carcinome dont les cellules ont franchi la basale épithéliale.

**Carcinome adénoquameux** : adénocarcinome avec contingent épidermoïde

**Carcinome à petites cellules** : cancer de nature neuro-endocrine, caractérisé par une architecture à cellules de petite taille, au cytoplasme réduit et au noyau lymphocytoïde.

**Carcinome indifférencié** : carcinome ne comportant pas trace d'une différenciation cellulaire, tissulaire ou fonctionnelle, et donc d'architecture peu ou pas identifiables (= carcinome peu différencié).

**Cellules absorbantes** : cellules épithéliales intestinales, cylindriques, les plus nombreuses, à microvillosités et à riche équipement enzymatique, ayant un rôle d'absorption des métabolites formés lors de la digestion.

**Cellules argentaffines** : cellules endocrines réparties dans tout le tractus digestif et considérées comme des glandes endocrines unicellulaires, dont l'ensemble forme le système endocrinien diffus (= cellules entérochromaffines).

**Cellules caliciformes** : cellules épithéliales intestinales au pôle apical distendu par des mucines qui sont des glycoprotéines acides (sécrétées et excrétées par la cellule) et à rôle protecteur et lubrifiant, disposées entre les cellules absorbantes.

**Cellules en gobelet** : voir « cellules caliciformes ».

**Cellules endothéliales** : cellules d'origine mésenchymateuse, formant la paroi des capillaires et l'intima des vaisseaux sanguins plus importants. Elles sont unies par des gap-junctions dans les

capillaires où elles peuvent être entourées de cellules adventicielles ou péricytes, elles-mêmes d'origine mésenchymateuse.

**Cellules endocrines** : cellules productrices de médiateurs chimiques ou/et d'hormones, qu'elles sécrètent et excrètent dans le sang. Dans l'intestin elles produisent des polypeptides et sont situées à proximité de la basale.

**Cellules mésothéliales** : cellules du revêtement épithélial pavimenteux simple revêtant les séreuses.

**Cellules de Paneth** : cellules exocrines situées au fond des glandes intestinales et ayant un rôle de contrôle de la flore intestinale.

**Cellules souches** : cellules capables de s'auto-renouveler de façon apparemment définie ; une cellule souche par division asymétrique peut donner naissance à une cellule différenciée et à une cellule souche fille, assurant ainsi la conservation du pool de cellules capables de renouvellement. Les cellules souches intestinales sont situées au fond des villosités.

**Chorion** (Lamina propria) : tissu conjonctif à rôle nourricier et de soutien, dans lequel sont situées les structures épithéliales, et dont elles sont séparées par leur basale.

**Cryptes glandulaires** : les cryptes intestinales (ou glandes de Lieberkuhn) sont les glandes tubuleuses qui débouchent à la base de l'épithélium de revêtement.

**Cryptes aberrantes** : la plus précoce lésion adénomateuse identifiable, constituée par une crypte élargie et hyperplasique.

**Dysplasie** : anomalie de structure, stricto sensu ; en fait, terme employé pour définir un bouleversement architectural de l'épithélium normal, avec apparition simultanée de degrés divers d'atypies cellulaires

**Dysplasie de bas degré** : regroupe les dysplasies légère et moyenne des nomenclatures antérieures.

**Dysplasie légère** : caractérise le degré le plus léger de dysplasie.

**Dysplasie moyenne** : caractérise un degré plus important de dysplasie.

**Dysplasie de degré élevé** : correspond à la dysplasie sévère des anciennes nomenclatures.

**Dysplasie sévère** : caractérise un degré très important de dysplasie, qui ne peut en général pas être différencié d'un carcinome in situ.

**Entérocytes** : cellules épithéliales intestinales.

**Epithélium** : tissu constitué de cellules étroitement juxtaposées, avec une cohésion très importante, et très peu de substance intercellulaire.

**Épithélium de revêtement** : tissu épithélial dont les cellules sont organisées en couche qui revêt la surface externe ou limite les cavités de l'organisme. On distingue les épithéliums simples, à une seule couche, et les épithéliums stratifiés.

**Épithélium glandulaire** : tissu épithélial formé de cellules spécialisées dans la production d'une sécrétion, et généralement regroupées en glandes.

**Etat précurseur du cancer** : état caractérisé par des altérations tissulaires ou cellulaires au niveau desquelles la probabilité d'apparition d'un cancer est significativement plus élevée qu'au niveau des tissus sains ou des autres lésions quelles qu'elles soient (= états précancéreux).

**Glandes** : voir „épithélium glandulaire“.

**Glandes de Lieberkuhn**: voir „cryptes intestinales“.

**Hyperplasie** : augmentation de volume d'un tissu (ou d'un organe) par multiplication cellulaire.

**Hyperplasie adénomateuse** : hyperplasie par augmentation du nombre et/ou du volume des formations glandulaires.

**Hyperplasie atypique** : lésion dysplasique.

**Linite plastique** : carcinome infiltrant, généralement du tube digestif, caractérisé par l'épaississement cartonneux des parois de l'organe, par envahissement par des cellules carcinomateuses indépendantes et/ou en bague à chaton.

**Microvillosités** : multitude d'invaginations en doigts de gant présentée par la bordure membranaire de certaines cellules épithéliales plus fréquemment spécialisées dans l'absorption.

**Musculaire muqueuse** : fine couche de cellules musculaires lisses séparant la muqueuse de la sous-muqueuse (= muscularis mucosae).

**Musculeuse**: tunique située en continuité de la sous-muqueuse et constituée de faisceaux musculaires lisses orientés selon deux directions : circulaire dans la couche interne, et longitudinale dans la couche externe ; entre les deux couches se trouve un tissu conjonctif contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques, et des éléments nerveux.

**Néoplasie** : ce terme regroupe toutes les altérations dysplasiques marqueurs ou précurseurs du cancer.

**Néoplasie intraépithéliale** : lésions localisées dans la membrane basale de l'épithélium de surface et/ou glandulaire.

- de degré bas : altérations cellulaires peu sévères (cellules cylindriques mucosécrétantes, noyaux gros et hyperchromatiques, pseudostratification limitée à la moitié basale des cellules).

- de degré élevé : altérations cellulaires sévères proches voire indistinguables du Carcinome In Situ (basophilie des noyaux, déplétion de mucus, noyaux tassés avec pseudostratification affectant toutes les assises cellulaires).

**Plexus nerveux** : ensembles de fibres nerveuses groupées en réseaux situés entre les couches musculaires et comportant des cellules neuronales argyrophiles, argyrophobes et cholinergiques ; ils règlent la motricité du tube digestif.

**Plexus sous-muqueux de Meissner** : plexus nerveux situé dans la sous-muqueuse de l'intestin.

**Plexus d'Auerbach** : plexus nerveux myo-entérique situé entre les deux couches de la musculature dans l'intestin.

**Polype** : tumeur exophytique amarrée à un revêtement muqueux, soit par un pédicule (polype pédiculé) soit par une large base d'implantation (polype sessile).

**Polype adénomateux** : polype formé par une prolifération glandulaire adénomateuse.

**Sous-muqueuse** : lame tissulaire conjonctive faisant suite à la muqueuse dont elle est séparée par la musculature muqueuse, et s'appuyant sur la musculature ; elle contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, et des éléments nerveux, ainsi que des cellules inflammatoires.

**Séreuse** : fine et lâche couche conjonctive comportant des vaisseaux sanguins, des lymphatiques et des adipocytes, et revêtue par un épithélium de revêtement pavimenteux (mésothélium).

**Sous-séreuse** : compartiment cellulaire lâche sous la séreuse.

**Tunique musculaire interne** : voir « musculature ».

**Tunique musculaire externe** : voir « musculature ».

## ANNEXE 2 :

### CARACTERISTIQUES ANATOMO-CLINIQUES DES PATIENTS DE L'ETUDE

**Tableau 1:** caractéristiques anatomo-cliniques des porteurs de lésions bénignes et/ou précancéreuses.

N°	Diagnostic	Age/sexe	Localisation
1	Adénome tubuleux dysplasie faible	64 M	Charnière
2	Adénome tubulovilleux dysplasie élevée (CIS)	81 F	Charnière
3	Adénome tubulovilleux dysplasie élevée	73 F	Angle droit
4	Adénome tubuleux dysplasie faible	78 M	Rectum
5	Adénome tubuleux dysplasie faible	84 M	Charnière
6	Adénome tubulovilleux dysplasie élevée (CIS)	68 M	Transverse
7	Adénome tubuleux dysplasie faible	66 F	Transverse
8	Adénome tubuleux dysplasie faible	49 F	Angle droit
9	Adénome vilieux dysplasie mixte	74 M	Marge anale
10	Adénome tubuleux dysplasie faible	50 M	Rectum
11	Adénome vilieux dysplasie élevée (CIS)	55 F	Rectum
12	Adénome tubulovilleux dysplasie faible	74 F	Rectum

F : féminin ; M : masculin ; CIS : carcinome In Situ.



**Tableau 2** : caractéristiques anatomo-cliniques des porteurs de cancers invasifs

N°	Diagnostic	Age sexe	localisation	pTNM	Grade histologique	Trt. préopératoire
1	ADK lieb	56 M	Colon droit	T4N0M0	3	Non
2	Mucosécrot	88 M	Caecum	T4N2M1	3	Non
3	ADK lieb	64 M	Charnière	T2N1M0	3	Non
4	ADK lieb	81 F	Charnière	T3N1M1	2	Non
5	ADK lieb	40 M	Sigmoïde	T3N0M0	1	Non
6	ADK lieb	58 M	Rectum	T3N1M0	2	Oui (RX)
7	ADK lieb	60 F	Caecum	T4N2M1	3	Non
8	ADK lieb	71 M	Charnière	T3N2M1	3	Non
9	Mucosécrot	82 F	Rectum	T3N0M0	3	Oui (RX)
10	ADK mixte	50 F	Colon droit	T3N0M0	2	Non
11	ADK lieb	61 M	Charnière	T3N2M1	3	Non
12	ADK lieb	62 M	Rectum	T2N1M1	2	Oui (RX)
13	ADK lieb	84 M	Sigmoïde	T2N0M0	1	Non
14	ADK lieb	62 F	Rectum	T2N2M0	2	Oui (RX)
15	ADK lieb	69 F	Colon droit	T3N2M0	3	Non
16	ADK lieb	67 M	Sigmoïde	T3N1M1	2	Non
17	ADK lieb	64 F	Rectum	T2N2M0	1	Oui (RX)
18	ADK non lieb	61 F	Sigmoïde	T3N1M0	2	Non
19	ADK lieb	72 M	Charnière	T4N0M0	3	Non
20	ADK non lieb	77 F	Rectum	T3N2M0	3	Oui (RX)
21	ADK non lieb	41 F	Caecum	T4N2M1	3	Non
22	Mucosécrot	39 M	Transverse	T3N2M0	3	Non
23	Mucosécrot	81 M	Angle droit	T3N0M0	3	Non
24	ADK lieb	73 F	Angle droit	T3N1M1	2	Non
25	ADK lieb	59 F	Sigmoïde	T3N1M0	2	Non
26	ADK lieb	50 F	Charnière	T2N0M0	1	Non
27	ADK non lieb	89 M	Angle droit	T3N0M0	2	Non
28	ADK lieb	60 F	Caecum	T3N1M1	3	Non
29	ADK lieb	64 F	Sigmoïde	T3N2M1	2	Non
30	ADK lieb	74 M	Colon droit	T4N0M0	3	Non
31	ADK lieb	71 M	Charnière	T2N1M0	2	Non
32	ADK lieb	71 M	Colon G	T4N0M0	2	Non
33	Mucosécrot	63 M	Colon droit	T4N2M1	3	Non
34	ADK lieb	50 F	Sigmoïde	T3N1M0	2	Non
35	ADK lieb	57 M	Colon droit	T4N0M0	3	Non
36	ADK lieb	84 F	Charnière	T2N0M0	1	Non
37	ADK lieb	70 F	Colon droit	T4N2M1	3	Non
38	ADK lieb	60 M	Sigmoïde	T3N0M0	3	Non
39	Mucosécrot	39 M	Transverse	T3N2M0	3	Non
40	ADK lieb	72 F	Sigmoïde	T4N1M1	3	Non
41	ADK lieb	68 M	Colon droit	T3N0M0	2	Non
42	ADK lieb	48 F	Sigmoïde	T3N1M0	2	Non
43	ADK lieb	75 M	Sigmoïde	T1N0M0	1	Non
44	ADK lieb	71 M	Rectum	T3N2M0	2	Non

45	ADK lieb	72 M	Rectum	T3N0M1	3	Non
46	ADK lieb	62 M	Sigmoïde	T3N0M0	3	Non
47	ADK lieb	59 F	Sigmoïde	T3N1M0	3	Non
48	ADK lieb	77 F	Sigmoïde	T4N2M0	3	Non
49	Mucosécrot	78 M	Caecum	T2N2M0	3	Non
50	Mucosécrot	43 M	Sigmoïde	T4N2M1	3	Non
51	ADK lieb	70 F	Rectum	T4N2M0	3	Oui (RX)
52	ADK lieb	61 F	Rectum	T2N1M0	1	Non
53	ADK non lieb	56 M	Rectum	T3N1M1	3	Non
54	ADK lieb	61 M	Rectum	T3N1M1	3	Oui (RX)
55	ADK lieb	55 F	Rectum	T1N0M0	1	Non
56	ADK lieb	66 F	Rectum	T2N0M0	1	Oui (RX)
57	ADK lieb	55 F	Rectum	T3N1M0	3	Oui (RX)

ADK lieb : adénocarcinome lieberkuhnien ;

ADK non lieb : adénocarcinome non lieberkuhnien.

ADK mixte : adénocarcinome lieberkuhnien avec contingent mucosécrotant égal ou supérieur à 10%.

Mucosécrot : adénocarcinome mucosécrotant.

F : féminin ; M : masculin ;

TRT préop : traitement préopératoire ;

RX : radiothérapie;

chimio : chimiothérapie ;

## ANNEXE 3 :

### TABLEAU DES ANTICORPS

Le marquage immuno-histochimique des coupes de tissus a été fait au moyen des anticorps figurant dans le tableau ci-dessous :

<i>Anticorps</i>	<i>Laboratoire</i>	<i>Clone</i>	<i>Type</i>	<i>Dilution</i>	<i>Dénaturation par la chaleur</i>
<i>Ki-67</i>	<i>Dako</i> <sup>1</sup>	<i>MIB-1</i>	<i>Monoclonal souris</i>	<i>1/150</i>	<i>oui</i>
<i>β-caténine</i>	<i>Novocastra</i> <sup>2</sup>	<i>17C2</i>	<i>Monoclonal souris</i>	<i>1/100</i>	<i>oui</i>
<i>Cycline D1</i>	<i>Dako</i>	<i>DCS-6</i>	<i>Monoclonal souris</i>	<i>1/30</i>	<i>oui</i>
<i>Bcl-2</i>	<i>Dako</i>	<i>124</i>	<i>Monoclonal souris</i>	<i>1/50</i>	<i>oui</i>

La technique utilisée est celle du kit Streptavidine Biotine LSAB2 de Dako fourni avec les anticorps secondaires et le révélateur. Le protocole suivi a été celui préconisé dans le kit.

<sup>1</sup> Dako : Dakocytomation, Inc. USA.

<sup>2</sup> Novocastra : Novocastra Laboratories Ltd. UK.

**ANNEXE 4 :**  
**PUBLICATION**  
**(CALCUL DE L'INDEX D'HETEROGENEITE)**

# **On stereological estimation in the presence of spatial heterogeneity**

**Sharifi-Salamatian V. and Simony-Lafontaine J.**

**Image Analysis in Medical Microscopy and pathology, 2007 : 153-165**

## **RESUME : BOULEVERSEMENTS ARCHITECTURAUX INDUITS DANS LA MUQUEUSE COLIQUE NORMALE ET TUMORALE PAR LA TRANSFORMATION MALIGNE ET LA PROGRESSION TUMORALE : APPROCHE MORPHOLOGIQUE**

Les bouleversements architecturaux induits dans la muqueuse colique par la cancérisation ont été étudiés par une approche morphologique sur des cancers colorectaux sporadiques comparés à des échantillons coliques non cancéreux.

En premier lieu, la muqueuse normale au contact du cancer a été individualisée de la muqueuse normale à distance par ses caractéristiques histo-morphométriques, qui montrent son épaissement tandis que sa densité en cryptes est significativement diminuée ; son profil prolifératif, mis en évidence par le marquage aux anticorps Ki-67,  $\beta$ -caténine et Cycline D1, reste analogue à celui de la muqueuse à distance. Ceci suggère un mécanisme de conservation de l'équilibre cellulaire des cryptes au contact de l'expansion tumorale.

Dans un deuxième temps, l'individualisation des cellules prolifératives au moyen des anticorps déjà cités a permis d'étudier les modifications de distribution de ces cellules dans les cancers, ainsi que le désordre qui en résulte. A cette fin, l'utilisation du diagramme de Voronoï, outil de sociologie cellulaire, a montré un réarrangement dans l'espace des cellules cancéreuses qui est discriminant par rapport à la muqueuse normale adjacente, et qui est le fait uniquement des cellules Ki-67 positives.

En dernier lieu l'accent a été mis sur l'hétérogénéité du marquage des cellules tumorales. Cette hétérogénéité a été étudiée de façon semi-quantitative sur des zones de « spots virtuels », puis de façon quantitative au moyen de l'index d'hétérogénéité spatiale, outil mathématique lié aux statistiques spatiales. L'hétérogénéité du marquage est importante dans les dysplasies, et tend à s'atténuer dans les tumeurs les plus évoluées.

**Mots Clés :** cancer colorectal – sociologie cellulaire – diagramme de Voronoï – hétérogénéité tumorale – Index d'hétérogénéité spatiale