



HAL
open science

Caractérisation des cellules tumorales portant la mutation BRAFV600E dans le cancer colorectal, CRC

Olivia Villeronce

► **To cite this version:**

Olivia Villeronce. Caractérisation des cellules tumorales portant la mutation BRAFV600E dans le cancer colorectal, CRC. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT090 . tel-03342134

HAL Id: tel-03342134

<https://theses.hal.science/tel-03342134v1>

Submitted on 13 Sep 2021

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie

CBS2 N°168, École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche CNRS 5203 / Inserm U1191

Caractérisation des cellules tumorales portant la mutation BRAF V600E dans le cancer colorectal

Présentée par Olivia VILLERONCE

Le 11 Décembre 2020

Sous la direction de Julie PANNEQUIN

Devant le jury composé de

Mr. Christophe GINESTIER, Chargé de Recherche, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille	Rapporteur
Mr. Luca GRUMOLATO, Maître de conférence, Université de Rouen Normandie	Rapporteur
Mme. Céline GONGORA, Directrice de recherche, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier	Examinatrice/ Présidente du Jury
Mme. Julie PANNEQUIN, Directrice de recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier	Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Je remercie les Drs Céline Gongora, Christophe Ginestier, Luca Grumolato pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

*« Voilà, c'est fini, je me suis battue pour vivre cette expérience et je ne réalise pas que c'est déjà fini !
J'ai le sentiment de ne pas avoir assez profité... »*

Merci à toi, **Julie**, de m'avoir donné cette merveilleuse opportunité. Je garde de nombreux souvenirs dont ceux où je toque à ta porte surexcitée à l'idée de te montrer des nouveaux résultats. Ces années n'ont pas été de tout repos, le suivi des financements, mes grossesses, le confinement... Mais tu as tout bien géré. Tu gères tout toujours bien, **Merci**.

Merci aux membres de l'équipe : Jean Marc, Chris, Céline, Amandine A, Lucile, Kévin, Amandine B, Alex, Hélène, Sébastien, Françoise et Armelle, JulieT, Philippe. Que des bons moments, en manip et entre midi et deux. Merci à tous pour m'avoir supporté ☺.

La « team » du petit bureau : Zeinab, « merci, merci et merci ». Des moments de discussion, rigolade et de découverte dans ce bureau. « Guigui », qui nous anime le bureau, la piste de danse, la voiture... Bonne continuation à vous deux dans vos futures carrières de chercheur. Ma Jihane, mon rayon de soleil.

Les membres de l'équipe JAY, avec un petit clin d'œil à Alicia, Célima, Julie, Manu et Marième.

Aux anciens : **Fanny**, grâce à toi tout a commencé. C'était en 2015 ; merci.

Merci à mes amis (Sara, Céline et Arnaud, Emilie et Bryan, Ingrid et « Ricardo », Céline et Thomas, Mélissa...). Merci de m'avoir soutenu.

Merci à ma famille, Maman, Jocelyn, Cindy, Nanou, Cora, Chachou, Mamie... *Sans vous, rien n'existerait*. Merci à tous mes proches. Belle maman et Emile Jr qui n'ont pas cessé de m'encourager...

Merci à toi doudou, tu m'as épaulé et aidé tout au long de ces années. Merci d'avoir accepté de vivre ces instants avec moi. *« Tu es mon roc ! »*.

À mes enfants,

Table des matières

1	Etude Bibliographique.....	16
1.1	Le cancer colorectal (CRC).....	17
1.1.1	Incidence du CRC	17
1.1.2	Facteurs de risque favorisant l'apparition d'un CRC.....	17
1.1.3	Histologie du cancer CRC	21
1.1.4	Mécanismes d'initiation et de progression tumorale.....	26
1.1.5	Des cellules cancéreuses hétérogènes.....	31
1.1.6	La classification des CRC.....	33
1.1.7	Prise en charge des patients atteints de CRC.....	36
1.1.8	Mécanismes de Résistance aux traitements	40
1.2	Le concept des cellules souches cancéreuses (CSC).....	44
1.2.1	Les modèles de carcinogenèse	44
1.2.2	Qu'est qu'une CSC ?.....	46
1.2.3	L'identification des CSC dans le CRC	50
1.2.4	L'analyse des cellules souches cancéreuses.....	60
1.3	La kinase BRAF, effectrice de la voie des MAPkinases	62
1.3.1	Présentation générale de la voie des MAPkinases	62
1.3.2	La kinase RAF	67
2	Hypothèse et objectif	84
3	Résultats	86
4	Discussion	98
5	Matériel et méthode	110
6	Communications scientifiques et collaboration	116
7	Bibliographie.....	118

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

5FU	5-fluorouracile
AJCC	American Joint Commission on Cancer
AKT	Protéine kinase B
APC	Adenomatous poliposis Coli
BAX	Bcl-2-associated X
BM1/2	Sous types d'expression génique de BRAF V600E
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1
CAT	Cellule amplificatrice de transit
CIMP	CpG island methylator phenotype
CMS	Consensus Molecular Système
CRCm	Cancer colorectal métastatique
CRD	Domaine riche en cystéine
CSI	Cellules souches intestinales
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
FC	Facteur de croissance
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FT	Facteur de transcription
GEF	Facteur d'échange guanine nucléoside
HNPCC	Le syndrome de Lynch ou Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HP	Adénomes hyperplasiques
iBRAFs	Inhibiteurs pharmacologiques de la kinase BRAF V600E

iMEKs	Inhibiteurs pharmacologique des kinases MEK1/2
KRAS	Kristen rat sarcoma viral oncogene homologue
KSR	Suppresseur de kinases Ras
MAP	Polypose associée à MUTYH
MAPK	Voie de signalisation des Mitogen-activated protein kinases
MEK	MAPK-ERK-Kinase
MLH1	MutL homolog 1
MMR	Gène de réparation des mésappariements
MSH2	MutS homolog 2
MSI	Microsatellite instable
MSS	Microsatellite stable
NBD	Domaine cytoplasmique de liaison aux nucléotides (transporteurs actifs ABC)
NGS	Le séquençage de nouvelle génération
OMS	Organisation mondiale de la santé
P53	Protéine 53
PAF	Polypose adénomateuse familiale
PTB	Domaine de liaison à la phosphotyrosine
PTEN	Phosphatase and TENSin homolog
PXR	Pregnane X receptor
RAS	Rat sarcoma viral oncogene homologue
RBD	Domaine de liaison à RAS
RSK	p90 ribosomale S6 kinase
SFC	Capacité à former des sphères
SG	Survie globale
SI	Système immunitaire

SOS	Son of Sevenless
SSA	Adénomes sessiles
TCGA	Cancer Genome Atlas
TGF- β	Transforming growth factor
TMD	Domaines transmembranaires (transporteurs actifs ABC)
TNM	Tumor-Nodal-Metastasis
TSA	Adénomes festonnés traditionnels

TABLE ILLUSTRATION

FIGURE 1: INCIDENCE DU CRC DANS LE MONDE EN 2018	17
FIGURE 2: IMPACT DE L'ENVIRONNEMENT ET DE L'HEREDITE SUR L'APPARITION D'UN CRC.....	18
FIGURE 3: L'EPITHELIUM INTESTINAL ET SON RENOUVELLEMENT	23
FIGURE 4: CLASSIFICATION TNM ET STADE D'EVOLUTION DU CRC	26
FIGURE 5: LE MODELE DE FEARON ET VOGELSTEIN.....	28
FIGURE 6: LA VOIE DE SIGNALISATION WNT/B CATENINE	29
FIGURE 7: LA VOIE DU POLYPE FESTONNEE MUTEE PAR BRAF V600E.....	31
FIGURE 8: HETEROGENEITE TUMORALE	33
FIGURE 9: LA CLASSIFICATION DU CRC PAR LE « CANCER GENOME ATLAS » (TCGA)	34
FIGURE 10 : LA CLASSIFICATION MOLECULAIRE DU CONSENSUS MOLECULAR SUBTYPES (CMS).....	35
FIGURE 11: IMPACT PRONOSTIC DE LA CLASSIFICATION DE CMS EN SITUATION METASTATIQUE POUR DES PATIENTS RAS NON-MUTEE DANS L'ESSAI FIRE-3.	36
FIGURE 12: MECANISMES DE CHIMIORESISTANCE.....	43
FIGURE 13: MODELE DE CANCEROGENESE STOCHASTIQUE ET HIERARCHIQUE	44
FIGURE 14: MODELE HIERARCHIQUE DES CSC	45
FIGURE 15: LES CSC SONT HETEROGENES.....	48
FIGURE 16: LA PLASTICITE CELLULAIRE DES CELLULES TUMORALES.....	50
FIGURE 17: LE MARQUEUR CD44V6.....	52
FIGURE 18: LE MARQUEUR CD26.....	54
FIGURE 19 : PRINCIPE DU KIT ALDH STEM CELL ®.....	56
FIGURE 20: GRAPHIQUE DE LA SIDE POPULATION EN CYTOMETRIE EN FLUX.....	57
FIGURE 21: LE TEST DE FORMATION DE SPHERES (SFC).....	60
FIGURE 22: TEST D'INITIATION TUMORALE SUR DES MODELES MURINS	61
FIGURE 23: VOIE DES MAPK/ERK SIMPLIFIEE	62
FIGURE 24 : SIGNALISATION EN AVAL DE RAS.....	64
FIGURE 25: MECANISMES DE REGULATION DE LA VOIE DES MAPKINASES	66
FIGURE 26 : ORGANISATION MOLECULAIRE DES ENZYMES DE RAF	68
FIGURE 27: LE CYCLE D'ACTIVATION DE RAF.....	70
FIGURE 28: SOUS-TYPE MOLECULAIRE DE BRAF V600E DANS LE CRC	73
FIGURE 29: COURBE DE SURVIE DES PATIENTS CRC BRAF WT ET BRAF V600E	75
FIGURE 30: L'INHIBITION DE BRAF V600E PAR DES IBRAFS.....	77
FIGURE 31: RESISTANCE AUX IBRAFS CRC	80
FIGURE 32: IBRAF V600E, IMEK ET ANTI-EGFR	81
FIGURE 33: LA MUTATION BRAF V600E CORRELE AVEC UN FORT PHENOTYPE DE CSC	88
FIGURE 34 : VALIDATION DE LA SUREXPRESSON (OE) DE BRAF V600E DANS UNE LIGNEE BRAF WT.....	89

FIGURE 35 : AUGMENTATION DU PHENOTYPE DE CSC APRES AJOUT DE LA FORME BRAF V600E DANS UNE LIGNEE BRAF WT.	90
FIGURE 36 : L'AJOUT DE BRAF V600E AUGMENTE LES CAPACITES D'INVASION CELLULAIRE.....	91
FIGURE 37: VALIDATION DE L'INHIBITION DE BRAF V600E AVEC DES IBRAF V600E	92
FIGURE 38 : L'INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE BRAF V600E AUGMENTE LE PHENOTYPE DE CSC.	94
FIGURE 39 : AUGMENTATION DES CAPACITES D'INVASION APRES TRAITEMENT PAR DU DABRAFENIB POUR LA LIGNEE CTC45.....	94
FIGURE 40 : LA TRIPLE INHIBITION DE L'EGFR, BRAF ET MEK AVEC DU CETUXIMAB, DE L'ENCORAFENIB ET DU BINIMETINIB AUGMENTE LE PHENOTYPE DE CSC.	95
FIGURE 41 : L'INHIBITION SPECIFIQUE DE BRAF V600E PROMEUT AUSSI LE PHENOTYPE DE CSC.	96
FIGURE 42 : L'ANALYSE DES PEPTIDES PHOSPHORYLES SUGGERENT UNE AUGMENTATION D'ACTIVITE DE LA VOIE DE SIGNALISATION SRC	97
FIGURE 43: FIGURE BILAN : LA MUTATION BRAF V600E DANS LE CRC	98
FIGURE 44: L'AJOUT DE BRAF V600E SENSIBILISE LA LIGNEE AU FIRI (5 FU+ SN38)	100
FIGURE 45: LA DOUBLE THERAPIE VEMURAFENIB ET CETUXIMAB NE DIMINUE PAS L'EXPRESSION DES MARQUEURS DE CSC	103
FIGURE 46: L'INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE BRAF V600E DANS LA LIGNEE MSI, RKO, SEMBLE IMPACTER LA POPULATION DES CSC.....	104
FIGURE 47: ACTIVITE DE L'ALDH DANS DES LIGNEES DE MELANOMES.....	105
FIGURE 48: INHIBITION PHARMACOLOGIQUE ET GENETIQUE DE BRAF V600E DANS UNE LIGNEE DE MELANOME MEL501 (BRAV V600E).	105
FIGURE 49 : STRATEGIE DE CIBLAGE DES CSC.....	107
FIGURE 50 : ANALYSE HTRF DES NIVEAUX PROTEIQUES DE BRAF WT ET BRAF V600E APRES TRAITEMENT AVEC DIFFERENTS SIBRAF V600E.....	111
FIGURE 51: STRUCTURE DES PLASMIDES PBABE CTRL, BRAF WT, BRAF V600E.....	115

AVANT-PROPOS

Le cancer est actuellement la seconde cause de décès dans le monde après les maladies cardiovasculaires et ce, malgré l'émergence de nouvelles maladies contagieuses (l'AFP-Relaxnews 2019). Il est prévu que dans quelques années le cancer représentera la première cause de décès (Foucart 2020). C'est ce qui commence à être observé dans les pays industrialisés où la hausse de l'incidence des cancers est plus rapide. En effet, ces pays ont un fort vieillissement de la population et un mode de vie qui se dégrade (Dagenais et al. 2020). Chaque année, plus de 18 millions de personnes sont diagnostiqués avec un cancer et 10 millions d'entre eux vont en mourir (IARC 2018). La mortalité étant majoritairement associée à la présence de métastases.

Le cancer colorectal est l'une des tumeurs malignes la plus courante (3^{ème}) dans les pays occidentaux. Il provoque fréquemment la mort de patients et il est attendu une émergence de cette maladie aux cours des prochaines années (2.5 millions de patients diagnostiqués pour 2035) (Xie, Chen, et Fang 2020). Il est d'ailleurs actuellement observé une augmentation de l'incidence de ce cancer dans des tranches d'âges inférieure à la moyenne.

Mon projet a pour but de caractériser l'impact d'une mutation oncogénique, BRAF V600E, sur le phénotype des cellules souches tumorales du côlon. Les patients porteurs d'un CRC avancé portant cette mutation ont une diminution drastique de leur survie quel que soit le traitement choisi. Il devient primordial de mieux comprendre cette maladie et les mutations impactant la survie des patients.

Au final, ce projet a pour ambition lointaine d'améliorer la prise en charge des patients porteurs d'un cancer du côlon avec la mutation BRAF V600E afin de diminuer la mortalité associée à ce sous type de cancer.

1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

« Créer, c'est vivre deux fois. »

~ Albert Camus

1.1 LE CANCER COLORECTAL (CRC)

1.1.1 Incidence du CRC

Dans le monde, 1,8 millions de patients sont atteints d'un CRC, ce qui en fait le 2^{ème} cancer le plus diagnostiqué chez la femme et le 3^{ème} chez l'homme (Dekker et al. 2019). Plus de la moitié des cas sont localisés dans les régions du monde les plus développées (Rawla, Sunkara, et Barsouk 2019) (Figure 1).

En France, 43 336 nouveaux cas de CRC ont été dénombrés en 2018. L'incidence de ce cancer est en très faible diminution avec un taux de -0.6 % entre 1990 et 2018 (Defossez G et al. 2019) cette diminution est due aux campagnes de dépistages permettant un diagnostic survenant plus tôt dans la formation de la maladie dès le stade de polypes (excroissance anormale de cellules).

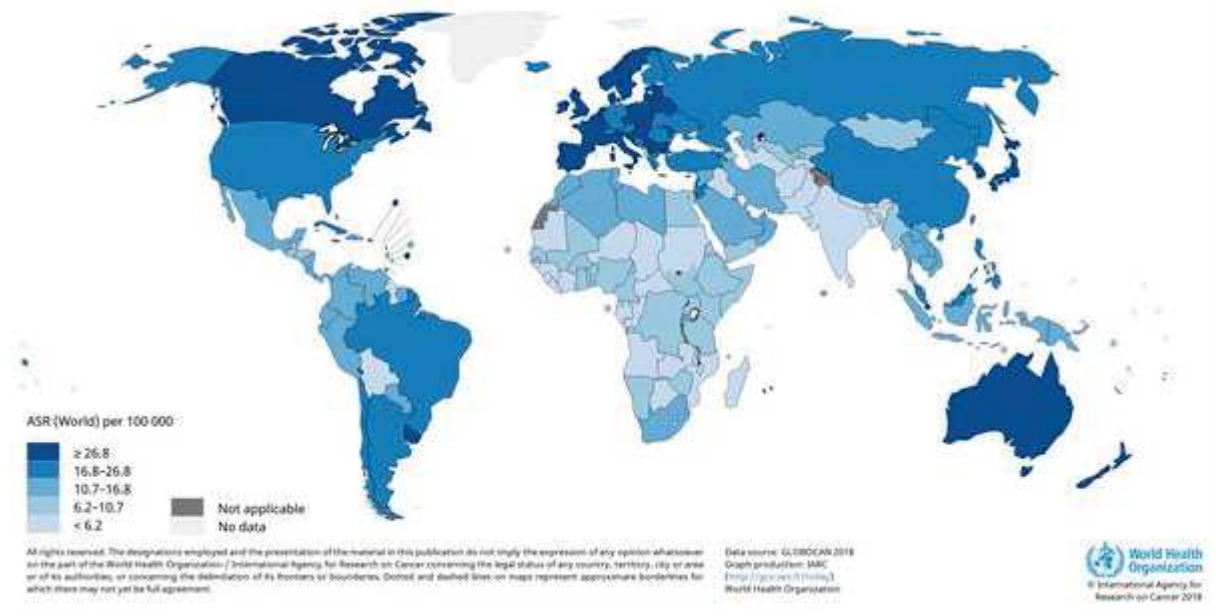


Figure 1: Incidence du CRC dans le monde en 2018

Estimation de l'incidence du CRC dans le monde pour les deux sexes et de tous les âges.

Source : <https://publications.iarc.fr/Databases/iarc-Cancerbases/Cancer-Today-Powered-By-GLOBOCAN-2018--2018>

Le taux de survie globale est estimé à environ 60 % à 5 ans et 52 % à 10 ans. Dans 30 % des cas, la détection de la maladie est tardive, ce qui réduit la survie à 5 % à 5 ans (« Cancer Today » 2018).

1.1.2 Facteurs de risque favorisant l'apparition d'un CRC

1.1.2.1 Introduction des facteurs de risques

L'environnement et la génétique (l'hérédité) jouent un rôle important dans l'apparition de la maladie (Figure 2). La majorité des cas de CRC sont sporadiques (~80%) et sans antécédent familial; pour les

autres cas (10 à 20 %) une origine familiale est détectée (Henrikson et al. 2015). Le sexe (masculin) et l'âge (âge moyen 71 ans) sont des facteurs à risques pour le CRC, une forte association est observée entre les hommes âgés et l'incidence de ce cancer.

Dans les populations occidentales, le risque d'un CRC sporadique est de 3-5%. En cas d'antécédents familiaux, ce risque est doublé (Kuipers et al. 2015). Cela démontre une connexion entre les différents facteurs de risques dans l'établissement d'un CRC.

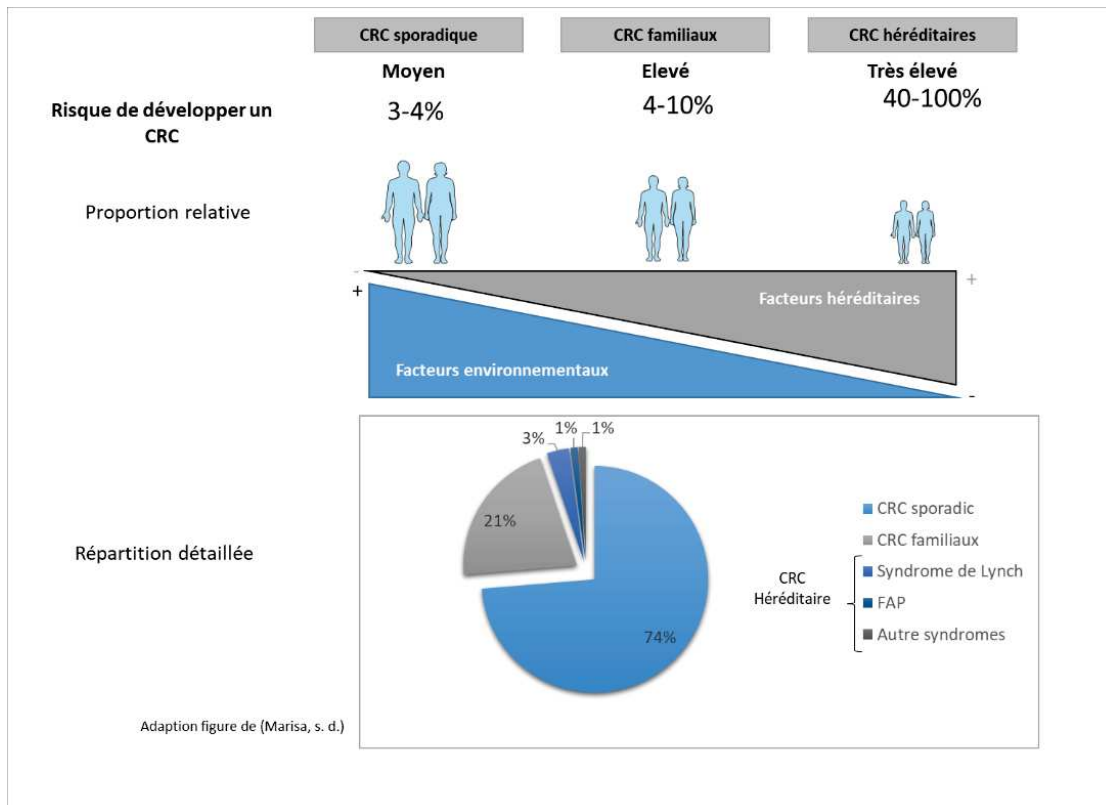


Figure 2: Impact de l'environnement et de l'hérédité sur l'apparition d'un CRC.

Le risque de développer un CRC va dépendre des facteurs environnementaux et génétiques. Il sera plus élevé pour les individus ayant une forte part héréditaire. Les CRC héréditaires sont de faible proportion et représentent 5% des CRC totaux. Adaptation figure (Marisa, s. d.).

1.1.2.2 Les facteurs environnementaux

De nombreux facteurs environnementaux peuvent augmenter le risque de CRC tels que le tabagisme, la consommation excessive d'alcool, de viandes rouges et transformées. Les maladies comme l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) font aussi partie de ces facteurs.

Récemment, il a été proposé que la composition du microbiote intestinal (microorganisme peuplant l'appareil digestif) pourrait également augmenter le risque de CRC, c'est l'exemple des bactéries *Fusobacterium nucleatum* et *Bacteroides fragilis* (Kostic et al. 2013 ; Kwong et al. 2018).

1.1.2.3 Les facteurs héréditaires

Les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques, ou présentant des polypes ou adénomes, ou encore ayant déjà eu un CRC dans le passé ont un risque accru de développer la maladie.

Les facteurs héréditaires contribuent peu à la formation d'un cancer, ils représentent 10 à 20% des CRC (Dekker et al. 2019). Les formes héréditaires sont divisées en deux groupes : ceux sans polypes (syndrome de lynch) et ceux avec de nombreux polypes la polypose adénomateuse familiale (PAF) ou la MAP (MUTYH-Associated Polyposis...).

1.1.2.3.1 Exemples de formes héréditaires de CRC :

1.1.2.3.1.1 *Le Syndrome de Lynch*

Le syndrome de Lynch encore appelé syndrome HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) ou cancer colorectal héréditaire sans polypose, est le cancer héréditaire le plus courant. Il représente environ 3 à 5 % des nouveaux cas de CRC (Cox et al. 2018). Ce syndrome est une maladie autosomique dominante touchant les protéines participant aux réparations des mésappariements (MMR) telles que MSH2 (MutS homolog 2), MLH1 (mutL homolog 1) ou MSH6 (MutS homolog 6) (Bouguenouch et al. 2016). Ces mutations entraînent de mauvaises réparations de l'ADN et l'apparition d'erreurs lors de la réplication cellulaire. Ces erreurs sont préférentiellement localisées dans des régions du génome appelées microsatellites (MS). Les microsatellites sont des petites régions répétitives de séquences d'ADN. Lors de la réplication de l'ADN, des mutations peuvent se produire dans ces séquences ce qui va engendrer une augmentation ou une diminution de leur nombre. L'absence de MMR totalement fonctionnelle va permettre la conservation de ces erreurs et favoriser l'initiation tumorale. Les tumeurs formées auront un phénotype MSI pour microsatellites instables.

Les patients sont diagnostiqués avec un CRC à un âge moyen de 44 à 61 ans contre 69 ans pour les cas sporadiques (Cox et al. 2018).

1.1.2.3.1.2 *La polypose adénomateuse familiale (PAF)*

La PAF aussi appelée polypose colique familiale est une maladie génétique rare à transmission autosomique dominante. Elle est définie par la présence de nombreux polypes adénomateux dans le côlon et le rectum. Son incidence est de 1/7 000 à 1/30 000 à la naissance. Les individus atteints de PAF non détectée vont obligatoirement développer un CRC vers l'âge de 40-50 ans. Ils représentent 1% des CRC. Ces patients PAF vont en plus développer des ostéomes, des anomalies dentaires, ainsi que d'autres lésions situées dans tout le corps. Ces patients accumulent des mutations du gène *Adenomatous polyposis coli* (APC) dont la protéine régule la voie de signalisation Wnt/ β caténine. La

perte de l'activité d'APC sera à l'origine du processus néoplasique conduisant à la formation tumorale (Dinarvand et al. 2019).

1.1.2.3.1.3 La polypose associée à la MUTYH ou syndrome de Lynch atypique

Une voie alternative de CRC implique la mutation de la protéine MUTYH (encore appelée MYH, mutY homolog), à l'origine de la polypose associée à MUTYH (MAP). La protéine MUTYH est responsable de la réparation de l'ADN par excision de base. La perte de son activité entraîne de nombreuses mutations à l'origine de la polypose (Poulsen et Bisgaard 2008). À la différence de la PAF, la MAP est une maladie héréditaire autosomique récessive. Les patients porteurs de la mutation bi-allélique présentent un risque de 30 à 50 % de développer un CRC, ce risque se rapproche de 100 % à l'âge de 60 ans. La présence de nombreux polypes à l'âge de 45-57 ans est un marqueur de la MAP, cependant le diagnostic définitif va requérir une analyse génétique (Kastrinos et Syngal 2007).

1.1.2.4 Le diagnostic de la maladie

1.1.2.4.1 Symptômes cliniques

Le développement de la maladie est souvent asymptomatique jusqu'à un stade avancé. Par la suite, les symptômes sont très variables: douleurs abdominales, troubles du transit intestinal, anémie, présence de sang dans les selles et hémorragie du côlon ou du rectum (Dekker et al. 2019). La suspicion d'un CRC va aussi prendre en compte les facteurs de risques précédemment décrits. Une fois la somme de ces informations obtenues, le patient subira des examens médicaux afin de détecter des signes cliniques du cancer.

1.1.2.4.2 Les examens de diagnostic

1.1.2.4.2.1 Dépistage par test immunologique

L'absence de symptômes précoces valide l'importance du dépistage qui peut permettre de déceler des lésions précancéreuses. Le dépistage précoce impacte la mortalité du CRC, et la diminue de 50% (Bretthauer et Kalager 2012; Brenner, Stock, et Hoffmeister 2014). En France, les tests immunologiques tel que Hemocult II®, prescrit par un généraliste, a pour but de détecter du sang dans les selles (provenant des lésions intestinales). Ce test contient des anticorps ciblant l'hémoglobine contenue dans les globules rouges. Un échantillon de selles sera prélevé et analysé dans un laboratoire médical. Un résultat positif n'est pas suffisant pour valider le diagnostic, cependant il conduira à la prescription d'examens complémentaires.

1.1.2.4.2.2 Le toucher rectal

Cet examen a pour but de diagnostiquer des cancers du côlon proche d'environ 8 cm du rectum. Le clinicien va palper la paroi du rectum afin de détecter des bosses pouvant être tumorales. Si une

anomalie est détectée, une coloscopie sera prescrite afin de visualiser l'intérieur du côlon et du rectum ainsi que de prélever un ou des échantillons nommés biopsies.

1.1.2.4.2.3 La coloscopie

La coloscopie, généralement proposée aux individus de plus de 50 ans, est un examen médical permettant de visualiser la muqueuse colique et rectale. Un endoscope composé de fibres optiques est inséré dans l'anus et va permettre l'inspection de la muqueuse. Le but est de déceler la présence de lésions simples (polypes) ou avancées (adénomes). Ces lésions seront retirées chirurgicalement (polypectomie ou adénomectomie) et analysées. Si nécessaire, et afin d'avoir plus d'informations, il est possible de réaliser une chromo-endoscopie. Cette méthode utilise des colorants afin de mieux définir l'extension des lésions décelées.

Il est aussi possible de pratiquer un coloscanner qui est une technique moins invasive. Elle consiste à scanner l'abdomen et fournit une représentation virtuelle de la muqueuse colique (Scalise et al. 2016). En 2015, un nouveau dispositif de visualisation par capsule a été mis en place et permet après ingestion d'imager tout le tractus gastro-intestinal (Kuipers et al. 2015). Ces nouveaux systèmes ont pour but de favoriser la recherche de lésions tout en diminuant le risque de complications après une coloscopie. Ces complications (hémorragies, perforations) sont néanmoins très rares 1 pour 1000.

De plus, l'IRM (imagerie par résonance magnétique) sera utilisée pour détecter les métastases.

Le diagnostic de CRC est posé après analyse de la biopsie prélevée au cours de la coloscopie. L'analyse histologique par des anatomopathologistes permettra de déterminer le stade de la maladie.

1.1.3 Histologie du cancer CRC

1.1.3.1 Le côlon

1.1.3.1.1 Généralités

Le côlon forme la dernière partie du tube digestif, il est composé de six segments : le cæcum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïde et le rectum. Sa fonction primaire est la réabsorption de l'eau, des nutriments et des minéraux présents dans le chyme (résultat de la digestion) (Rawla, Sunkara, et Barsouk 2019). Tout comme le reste du tube digestif, le côlon a une structure en trois couches : la couche séreuse à l'extérieur, la couche musculuse en position médiane et la muqueuse qui délimite la lumière du tube. Cette muqueuse est un tissu épithélial organisé en cryptes. Le haut de ces cryptes est composé de cellules différenciées (entérocytes, cellules entéro-endocrines, cellules caliciformes, les cellules « tufts ») (Reya et Clevers 2005), tandis que le bas des cryptes, aussi appelées glandes de Lieberkühn, est composé de **cellules souches intestinales (CSI)** et des cellules de Paneth (cellules différenciées) (Figure 3A) (Medema et Vermeulen 2011).

1.1.3.1.2 Les cellules souches intestinales (CSI)

Les CSI, localisées aux deux tiers inférieurs des cryptes, sont des cellules indifférenciées, multipotentes et possédant des facultés d'autorenouvellement. Leur nombre est d'environ 6 CSI par crypte. Ces cellules expriment exclusivement le marqueur de surface LGR5 pour « leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor ».

En se multipliant, elles peuvent donner deux cellules différentes : l'une CSI et l'autre une cellule progénitrice. Le maintien du statut de CSI est garanti par la présence de la niche aussi appelée microenvironnement intestinal. Cette niche est définie comme étant le microenvironnement nécessaire au maintien et à la prolifération des CSI. Elle est composée de cellules fournissant des signaux localement aux CSI. Ces signaux sont issus de voies de signalisation telles que les voies Wnt/ β caténine, Notch et BMP (Bone morphogenic protein) (Lau, Ho, et Lee 2017; Santos et al. 2018).

La cellule progénitrice aussi appelée cellule amplificatrice de transit (CAT) va migrer vers le haut de la crypte en se divisant et en se différenciant afin de produire les différents types cellulaires composant l'épithélium (Reya et Clevers 2005). Le processus de différenciation est coordonné à partir de gradients de protéines, telles que les protéines Wnt, BMP et TGF- β en plus de la niche cellulaire déjà décrite (Figure 3B). En utilisant ce mécanisme, l'épithélium est entièrement renouvelé en 5 jours (W. S. Wang, Chen, et Su 2006; Williams et Dickey 1969).

1.1.3.1.3 Les cellules différenciées

Les cellules progénitrices donnent naissance à deux types de cellules différenciées : les cellules de type absorbant et celles de type sécréteur (Reya et Clevers 2005).

Les entérocytes de type absorbant, sont les plus abondantes. Elles sont localisées le long de la villosité en contact avec la lumière du tube.

Les cellules caliciformes sont sécrétrices de mucus. Ce mucus joue un rôle protecteur et lubrifiant.

Les entéro-endocrines sont libératrices d'hormones telles que la sécrétine, et la somatostatine. Ces hormones vont réguler la motricité et les sécrétions de l'épithélium.

Les cellules de Paneth, localisées dans la partie inférieure des cryptes, jouent un rôle dans l'immunité innée de la barrière intestinale en sécrétant des molécules antimicrobiennes. Elles interagissent avec les CSI et permettent la traduction des signaux environnementaux en réponse épithéliale intestinale. Par exemple, lors d'altération de l'épithélium, les cellules de Paneth vont percevoir les signaux de dégradation et induire le renouvellement de l'épithélium par les CSI. Les cellules de Paneth, à la différence des autres cellules différenciées, proviennent d'une CAT ayant migré vers la base de la crypte (Zouiten-Mekki et al. 2013).

D'autres types cellulaires moins bien caractérisés existent, c'est le cas des cellules « Tuft ». Ces cellules participent à l'immunité de type 2 de la muqueuse intestinale (Gerbe et al. 2016).

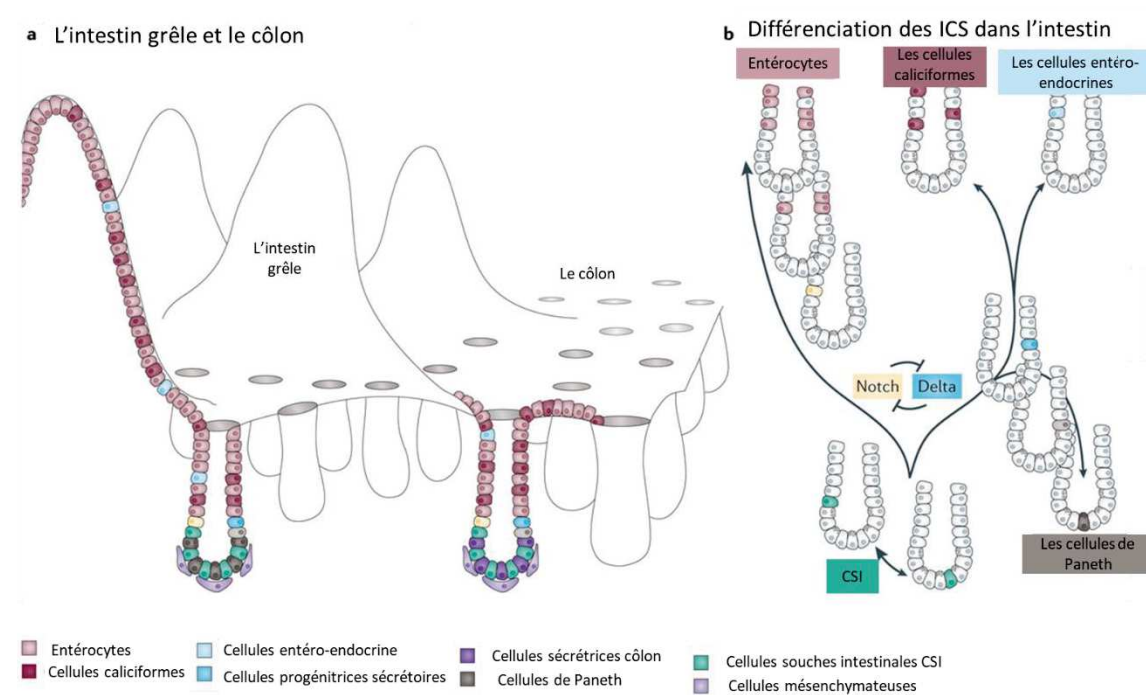


Figure 3: L'épithélium intestinal et son renouvellement

A. Les cellules composant l'intestin grêle et le colon. Les CSI et cellules de Paneth sont localisées dans le fond des cryptes. Les cellules différenciées (entérocytes, cellule caliciformes, cellules entéro-endocrines, cellules tufts) sont localisées le long du prolongement de la crypte. L'intestin grêle comprend en plus des cryptes des villosités peuplées par les cellules différenciées.

B. Les processus de différenciation responsables de la diversité des cellules épithéliales. Tractus suivi par une CAT afin de produire les différents types cellulaires. Ceci permet l'homéostasie des compartiments. Adaptation figure (Vermeulen et Snippert 2014).

1.1.3.2 Classification histologique des cancers colorectaux

1.1.3.2.1 Histologie du CRC

La transformation cancéreuse commence au niveau de l'épithélium du côlon-rectum. En général, le CRC est la résultante d'une tumeur bénigne aussi appelée polype ou adénome, qui va évoluer et devenir cancéreuse. Plus tard, ce cancer peut conduire à la formation de métastases dans des organes distants. La transformation cancéreuse est lente, elle prend environ 15 ans (Kuipers, Rösch, et Bretthauer 2013).

1.1.3.2.1.1 La formation des adénomes et des adénocarcinomes

Initialement, les cellules composant l'épithélium intestinal vont devenir hyperplasiques en se multipliant. Au cours de cette transformation, les cellules vont conserver l'architecture de l'épithélium.

Ensuite, elles vont subir des altérations cytologiques modifiant leur taille ainsi que la forme des noyaux cellulaires. À cet instant, ces cellules sont appelées dysplasiques.

Par la suite, la prolifération cellulaire aberrante va entraîner une perte de l'organisation et de l'architecture des cryptes et former une excroissance appelée adénome. Cet adénome souvent appelé polype ou polype adénomateux est considéré comme bénin car les cellules le constituant sont regroupées et contenues par la membrane basale.

La forte croissance cellulaire va aussi créer des conditions d'hypoxie (diminution de l'approvisionnement en oxygène). Cela conduit à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, c'est le processus d'angiogenèse. Lorsque les cellules vont disséminer en traversant la membrane basale, l'adénome devient adénocarcinome. Ces cellules vont par la suite traverser les vaisseaux sanguins néoformés et coloniser d'autres organes afin de donner naissance à des métastases. Plus de 50% des patients atteints de CRC possèdent des métastases distantes au moment du diagnostic. Dans le cas du CRC, les métastases sont préférentiellement détectées dans le foie, les poumons et le péritoine (Nappi et al. 2018). Actuellement, 70% des décès de patients de CRC sont causés par des métastases hépatiques (Neo et al. 2010; Zarour et al. 2017). Plus rarement, les patients développent des métastases dans les os, le cerveau et la moelle épinière.

L'évolution d'un adénome en adénocarcinome est également très lente. De plus, seuls 3 adénomes sur 1000 évolueront pour devenir des adénocarcinomes (Bretthauer et Kalager 2012; Fleming et al. 2012).

1.1.3.2.1.2 Les différents types d'adénomes

Il existe deux types de polypes : les adénomateux et les non adénomateux. Les non adénomateux sont composés de polypes hyperplasiques, hamartomateux et inflammatoires, ils n'évolueront jamais en tissus cancéreux. Les polypes adénomateux sont regroupés en deux groupes : les adénomes conventionnels et ceux de type festonné.

1.1.3.2.1.2.1 Histologie des adénomes conventionnels

Suivant leur architecture, les adénomes conventionnels sont divisés en trois groupes : les tubuleux (75%), les vilieux (20%) et les tubuleux vilieux (20%).

Les adénomes tubuleux sont composés de glandes dysplasiques, et sont les plus petits adénomes. Ils présentent peu de risques d'évoluer en cancer.

Les vilieux eux, sont généralement de grande taille (>1cm) et de haut grade. Ils sont considérés comme des adénomes avancés et ont un risque élevé de se transformer en cancer. Ils nécessitent donc une surveillance accrue.

Pour finir, les tubuleux villosités sont des lésions intermédiaires entre le groupe des tubuleux et des villosités. Le risque qu'ils se transforment en tumeur est donc intermédiaire (Fleming et al. 2012).

1.1.3.2.1.2.2 Histologie des adénomes festonnés

Les adénomes festonnés possèdent une architecture en dents de scie ou étoilée (Liang et al. 2013). Ils sont issus de modifications et d'altérations moléculaires différentes des adénomes conventionnels (Snover 2011) (développé dans le paragraphe [1.1.4.2.2](#) Modèle festonné). Ils sont eux aussi regroupés en trois groupes hétérogènes : les hyperplasiques (HP), les adénomes festonnés traditionnels (TSA), et les sessiles (SSA).

Les HP sont les lésions les plus courantes et de petites tailles (<5mm). Ils ont longtemps été considérés comme bénins, mais des études suggèrent actuellement qu'ils soient des précurseurs de CRC (Torlakovic et al. 2003).

Les SSA sont généralement plus gros que les HP. Ces adénomes non dysplasiques ont une histologie festonnée et sont précurseurs de CRC MSI (microsatellite instable) et MSS (microsatellite stable). Le phénotype MSI résulte d'anomalies au niveau de la réparation de l'ADN engendrant des mutations des MS. À l'inverse les CRC MSS ne possèdent pas ce type d'anomalie.

Les TSA sont les plus rares, ils présentent une dysplasie nucléaire semblable à celle des adénomes conventionnels. Néanmoins, ils ont une architecture dentelée similaire à celle des HP et SSA (Fleming et al. 2012; Patai 2013; Liang et al. 2013).

1.1.3.2.1.3 La classification « Tumor node Metastasis » (TNM)

Le premier système de classification pathologique fut introduit il y a plus de 50 ans. Ce système classait les CRC en trois groupes selon l'atteinte des tissus environnants (W. S. Wang, Chen, et Su 2006). Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) recommande d'utiliser le système de stadification TNM pour « Tumor-Nodal-Metastasis » développé par l'American Joint Commission on Cancer (AJCC). Ce système permet d'associer des pronostics à un stade de la maladie et définit la prise en charge du patient. La classification TNM mesure l'étendue locale et à distance de la tumeur à trois niveaux : 1 : l'envahissement de la tumeur (T), 2 : l'envahissement des ganglions périphériques et leurs nombres (N), 3 : la présence de métastases (M). Un chiffre est attribué à chaque niveau et l'ensemble est classé en stades allant de I à IV. I étant le stade le plus faible et IV le stade le plus avancé (Figure 4). Cette classification est réévaluée afin de s'adapter aux observations actuelles concernant l'évolution clinique des patients (Weledji 2017).

A. La 7^{ème} édition du système de classification TNM **B.**

TNM	Disease extension	Stage*	T	N	M
I		I	T1	N0	M0
			T2	N0	M0
II		II			
a	Tumour invades through the muscularis propria	a	T3	N0	M0
b	T1 or T2 tumour with satellite deposits in pericolorectal tissues	b	T4a	N0	M0
III		III			
a	Tumour penetrates the visceral peritoneum	a	T1-T2	N1	M0
b	Tumour directly invades or is adherent to other organs or structures	b	T1	N2a	M0
IV		IV			
a	No regional lymph node metastasis	a	T3-T4a	N1	M0
b	Metastases in 1 to 3 regional lymph nodes	b	T2-T3	N2a	M0
MO		c	T1-T2	N2b	M0
MI		c	T4a	N2a	M0
a	Metastasis confined to one organ or site (e.g., liver, lung, ovary, non-regional node)		T3-T4a	N2b	M0
b	Metastases in more than one organ/site or the peritoneum		T4b	N1-N2	M0
IV		IV	Any T	Any N	M1

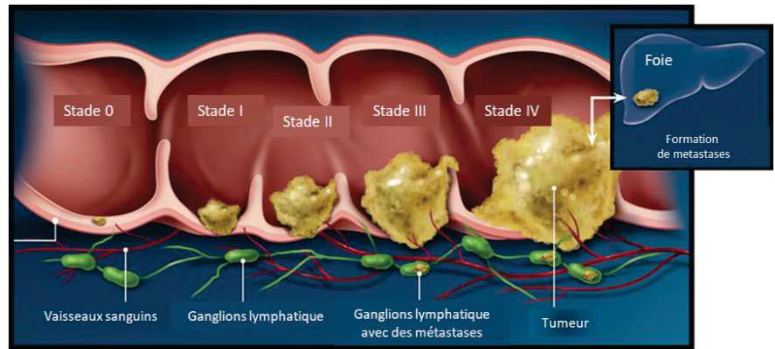


Figure 4: Classification TNM et stade d'évolution du CRC

À chaque stade est associé une description histologique. **A.** Tableau de la classification TNM : T, stade tumoral ; N, atteinte des ganglions lymphatiques ; M, métastase à distance. **B.** Image illustrant les différents stades de CRC. Adaptation figure de www.guidetocrc.ca et (Weledji 2017).

1.1.4 Mécanismes d'initiation et de progression tumorale

1.1.4.1 Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation du CRC

Trois grands mécanismes moléculaires sont à l'origine du développement d'un CRC :

- La perte de l'instabilité chromosomique, occasionnant des mutations modifiant l'activité de voies de signalisation.
- Le dysfonctionnement de la machinerie de réparation de l'ADN causant des instabilités au niveau du génome.
- L'hyperméthylation de l'ADN modifiant l'activité des gènes responsables de l'homéostasie cellulaire.

Tous ces mécanismes sont dynamiques et influent sur la promotion et la progression du CRC.

1.1.4.1.1 L'Instabilité chromosomique (CIN)

La perte de stabilité génétique permet l'acquisition de mutations influençant la formation d'un cancer.

L'instabilité chromosomique est la plus répandue (80% des CRC), elle provoque des changements dans le nombre de copies d'un gène et dans la structure des chromosomes (Geigl et al. 2008). Cette instabilité est efficace pour créer des pertes de la forme non mutée d'un gène comme pour APC ou P53 (Protéine 53) par exemple, protéines dont la perte d'activité va favoriser la formation et la

progression tumorale (Markowitz et Bertagnolli 2009). Dans le CRC, les mutations des gènes responsables de la stabilité des chromosomes génèrent le CIN.

1.1.4.1.2 Instabilité des microsatellites (MSS ou MSI)

L'inactivation des gènes participant à la réparation de l'ADN appelés gène de réparation des mésappariements (MMR) contribue à la formation d'un CRC. Cette inactivation peut être héréditaire, comme c'est le cas pour le syndrome de Lynch, ou acquis dans les tumeurs sporadiques.

La perte d'activité des gènes MMR est associée à l'instabilité des microsatellites, causant lors de la réplication des modifications du nombre et de la taille de ces petites séquences. L'instabilité des microsatellites est détectée dans 15% des CRC, dans des tumeurs souvent positionnées dans le côlon proximal, dans les cas sporadiques majoritairement chez les femmes et dans des cas avancés (Lynch et al. 2008 ; Gupta, Sinha, et Paul 2018). Le statut MSI d'un patient est déterminé en utilisant cinq marqueurs, selon le nombre de marqueurs positifs, la tumeur est classée MSI-élevée ; MSI-faible ou MSS (microsatellite stable). Environ 3 à 15% des CRC sporadiques sont classés MSI (Yamagishi et al. 2016).

1.1.4.1.3 Hyperméthylation des îlots CpG (CIMP)

Un autre mécanisme identifié dans le CRC est l'inactivation des gènes par une méthylation aberrante de l'ADN. Une forme méthylée (CH₃) de cytosine est introduite par des ADN méthylases dans des îlots CPG (succession de cytosines précédant une guanine). Dans un contexte sain, cette méthylation est localisée dans des séquences d'ADN répétitives en dehors des exons et est exclue des îlots CPG (zone de forte traduction) (Toyota et al. 1999). Dans le CRC, il se produit une perte de méthylation des zones répétitives et une augmentation de cette méthylation sur des îlots CPG. Cela induit une répression épigénétique de l'expression des gènes en aval de ce promoteur. C'est l'exemple de la MLH1 réprimée dans le CRC sporadique avec une instabilité microsatéllitaire. Les mécanismes moléculaires menant au phénotype CIMP (CpG island methylator phenotype) sont encore mal connus mais l'équipe d'Issa propose que ces accumulations seraient liées à l'âge ou à une modification d'activité des méthyltransférases (Toyota et al. 1999; Mojarad et al. 2013; Issa 2004).

1.1.4.2 Modèles de développement tumoral

Le développement tumoral est souvent décrit comme un processus en plusieurs étapes impliquant un évènement mutagène initial. Cet évènement conduit à l'acquisition d'un avantage de croissance ou de sélection à l'origine du phénotype cancéreux. Par la suite, des évènements supplémentaires vont permettre la promotion tumorale (croissance tumorale). Dans le CRC, deux modèles sont généralement reportés : le modèle de « Fearon and Vogelstein » et le modèle festonné.

1.1.4.2.1 Le modèle de « Fearon and Vogelstein »

Le modèle de « Fearon and Vogelstein » proposé en 1988 aussi appelé le modèle adénome-carcinome correspond à 70% des cancers du côlon et 90% des cancers du rectum. Il décrit la séquence des altérations moléculaires responsables de l'évolution d'un polype adénomateux vers un carcinome (Vogelstein et al. 1988). Ce processus se produit en plusieurs étapes dont chaque altération histologique est la conséquence de modifications moléculaires. Ces altérations vont réguler la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire procurant aux cellules un avantage de survie par rapport à l'épithélium sain.

L'évènement initiateur est la mutation du suppresseur de tumeur *Adenomatous polyposis Coli* (APC) sur un de ses allèles. Lorsqu'il est suivi de la perte du second allèle, il entraîne la formation d'une protéine tronquée au niveau N-terminal qui devient inactive. Ceci conduit à une activation constitutive de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine créant une prolifération anarchique et continue des cellules de l'épithélium du côlon (Reya et Clevers 2005; Gregorieff et Clevers 2005; Behrens 2005).

Cette prolifération non contrôlée va favoriser l'accumulation de mutations permettant le développement et l'évolution tumorale ; c'est le cas des mutations du gène KRAS (Kristen rat sarcoma viral oncogene homologue) et p53 par exemple (Figure 5)(Fearon 2011).

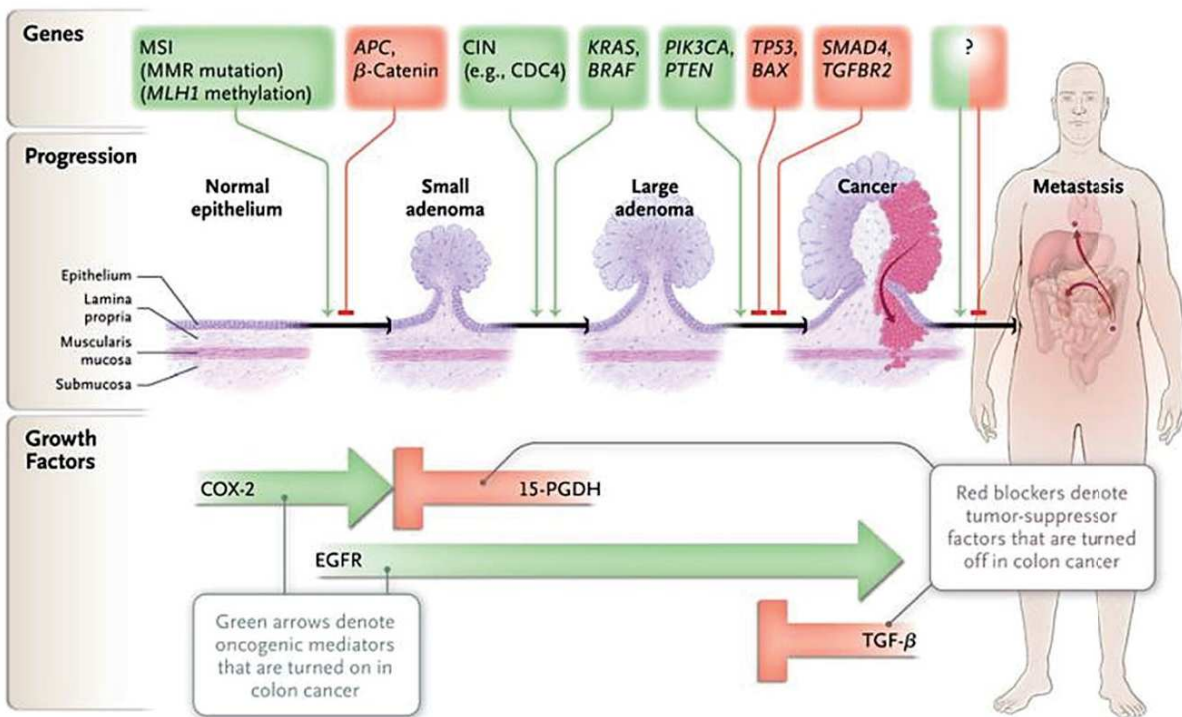


Figure 5: Le modèle de Fearon et Vogelstein

Ce modèle décrit les modifications moléculaires à l'origine de la progression tumorale partant d'un épithélium sain à un adénocarcinome et des métastases. Source (Markowitz et Bertagnolli 2009).

1.1.4.2.1.1 Le gardien de la tumorigenèse : La voie Wnt/ β -caténine

La voie Wnt/ β -caténine, conservée au cours de l'évolution, est décrite comme responsable du développement et de l'homéostasie cellulaire des organismes au stade embryonnaire (Nusse et Clevers 2017). Dans l'épithélium intestinal sain la voie Wnt/ β caténine permet le maintien, la prolifération et la différenciation des CSI (Testa, Pelosi, et Castelli 2018). Active dans les CSI à la base des cryptes de Lieberkühn, elle permet le renouvellement de l'épithélium.

Elle est graduellement inactivée dans les CAT, afin de diminuer leur capacité de prolifération au fur et à mesure qu'elles migrent vers le haut de la crypte. Cela permet la mise en place des différentes populations cellulaires différenciées composant la crypte.

Les dérégulations de la voie Wnt/ β caténine, ont beaucoup été étudiées dans le syndrome de la PAF, et sont présentes dans de nombreux cancers. L'inactivation d'APC entraîne la stabilisation de la protéine β -caténine, ce qui rend constitutivement active la voie de signalisation (Kinzler et Vogelstein 1996; Morin et al. 1997) (Figure 6). Par ailleurs, dans les cas où APC n'est pas muté, il y a des mutations activatrices de la β -caténine responsables également d'une activation aberrante de la voie de signalisation (Morin et al. 1997).

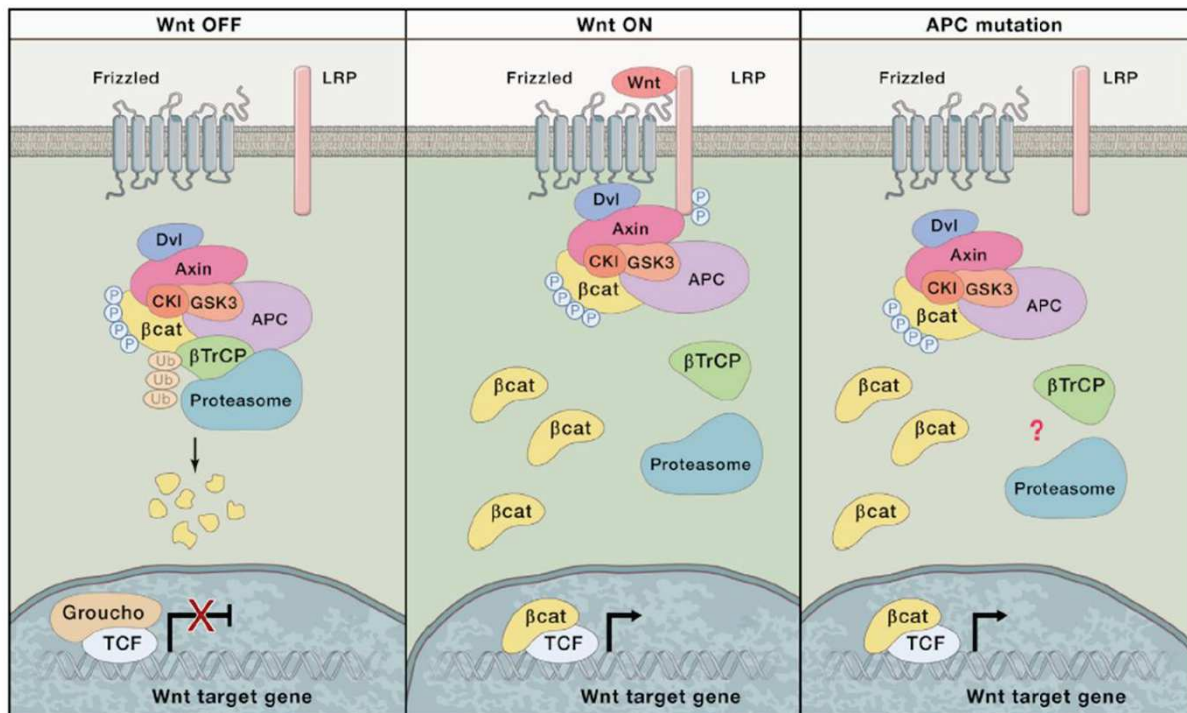


Figure 6: La voie de signalisation Wnt/ β caténine

Gauche : Voie Wnt canonique inactivée. En absence de signal la β -caténine est dégradée par un complexe protéique contenant APC.

Milieu : Voie Wnt canonique active. À la suite d'un signal activateur, l'activité du complexe protéique comprenant Wnt est arrêté. LA β -caténine, non dégradée, peut aller dans le noyau réguler l'expression de ces gènes cibles.

Droit : Perte d'activité d'APC, activation aberrante de la voie Wnt. Source : (Nusse et Clevers 2017)

1.1.4.2.1.2 *La voie de signalisation de l'EGFR*

Le récepteur à l'EGF (**Epidermal Growth Factor receptor (EGFR)**) ou HER1 (human EGF Receptor) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase (RTK) appartenant à la famille des ErbB2. Exprimé préférentiellement dans les tissus épithéliaux, son activation induit une augmentation de la prolifération cellulaire, de la motilité cellulaire et de la survie cellulaire (par une diminution de la mort cellulaire programmée : apoptose) (Krasinskas 2011). L'activation anormale de cette voie a été démontrée comme participant à la transformation cancéreuse et à l'évolution tumorale (Koveitypour et al. 2019).

L'EGFR régit la signalisation cellulaire en activant d'autres voies de signalisation telles que celle des MAPK et PI3K-AKT :

La voie des Mitogen-activated protein kinases (MAPK ou MAPkinase), qui est située en aval de la voie EGFR, est fréquemment mutée dans le CRC. C'est le cas des mutations de K-RAS (Kristen rat sarcoma) et BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1) détectées dans 50% et 15% des CRC respectivement (Pylayeva-Gupta, Grabocka, et Bar-Sagi 2011). Une activation aberrante de la voie des MAPkinase en plus de la voie Wnt est suffisante pour induire la progression de la maladie en adénome intermédiaire (D'Abaco, Whitehead, et Burgess 1996).

La voie PI3K-AKT (Phosphatidyl Inoside 3-Kinase-protein kinase B), également en aval de l'EGFR, est impliquée dans les mécanismes de croissance et de survie cellulaire. La suractivation de cette voie, souvent due à des mutations activatrices de PIK3CA, induit directement une croissance tumorale et une résistance à l'apoptose (Fearon 2011; M. T. Nguyen et Weinberg 2016) .

1.1.4.2.1.3 *La voie de TGF- β*

Les mutations de la voie de signalisation du facteur de croissance transformant appelé en anglais « transforming growth factor » (TGF- β), est la 3^{ème} étape dans la progression du CRC (Derynck, Akhurst, et Balmain 2001). Il est inactivé dans 90 % des CRC. Les mutations ou délétions inactivant la voie ou les composants de la voie permettent la progression tumorale (Grady et al. 1998).

1.1.4.2.1.4 *L'inactivation de P53*

L'inactivation de l'activité de la protéine 53 ou « Tumor protein 53 » (TP53) causée par des mutations faux-sens est une étape importante dans le développement tumoral, elle est responsable de la transition d'adénome vers carcinome (Baker et al. 1990). En effet, dans un contexte sain, la P53 participe à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose (Vazquez et al. 2008).

Dans le CRC, les mutations inactivant P53 sont présentes dans 40-50% des cas (X.-L. Li et al. 2015). Dans les cas où elle n'est pas mutée, d'autres mutations peuvent survenir afin d'atténuer son activité.

C'est l'exemple des mutations de la protéine BAX (Bcl-2-associated X), protéine aussi impliquée dans les processus d'apoptose (Miquel et al. 2005).

1.1.4.2.2 Modèle festonné

Près de 30% des CRC se développent selon le modèle festonné nommé en anglais « serrated pathway ». Tout comme le modèle de Fearon and Vogelstein, le modèle festonné décrit les altérations moléculaires conduisant à la formation d'adénomes festonnés (HP, TSA et SSA) puis d'un CRC (Figure 7) (Jass 2007; Bettington et al. 2013). Ce modèle n'est pas totalement caractérisé.

Ces adénomes sont souvent la conséquence d'hyperméthylation aberrantes des îlots CPG (CIMP élevée) et de mutations des protéines MMR (Jass 2007). Ils présentent rarement des mutations d'APC. L'évènement initiant le processus est la mutation de l'oncogène BRAF (50% des cas) ou plus rarement KRAS (15 à 36% des cas). Ces mutations activatrices créent une suractivation de la voie des MAPkinases et a pour conséquence une hyperplasie cellulaire et une diminution de l'apoptose des cellules (Bettington et al. 2013). La voie des MAPkinases ainsi que les protéines la composant seront décrites plus en détails dans le chapitre ([1.3 La kinase BRAF, effectrice de la voie des MAPkinases](#)). Après, la mutation de BRAF, les tumeurs vont se développer et converger vers la voie MSI ou MSS (L. H. Nguyen, Goel, et Chung 2020).

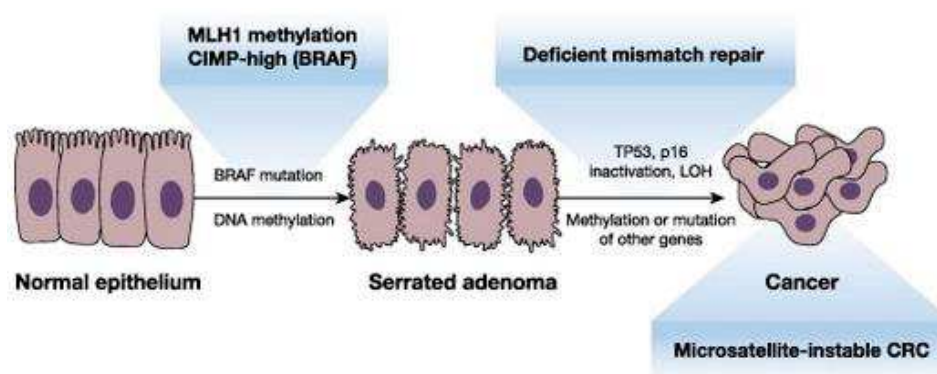


Figure 7: La voie du polype festonné mutée par BRAF V600E

Deux majeures altérations moléculaires sont impliquées dans la formation du CRC : l'hyperméthylation des îlots CpG (CIMP), et l'instabilité microsatéllitaire (MI). La mutation de BRAF provoque l'activation de la voie des MAPkinase conduisant à une forte prolifération cellulaire. L'inactivation ultérieure des suppresseurs de tumeurs favorise la formation cancéreuse.

Source : (Strickler, Wu, et Bekaii-Saab 2017)

1.1.5 Des cellules cancéreuses hétérogènes

1.1.5.1 Hétérogénéité intra et inter tumorale

La variété des mécanismes menant à la formation d'un CRC conduit à de nombreuses implications cliniques et pronostics. En effet, elles sont à l'origine de diversité morphologique, immuno-

phénotypique (expression protéique), génomique et épigénétique entre les cellules cancéreuses d'une seule tumeur. Cette diversité est appelée **hétérogénéité intra-tumorale** (Figure 8A). Elle est la conséquence de la cohabitation de populations cellulaires génétiquement distinctes, issues de différents processus de différenciation. C'est l'exemple des tumeurs possédant des altérations des protéines MMR et étant MSI. Elles accumulent beaucoup de mutations, ce qui est à l'origine de profils cellulaires différents (Punt, Koopman, et Vermeulen 2017). Au cours du développement tumoral, les cellules cancéreuses vont se multiplier et augmenter la proportion de leurs clones (cellule génétiquement identique) dans la tumeur. Cette proportion de clones peut varier en réponse à une forte pression environnementale, comprenant les thérapies anti-cancéreuses, et créant une sélection darwinienne des clones. Certains clones possédant un avantage sélectif vont se développer tandis que les autres vont stagner ou décliner.

Des études de séquençage (NGS) ont démontré que la diversité des mutations d'une masse tumorale est élevée. Elle est d'environ 80 mutations dont moins de 15 seraient la force motrice de la tumorigenèse (mutations drivers). Ceci cause une hétérogénéité importante avec par exemple, très peu de mutations partagées entre deux tumeurs primaires ayant été initiées avec la même mutation (Wood et al. 2007). D'un point de vue pronostic, la localisation du cancer affecte aussi la survie du patient, des études ont démontré que les tumeurs sur le côlon droit donnent de moins bons pronostics que celles du côlon gauche (Figure 8B). Les causes ne sont pas encore élucidées, cependant des hypothèses proposent que l'origine embryonnaire différente entre le côlon droit et gauche créerait une différence biologique. Cette différence impacterait le développement tumoral et la réponse aux traitements. De plus, les tumeurs MSI se développent plus souvent du côté droit et chez la femme alors que celles au statut CIN se sont préférentiellement du côté gauche et chez l'homme (Benedix et al. 2010; Phelip 2018; Cancer Genome Atlas Network 2012).

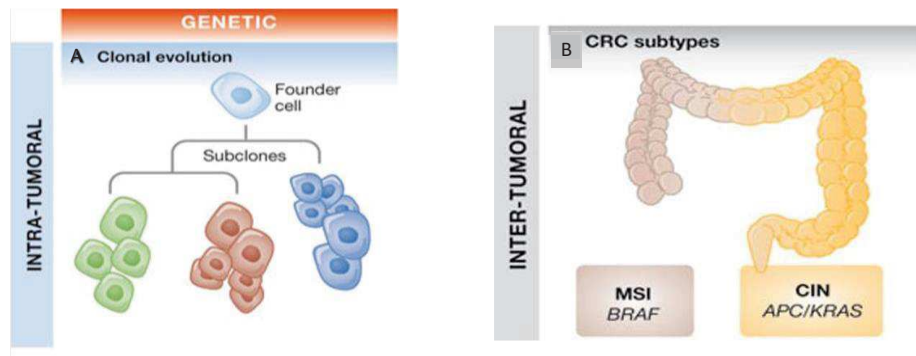


Figure 8: Hétérogénéité Tumorale

A : Hétérogénéité intra-tumorale : Présence de différents clones cellulaires.

B. Hétérogénéité inter-tumorale : Mécanismes moléculaires sélectifs localisés aux niveaux du côlon. Source : adaptation de (Melo et al. 2013)

L'hétérogénéité des tumeurs se manifeste aussi par la composition du stroma environnant la tumeur. En effet, des études sur les modèles murins notamment ont démontré que l'environnement tumoral et le système immunitaire (SI) local influencent l'évolution du CRC. C'est ce qui est observé chez les patients atteints de MICI, où le terrain inflammatoire de l'épithélium favorise la carcinogénèse en induisant des dommages à l'ADN ; la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (NOS) ; la modification de la polarité des cellules intestinales ; et en modifiant le microenvironnement tumoral (Itzkowitz et Yio 2004; Tilg et al. 2018).

En somme, toutes les différences étant propres à une tumeur ou à un patient témoignent de **l'hétérogénéité inter-tumorale** (entre les tumeurs).

1.1.6 La classification des CRC

Malgré cette importante hétérogénéité de nombreux systèmes tentent de classer différents sous types de CRC. L'objectif étant d'associer une valeur pronostic (développement, réponse aux traitements, survie des patients) à un phénotype tumoral.

L'exemple du « Cancer Genome Atlas » (TCGA) propose de regrouper les CRC en 3 classes (Figure 9) et plus récemment une classification moléculaire CMS a été identifiée (Consensus Molecular Système) (Figure 10) (Cancer Genome Atlas Network 2012; Guinney et al. 2015).

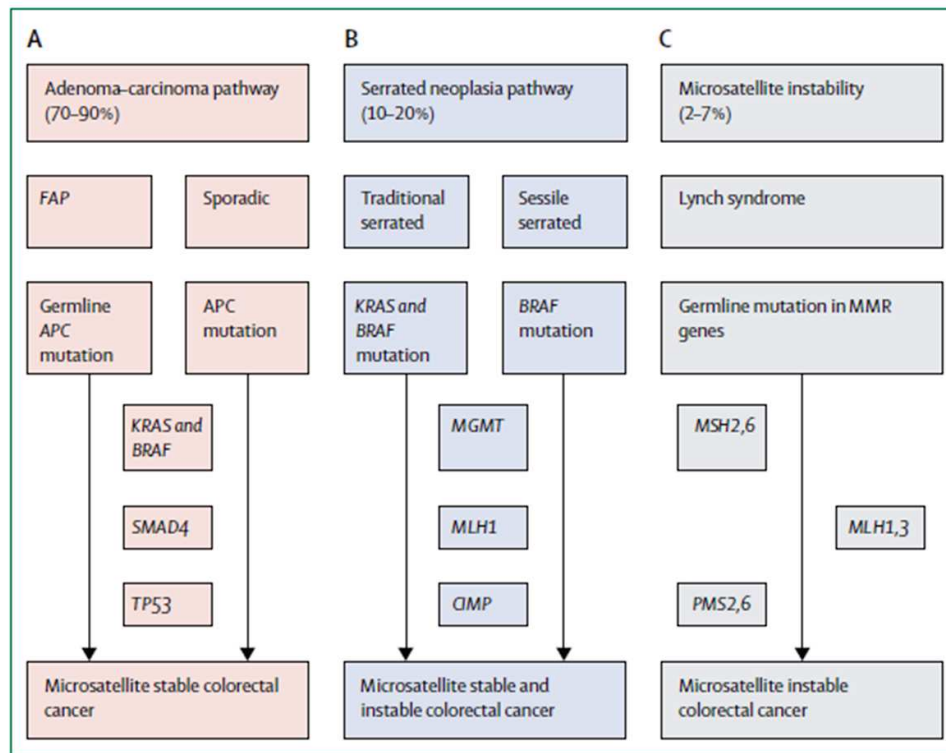


Figure 9: La classification du CRC par le « Cancer Genome Atlas » (TCGA)

FAP : la polypose adénomateuse familiale. Gènes de réparation des mésappariements (MMR) : MGMT (méthylguanine méthyltransférases), MSH2,6 et MLH1,3 (protéines de réparation des mésappariements d'ADN).
Source : (Dekker et al. 2019)

La classification de CMS a été créée en 2015. Elle a proposé 4 sous-types de CRC après l'analyse de l'expression génique d'une cohorte de plus de 4000 patients. Ces sous-types sont nommés groupes moléculaires consensus (CMS) de 1 à 4.

Le groupe CMS1 (« MSI, Immune ») représente 14% des CRC. Il est caractérisé par des tumeurs avec une MSI élevée et une forte activation du SI. Elles sont fréquemment de type CIMP élevé avec des mutations de la voie des MAPkinases (comme BRAF). Ces tumeurs sont préférentiellement localisées dans le colon droit. En l'absence de métastase, ce sous-type est de bon pronostic. En revanche il est de très mauvais pronostic pour les patients présentant des métastases (CRCm).

Le groupe CMS2 (« canonical ») représente 37% des CRC. Il est composé de tumeurs épithéliales de type MSS et possédant des mutations somatiques fréquentes. Ces tumeurs ont une forte activation des voies de signalisation telles que l'EGFR et la voie Wnt/ β caténine. Leur pronostic est intermédiaire.

Le groupe CMS3 (« metabolic ») représente 13% des CRC. Il est caractérisé par des tumeurs mésenchymateuses majoritairement de type MSS (90% des cas) avec une faible CIN et CIMP. Leur pronostic est également intermédiaire.

Et pour finir, **le groupe CMS4** (« mesenchymal/stemness ») représente 23% des CRC. Les tumeurs associées possèdent une CIN élevée ainsi qu'une activation fréquente de la voie de signalisation du TGF- β et de l'angiogénèse. Les tumeurs sont le plus souvent MSI et sont localisées préférentiellement sur le côlon gauche. Leur pronostic est mauvais en situation métastatique.

Il faut noter qu'environ 20 % des CRC ne peuvent être classés (Guinney et al. 2015).

CMS1 MSI Immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hypermutation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGF β activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

Figure 10 : La classification moléculaire du Consensus Molecular Subtypes (CMS)

Description des caractéristiques des groupes CMS. Source : (Guinney et al. 2015)

L'impact prédictif de la classification de CMS a été validé dans l'essai FIRE où les tumeurs classées CMS1 en condition métastatique ont obtenu le plus mauvais pronostic (Figure 11). Néanmoins, la classification semble être moins fiable pour la prédiction d'efficacité des traitements (Stintzing et al. 2019).

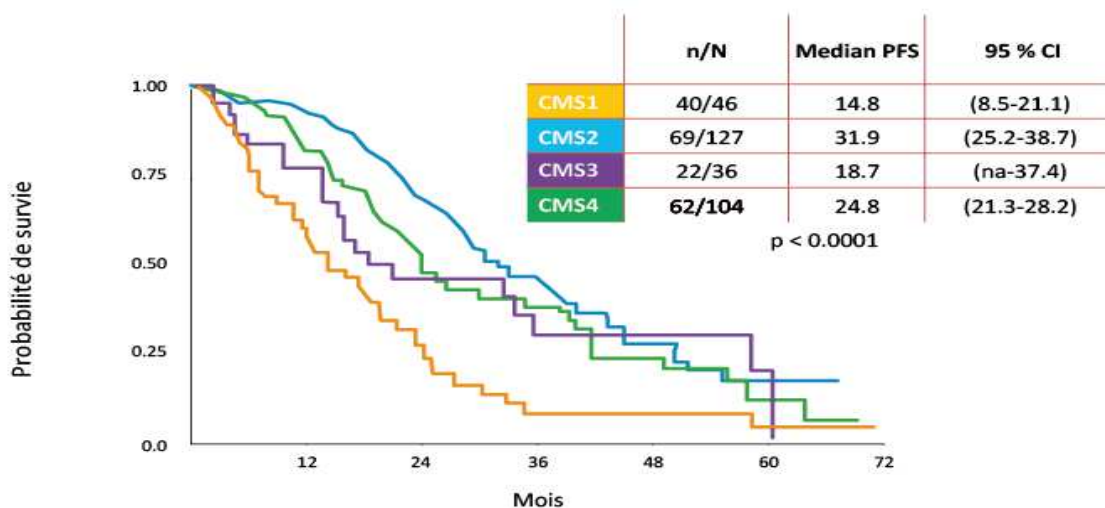


Figure 11: Impact pronostic de la classification de CMS en situation métastatique pour des patients RAS non-mutée dans l'essai FIRE-3.

La classification CMS a été en mesure de prédire de manière significative la survie d'une cohorte de patients. Le CMS1 étant le sous type avec la pire survie pour le RAS sauvage. Source : (Stintzing et al. 2019)

La classification de CMS fournit des informations sur la biologie des CRC mais n'est pour le moment pas un paramètre intégré dans la prise en charge des patients en clinique. En routine, afin de déterminer le traitement des patients, les oncologues vont analyser : le statut TNM du patient, le statut des MS et les mutations d'oncogènes tels que BRAF et KRAS.

1.1.7 Prise en charge des patients atteints de CRC

1.1.7.1 Stratégies de traitements

1.1.7.1.1 Traitement de la tumeur primaire

La résection chirurgicale de la tumeur primaire ainsi que des ganglions lymphatiques est le seul traitement curatif du CRC (W. S. Wang, Chen, et Su 2006). La zone réséquée est plus ou moins importante en fonction de la localisation et la tumeur et de son degré d'avancement. La majorité des patients (70-80%) sont diagnostiqués avec un CRC localisé permettant l'ablation chirurgicale (Lombardi et al. 2010). Pour les patients atteints de CRC de stade I aucun traitement supplémentaire n'est requis, le taux de guérison est supérieur à 90% ; pour ceux avec des tumeurs de stades II et III (et particulièrement pour ceux de stades III) en supplément il leur est prescrit une chimiothérapie adjuvante avec des agents cytotoxiques (André et al. 2004). La chirurgie curative est rarement applicable aux patients possédant un CRC disséminant et avancé (environ 25% des cas). Ils recevront d'abord un traitement systémique de chimiothérapies standards. Si la chimiothérapie diminue la taille de la tumeur, la chirurgie sera alors envisagée (Manhas et al. 2016; Chibaudel et al. 2015). Afin d'amplifier l'efficacité de la chimiothérapie et sous certaines conditions des thérapies ciblées seront également administrées.

1.1.7.1.2 Traitement des métastases

De nombreuses thérapies locales sont disponibles pour les patients de stades IV. Le but étant de contrôler à long terme la progression de la maladie. Bien que ce ne soit pas encore démontré dans les essais randomisés le traitement et l'ablation des métastases est bénéfique aux patients. La chirurgie hépatique avec ablation des tumeurs par radiofréquence (fréquence particulière créant la destruction des tissus) est une bonne alternative. Pour les métastases du poumon l'ablation est plus controversée. En ce qui concerne les métastases du péritoine une chirurgie cytoréductive ainsi qu'une chimiothérapie intrapéritonéale hyperthermique ont permis d'améliorer la survie des patients (Dekker et al. 2019).

1.1.7.2 Les agents cytotoxiques

La chimiothérapie a été inventée dans les années 1900 afin de traiter les maladies avec des agents chimiques (DeVita et Chu 2008). Aujourd'hui, son objectif est de détruire le plus spécifiquement possible les cellules cancéreuses en inhibant un ou plusieurs processus impliqués dans la division cellulaire. Les cellules endommagées ont pour destin de mourir par apoptose, ou par nécrose (mort non programmée) (Lind 2008; Okada et Mak 2004).

Les principaux agents utilisés sont le 5-fluoro-uracile (5-FU), la capécitabine ou Xéroda[®], l'oxaliplatine ou Eloxatine[®], l'irinotécan ou Campto[®] et le raltitrexed ou Tomudex[®].

Jusqu'en 2000, le **5FU** était le seul traitement approuvé par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA). Il était utilisé dans les cas de CRC avancés. La survie globale associée à ce traitement était de moins d'un an (Chibaudel et al. 2015). Le 5FU est un analogue de l'uracile qui inhibe la division cellulaire des cellules cancéreuses en bloquant de manière irréversible l'action de la thymidylate synthase. Cette inhibition empêche la synthèse de l'ADN lors de réplication (Heidelberger et al. 1957). Une amélioration de la survie (passant de 6 mois à 2 ans) a été obtenue lors de l'ajout d'autres molécules telle que l'acide folinique (Leucovorin [®]) qui semble potentialiser l'effet du 5FU (Gustavsson et al. 2015). Le 5FU peut être administré sous forme de pro-drogue (**capécitabine**) afin de réduire les effets secondaires liés aux traitements, ou encore sous forme d'analogue tel que le raltitrexed. L'**oxaliplatine**, développé dans les années 2000, est un agent contenant des platines qui a pour effet d'inhiber les topoisomérases. En agissant comme un alkylant de l'ADN, il provoque des réticulations des brins d'ADN ce qui a pour effet d'inhiber la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines ce qui déclenche la mort cellulaire (« Oxaliplatin » 2012). L'**irinotécan**, est un dérivé de la camptothécine, il possède le même mécanisme d'action de l'oxaliplatine. Il est injecté sous la forme de pro-drogue et sera activé préférentiellement dans le tissu tumoral en un métabolite actif : le SN38.

Ces agents sont administrés en protocoles combinés : 5FU+ acide folinique ; FOLFOX : 5FU + acide folinique + oxaliplatine ; FOLFOXIRI : 5FU + acide folinique + oxaliplatine + irinotécan ; FOLFIRI : 5FU + acide folinique + irinotécan ; CAPOX : capécitabine + oxaliplatine (Szaryńska et al. 2017).

1.1.7.3 Les thérapies moléculaires ciblées

Les thérapies ciblées ont un mode d'action plus spécifique sur les cellules tumorales en ciblant d'autres mécanismes cellulaires que la réplication de l'ADN. Elles ciblent des voies de signalisation anormalement activées dans les cancers.

C'est l'exemple des anti-angiogéniques tels que le Bevacizumab (Avastin®) qui cible le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et le Panitumumab (Vertibix®) ou le Cetuximab (Erbix®) qui inhibent le récepteur à l'EGF (EGFR). Ces agents sont souvent associés à la chimiothérapie adjuvante et ont permis l'augmentation de la survie des patients atteints de CRCm (Paldino et al. 2014). Ce bénéfice est observé dans de nombreux cancers tel que celui du sein à un stade avancé où l'utilisation du Trastuzumab (HERCEPTIN®), un anticorps monoclonal spécifique aux récepteurs du facteur de croissance épidermique humain de type 2 (HER-2) augmente globalement la survie des patients (Balduzzi et al. s. d.).

Le Panitumumab et le **Cetuximab** sont des anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR. Ils possèdent une forte affinité (10 fois supérieur aux ligands endogènes) et vont inhiber l'activité du récepteur avec une activité bloquante. De plus, ces deux anticorps provoquent l'ADCC qui est une cytotoxicité (mort cellulaire) médiée par les anticorps (Kimura et al. 2007). Le Panitumumab est moins efficace pour réaliser l'ADCC cependant il augmente significativement la survie des patients en combinaison avec le FOLFOX en première ligne (Monteverde et al. 2015). Ces anticorps sont indiqués pour les patients présentant un CRC avec les formes non mutées de RAS, BRAF et du récepteur à l'EGFR.

Le **Bevacizumab** est un anticorps anti-VEGF-A. On suppose que cet anticorps inhibe la croissance tumorale en provoquant la régression du système vasculaire tumoral et en inhibant l'angiogenèse. Ce traitement est corrélé à un avantage clinique dans un éventail de tumeurs comme notamment le carcinome rénal, le cancer du col de l'utérus, le glioblastome et le CRCm (Rosen, Jacobs, et Burkes 2017). Depuis 2013, l'inhibiteur de multi-tyrosine kinase **regorafenib** (inhibiteur multikinase) et l'**aflibercept** (protéine de fusion recombinante ciblant VEGF-A/B et PlGF) sont approuvés pour les patients atteints de CRCm réfractaires (en deuxième ou troisième ligne de traitement). Ces deux

molécules ont une action anti-angiogénique, cependant le regorafenib de part ces cibles aurait aussi une action anti-tumorale (Sanz-Garcia et al. 2015; Strumberg et Schultheis 2012).

L'immunothérapie est de plus en plus utilisée afin de traiter uniquement les patients présentant un CRC au statut MSI élevé. Des essais cliniques de phase 2 avec des inhibiteurs de PD-1 (protéine de mort cellulaire 1) tel que le **Nivolumab** donnent des taux de réponses (proportion de patients avec une réduction objective de la tumeur) et des signaux de survie très prometteurs (Modest, Pant, et Sartore-Bianchi 2019). En effet, PDL-1 (ligand de PD-1) est exprimé par les cellules tumorales et permet l'échappement de ces cellules au système immunitaire. L'objectif des inhibiteurs de PD-1 est de restaurer une immunité anti-tumorale efficace. Ces inhibiteurs ont déjà montré leur efficacité dans le mélanome métastatique sans mutation de BRAF où la survie des patients est clairement augmentée (Dubois et al. 2019).

En 2017, le **pembrolizumab**, un anticorps humanisé ciblant PD-1 a été approuvé par la FDA afin de traiter les CRC non résécables ou métastatiques au statut MSI élevé (O'Neil et al. 2017).

1.1.7.4 Prise en charge du cancer rectal

La chirurgie du rectum est plus complexe à cause de la localisation du bassin. L'excision mésorectale totale est l'approche standard.

La radiothérapie est principalement utilisée pour les cancers du rectum invasifs avec ou sans métastases afin de diminuer la taille de la tumeur pour favoriser l'ablation chirurgicale et diminuer le risque de récurrence. Ce traitement est de plus en plus associé à une chimiothérapie néoadjuvante avec de la capécitabine en plus de la chirurgie. Les tumeurs rectales sont plus sujettes à récidiver et sont associées à un très mauvais pronostic (Binefa et al. 2014).

1.1.7.5 Les données cliniques des patients traités

Malgré l'amélioration et la rapidité de la prise en charge des patients, le taux de survie globale à 5 ans demeure faible. Parmi les patients traités par chirurgie curative, 40 à 50% d'entre eux vont présenter une récurrence et une maladie métastatique. Pour les patients diagnostiqués avec des métastases (20 à 30% des cas), 50% des patients répondent aux traitements conventionnels mais la plupart d'entre eux vont développer une résistance et vont récidiver. La majorité des patients ayant un CRCm ne seront pas guéris avec une survie globale (SG) d'environ 12 à 36 mois (Roseweir et al. 2017; Loupakis et al. 2014 ; Siegel, Miller, et Jemal 2019).

Malgré l'amélioration significative de la survie globale des patients, la résistance aux traitements anticancéreux reste un obstacle majeur au traitement curatif du cancer. On estime les CRCm de stades très avancés comme étant incurables.

1.1.8 Mécanismes de Résistance aux traitements

La chimiorésistance concerne plus de 90% des patients et est rencontrée dans toutes les tumeurs solides (Longley et Johnston 2005). Elle aura pour conséquence la propagation et la croissance de la tumeur, ce qui conduira inévitablement à la mort du patient.

Cette chimiorésistance peut être intrinsèque (indépendante du traitement) ou extrinsèque (liée à la thérapie) ou acquise après traitement. Elle se manifeste par de nombreux mécanismes pouvant également impliquer des acteurs présents dans l'environnement tumoral (Figure 12).

1.1.8.1 La chimiorésistance intrinsèque

De manière simplifiée, cette chimiorésistance s'obtient par 3 grands mécanismes majeurs.

Premièrement, **la diminution de l'absorption** des composés hydrosolubles qui utilise des transporteurs afin de pénétrer dans les cellules. Deuxièmement, **l'efflux actif** accru des composés cytotoxiques par des protéines de transport actif. Et, troisièmement, par **des changements cellulaires** qui vont diminuer la cytotoxicité des composés.

1.1.8.1.1 La diminution de l'absorption par inactivation du composé :

Cette méthode consiste à diminuer la quantité de traitement disponible. Par exemple en réalisant une liaison covalente entre l'agent cytotoxique contenant des sels de platines avec le thiol glutathion (GSH). Cela favorise l'efflux des molécules par les transporteurs membranaires. Le GSH est un antioxydant impliqué dans les processus de réponse au stress oxydatif (Jamali et al. 2015).

1.1.8.1.2 L'efflux énergétique

De nombreux travaux suggèrent que les **transporteurs actifs de la famille ABC** sont responsables de l'altération de l'efflux des médicaments. Structuellement, les transporteurs ABC possèdent une architecture à quatre domaines. Les deux domaines cytoplasmiques de liaison aux nucléotides (NBD) se lient et hydrolysent l'ATP. Tandis que les deux autres transmembranaires (TMD) reconnaissent et transportent des substrats (Szakács et al. 2006). La structure de ces TMD est très hétérogène ce qui permet aux récepteurs de pouvoir se lier à une multitude de substrats. L'hydrolyse de l'ATP par le NBD permet la translocation des substances fixées au NBD à l'extérieur de la cellule sans prendre en compte les gradients de concentration. Sur les 48 transporteurs découverts, 19 d'entre eux sont capables d'effluer des agents anticancéreux et sont donc des acteurs clés de la chimiorésistance (Fletcher et al.

2016 ; Robey et al. 2018). L'expression de ces transporteurs joue un rôle dans la résistance clinique aux médicaments dans certains contextes. C'est le cas des protéines de résistance multidrogue 1 (MDR1) et BCRP / ABCG2.

La protéine MDR1 anciennement appelée P-gp est le premier transporteur ABC découvert. Il est présent dans l'épithélium intestinal, les cellules hépatiques, le tubule rénal proximal et dans les cellules endothéliales capillaires. Il participe à la détoxification médicamenteuse par efflux ou par GSH, en effet, il rejette une grande variété de molécule dont l'irinotécan (Kruh et Belinsky 2003; Bossennec et al. 2018). La surexpression de ce transporteur est détectée dans de nombreuses tumeurs, telles que la leucémie, les neuroblastomes, et les cancers de l'ovaire et du sein. (Deeley et Cole 2006).

La protéine ABCG2 aussi appelée BCRP (breast cancer resistance protein) est physiologiquement exprimée dans les tissus ayant une fonction de barrière tels que le placenta, le foie et les glandes mammaires (Anju Singh et al. 2010). Cette pompe agit comme une protection des agents toxiques endogènes et exogènes. Sa surexpression dans la lignée tumorale mammaire MCF-7 est associée à une forte résistance aux traitements (Doyle et al. 1998 ; Chang et al. 2017).

1.1.8.1.3 Les modifications cellulaires

Les cellules cancéreuses ont une grande adaptabilité aux stress et optent pour une multitude de modifications tels que :

La modification des cibles médicamenteuses par des changements du niveau d'expression ou par des mutations. Cela a un fort impact sur la chimiorésistance. Par exemple, l'efficacité du 5FU est corrélée au niveau d'expression de thymidylate synthase cellulaire. Les cellules tumorales possédant une faible expression de cette enzyme présentent un meilleur taux de réponse aux traitements (Johnston et al. 1995).

L'augmentation de l'activité des enzymes du métabolisme afin d'inactiver les métabolites actifs. C'est l'exemple des enzymes du cytochrome P450 et des UDP-glucuronyltransférases (UGT) (Strassburg, Kalthoff, et Ehmer 2008; Manikandan et Nagini 2018). Dans la famille des UGT, nous retrouvons l'UGT1A1 qui est surexprimée dans différents cancers et impliquée dans la dégradation du SN38 (Gagné et al. 2002, 38)

La réponse aux dommages à l'ADN est la réparation des dégâts ou l'apoptose. Les cellules tumorales sont capables d'arrêter le cycle cellulaire afin d'augmenter la durée d'action des acteurs de la réparation de l'ADN. Une fois la réparation effectuée, la cellule relancera son programme de cycle cellulaire. Dans les cas où la réparation de l'ADN est impossible, car les dommages sont trop

importants, la cellule entrera en apoptose. Dans les tumeurs où la P53 n'est pas mutée, son activité est altérée afin d'éviter l'apoptose.

Les protéines à activité de tyrosine kinase (RTK) impactent aussi la résistance aux traitements (chimiothérapies et thérapies ciblées). La surexpression et les mutations de ces récepteurs modifient l'activité des voies de signalisation associées et promeuvent les signaux de survie cellulaire (Blumenjensen et Hunter 2001). C'est l'exemple de l'EGFR où la surexpression ou des mutations activent d'autres voies telles que les voies JAK / STAT3 et PI3K / AKT. Cela a pour incidence une augmentation des capacités de prolifération et de survie cellulaire. Dans le cancer du poumon, le cancer du sein, et le glioblastome, les mutations de l'EGFR sont associées à une chimiorésistance (X. Chen, Yeung, et Wang 2000; Zheng 2017).

1.1.8.2 La chimiorésistance extrinsèque ou acquise

Ce mode de résistance s'explique par la présence de cellules tumorales initialement sensibles aux traitements qui deviennent résistantes. Cette résistance adaptative apparaît en cours de traitement. Elle est causée par l'augmentation d'activité des voies de signalisation, de l'activité des pompes à efflux, et la capacité de réparation de l'ADN. Des mécanismes d'adaptation sont aussi utilisés tels que :

L'autophagie, qui permet le recyclage des organites et des particules cellulaires altérées, est activée en réponse aux traitements. Cela va favoriser la survie cellulaire (Ojha, Bhattacharyya, et Singh 2015) ;
La **modulation d'expression des microARNs** comme le mir-223 qui sous exprimé à cause du mutant de P53 induit une résistance des cellules cancéreuses du sein et du poumon (Masciarelli et al. 2014).

Tous ces mécanismes vont promouvoir la survie cellulaire. Les causes de cette adaptation ne sont que partiellement comprises (J. Zhao 2016).

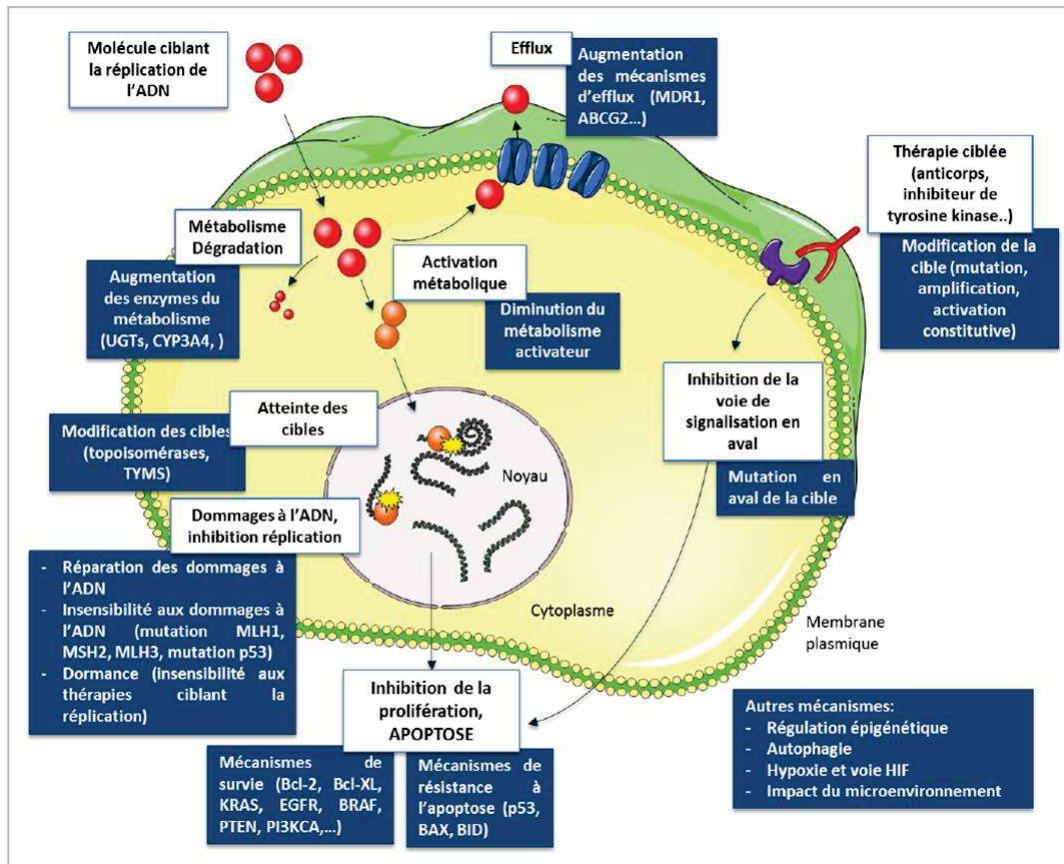


Figure 12: Mécanismes de chimiorésistance

Les différents mécanismes utilisés par les cellules afin de survivre à la chimiothérapie. Source thèse de (Grillet 2015)

1.2 LE CONCEPT DES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES (CSC)

1.2.1 Les modèles de carcinogénèse

L'acquisition de connaissances sur le développement tumoral met en lumière deux questions importantes : quelle cellule acquiert les altérations génétiques, et devient la première cellule tumorale ? Quelles sont par la suite les cellules responsables de la propagation tumorale ?

Deux modèles de carcinogénèse sont couramment décrits : le modèle stochastique, où toutes les cellules sont capables d'initier une tumeur, et le modèle hiérarchique dans lequel seule une sous population tumorale appelée « cellules souches cancéreuses » possède cette capacité.

Néanmoins, Il est important de différencier la cellule à l'origine de la tumeur et les CSC. Elle peut être de n'importe quel type cellulaire. En 2008, l'équipe de J.Sansom et H.Clevers démontre que seule la mutation d'APC dans les cellules souches intestinales (LGR5^{POS}) induit la formation d'un adénome qui dérivera un carcinome (Barker et al. 2009). Ce résultat étant en faveur du modèle hiérarchique.

En réalité, il est accepté que ces deux théories coexistent et sont complémentaires pour l'initiation et le développement tumoral (Figure 13).

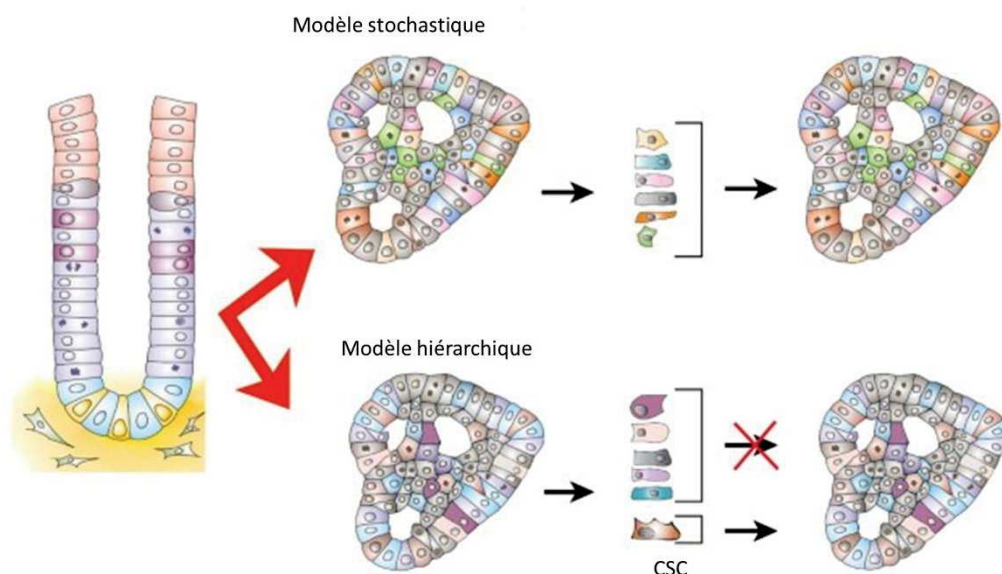


Figure 13: Modèle de cancérogenèse stochastique et hiérarchique

Dans le modèle stochastique chaque clone tumoral participera à l'évolution de la tumeur. Tandis que dans le modèle hiérarchique, les CSC sont les seules à soutenir le développement tumoral.
Adaptée de (Vries, Huch, et Clevers 2010)

1.2.1.1 Le modèle stochastique (ou évolution clonale)

Dans ce modèle, toutes les cellules épithéliales (CSI, progénitrices et cellules différenciées) seraient capables d'initier une tumeur et de participer au développement tumoral. L'acquisition de mutations serait à l'origine de la transformation cancéreuse. Ensuite, l'addition successive et aléatoire de mutations sur des populations cellulaires formerait l'hétérogénéité tumorale. Pour finir, seuls des clones sélectionnés aux propriétés d'initiation métastatique pourraient migrer pour former une métastase (Vaiopoulos et al. 2012).

1.2.1.2 Le modèle des cellules souches cancéreuses (CSC) (ou hiérarchique)

Ce modèle postule que la tumeur serait hiérarchisée et composée de plusieurs populations cellulaires pouvant être regroupées en 2 groupes : **les CSC et les non- CSC** :

Les CSC, à l'image des cellules souches saines, possèderaient des capacités d'autorenouvellement et de différenciation permettant l'approvisionnement et le soutien des cellules non-CSC (Figure 14). Ces non-CSC sont composées d'une diversité cellulaire allant de cellules progénitrices (à forte capacité de prolifération) à des cellules différenciées (à très faible prolifération).

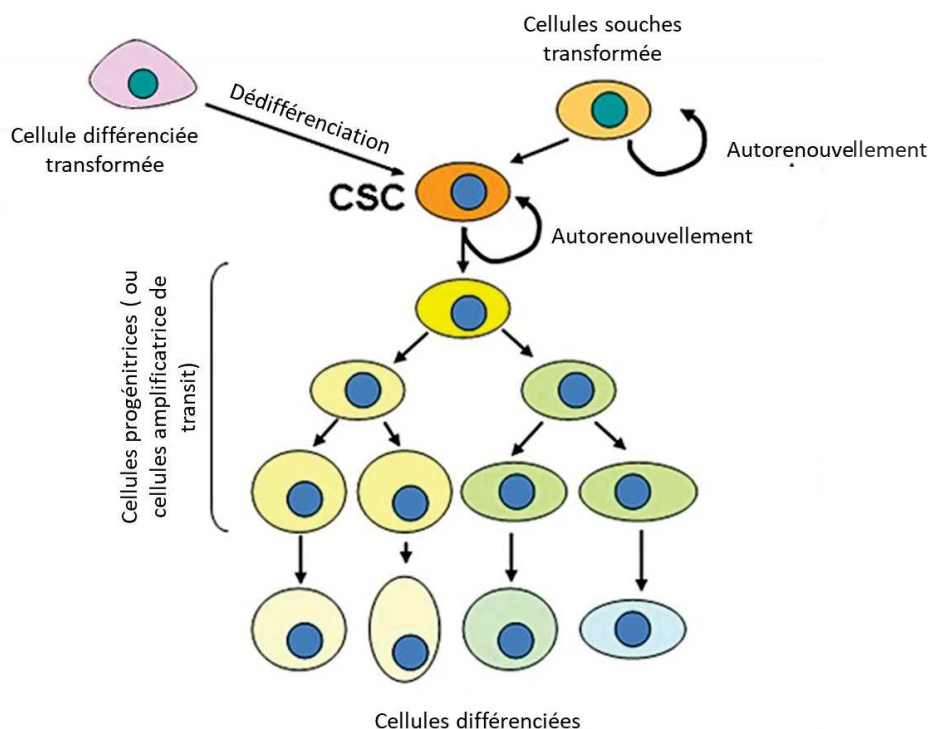


Figure 14: Modèle hiérarchique des CSC

Une CSC proviendrait d'une cellule souche transformée ou d'une cellule différenciée transformée. Tout comme les cellules souches saines, la CSC est dotée de capacité d'autorenouvellement et de différenciation à l'origine des cellules amplificatrices de transit (CAT) puis des cellules différenciées cancéreuses.

Adaptée de (Carnero et Lleonaart 2016)

Ce modèle propose aussi que seules les CSC détiendraient les capacités d'initiation tumorale et métastatique.

1.2.2 Qu'est qu'une CSC ?

Les CSC ont été identifiées pour la première fois par l'équipe de John Dick dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) en 1997. Ces cellules représentant moins de 1% de la population cellulaire était capable d'induire une leucémie lorsqu'elles étaient transplantées dans des souris immunodéficientes (Bonnet et Dick 1997). L'équipe a proposé que ces CSC soient issues de mutations ou dérégulations touchant une cellule souche saine. Cependant, des études supplémentaires dans la LMC proposent qu'elles soient aussi le résultat d'altérations subies par une cellule différenciée. Cette cellule se dédifférencierait en une CSC (Clarke et al. 2006; Kuhlmann et al. 2015). Par la suite, les CSC ont aussi été découvertes dans de nombreuses tumeurs solides telles que celles du sein, du cerveau et du CRC (Lau, Ho, et Lee 2017).

1.2.2.1 Elles sont appelées CSC pour souligner leurs propriétés semblables aux CS saines.

Les CSC possèdent des capacités d'autorenouvellement (par division symétrique) et de différenciation (division asymétrique). Elles génèrent des cellules progénitrices aussi appelées amplificatrice de transit (CAT) qui possèdent de forte capacités de prolifération (Figure 14) (Ricci-Vitiani et al. 2009).

1.2.2.2 Les CSC sont de proportion variable au sein des tumeurs solides

Elles représenteraient environ 0.1 à 10% des cellules tumorales dans les tumeurs solides, la fréquence de ces cellules dépend du type cellulaire, de l'avancement de la tumeur et de la méthode d'identification (Riya Gupta et al. 2019 ; Iyer et al. 2013). On les estime représenter de 0,1 à 1% des cellules cancéreuses de l'ostéosarcome et la LMC, 1% dans le cancer du sein (Yu et al. 2016 ; Bonnet et Dick 1997 ; Dean 2009). Cependant, leur proportion fluctue aux cours du temps, par exemple, elle augmenterait à 30% pendant la progression tumorale dans la LMC (Najafi, Mortezaee, et Majidpoor 2019). Des travaux dans le mélanome ont proposé que la population de CSC serait moins rare et représenterait 27% des cellules tumorales (Quintana et al. 2008). Il est important de préciser que la proportion de CSC est déterminée expérimentalement, cela explique pourquoi au sein d'un même cancer, les proportions estimées sont différentes.

1.2.2.3 Les CSC sont capables d'initier une tumeur/ ou une métastase :

Malgré les informations connues sur les facultés des CSC, l'implication de ces cellules dans la formation de métastases ne fut pas intuitive. En effet, il a longtemps été proposé que l'acquisition de mutations génétiques des CSC serait responsable de l'apparition des capacités initiatrices de métastases.

Cependant, la comparaison des tumeurs dans le CRC primaires et métastatiques n'a pas révélé la présence de mutations pouvant être directement impliquées dans la formation de métastases. D'autres études suggèrent que cette acquisition serait causée par des modifications épigénétiques, des modifications de l'activité des voies de signalisation et par l'influence de l'environnement tumoral. C'est l'exemple de la suractivation des voies de signalisation TGF- β , PI3K/AKT/mTOR (Zeuner et al. 2014).

Par la suite, les CSC ont été décrites comme étant les « graines » à l'origine des métastases. Lors du processus métastatique, ces cellules réalisent **l'EMT (Transition épithéliale-mésenchymateuse)**. L'EMT consiste en la conversion du phénotype « épithélial » des cellules tumorales à un phénotype « mésenchymateux ». En contexte sain, ce processus réversible est utilisé lors du développement embryonnaire et lors du remodelage tissulaire. Dans un contexte tumoral, cette transition joue un rôle essentiel dans les mécanismes d'invasion tissulaire et de formation de métastases. L'acquisition du phénotype mésenchymateux augmente considérablement les capacités de migration, d'invasion et de résistance à l'apoptose (A. Singh et Settleman 2010; Kalluri et Weinberg 2009). L'EMT peut être induite par de nombreux stimuli tels que par l'activation aberrante de facteurs de transcription (SNAIL, TWIST, ZEB), la suractivation des voies de signalisation TGF- β , PI3K-AKT ou de Wnt/ β caténine, la réorganisation des protéines du cytosquelette ou de l'ECM, et le recrutement du système immunitaire dans l'environnement tumoral (Peinado, Olmeda, et Cano 2007; Varga et Greten 2017; Quail et Joyce 2013). En plus de son implication dans la formation métastatique, il a été démontré dans le cancer de l'ovaire que l'EMT permet aussi l'invasion des cellules tumorales aux traitements (Ahmed et al. 2010). **Les CSC seraient hautement tumorigènes**, dans le cancer du pancréas, cette tumorigénicité est quantifiée comme étant 10 fois plus importante pour les CSC que pour non-CSC (Dembinski et Krauss 2009). Ces cellules sont à l'origine de métastases hétérogènes pouvant ressembler d'un point de vue phénotypique au cancer d'origine (Batlle et Clevers 2017). Des études démontrent que les CSC sont hétérogènes et que seul un sous ensemble d'entre elles seraient capables de former des métastases (Hirata et al. 2019). Les CSC possédant ces compétences sont appelées **cellules initiatrices de tumeurs (CIT)** ou **CSC-CIT** (Clarke et al. 2006 ; Ricci-Vitiani et al. 2009).

Des données suggèrent aussi que les CSC-CIT auraient des organes privilégiés pour la formation de métastases par exemple l'équipe de Gao démontre que dans le CRC, les cellules exprimant la prominin 1 (CD133) et le récepteur de la thrombopoïétine (CD110) sont aptes à coloniser le foie alors que celles exprimant la protéine 1 contenant le domaine CUB (CDCP1) peuvent faire des métastases pulmonaires (Gao et al. 2013) (Figure 15).

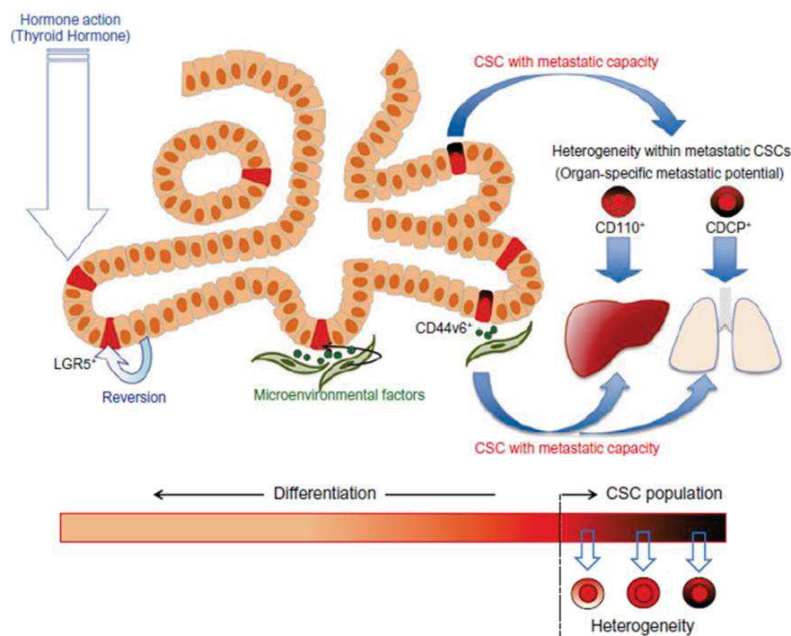


Figure 15: Les CSC sont hétérogènes

*Les CSC aux capacités métastatiques (CSC-CIT) ont des sites de formation de métastases préférés.
Source : (Tomita et al. 2016)*

1.2.2.5 Les CSC sont intrinsèquement résistantes aux traitements de radio et chimiothérapie

Ces cellules jouent un rôle central dans la résistance aux traitements. Elles sont intrinsèquement résistantes à la radio/chimiothérapie par de nombreux mécanismes précédemment présentés ([1.1.8 Mécanismes de Résistance aux traitements](#)). Dans les faits, ces traitements ciblent des cellules différenciées, à division rapide et sensibles à l'apoptose ce qui n'est pas le cas des CSC. De plus, ce type cellulaire est très **dynamique et hétérogène** ce qui leur offre une très bonne adaptabilité à l'environnement tumoral changeant (Najafi, Mortezaee, et Majidpoor 2019). Elles intègrent aussi des signaux extrinsèques issus de l'environnement tumoral ce qui influence aussi sur la résistance.

Ces cellules seraient largement responsables de la rechute de la maladie après le traitement initial.

Il est important de pouvoir identifier ces cellules afin de les caractériser et de développer des stratégies thérapeutiques. Actuellement, les maladies métastatiques sont considérées incurables et sont responsables de 90% des décès par cancer (Netgen 2007; Clark et Palle 2016).

1.2.2.4 La plasticité des cellules souches cancéreuses

Les cellules souches embryonnaires possèdent une grande variabilité fonctionnelle qui leur permet de passer par exemple d'un état prolifératif, à celui de différenciation ou quiescent (état de dormance cellulaire, G0 du cycle cellulaire). Cette variabilité fonctionnelle est appelée **plasticité**. Elle confère aux cellules souches saines une grande adaptabilité à son environnement.

Les CSC sont aussi plastiques. Elles utilisent particulièrement cette compétence pour survivre aux traitements anti-cancéreux. Dans la leucémie, des chercheurs ont démontré que les cellules souches leucémiques quiescentes sont responsables de la rechute tumorale après traitement. En effet, à la fin de la chimiothérapie ces cellules entrent dans le cycle cellulaire ce qui permet la génération de cellules tumorales (Batlle et Clevers 2017). Cette plasticité est aussi observée dans l'épithélium intestinal où en cas de déplétion des cellules souches cancéreuses LGR5^{positive}, les cellules LGR5^{négative} sont capables de repeupler cette population indispensable à l'homéostasie de la tumeur (de Sousa e Melo et al. 2017). Ces observations sont aussi validées dans de nombreux cancers solides (cancer de l'ovaire, cancer du sein, glioblastome, mélanome) (J. Zhao 2016).

La génération des cellules souches pluripotentes induites (IPS) donne des pistes de compréhension sur la plasticité cellulaire. Ces IPS sont des cellules somatiques (différenciées) ayant subi une dédifférenciation par l'utilisation des facteurs de transcription OCT-4, SOX-2, KLF4, et C-myc (Takahashi et al. 2007). Les IPS obtenues ont montré des capacités semblables aux cellules souches embryonnaires. Ce qui prouve que le processus de différenciation cellulaire est réversible (Figure 16). Cette dédifférenciation a été démontrée dans le CRC, où l'activation de voie de signalisation par des cytokines ou par des cellules est capables d'induire des CSC à partir de cellules progénitrices (Vermeulen et Snippert 2014).

Cette capacité est à prendre en compte lors de l'étude des CSC, mais aussi pour la mise en place de protocole de traitement et pour la gestion de la récurrence.

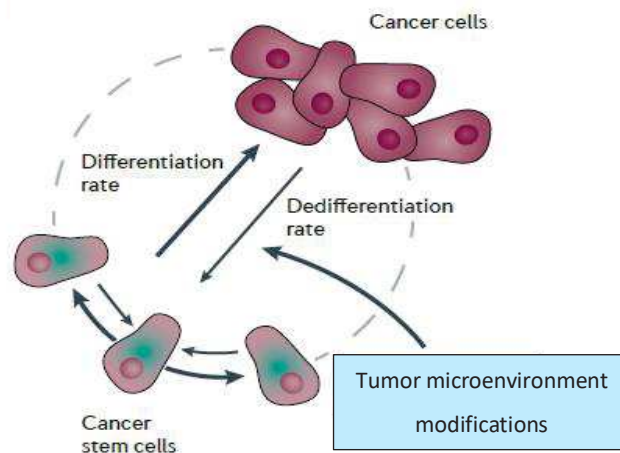


Figure 16: La plasticité cellulaire des cellules tumorales

En réponse aux signaux environnementaux (modifications de la population cellulaire, mortalité par traitement, hypoxie), les cellules cancéreuses peuvent se dédifférencier en CSC. Ces nouvelles CSC sont généralement résistantes aux modifications subies et sont capables de se différencier afin de promouvoir le développement de la tumeur. Adaptée de (Vermeulen et Snippert 2014).

1.2.3 L'identification des CSC dans le CRC

Deux études simultanées ont utilisé le marqueur CD133 afin d'isoler les CSC du CRC (Ricci-Vitiani et al. 2007; O'Brien et al. 2007). Ce marqueur connu sous le nom de la Promonin-1, est une glycoprotéine transmembranaire qui semble être impliquée dans l'organisation de la membrane plasmique (Schmohl et Vallera 2016, 133). L'équipe de Ruggero De Maria a démontré que 2.5% de la population tumorale possède des caractéristiques de CSC-CIT (Ricci-Vitiani et al. 2007). Tandis que la seconde équipe a déterminé cette fréquence d'1/262 cellules CD133^{pos} (positives) (O'Brien et al. 2007). Ils prouvent que les cellules exprimant le marqueur CD133 (CD133^{pos}) sont indifférenciées car elles n'expriment pas de marqueurs de différenciation cellulaire tels que le CK20 (marqueur des entérocytes). De plus les CD133^{pos} sont capables de former des tumeurs dans des modèles de souris sévèrement immunodéprimées (NOD-SCID) lors d'injections en dilution limite. En outre, les tumeurs formées présentaient les mêmes caractéristiques phénotypiques que la tumeur parentale : une hétérogénéité cellulaire montrée par la présence de cellules CD133^{pos} et CD133^{neg} (négatives). En somme les cellules CD133^{pos} sont indifférenciées, tumorigènes et sont capables de se différencier, elles possèdent donc les caractéristiques de CSC ce qui validait ce marqueur membranaire (O'Brien et al. 2007).

Après ces résultats encourageants, une autre étude a démontré que le marqueur CD133 n'était pas spécifique des CSC puisqu'il était aussi exprimé dans des cellules épithéliales non-CSC (Shmelkov et al. 2008, 133). À la suite de ces résultats, l'identification de marqueurs spécifiques des CSC est devenue une priorité dans la recherche. De nombreux marqueurs ont été proposés tels que les marqueurs LGR5, CD26, CD44 et bien d'autres. Malheureusement, ils sont aussi controversés. Une des raisons étant que l'expression des marqueurs de surface est variable d'une tumeur à l'autre mais varie aussi au cours des stades de la tumeur. De plus, les fonctions des marqueurs proposés ne sont pas toujours décryptées (Jaggupilli et Elkord 2012). Enfin, leur expression est rarement spécifique au tissu tumoral, limitant leur utilisation à des fins de dépistage et en tant que cible thérapeutique.

Les controverses au sujet des marqueurs de CSC sèment le doute sur l'existence de ces cellules dans de nombreux cancers. C'est le cas par exemple du mélanome où la spécificité des marqueurs de CSC est encore débattue (Quintana et al. 2008).

Actuellement, **l'identification et la caractérisation des CSC se font par l'utilisation des marqueurs d'expression couplés à des tests fonctionnels** (Visvader et Lindeman 2008).

1.2.3.1 Marqueurs de surfaces des CSC

Le marqueur CD44 est reconnu comme étant un récepteur à l'acide hyaluronique et appartenant à la famille des glycoprotéines transmembranaires multifonctionnelles. Il se lie aussi à l'ostéopontine, ainsi qu'à des cytokines du milieu environnant (facteurs de croissance). De ce fait, il participe aux interactions cellules-cellules, à l'adhésion et à la migration cellulaire. Son expression est régulée par l'activité de la voie Wnt/ β -caténine. Les fonctions de CD44 lui confèrent un rôle important dans la progression tumorale et le développement métastatique (Figure 17A). Grâce aux interactions entre CD44 et la niche cellulaire des tumeurs solides, ce récepteur contribue au maintien d'un phénotype souche (Morath, Hartmann, et Orian-Rousseau 2016, 44). Les cellules CD44^{pos} possèdent une prolifération cellulaire accrue, une insensibilité à l'apoptose, et une résistance aux traitements en comparaison avec les cellules CD44^{neg} (Lee et al. 2017, 44). Une forte expression de ce marqueur est un facteur de mauvais pronostic pour le patient (Huh et al. 2009).

Bien que le marqueur CD44 soit le plus étudié, l'expression de ses isoformes semble être restreinte à certaines sous populations cancéreuses, c'est l'exemple de l'isoforme **CD44v6** obtenu par épissage alternatif. CD44v6 a été détectée dans des carcinomes cervicaux, pancréatiques et colorectaux. L'expression de CD44v6 provient d'un système complexe reliant l'environnement tumoral, des cytokines (tels que des facteurs de croissance) et des voies de signalisation (Wnt/ β -caténine, PI3/AKT)

(Morath, Hartmann, et Orian-Rousseau 2016; Ma, Dong, et Chang 2019). Cette isoforme joue un rôle important dans les processus d'invasion et de formation de métastases en régulant la matrice extracellulaire (MEC) et en favorisant la motilité cellulaire (Saito et al. 2013).

Malgré son importance dans le maintien du statut indifférencié, les expériences d'ajout de la forme CD44v6 dans des cellules CD44v6^{neg} ne permet pas l'acquisition d'un phénotype de CSC. Toutefois cette insertion conduit à une augmentation des capacités de migration et de colonisation (Todaro et al. 2014, 4). Tout comme CD44, CD44v6 est un marqueur de mauvais pronostic, les taux de survie à 5 ans pour des patients atteints de CRC et exprimant l'isoforme CD44v6 est diminué de 40% (Figure 17B) (X.-D. Li et al. 2013).

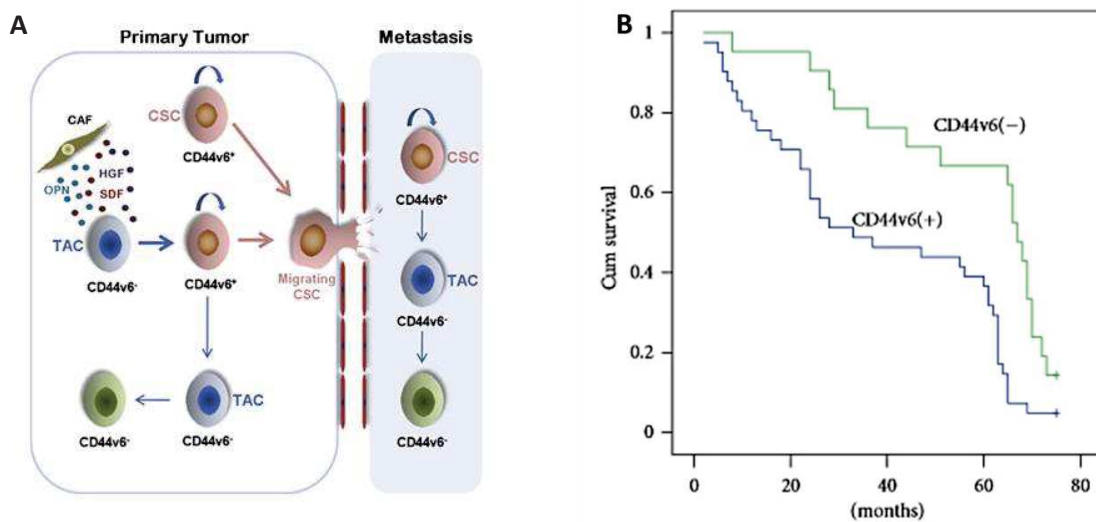


Figure 17: Le marqueur CD44v6

A. Implication du marqueur CD44v6 dans le processus de formation métastatique. La libération de facteurs par les CAFs (fibroblastes associés au cancer) engendre une reprogrammation des cellules en CSC et l'expression du marqueurs CD44v6. Ces nouvelles CSC auront la capacité de disséminer afin de coloniser différents organes formation métastatique). Lors du processus métastatique, les CSC vont former une tumeur hétérogène composée de cellules CD44v6^{pos} et CD44v6^{neg}. TAC : cellules amplificatrices de transit, OPN : Ostéopontine, HGF : Facteur de croissance des hépatocytes, SDF : facteur dérivé de cellules stromales. Source : (Todaro et al. 2014).
B. Courbe de survie selon l'expression de CD44v6 dans des groupes de patients atteints de carcinome ovariens (Zhou, Liu, et Xue 2012).

Le marqueur « Epithelial Cell Adhesion Molecule » **EPCAM (ou CD326)** connu sous le nom d'antigène spécifique épithélial (eSA) est exclusivement exprimé par des cellules épithéliales avec une expression plus élevée dans les cancers. Il fut premièrement découvert dans le CRC et par la suite mis en évidence dans d'autres cancers tels que ceux du sein, des ovaires, de la prostate et des poumons (Baeuerle et Gires 2007). Ce marqueur participe à l'adhésion cellule-cellule, aux processus de signalisation cellulaire, à la migration, la prolifération et à la différenciation cellulaire (Trzpis et al. 2007). Son rôle dans le développement tumoral est contesté. Il aurait une action antitumorale due aux interactions

d'adhésion à la MEC qui ne favoriseraient pas la motilité cellulaire et empêcheraient la formation métastatique. Et, en même temps la protéine EpCam aurait une action pro-tumorale en favorisant la motilité, la prolifération et la survie cellulaire (van der Gun et al. 2010). En réalité l'action d'EPCAM va dépendre du contexte cellulaire et environnemental. Dans les carcinomes de la thyroïde et du rein à cellules claires l'expression de EPCAM est de bon pronostic ; tandis que pour ceux de la vessie et du pancréas il est associé à une diminution de la survie globale des patients. Pour les carcinomes colorectaux, mammaires, pulmonaires et ovariens les deux rôles ont été proposés (Keller, Werner, et Pantel 2019). Dans le cancer du sein par exemple, il est de moins bon pronostic pour le sous type HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) et inversement pour ceux de type « basal-like » et luminal B HER2^{pos} (Soysal et al. 2013).

Malgré cela, la surexpression d'EPCAM est un marqueur potentiel de dépistage, cependant, en raison de sa forte expression dans les adénocarcinomes il est souvent utilisé afin de détecter les cellules tumorales circulantes (CTC) ou les métastases (Patriarca et al. 2012). Dans le CRC, il a été montré que les cellules présentant une forte expression du marqueur EPCAM et CD44 ont de fortes capacités de CSC telles que l'invasion et la formation de métastases (Dalerba et al. 2007).

Le marqueur LGR5 aussi appelé Gpr49 (G-protein coupled receptor 49) est un récepteur couplé aux protéines G. Son expression est dépendante de l'activité de la voie Wnt/ β caténine. Des expériences *in vitro* ont aussi prouvé que les cellules LGR5^{pos} ont des capacités d'autorenouvellement et de différenciation, ce qui permet de proposer ce marqueur comme un marqueur de CSC (Kobayashi et al. 2012). La surexpression de LGR5 est importante pour la progression tumorale car elle corrèle avec une forte activité de la voie Wnt/ β caténine. En effet, LGR5 promeut l'activation de la voie en inhibant la dégradation du récepteur de Wnt. Cliniquement, une forte expression de LGR5 est associée à un CRC de stade avancé. De plus LGR5 serait un facteur de mauvais pronostic car la réponse au 5FU paraît être meilleure pour les tumeurs LGR5^{faible} (faible niveau d'expression) (Novellasdemunt, Antas, et Li 2015).

Les expériences d'inhibition de LGR5 dans un contexte tumoral entraînent une régression tumorale et une diminution de l'activité de la voie Wnt (de Sousa e Melo et al. 2017). De plus, dans des modèles murins l'inhibition de LGR5 induit une régression et une disparition des métastases hépatiques (Fumagalli et al. 2020).

Le marqueur « cluster of differentiation 26 » (CD26) aussi appelée Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4), est une glycoprotéine de surface exprimée dans de nombreux types cellulaires (endothéliaux, épithéliaux,

immunitaires) (S. Davies, Beckenkamp, et Buffon 2015, 26). Son expression dans les tumeurs primaires permet de prédire la formation de métastases. Une étude *in vivo* démontre aussi que dans le contexte d'un CRC, les cellules CD26^{pos} sont dotées de fortes propriétés de CIT. L'étude affirme aussi que les traitements induisent un enrichissement de la population CD26^{pos} ce qui valide le caractère chimiorésistant associé à ce marqueur (Figure 18A) (Pang et al. 2010, 26). La forte expression de CD26 est corrélée à une diminution de la survie globale des patients avec ou sans traitement de chimiothérapies (Figure 18B) (Lam et al. 2014). D'autres études ont validé la corrélation entre l'expression des marqueurs CD133 et CD26. Par ailleurs l'augmentation de l'expression de CD133 induit aussi celle de CD26 et est suivie d'une forte activation des gènes de pluripotence (tels que Nanog et Oct-4) (Grunt et al. 2015). Une corrélation similaire est observée pour les marqueurs CD26, CD44 et ALDH (marqueur fonctionnel de CSC). Les cellules CD26^{pos} se révèlent être aussi CD44^{pos} et ALDH^{pos} (Grillet et al. 2017). Toutes ces informations valident le marqueur CD26 comme marqueur de CRC-CSC avec de fortes capacités de CIT et de chimiorésistance.

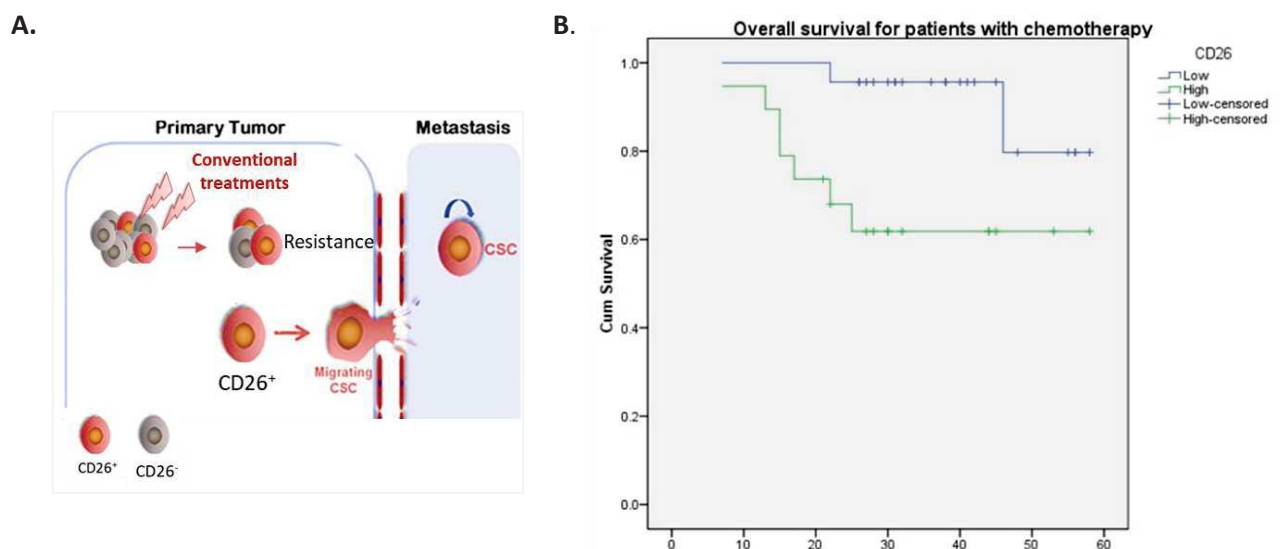


Figure 18: Le marqueur CD26

A. Les cellules CD26^{pos} possèdent des propriétés de CIT telles que la chimiorésistance et la capacité à former des métastases. Source O.Villeronce. B. Courbe de survie après traitement de chimiothérapie et en fonction de l'expression du marqueur. La forte expression de CD26 est associée à diminution de la survie globale après traitement de chimiothérapies dans le CRC. Source (Lam et al. 2014)

1.2.3.2 Marqueurs fonctionnels de CSC

L'activité de l'enzyme ALDH1 (aldéhyde déshydrogénase-1) a été proposée comme un marqueur des cellules souches saines et cancéreuses dans le côlon (Huang et al. 2009). L'ALDH est une enzyme du

groupe des enzymes dépendantes du nicotinamide-adénine dinucléotide phosphaté positif (NAD(P)^{POS}) qui catalysent des réactions d'oxydation de substrats endogènes et exogènes. Cette enzyme est présente dans le cytosol des cellules de différents organes tels que le cerveau, les yeux, le foie ou les poumons ; et participe au maintien et au développement des organes (Tomita et al. 2016). Elle a une activité élevée dans les cellules souches saines et participe aux fonctions d'auto protection (détoxification cellulaire, protection des dégâts des ROS), de différenciation et d'expansion cellulaire (Marcato, Dean, Giacomantonio, et al. 2011; S. Singh et al. 2013).

Dans le contexte tumoral, les isotypes de l'ALDH1 jouent un rôle essentiel en tant que marqueur de CSC. L'isotype va dépendre de la tumeur, pour les cancer de la prostate et du côlon l'isotype associé à la population de CSC est l'ALDH1A1, alors que celui du cancer du sein est ALDH1A3 (Marcato, Dean, Pan, et al. 2011; S. Singh et al. 2013).

Des études de tumorigénicité dans des modèles murins ont validé les propriétés de CSC associées à l'expression du marqueur. En effet, les cellules ALDH^{POS} ont des capacités de CIT et de résistance supérieures au ALDH^{NEG} (Dylla et al. 2008; Huang et al. 2009). Le marquage additionnel avec CD133 ou CD44 n'augmente que très peu les capacités observées.

Des études supplémentaires ont par la suite associé les capacités d'autorenouvellement et le potentiel de croissance à ce marqueur (Nishikawa et al. 2013). Par exemple, dans le cancer de la prostate, les cellules ALDH^{POS} possèdent une forte activité de la voie Wnt/ β caténine ce qui promeut le développement tumoral (Cojoc et al. 2015).

L'activité de l'enzyme est quantifiée avec un kit *in vitro* (kit de dosage Aldefluor, StemCell Technologies, Durham, NC, USA) (Figure 19). L'utilisation de la cytométrie en flux permet de sélectionner les différentes populations (ALDH^{POS} ou ^{NEG}) afin de les étudier dans des conditions *in vitro* (culture cellulaire) ou *in vivo* avec des modèles animaux.

Cet outil a été développé et utilisé par le Dr Ginestier dans l'équipe de Max Wicha afin de démontrer que dans le cancer du sein, seules les cellules ALDH^{POS} ont des capacités de CIT. (Ginestier et al. 2007). Dans le cancer du sein, la forte d'activité de l'ALDH est corrélée à une forte expression de l'enzyme, ce qui permet de valider l'expression de l'ALDH comme marqueur de la population CSC (Deng et al. 2010). Tout comme les autres marqueurs de CSC, l'activité et l'expression de l'ALDH sont controversées. Des études révèlent que la population cellulaire ALDH^{POS} ne correspond pas toujours à la population de

CSC (Pearce et Bonnet 2007). La forte expression de ce marqueur, tout comme les autres marqueurs de CSC est associé à un mauvais pronostic dans le CRC.

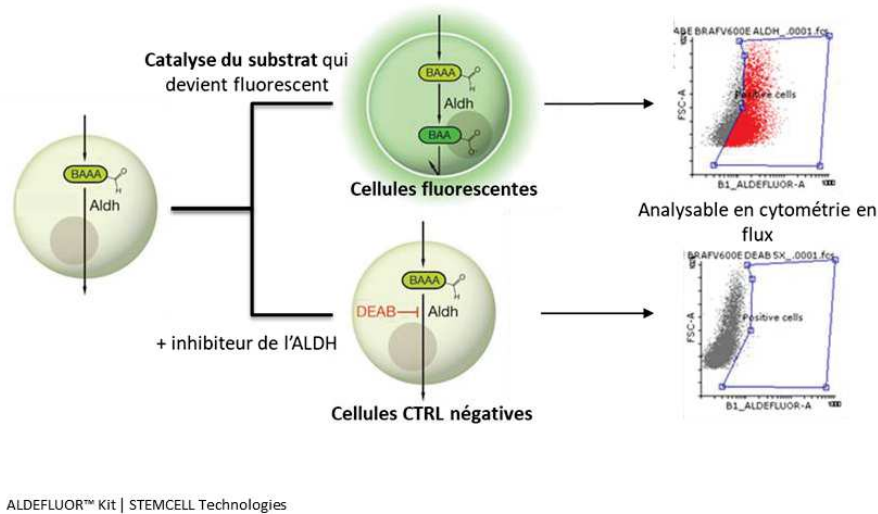


Figure 19 : Principe du Kit ALDH stem cell ®

La catalyse du réactif (fournis dans le kit) par l'ALDH1 endogène forme un produit fluorescent qui reste piégé dans les cellules. Le niveau de fluorescence obtenu sera le reflet de l'activité de l'enzyme. Afin d'avoir un contrôle (de bruit de fond) propre à chaque lignée et condition, un contrôle sera réalisé, en ajoutant en plus du substrat un inhibiteur spécifique de l'enzyme (le DEAB). Les cellules exprimant des niveaux élevés d'ALDH deviennent brillamment fluorescentes ($ALDH^{br}$ ou $ALDH^{élevée}$) et seront identifiées et quantifiées à l'aide d'un cytomètre en flux. Source O.Villeronce

La side population (SP), fait référence à une population cellulaire négative (SP^{neg}) lors d'analyses de cytométrie de flux après marquage avec des colorants ciblant l'ADN tels que le Hoechst ou la rhodamine-121 (Behbod et Vivanco 2015). Ce marquage repose sur la surexpression de pompes transmembranaires de la famille des transporteurs ABC comme décrit précédemment. Les cellules de la SP sont capables de rapidement rejeter les colorants, à l'inverse des autres cellules (SP^{pos}) (Goodell et al. 1997) (Figure 20). Ces cellules isolées possèdent de fortes capacités d'autorenouvellement et de CIT. Dans le cancer de l'ovaire, la population cellulaire $ALDH^{pos}$ et SP présente une plus forte capacité de CIT que les deux populations séparées (Yasuda et al. 2013). Cela démontre la présence de CSC dans la SP (Hill et Perris 2007). Cette population cellulaire a été isolée dans de nombreuses tumeurs solides et lignées cellulaires (Richard et al. 2013).

La SP a la propriété importante de pouvoir isoler des cellules à caractère de CSC sans marqueurs de surface. Malheureusement, cette technique a de nombreuses limitations dont les méthodes d'isolement qui dans le cancer du sein ne fournissent qu'une faible quantité de cellules, et la toxicité du colorant (Casarsa, Oriana, et Coradini 2008).

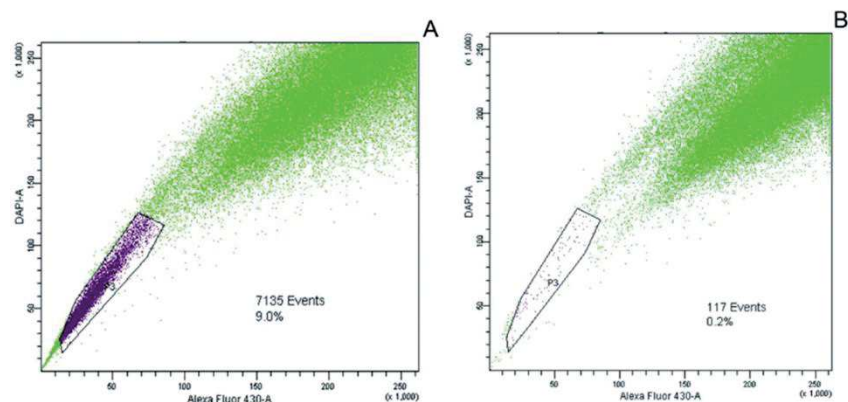


Figure 20: Graphique de la Side population en cytométrie en Flux

A : La side population est en bleu et la non-side population (SP^{neg}) en vert.

B : Perte de la side population lors de l'inhibition des pompes à efflux avec du Vérapamil

Source : (Hatina et al. 2019)

En somme, le caractère controversé des marqueurs membranaires et fonctionnels de CSC prouve que l'utilisation de combinaisons de marqueurs serait plus convaincante pour caractériser la population de CSC.

1.2.3.3 Autres marqueurs : facteurs de transcription

D'autres marqueurs plus ubiquitaires existent tels que Oct-4, SOX-2 et Nanog. Ces facteurs de transcription jouent un rôle dans la pluripotence des cellules souches saines (Hadjimichael et al. 2015).

OCT-4 (octamer-binding transcription factor 4) est impliqué dans l'embryogenèse, le maintien des CS saines et dans la croissance tumorale/métastatique. Ce FT est au cœur du mécanisme du maintien de la pluripotence cellulaire, il coopère avec Nanog et SOX2, afin d'activer des gènes cibles et maintenir la pluripotence (Pan et Thomson 2007; G. Shi et Jin 2010). OCT-4 est exprimé dans 100% des tissus tumoraux, où il fonctionne un peu comme un oncogène et promeut la croissance tumorale (Hochedlinger et al. 2005; Y.-D. Wang et al. 2013). Une relation significative existe entre l'augmentation du grade de la tumeur et l'expression des gènes de pluripotence (Amini et al. 2014).

Le FT **Nanog** est exprimé de manière aberrante dans les cellules cancéreuses. Il participe à la prolifération cellulaire et à l'EMT. Il contribue à l'activation de voies de signalisation comme celle de

STAT3 ce qui permet le maintien des propriétés souches (Gawlik-Rzemieniewska et Bednarek 2015). Dans le CRC, Nanog joue un rôle important dans la prolifération cellulaire, l'invasion et la motilité cellulaire (Wahab et al. 2017).

Tout comme OCT-4 et Nanog, **SOX-2** (SRY-Box Transcription Factor 2) est également exprimé dans les tissus malins. Sa surexpression est associée à une agressivité tumorale et à la formation métastatique (Grimm et al. 2019). SOX2 contrôle l'expression de d'OCT4, et est aussi nécessaire au maintien de la pluripotence.

Plusieurs gènes et voies de signalisation impliquées dans le développement, notamment Bmi-1, Sonic Hedgehog (Shh), Notch et Wnt/ β -caténine, se sont avérés avoir des fonctions régulatrices importantes pour les CSC. Cependant, ces gènes sont aussi actifs dans d'autres types de cellules, ils ne peuvent donc pas être utilisés comme marqueurs de CSC.

Tableau 1: Marqueurs de CSC dans les tumeurs solides (liste non exhaustive)

<u>Marqueurs</u>	<u>Fonctions</u>	<u>Importance</u>
<i>ALDH1</i>	Enzyme de détoxification cellulaire	Forte capacité de CIT dans des modèles murins Résistance thérapeutique
<i>CD44</i>	Molécule d'adhésion cellulaire. Interaction avec l'acide hyaluronique	Forte capacité de CIT dans des modèles murins Associé aux tumeurs de stades avancés Mauvais pronostic de survie
<i>CD44v6</i>		Motilité cellulaire et formation de métastases dans des modèles murins
<i>CD133</i>	Glycoprotéine transmembranaire	Forte capacité de CIT dans des modèles murins Résistance thérapeutique Mauvais pronostic et une rechute tumorale
<i>CD26</i>	Glycoprotéine de surface	Développement de métastases à distance (modèle murins) Chimiorésistance Mauvais pronostic, associé à la présence de métastases
<i>EPCAM</i>	Molécule d'adhésion cellulaire	Mauvais pronostic en fonction du cancer Marqueurs de CTC et de métastases
<i>LGR5</i>	Gène cible de la voie Wnt	Correspond à un stade avancé de la maladie Forte activité de la voie Wnt et mauvais pronostic
<i>SP</i>	Pompes à efflux membranaires	Capacité de CIT dans des modèles murins
<i>Oct-4, Sox-2, Nanog, c-myc,</i>	Facteurs de transcription	Mauvais pronostic Résistance thérapeutique Rechute des patients

1.2.4 L'analyse des cellules souches cancéreuses

1.2.4.1 Les analyses *in vitro*

Les CSC des tumeurs solides peuvent être maintenues en culture cellulaire. Ce mode d'amplification offre la possibilité d'étudier les caractéristiques des populations cellulaires présentes, surtout de celles en faible proportion comme les CSC des tumeurs solides. De nombreuses lignées cellulaires issues de patients sont disponibles (Linnekamp et al. 2018).

Les tests *in vitro* sont quantitatifs, spécifiques et permettent de travailler sur les cellules d'intérêts qui sont minoritaires au sein de la population cellulaire. Plusieurs tests *in vitro* ont été utilisés pour identifier et analyser les CSC, tels que les tests de formation de sphères, les tests en série d'unités de formation de colonies (CFU) (tests de réplication), les tests d'expression de marqueurs, et ceux de rétention de colorants. Ces tests sont basés sur la propriété intrinsèque d'autorenouvellement des CSC.

La cytométrie en flux est une méthode sensible spécifique et robuste qui permet l'analyse quantitative de marqueurs fluorescents de surface ou fonctionnels ; et après purification des populations d'intérêt, ces cellules sont facilement disponibles pour des études *in vitro* ou *in vivo*.

Le test de formation de sphères (SFC : sphere formation capacity) permet un enrichissement de la population de CSC. Cette technique fut d'abord utilisée pour l'étude des cellules souches adultes, puis fut ensuite appliquée et validée pour celle des CSC de divers cancers. Les lignées cellulaires sont cultivées en suspension (3D), sans ancrage à une matrice et sans addition de sérum, les non-CSC vont subir une mort cellulaire par anoikis, alors que les CSC vont s'adapter, survivre, se multiplier et former des sphères (appelées colosphères dans le cancer du côlon) (Figure 21). Les sphères obtenues ressemblent à des micro-tumeurs, et présentent une composition hétérogène de cellules. Ce mode de culture est plus fidèle à ce que l'on observe chez le patient que la culture en adhérence (2D) (Weiswald et al. 2009). Ce type de culture a aussi permis l'étude génétique des populations souches et non souches en culture.

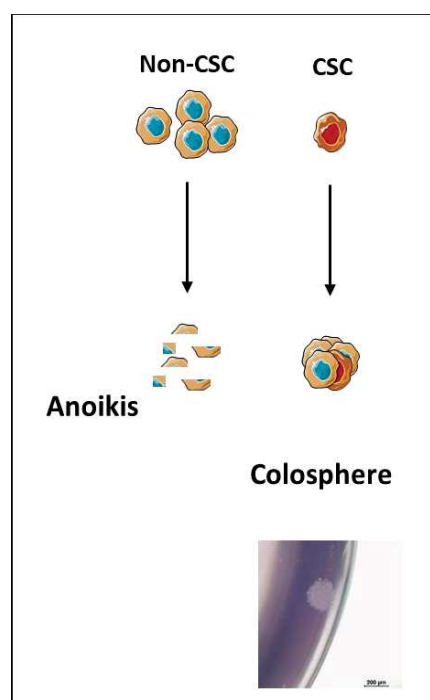


Figure 21: Le test de formation de sphères (SFC)

Seules les CSC peuvent survivre en culture en suspension et former des sphères appelées colosphères. Les autres cellules vont mourir par anoikis. Source : O.Villeronce

Néanmoins chacune des méthodes potentiellement utilisables pour isoler et sélectionner des cellules possèdent des inconvénients qui compliquent l'interprétation des résultats. **C'est pour cela que les tests *in vitro* doivent impérativement être validés par des tests *in vivo* de référence, considérés comme le meilleur test fonctionnel pour étudier les capacités de CIT et d'autorenouvellement des CSC.**

1.2.4.2 Les analyses *in vivo*

Les cellules cancéreuses sont xéno-gréffées dans un site orthotopique ou hétérotopique de souris immunodéprimées. L'initiation tumorale sera suivie et quantifiée. Afin de montrer les capacités d'autorenouvellement infinies, les cellules issues de ces tumeurs seront récupérées et à nouveau greffées dans une deuxième souris (Figure 22). L'initiation tumorale démontre la présence de CSC dans le pool de cellules injectées.

Il ne faut cependant pas oublier que ce modèle n'est pas parfait du fait des interactions entre les CSC et le stroma environnant (la niche) qui est appauvri dans les souris immunodéprimées (Bissell et Labarge 2005). Pour pallier cet obstacle l'injection de cellules tumorales syngéniques est pertinente.

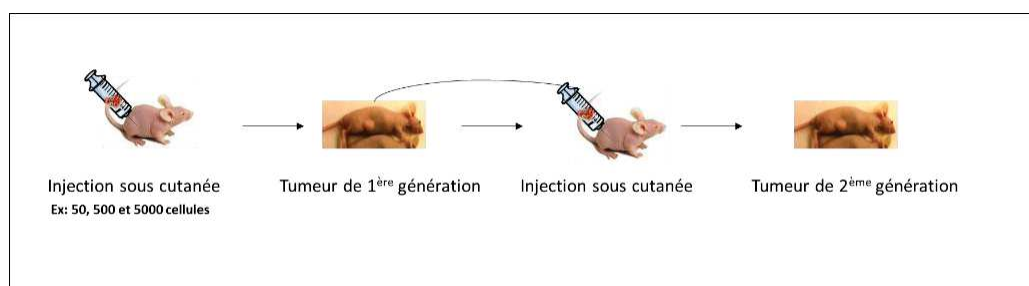


Figure 22: Test d'initiation tumorale sur des modèles murins

Injection en sous-cutanée de différentes densités de cellules cancéreuses. L'apparition des tumeurs est suivie et quantifiée. Les tumeurs de première génération seront récupérées, dissociées et réinjectées dans d'autres souris afin d'obtenir des tumeurs de seconde génération.
Source O.Villeronce

Les analyses obtenues *in vitro* et *in vivo* doivent être compilées afin de fournir une meilleure caractérisation de la population de CSC.

1.3 LA KINASE BRAF, EFFECTRICE DE LA VOIE DES MAPKINASES

1.3.1 Présentation générale de la voie des MAPkinases

La voie de signalisation intracellulaire des « mitogen activated protein kinase » (MAPK ou MAPkinase) possède un rôle central dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux. Conservée au cours de l'évolution, elle est impliquée dans les mécanismes de prolifération cellulaire, de différenciation, de survie et de mort (Hagemann et Rapp 1999).

La signalisation comprend une protéine G en amont d'un ensemble de kinases : une MAPKKK (MAPK kinase kinase) qui phosphoryle et active une MAPKK (MAPK kinase) qui à son tour active une MAPK. Les MAP-kinases sont des kinases qui catalysent la phosphorylation de protéines MAP. La MAPK active est transférée dans le noyau afin d'activer différentes cibles et de modifier le comportement cellulaire

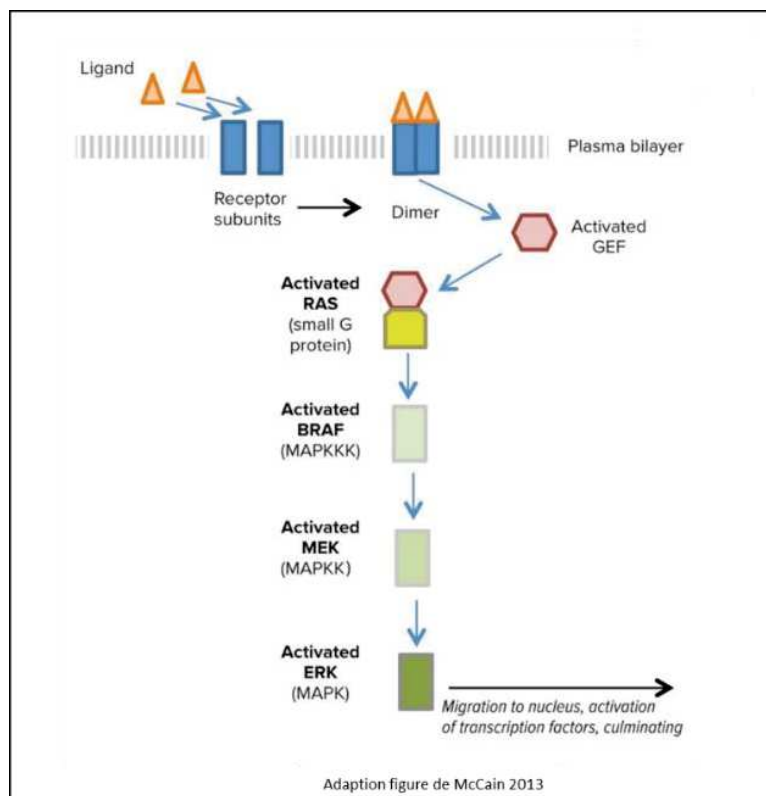


Figure 23: Voie des MAPK/ERK simplifiée

La signalisation commence par l'activation du récepteur RTK causée par la liaison d'un ligand (par exemple facteurs de croissance ou cytokine) sur ces domaines extracellulaires. Cette fixation induit la dimérisation du récepteur et l'autophosphorylation des domaines cytoplasmiques. Cette phosphorylation est reconnue par des protéines adaptatrices qui vont s'y lier (non montré). Ces protéines vont attirer les facteurs d'échange guanine-nucléotide (GEF) vers la membrane plasmique où elles vont activer la protéine RAS. Par la suite, RAS phosphoryle et active une MAPKKK connue sous le nom de RAF. Ensuite, RAF phosphoryle et active la MAPKK (MEK). Pour finir, MEK va activer ERK qui sera transloquée dans le noyau afin de moduler l'activité de ses cibles (Facteurs de transcription, protéines liants l'ADN, coactivateurs et corépresseurs). (Adaptation (McCain 2013)).

(Figure 23). Toutes ces boucles d'activation permettent une amplification du signal et offrent une grande interface de régulation ce qui permet l'ajustement de la durée et de l'amplitude de la voie (Kolch 2000).

Chez les mammifères, il existe plus d'une douzaine de gènes MAPK. Les plus connus appartiennent aux familles régulées par les signaux extracellulaires telles que les kinases ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) ; les kinases c-Jun N terminales (JNK) et les kinases p38. Les autres ERK3, ERK5, et ERK7 ont des régulations et fonctions distinctes.

Toutes ces voies suivent le processus d'activation (MAPKKK→MAPKK→MAPK) précédemment décrit (Krishna et Narang 2008). Les kinases RAF sont des MAPKKK et n'interviennent que dans la voie des MAPK débouchant sur l'activation des ERK 1/2.

1.3.1.1 Les effecteurs de la voie des MAPK-ERK1/2

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) : la voie des MAPK/ERK est principalement activée par des récepteurs de surface à activité de tyrosines kinases. Ces récepteurs subissent une dimérisation après fixation de leur ligand. Cette dimérisation engendre l'activation du récepteur et l'autophosphorylation des résidus Tyr (tyrosine) dans le domaine intracellulaire. Ces résidus servent de liaison aux protéines de facteurs d'échange (GEF) comprenant des domaines d'homologie Src 2 (SH2) ou de liaison à la phosphotyrosine (PTB). Ces protéines recrutées participeront à l'activation de RAS.

Les protéines RAS sont les membres d'une superfamille de GTPases associées à la membrane. Les RAS existent sous trois isoformes : HRAS (Harvey-RAS), KRAS (Kristen RAS), NRAS (Neuroblastoma RAS). Les isoformes diffèrent dans leur localisation d'expression mais semblent pourtant avoir les mêmes fonctions (Young et al. 2009). KRAS est l'isoforme exprimé dans presque toutes les cellules (Aoki et al. 2008).

L'activation de RAS est médiée par l'échange d'un ADP avec un GTP ce qui convertit RAS en sa forme active. Cette activation est possible grâce au recrutement à la membrane de facteur d'échange guanine nucléoside (GEF) tel que SOS (Son of Sevenless) (Pierre, bats, et Coumoul 2011). La forme active de RAS interagit avec de nombreux effecteurs afin de moduler différentes voies de signalisation (Figure 24). C'est par ces différents effecteurs que RAS peut contrôler des mécanismes comme la prolifération cellulaire et la survie. Les effecteurs de RAS sont RAF (de la voie des ERK), PI3K, la phospholipase C (PLC), et des GEF tels que la RAL guanine nucleotide dissociation stimulator (RALGDS) (Downward 2003).

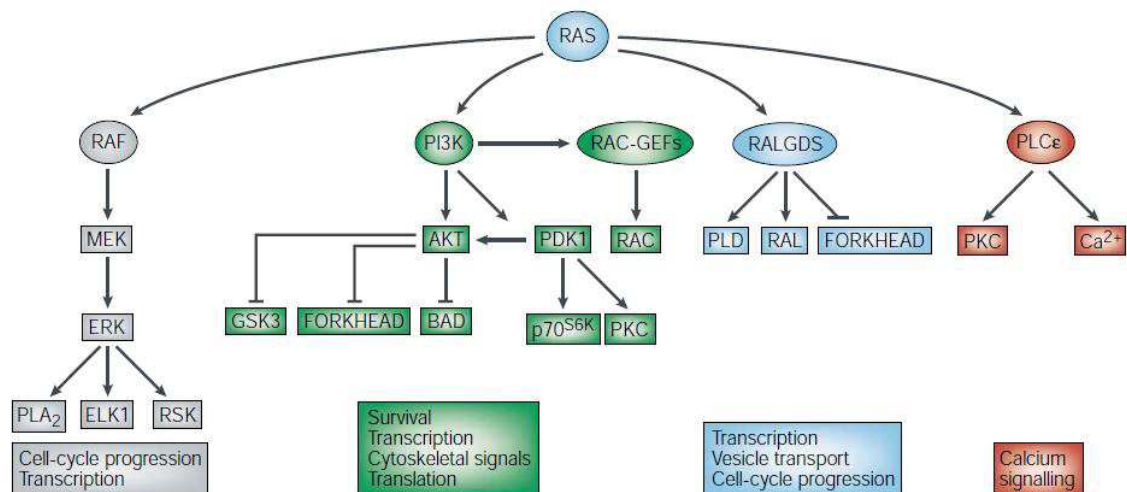


Figure 24 : Signalisation en aval de RAS

RAS interagit avec de nombreux effecteurs des voies de signalisation : RAF-MEK-ERK (en gris) ; PI3K-AKT (en vert), la voie de NF- κ B (en bleu), voie de la phospholipase C (en rouge).

Source : (Downward 2003)

Les kinases RAF : ARAF, BRAF et CRAF sont des sérine thréonine kinases localisées dans le cytoplasme (Garnett et Marais 2004). La RAS activée se lie à une des kinases de RAF et la déplace à la membrane plasmique afin de l'activer. Une fois active, RAF va par la suite phosphoryler et activer les MAPKK MEK1 et MEK2. Une présentation détaillée des kinases RAF sera réalisée dans la [partie 1.3.2.La kinase RAF](#).

MEK : Les MEK1 et MEK2 ou MEK ½ (MKK-1 et MKK-2) sont les seuls substrats de RAF. BRAF est son principal activateur (suivi de CRAF puis ARAF) (Hagemann et Rapp 1999). RAF va ainsi phosphoryler et activer MEK sur deux résidus Sérine clés (Ser218 et Ser222 dans la MEK1, et Ser222 et Ser226 dans la MEK2) (Lavoie et Therrien 2015)

Les MEK1/2 sont des protéines kinases à double spécificités tyrosine et thréonine ; activées elles sont capables de phosphoryler les ERK1/2.

Les ERK1 et ERK2 ou ERK1/2 également appelées MAPK p44 et p42 sont activées par la phosphorylation de MEK sur leurs résidus thréonine et tyrosine ((Thr202 et Tyr204 de ERK1, et Thr185 et Tyr187 de ERK2). Ces deux isoformes présentent 83% d'homologie et semblent être fonctionnellement équivalentes (Krishna et Narang 2008). Elles sont localisées dans le cytoplasme et sont associées à MEK ou à d'autres protéines d'échafaudage de régulation. Leur activation libère ERK1/2 qui pourra activer de nombreuses cibles dans le cytoplasme, à la membrane et dans le noyau. Par exemple, à la membrane ERK1/2 phosphoryle SOS afin d'inhiber l'activation de RAS. Dans le cytoplasme, ERK active la p90 ribosomale S6 kinase (RSK). Cette sérine thréonine Kinase phosphoryle

de nombreux substrats nucléaires ce qui promeut la croissance et la prolifération cellulaire (Carriere et al. 2008).

Dans le noyau ERK phosphoryle de nombreux facteurs de transcription (FT) tels que ELK1 qui régule l'expression de FOS et impacte ainsi la prolifération et la différenciation cellulaires (Chuderland et al., 2008, Ahn, 2009).

1.3.1.2 Activation de la voie des MAPkinases

La voie des MAPkinases permet essentiellement l'internalisation de signaux extracellulaires afin de modifier le comportement cellulaire. Elle est activée par de nombreux signaux extracellulaires tels que les facteurs de croissance (FC) et l'insuline. Les FC sont soit dérivés des plaquettes (PDGF, « Platelet Derived Growth Factor »), de l'épiderme (EGF) ou de la croissance nerveuse (NGF). En plus de l'activation par des RTK, la voie peut aussi être enclenchée par des ligands liant des récepteurs couplés au protéine G (RCPG) (on parle ainsi de transactivation). Les ligands peuvent être des cytokines par exemple et la voie peut également être activée par la désorganisation des microtubules ou encore par le stress osmotique (modification du niveau hydrique cellulaire) (Raman, Chen, et Cobb 2007).

Par ailleurs, l'EGFR a une grande variété de ligands en plus de l'EGF. Ses ligands sont des FC, des hormones, des facteurs de différenciation et des substances favorisant le stress métabolique ainsi que les dommages à l'ADN. La communication cellule-cellule est aussi un modificateur de la voie de signalisation des MAPkinases (S.-H. Yang, Sharrocks, et Whitmarsh 2013).

1.3.1.3 Les cibles de la voie des MAPkinases

Les effets de la voie des MAPkinases, sans prendre en compte les nombreuses cibles de RAS, vont être essentiellement le résultat des activations d'ERK1/2. Ces kinases sont cruciales et possèdent plus de 150 cibles en aval (Lm, Je, et Mh 2011). Les effecteurs d'ERK1/2 sont localisés dans tous les compartiments cellulaires.

La translocation d'ERK1/2 dans le noyau via l'utilisation de protéines chaperonnes permet la phosphorylation et la stabilisation des FT, des coactivateurs et corépresseurs de la transcription et la modification des protéines liant l'ADN tels que les histones. C'est l'exemple des FT c-Myc, c-Jun et c-fos qui sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et dans la croissance et la survie cellulaires (Whitmarsh 2007).

ERK va aussi activer des protéines cytosoliques du cycle cellulaire (rétinoblastome), des protéines pro apoptotiques (BAD, Caspase 9) et des protéines du cytosquelette (paxilline, calnexine) (Krishna et

Narang 2008; S.-H. Yang, Sharrocks, et Whitmarsh 2003, 200). L'impact de la voie dépend du type cellulaire, par exemple dans les cellules immunitaires l'activation d'ERK est impliquée dans la réponse immunitaire innée (Herrero et al. 2016; Arthur et Ley 2013).

De plus, la voie est aussi modulée par la synchronisation, la durée et l'intensité du signal d'activation. (Lo et al. 2002). Par exemple une faible intensité d'activation favorise la multiplication cellulaire tandis que la forte activation promeut l'arrêt du cycle cellulaire (Pagès et al. 1993; Sewing et al. 1997).

1.3.1.4 Régulation de la voie des MEK-ERK

La cascade de signalisation est régulée par de nombreux points de contrôles. Cette régulation s'exécute spatialement (dans tous les compartiments cellulaires) et temporellement. Elle s'effectue par des rétrocontrôles négatifs d'ERK sur EGFR, RAS, et RAF. Mais aussi par l'induction de l'expression de Sprouty ou des phosphatases « dual specific phosphatase » (DUSP) (Figure 25) (McCormick 2010). Ces protéines participent à l'arrêt d'activité de la voie. Leur fonctions ne sont pas encore bien décryptées, mais par exemple Sprouty semble capable d'inhiber l'activation de RAF (Ashton-Beaucage et Therrien 2010).

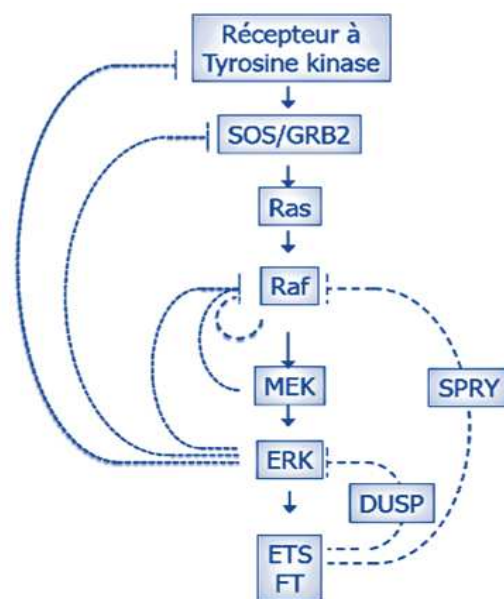


Figure 25: Mécanismes de régulation de la voie des MAPkinases

De nombreux rétrocontrôles participent à la régulation de la voie des MAPkinases. Source : (Favre 2014)

Par ailleurs, la voie des MAPK-ERK est en relation avec de nombreuses voies de signalisation. Ces régulations complexes vont impacter la réponse aux inhibiteurs des acteurs des voies. En effet, le blocage d'une voie de signalisation induit souvent une activation compensatoire d'une autre voie (Favre 2014).

1.3.1.5 MAPkinase et cancer

Les altérations de la voie des MAPkinases sont des inducteurs majeurs du développement de nombreux cancers. Elles sont la résultante de modifications génétiques ou épigénétiques entraînant des mutations activatrices des effecteurs de cette cascade. Ces mutations peuvent se réaliser en amont dans les gènes des récepteurs membranaires (tels que l'EGFR), dans les transducteurs du signal (tels que RAS, RAF, ou MEK), dans les partenaires de la régulation (comme Sprouty) et dans les kinases en aval de ERK. Les mutations des oncogènes RAF et RAS sont détectées dans plus d'un tiers des cancers (>30%), en comparaison de celles de MEK qui sont plus rares (3-8% dans le mélanome, 3% dans le CRC) (Burotto et al. 2014; Guo et al. 2020). Toutes les mutations conduisent à une activation non régulable de l'activité d'ERK.

Les mutations de la voie MEK-ERK touchent les mêmes types de tumeurs (mélanome, cancer du côlon, cancer de la thyroïde) et sont souvent mutuellement exclusives (H. Davies et al. 2002). Les raisons proposées sont que la présence de mutations redondantes ne conférerait pas d'avantage sélectif au développement de la tumeur ; en effet, une trop forte activation de la voie des MAPkinases induirait l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'apoptose (Sewing et al. 1997).

L'amplification de la cascade des MAPkinases, impacte de nombreuses voies de signalisation, et induit une augmentation des capacités de prolifération, de croissance et de survie cellulaire. En conséquence, sa suractivation promeut la progression tumorale (Braicu et al. 2019).

1.3.2 La kinase RAF

Comme indiqué dans la partie [1.3.1.1](#), la famille RAF se compose de trois enzymes : ARAF, BRAF et CRAF (aussi appelé RAF1). CRAF fut la première découverte en 1985 et demeure la RAF la plus étudiée. Les expériences d'inactivation de gènes (Knock out) chez les souris de RAF démontrent que ces protéines ne sont pas redondantes et remplissent des fonctions distinctes complémentaires (Hagemann et Rapp 1999). Par exemple, chez le rat, les isoformes A-RAF et C-RAF sont détectées de manière transitoire ou stable dans les mitochondries. Cela a permis d'impliquer les RAFs dans les processus d'apoptose (Yuryev et al. 2000). De surcroît, les RAFs possèdent des régulations et partenaires différents ce qui leurs confère des fonctions diverses et variées.

Néanmoins, toutes les RAFs sont activées par de petites GTPases RAS, des événements de phosphorylation régulateurs et des protéines d'échafaudage (Garnett et Marais 2004).

1.3.2.1 Structure et activation de RAF

Les protéines RAF sont composées de trois régions conservées (CR1 à CR3) (Figure 26). Structuellement ces régions forment deux domaines : Le domaine régulateur comprenant CR1 et CR2, ainsi que le domaine kinase, à l'extrémité C-terminale comprenant le CR3 (Wellbrock, Karasarides, et Marais 2004).

CR1 est un domaine riche en cystéines et est le principal site de liaison de RAS. Il comprend le domaine de liaison à RAS (RBD) et le domaine riche en cystéine (CRD).

CR2 est le domaine de régulation, et est riche en sérines et thréonines. Il agit comme une charnière flexible entre CR1 et CR3. Son rôle n'est pas vraiment bien défini, mais il est supposé que CR2 participe aux interactions protéines/protéines et à la localisation subcellulaire de RAF (Fabian et al. 1994).

CR3 représente le domaine catalytique et est régulé par phosphorylation. Il contient la région de la boucle de liaison ATP (Boucle P) qui est importante pour la stabiliser (Chong, Vikis, et Guan 2003).

Dans la famille des RAF, l'isoforme BRAF est la cible privilégiée de RAS. De plus, il a la plus forte affinité pour MEK ce qui en fait son plus puissant activateur (Papin et al. 1996).

Le proto-oncogène BRAF code pour la protéine BRAF de 73 kDa. Il est situé chez l'homme sur le chromosome 7 (7q34) et est composé de 18 exons.

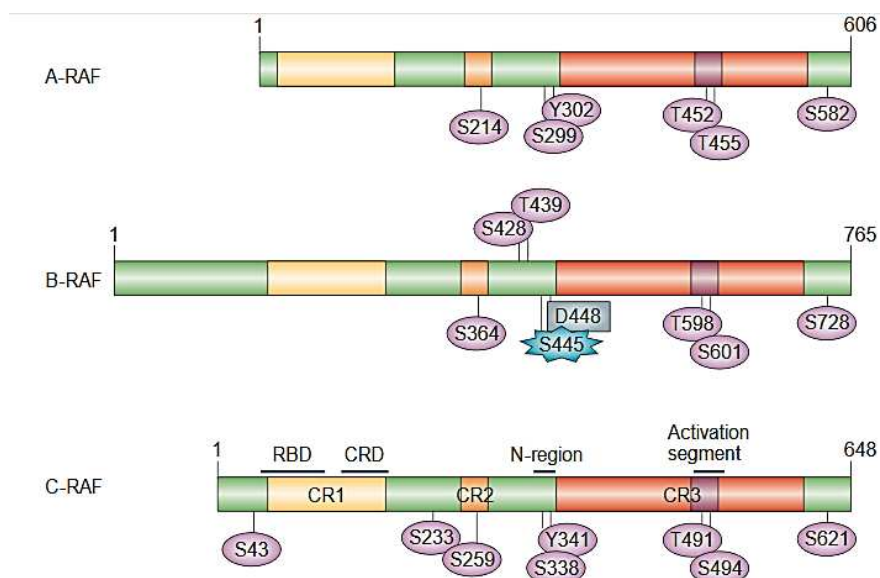


Figure 26 : Organisation moléculaire des enzymes de RAF

CR1, CR2, CR3 représentent les 3 régions conservées des enzymes. CR3 est le site d'activation des RAF. Les emplacements des sites de phosphorylation sont numérotés. Le résidu pS445 de BRAF est le résidu sérine phosphorylé de manière constitutive. Source : (Wellbrock, Karasarides, et Marais 2004)

Les mécanismes d'activation de BRAF diffèrent de ceux de ARAF et CRAF et ne sont pas encore totalement décryptés.

Le modèle accepté propose que dans une cellule saine, la BRAF inactivée est séquestrée dans le cytoplasme par les protéines 14-3-3. BRAF est sous forme de monomère et possède une conformation inactive repliée. Cette conformation permet une interaction hydrophobe entre le domaine régulateur (résidus G597 à V601) et le domaine catalytique contenant la boucle P (résidus G465 à V472) (Figure 27A 1→2) (Sun et Wang 2019).

La fixation de RAS-GTP (RAS activé) sur le CR1 au niveau des domaines RBD induit la libération du dimère 14-3-3. Cela permet la présentation du CRD qui permettra la translocation et la liaison de BRAF à la membrane (Karoulia, Gavathiotis, et Poulidakos 2017). BRAF est ensuite phosphorylée en T599 et S602, ce qui induit la déstabilisation des interactions hydrophobes et permet au segment d'activation de basculer dans sa conformation active. La kinase BRAF active peut par la suite s'homo-dimériser ou s'hétéro-dimériser avec d'autres membres de la famille RAF ou avec des protéines d'échafaudage telles que la protéine d'échafaudage KSR1 « suppresseur de kinases Ras » (Figure 27A 3→5) (Weber et al. 2001). En effet, la connexion entre RAF-MEK-ERK nécessite la protéine KSR1 (un homologue de RAF sans activité) (Figure 27B) (Morrison 2001). Une fois le signal transmis, le rétrocontrôle initié par ERK rend BRAF inactif par des événements de déphosphorylation des sites activés et des phosphorylations des sites inhibiteurs (Ritt et al. 2010).

Les étapes impliquant les KSR se déroulent en parallèle de celle de RAF. Les protéines d'échafaudage KSR sont inactives dans le cytoplasme et forment un complexe avec MEK (Figure 27B 1). Une fois activées, elles s'ancrent à la membrane, rendant MEK accessible à la forme BRAF activée (Figure 27B 2→3). Le rétrocontrôle négatif initié par ERK, libère les KSR de la membrane (Figure 27B 4) (Lavoie et Therrien 2015).

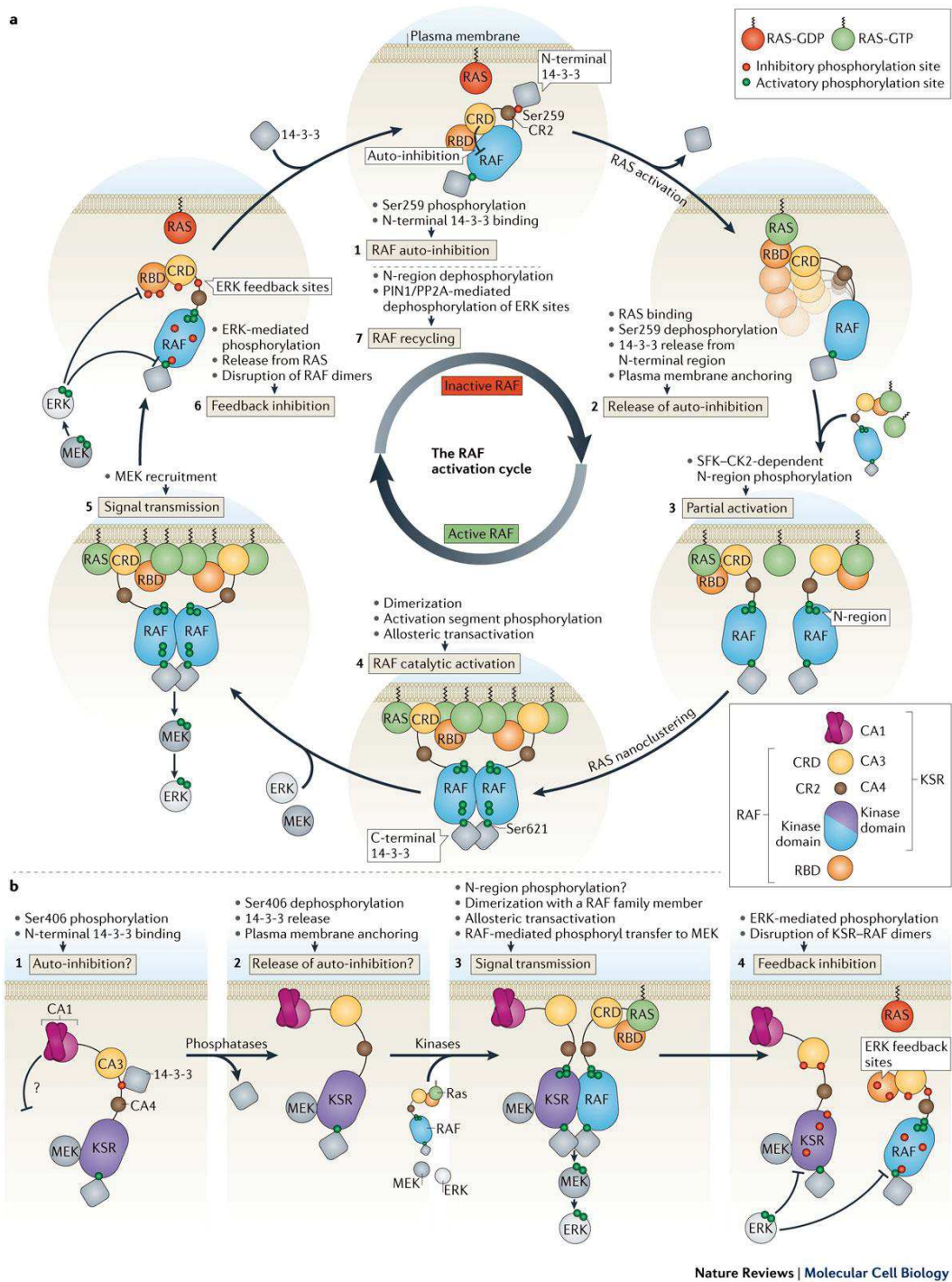


Figure 27: Le cycle d'activation de RAF

A. Les étapes d'activation de RAF. **B.** La participation de KSR dans l'activation de MEK-ERK
 Source : (Lavoie et Therrien 2015)

1.3.2.2 Rôle de BRAF dans la cellule cancéreuse

1.3.2.2.1 Les mutations de BRAF

Les mutations de BRAF existent dans 8% des cancers (Roskoski 2010). L'incidence la plus élevée de mutations de BRAF est dans le mélanome malin (27-30%), le cancer papillaire de la thyroïde (36-53%), le cancer colorectal (15-22%) et le cancer séreux des ovaires (~30%) (Garnett et Marais 2004).

Plus de 40 mutations différentes ont été identifiées dans le gène BRAF. Ces mutations ciblent majoritairement le domaine d'activation de la protéine (Lm, Je, et Mh 2011). La mutation la plus fréquente (80%) du gène BRAF est la substitution 1799T> A qui induit un changement d'acide aminé valine (V) en acide glutamique (E) dans la région d'activation de la kinase (BRAF V600E). Cela crée un phosphomimétisme formant une protéine active en tant que monomère. Ce mutant de BRAF possède une activité catalytique augmentée de plus de 500 fois par rapport à la forme non mutée (sauvage) (Wan et al. 2004; Karoulia, Gavathiotis, et Poulidakos 2017). La mutation perturbe l'interaction hydrophobe entre le domaine régulateur et le domaine catalytique de RAF. Cela engendre une kinase BRAF constitutivement active (Wan et al. 2004).

Les autres mutations minoritaires de BRAF sont soit des substitutions activatrices de V600 (telles que V600K, V600D et V600R) ou des mutations faux sens non V600 (H. Davies et al. 2002). En plus de ces mutations ponctuelles, il existe des protéines de fusion résultant de translocation du domaine catalytique de BRAF et des délétions protéiques entraînant aussi une activation de BRAF.

Quand BRAF est mutée, elle adopte des propriétés oncogéniques et induit une suractivation de la voie des MAPkinases indépendante des signaux extérieurs. En effet, la protéine RAF mutée ne dépend plus de l'activation en amont de RAS (Yao et al. 2015). Cela favorise la transformation tumorale. Sachant que les effets de la voie des MAPkinases varient en fonction du type cellulaire, l'impact de la mutation va dépendre du cancer. Dans le mélanome, la fréquence de la mutation a suggéré une implication importante dans le processus d'initiation tumorale. Finalement, des études ont démontré que les mutations de BRAF contribuent à l'hyperplasie des lésions mélanocytaires mais ne sont pas suffisantes pour initier une tumeur. L'ajout de mutations supplémentaires induiront un mélanome (Jn et al. 2006). À contrario, dans le CRC provenant du modèle de polype festonné, la mutation de BRAF est suffisante pour induire le processus d'initiation tumorale.

En somme, les mutations de BRAF semblent se produire dans des cancers où l'activation de la voie MAPK-ERK serait un avantage à l'origine d'une sélection.

Paradoxalement, il existe des mutations qui diminuent l'activité de BRAF pour MEK *in vitro*, tel que le variant BRAFD594V appelé « kinase morte ». Ce variant a déjà été retrouvé dans le mélanome (Heidorn

et al. 2010). Cependant, malgré la perte d'activité de la forme BRAF mutée, la « kinase morte » peut se lier à CRAF et sous l'effet d'une RAS mutée, stimuler néanmoins la voie des MAPkinases.

1.3.2.2.2 La classification des mutants de BRAF

Les mutants BRAF peuvent être classés en trois familles en fonction de 1) l'activité de la kinase, 2) la dépendance de RAS, et 3) l'état de la dimérisation. Ce classement a des implications cliniques importantes pour la prédiction de réponse aux thérapies ciblant la dérégulation de la voie de signalisation MAPkinases (Dankner et al. 2018) (Tableau 2).

Tableau 2: Classification des kinases BRAF mutées

CLASSE	CLASSE 1	CLASSE 2	CLASSE 3
ACTIVITE DE LA KINASE	BRAF V600 (E, D, K, R) Kinase fortement active (X500 à X700)	BRAF NON V600 Kinase inactive	BRAF NON V600 Kinase active
DEPENDANCE DE RAS	Indépendant	Indépendant	Dépendant
ETAT DE DIMERISATION	Monomères actifs	Dimères actifs	Hétérodimères avec CRAF et BRAF sauvage

1.3.2.3 BRAF V600E dans le CRC

1.3.2.3.1 La classification d'expression génique et moléculaire

D'un point de vue moléculaire, les tumeurs portant la mutation BRAF V600E sont hétérogènes, elles proviennent d'une multitude d'altérations moléculaires. Ces tumeurs représentent 10% des CRC sporadiques et 50% des CRC issus du modèle festonné (Rajagopalan et al. 2002). Cette hétérogénéité est visible par l'appartenance des tumeurs BRAF V600E à plusieurs classes de CMS. La majorité d'entre elles (>70%) sont classées dans le groupe moléculaire CMS1, 2% dans le CMS2, 5% dans le CMS3 et 17% dans le CMS4 (Barras et al. 2017). Afin de pallier cette diversité les patients atteints de CRCm sont regroupés en 2 sous types d'expression génique et d'altérations moléculaires nommés BM1 et BM2 (Figure 28).

Le sous type BM1 est associé à une forte dérégulation de la voie de signalisation MAPkinases et des gènes impliqués dans l'infiltration immunitaire (macrophages) ainsi qu'à une augmentation de l'EMT. Les patients ont une survie plus faible.

Le sous type BM2 est lui associé à des dérégulations du contrôle du cycle cellulaire. Les patients ont un meilleur pronostic vital et sont généralement de type MSI (Barras et al. 2017).

Tous les patients CRCm-BRAF V600E CMS4 sont BM1, tandis que ceux CMS1 sont répartis entre le sous type BM1 et BM2.

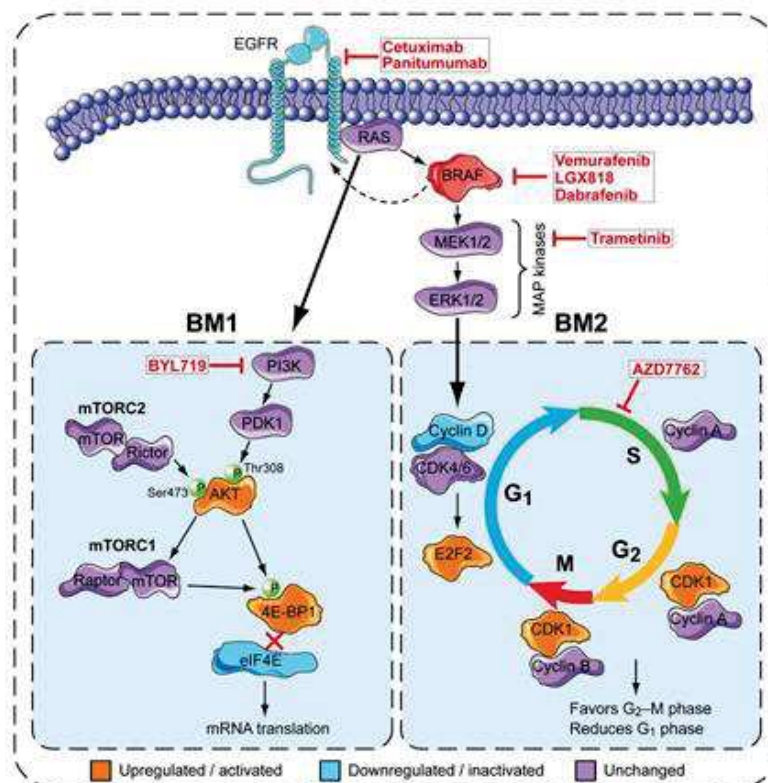


Figure 28: Sous-type moléculaire de BRAF V600E dans le CRC

L'analyse de données de protéomique permet de définir les sous-type BM1 et BM2. Le niveau de phosphorylation des protéines est représenté par un P. Chez les patients BM1 (à gauche) nous observons une dérégulation de la voie PI3K / mTOR / AKT. Pour ceux BM2 (à droite) la voie du cycle cellulaire et ses points de contrôles sont dérégulés. Source : (Barras et al. 2017)

1.3.2.3.2 Pertinences cliniques de BRAF V600E dans le CRC

D'un point de vue clinique, la contribution de l'oncogène BRAF peut varier d'un cancer à l'autre. C'est l'exemple du mélanome où la mutation est associée à un bon pronostic alors que dans le CRC elle est de très mauvais pronostic à partir du stade II de la classification TNM (Kopetz et al. 2015). Pour les stades précoces la mutation de BRAF n'a pas d'incidence sur la décision thérapeutique (exérèse chirurgicale) (Cohen et al. 2017).

Dans le CRC, cette mutation correspond à de nombreux facteurs cliniques tels que :

- **Le statut des microsatellites : 58% des patients sont MSI** (Lochhead et al. 2013). En effet, ces tumeurs proviennent en majorité des processus du modèle festonné qui à cause d'un fort phénotype CIMP engendre des tumeurs plus souvent MSI que MSS (Lao et Grady 2011; Fang et al. 2014). Ces patients ont un âge d'apparition de la maladie plus tardif et possèdent une très mauvaise réponse aux traitements (Barault et al. 2008).
- **Les patients porteurs sont souvent des femmes (61%) et ont plus de 70 ans** (Ogino et al. 2012; J. Wang et al. 2019).
- **Le site de la tumeur est au niveau du côlon droit (81%)** et elle est découverte à un stade avancé (O'Brien et al. 2008).
- **Le site métastatique est plus fréquemment le péritoine** que le foie ou les poumons (Prasanna et al. 2018). Ces patients ont une survie plus courte même après l'exérèse des métastases (Yaeger et al. 2014).
- Histologiquement, **ce sont généralement des tumeurs peu différenciées** avec une forte composante mucineuse (forte sécrétion de mucus) (Tran et al. 2011).
- Il est important de préciser que les patients porteurs d'une tumeur avec la mutation BRAF V600E et de statut MSS ont une mortalité élevée avec une survie globale (SG) diminuée (Sveen, Kopetz, et Lothe 2020; Seppälä et al. 2015).

Globalement, les CRC possédant la mutation BRAF V600E ont une faible réponse aux traitements cytotoxiques ce qui confère aux patients une faible survie globale (Figure 29). Les raisons de cette résistance ne sont pas encore complètement élucidées (Seligmann et al. 2017).

La mutation BRAF V600E est un facteur de mauvais pronostic. Cet oncogène est responsable d'une survie globale plus faible en comparaison avec les patients atteints de CRC-BRAF non-muté mais aussi avec ceux atteints de CRC avec des mutations de RAS (Yingchi Yang et al. 2018).

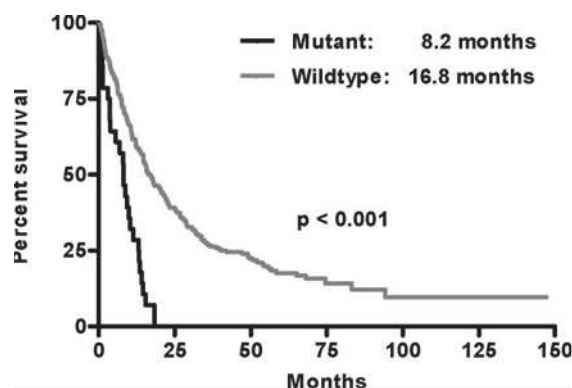


Figure 29: Courbe de survie des patients CRC BRAF WT et BRAF V600E

Les patients porteurs de la mutation BRAF ont une survie 2 fois moins longue que ceux ne portant pas la mutation
 Mutant : mutation BRAF V600E ; Wildtype : absence de la mutation BRAF V600E
 Source : (Tran et al. 2011).

1.3.2.3.2.1 Classification des enzymes BRAF et clinique

La mutation BRAF V600E appartient à la classe 1 des kinases (Tableau 2). Il est démontré que cette classification corrèle avec les données cliniques. En effet, les mutants de classe 3 sont retrouvés dans des tumeurs plus souvent du côté gauche, sans métastase péritonéale. Ces tumeurs confèrent aussi une meilleure survie de 44 mois au lieu de 21 mois (pour la classe1) (Schirripa et al. 2019).

1.3.2.4 Thérapie pour les patients atteints de CRC avec une mutation BRAF V600E

1.3.2.4.1 Les protocoles de chimiothérapies

Les patients atteints de CRC-BRAF V600E avancé sont traités indépendamment de ces caractéristiques cliniques et moléculaires liées à la présence de la mutation. Etant données les résistances intrinsèques connues pour les agents de chimiothérapie, ils reçoivent des combinaisons de chimiothérapies plus agressives telles que le FOLFOXIRI (5FU + acide folinique + oxaliplatine + irinotécan) associées à des anti VEGF (Bevacizumab) ou anti EGFR (Panitumumab ou Cetuximab).

Des études démontrent que la combinaison FOLFOXIRI-Bevacizumab semble augmenter la SG. Par exemple, l'étude de l'équipe d'A. Falcone indique que la survie des patients augmente de 11,8 mois à 24 mois (Loupakis et al. 2014). Cependant, la faible proportion des patients (15 patients) ne permet pas la validation statistique de ces résultats.

En ce qui concerne les combinaisons avec des anti-EGFR, les études sont aussi controversées à cause des faibles proportions de cohortes. Il est connu que l'utilisation d'anti-EGFR pour traiter des patients porteurs de mutations de RAS n'apporte pas de bénéfice thérapeutique. C'est d'ailleurs une contre-indication aux traitements. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque RAS est en aval de l'EGFR,

ce qui suggèrent que l'inhibition de l'EGFR n'impacte pas le niveau d'activation de la voie en aval de la kinase RAS mutée. Ces tumeurs sont intrinsèquement résistantes à l'inhibition de l'EGFR.

BRAF est aussi en aval de l'EGFR, malgré cela des combinaisons FOLFOXIRI+ anti-EGFR ont été proposées aux patients portant la mutation BRAF V600E. Des études ont finalement démontré un impact négatif de ces traitements sur ces patients (Tableau 3)(Di Nicolantonio et al. 2008).

Tableau 3: Etude clinique proposant des combinaisons d'agents cytotoxiques et des anti-EGFR

Etudes	Mutation de BRAF	BRAF SAUVAGE	Pronostic
Crystal (FOLFIRI ± Cetuximab)	26 patients	277 patients	La mutation de BRAF est un très mauvais pronostic (Van Cutsem et al. 2011)
Survie globale	14 mois	25 mois	
PRIME (FOLFOX ± Panitumumab)	24 patients	228 patients	La mutation de BRAF est un facteur de pronostic négatif (Douillard et al. 2013)
Survie globale	10.5 mois	28.3 mois	

La majorité des études réalisées chez ces patients ont en tant que limite la validité statistique due au faible nombre de patients dans les différentes cohortes. Cela explique les nombreuses controverses sur le sujet.

Enfin, en raison du caractère agressif de leur tumeur, 60% des patients sont moins susceptibles de recevoir un traitement de chimiothérapie de deuxième ligne (Seligmann et al. 2017). En effet, la survie des patients est 4 à 6 mois après échec de la thérapie initiale (Kopetz et al. 2019).

1.3.2.4.2 Les inhibiteurs de BRAF V600E

BRAF V600E est une cible thérapeutique convaincante car il n'a qu'une seule cible (en comparaison avec RAS). De nombreuses molécules ont été créés afin d'inhiber spécifiquement l'activité de la kinase.

Dans le mélanome, l'utilisation des inhibiteurs de BRAF (iBRAF ou iBRAF V600E) en compétition pour l'ATP ont révolutionné le traitement du mélanome métastatique (Flaherty et al. 2010). De nombreux iBRAFs ont été testés dans des essais cliniques et validés par la FDA pour traiter le mélanome métastatique, c'est le cas du **Vemurafenib (PLX4032, Zelboraf®)**, du **Dabrafenib**, et de l'**Encorafenib** (Dummer et al. 2018). Les iBRAFs diffèrent en termes de spécificité et d'activité. En effet, le Dabrafenib est 100 fois plus spécifique de BRAF V600E que le Vemurafenib. Cette augmentation d'affinité induit une meilleure efficacité (Mandalà et Voit 2013).

1.3.2.4.2.1 Mode d'action des molécules inhibitrices

Les iBRAFs sont spécifiques de BRAF V600E et inhibent son activité dans les cellules cancéreuses mutées.

Structurellement, l'activation de BRAF non mutée engendre un changement de conformation modifiant l'hélice α C (segment d'activation) qui passe de la conformation OUT à IN (Figure 30A). Cela rend possible la catalyse et l'interaction avec MEK.

Les iBRAFs tels que le Vemurafenib et Dabrafenib se lient au site catalytique et bloquent cette hélice en une position aberrante ni IN ni OUT. La présence de ces inhibiteurs appelés α C-OUT empêche allostériquement la formation d'homodimères (de BRAF liés aux inhibiteurs). Cela incite la formation de dimères imparfaits BRAF dont le second monomère n'est pas inhibé (Figure 30B). Ce dimère imparfait peut avoir une activité catalytique.

En revanche, il existe d'autres inhibiteurs de BRAF tels que l'AZD628 ou le GDC-0879 appelés α C-IN, qui vont se lier à BRAF V600E et bloquer l'hélice α C en position IN. Cela permet stériquement la liaison avec un autre monomère inhibé. On a ainsi un dimère totalement inhibé (Figure 30.C) (Karoulia, Gavathiotis, et Poulikakos 2017).

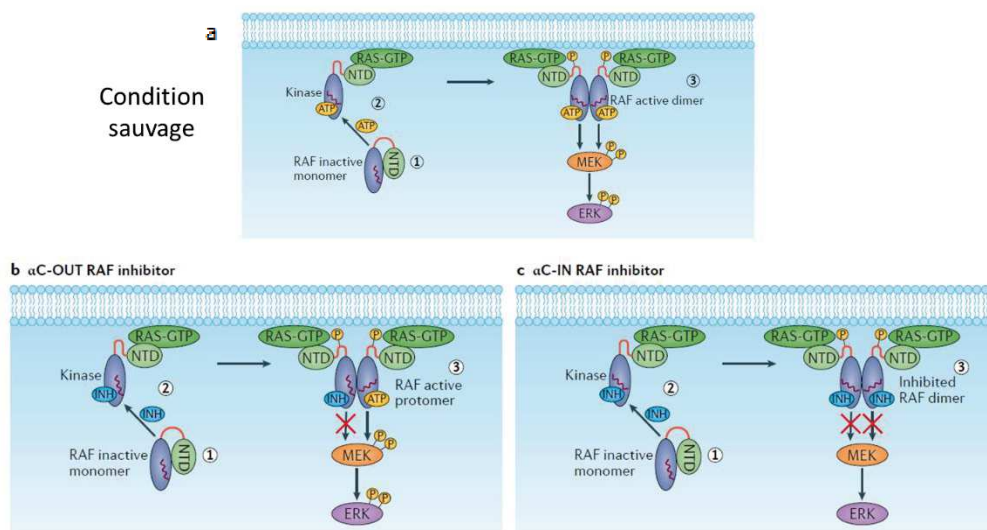


Figure 30: L'inhibition de BRAF V600E par des iBRAFs

A. L'activation et la dimérisation de BRAF sauvage

B. Les inhibiteurs α C-OUT (Vemurafenib, Dabrafenib, PLX4720)

C. Les inhibiteurs α C-IN (AZ628, GDC-0879)

Source : (Karoulia, Gavathiotis, et Poulikakos 2017).

Ainsi les iBRAFs sont classés selon la conformation dans laquelle ils stabilisent BRAF V600E en position « α C-IN » ou ' « α C-OUT ». « α C-OUT » représente la classe la plus représentée.

Un « effet paradoxal » est observé dans les cellules tumorales non-BRAF V600E. Les iBRAFs en absence de BRAF V600E augmentent l'activité des BRAF non mutés.

D'un point de vue cellulaire, les iBRAFs bloquent la voie des MAPkinases ce qui induit l'arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 et engendre la mort cellulaire (Tsai et al. 2008).

1.3.2.4.2.2 Les iBRAFs et le CRC

Le Vemurafenib (PLX4032) est le premier iBRAf à avoir montré une efficacité dans le mélanome BRAF V600E (Chapman et al. 2011). Il confère un taux de réponse de 50% dans le mélanome contre un taux de 5% dans le CRCm (Corcoran et al. 2015). Cette différence démontre à nouveau l'effet cancer spécifique associé à la mutation.

Dans le mélanome, les iBRAFs offrent une amélioration de la survie globale, cependant, la majorité des patients récidivent à cause d'une résistance acquise après 6-8 mois. Les résistances dans le mélanome impliquent généralement la réactivation de la voie des MAPkinases. Afin d'y pallier, les patients sont traités avec des molécules inhibant MEK1/2 (Trametinib et Binimetinib) couplés aux inhibiteurs de BRAF depuis 2018 (année d'approbation de la FDA) (Roskoski 2018).

Actuellement, les iBRAFs ne sont pas utilisés pour traiter les CRCm pour cause de leur inefficacité. Cependant, ils ont un effet prometteur dans le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC), et le cancer anaplasique de la thyroïde portant la mutation. Ces deux types de cancer ont fourni des taux de réponse élevés (supérieur à 40%) à ces traitements (Hyman et al. 2015). Des études cliniques supplémentaires seront nécessaires pour valider cette tendance.

1.3.2.5 Résistance aux iBRAFs dans le CRC

Divers mécanismes de résistance sont présentés comme spécifiques du CRC à la suite de traitement par des iBRAFs et sont présentés ci-dessous.

1.3.2.5.1 Les isoformes de RAS

Les lignées de mélanome acquièrent une résistance aux iBRAFs en augmentant l'expression de CRAF (Figure 31A) (Montagut et al. 2008). Dans ce contexte, CRAF forme des hétérodimères avec BRAF V600E ce qui peut conduire à l'activation de la signalisation des MEK (Dankner et al. 2018). Ce modèle est aussi proposé dans le CRC.

1.3.2.5.2 L'activation par rétroaction directe des TKs

L'inhibition de BRAF annule le rétrocontrôle d'ERK sur l'EGFR. L'absence d'activation de la phosphatase CDC25 par ERK induit une suractivation de l'EGFR (Figure 25). En conséquence, les voies de signalisation en aval de l'EGFR et passant par RAS sont aussi suractivées (Figure 24) (Prahallad et al. 2012). Les lignées cellulaires de CRC en comparaison avec celles du mélanome expriment de plus haut niveau de l'EGFR. Cela augmente l'efficacité de cette résistance. Plus récemment, la mutation de BRAF V600E a été décrite comme pouvant augmenter l'expression des RTKs tels que les HER1/2 permettant l'activation de la voie des PI3K-AKT (Herr et al. 2018). (Figure 31B).

1.3.2.5.3 L'activation de la voie des PI3K/AKT ou la perte de PTEN (Phosphatase and TENSin homolog)

L'activation de la voie des PI3K/AKT par des mutations (40% des CRC sont mutés PI3K), des suppressions d'inhibiteur (perte de PTEN) ou d'activation (par la suractivation de l'EGFR) favorise la survie et la croissance des cellules tumorales (Parsons et al. 2005; Ahmed et al. 2010; Yuan et Cantley 2008). Dans le contexte d'un CRC, cette activation est proposée comme responsable des résistances aux iBRAFs (Figure 31C) (Mao et al. 2013).

1.3.2.5.4 La suractivation de la voie Wnt/ β caténine

Les cellules tumorales de CRC-BRAF V600E ont une forte activité de la voie Wnt/ β caténine (G. Chen et al. 2018). D'une part, le traitement par iBRAFs induit une activation de la kinase d'adhésion focale cytoplasmique tyrosine kinase (FAK) ce qui crée une suractivation de la voie Wnt (Luu et Price 2019). En effet, dans des modèles murins de tumorigenèse induite par BRAF, la voie Wnt/ β caténine favorise la progression de l'hyperplasie intestinale vers le carcinome (Rad et al. 2013). D'autre part, ERK active le corécepteur Wnt LRP6 ce qui permet une surexpression du proto-oncogène c-Myc. (Figure 31D)

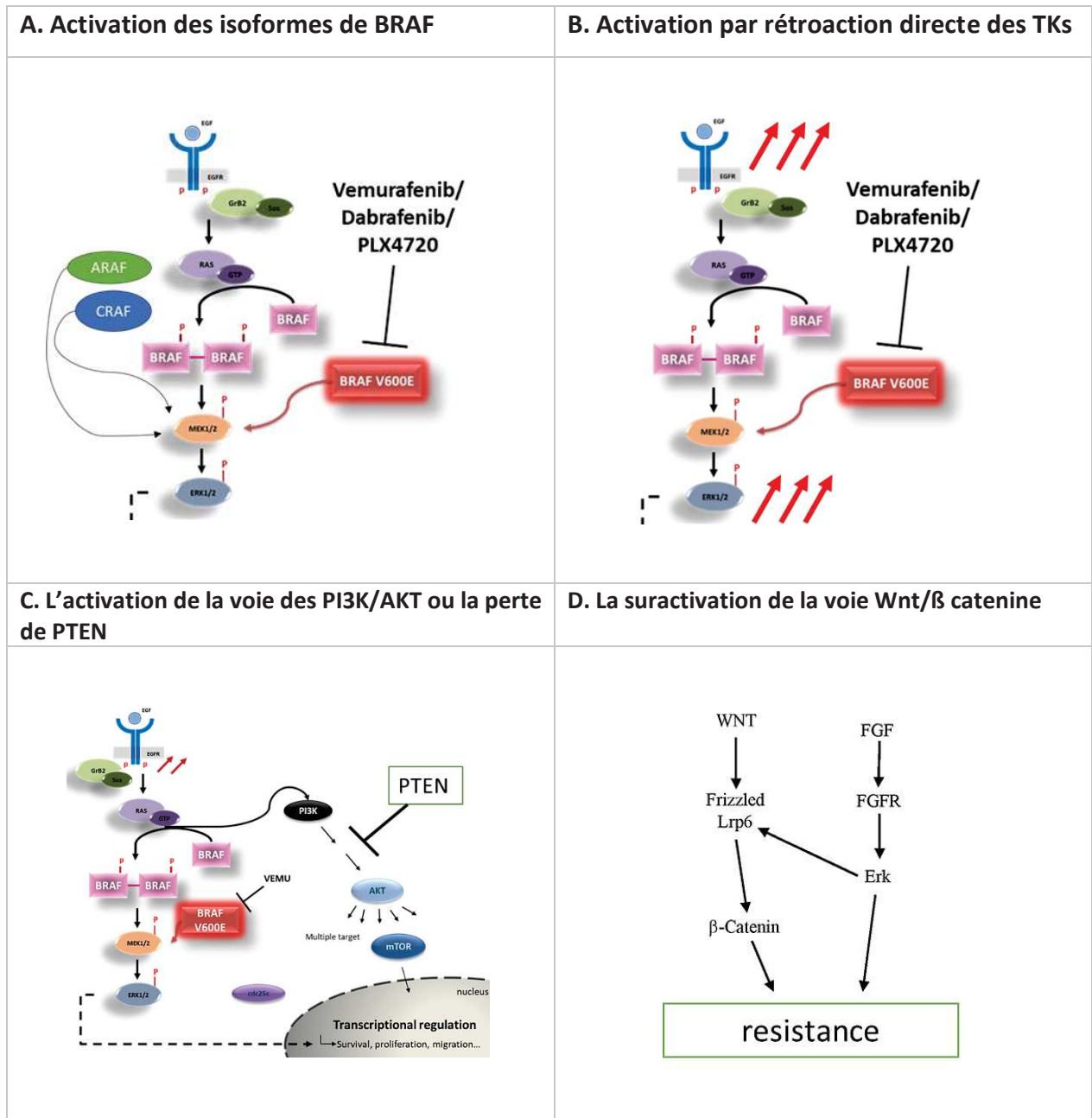


Figure 31: Résistance aux iBRAFs CRC

Différents mécanismes impliqués dans la résistance aux iBRAFs. **A.** résistance causée par l'augmentation de l'expression de CRAF (isoforme de BRAF). **B.** Résistance causée par la suractivation de voie de signalisation telle que la voie de l'EGFR. **C.** Résistance causée par l'activation de la voie des PI3/AKT par des mutations ayant pour finalité une activation de la voie. **D.** Résistance causée par la suractivation de la voie Wnt propre à certain type cancéreux tel que le CRC. Source O.Villeronce.

1.3.2.6 Les essais cliniques comprenant des iBRAFs dans le CRCm

Afin de pallier les résistances des iBRAFs, de nombreuses études cliniques sont conçues et menées. Elles utilisent une combinaison de thérapies ciblées et/ou de chimiothérapies.

1.3.2.6.1 iBRAF V600E et anti-EGFR

L'utilisation d'anti-EGFR en même temps que des iBRAFs a pour but d'inhiber la suractivation de l'EGFR précédemment présentée. Dans l'essai clinique de phase II « BASKET » en 2015, le Vemurafenib a été associé à du Cetuximab sur une cohorte de 122 patients atteints de CRCm-BRAF V600E. 1 patient a eu

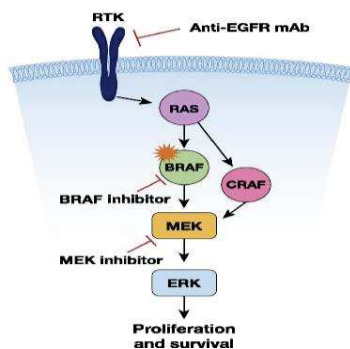
une réponse partielle (diminution de 30% des lésions) et 69% ont eu une maladie stable. La combinaison a augmenté la survie sans progression de 4 mois passant de 3.7 mois à 7.1 mois (Hyman et al. 2015).

D'autres essais avec l'association de Vemurafenib et de Panitumumab, ou Vemurafenib et l'Erlotinib (un anti-EGFR), l'Encorafenib et Cetuximab, le Dabrafenib et le Panitumumab ont été entrepris. Ils donnent un taux de réponse peu élevé mais en faveur des doubles combinaisons avec des taux de réponses variant de 4 à 23% (Caputo et al. 2019).

1.3.2.6.2 iBRAF V600E et iMEKs

Compte tenu des résultats de la combinaison des iBRAFs et iMEKs (Trametinib et Binimetinib) dans le mélanome, il a été entrepris de réaliser des essais cliniques dans le CRCm-BRAF V600E. Cette combinaison fournit un taux de réponse de 56% (Corcoran et al. 2015). Ces résultats semblent encourageants. Malheureusement, les taux de réponse sont bien moins importants que ceux observés dans le mélanome (75%) (Flaherty et al. 2012).

1.3.2.6.3 iBRAF V600E, iMEK et anti-EGFR



Dans l'optique d'une amélioration de la prise en charge des patients avec CRCm-BRAF V600E, des essais cliniques en triple thérapies ont été réalisés (Figure 32). L'objectif de cette combinaison est de bloquer la résistance par réactivation de la voie des MAPK menée par l'EGFR.

Trois cohortes de patients ont été traitées avec du Dabrafenib plus Panitumumab, ou du Panitumumab plus Trametinib ou avec la triple combinaison (Dabrafenib plus Trametinib plus Panitumumab). Le taux de réponse de la triple thérapie est de 21% et la survie sans progression de la maladie est passée à 9.1mois contre 4.1 mois (Corcoran et al. 2018).

Figure 32: iBRAF V600E, iMEK et anti-EGFR

Stratégie d'inhibition de la voie des MAPK par triple thérapie

Adapté de (Strickler, Wu, et Bekaii-Saab 2017)

En 2019, un essai similaire a été réalisé en seconde ligne sur 665 patients atteints de CRCm et ayant subi un échec thérapeutique après chimiothérapie. Cet essai visait à comparer la triple combinaison Encorafenib plus Binimetinib plus Cetuximab à une double combinaison (Cetuximab plus Encorafenib) et à une monothérapie avec du Cetuximab ou du FOLFIRI. La SG est augmentée en faveur de la triple thérapie de 3 mois par rapport à la monothérapie et d'1 mois par rapport à la double thérapie (Kopetz et al. 2019). Des études sont en cours afin de proposer cette triple thérapie en 1ere ligne aux patients

CRCm-BRAF V600E (« Encorafenib, Binimetinib and Cetuximab in Subjects With Previously Untreated BRAF-Mutant ColoRectal Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.Gov » 2020)

1.3.2.6.1 iBRAF V600E, anti-EGFR, iPI3Ks

Etant donnée l'implication de la voie des PI3K-AKT dans la résistance, des essais cliniques ont combiné l'Encorafenib (iBRAF), le Cetuximab (anti-EGFR) avec un inhibiteur de PI3K (iPI3Ks) l'Alpelisib. L'ajout de l'Alpelisib à la double combinaison Encorafenib plus Cetuximab ne confère pas de bénéfice de survie (Tabernero et al. 2016).

En somme, les taux de réponse obtenus avec des combinaisons de thérapies ciblées sont relativement inférieurs à ceux obtenus dans le mélanome en monothérapie. C'est encore une preuve du caractère organe dépendant de l'impact de la mutation. **De plus, cela démontre la nécessité de poursuivre la caractérisation de ces cellules tumorales BRAF V600E afin de proposer des traitements plus efficaces.**

1.3.2.6.2 Autres cibles thérapeutiques

D'autres cibles potentielles sont aussi envisagée telles que l'inhibition de la voie Wnt / β -caténine, d'HER2 ou d'ERK. L'immunothérapie est aussi une piste possible. En effet, cette stratégie fournit des résultats encourageants dans le CRC-MSI (Overman et al. 2018). Malheureusement, l'essai initial de ce traitement n'a pas inclus de CRC-MSI-BRAF V600E. Mais sachant que les tumeurs de sous type BM1 ont un fort profil immunitaire, ce traitement pourrait avoir un impact sur les patients atteints de CRC-MSI-BRAF V600E.

2 HYPOTHESE ET OBJECTIF

La mutation BRAF V600E est présente dans 5 à 15% des cancers colorectaux ce qui entraîne la production d'une protéine mutée constitutivement active, et qui possède une activité catalytique jusqu'à 500 fois supérieure à la protéine normale. Cette activité anormalement élevée conduit à une activation accrue de la voie des MAPkinases ce qui induit une augmentation de la survie, la prolifération ainsi que de la résistance aux traitements des cellules tumorales. De plus, la mutation est associée à un profil métastatique précoce et une survie des patients drastiquement plus courte peu importe le traitement proposé (chimiothérapie ± thérapie ciblée). Par conséquent, les patients porteurs d'un CRC avec une mutation BRAF V600E ont un très mauvais pronostic puisqu'ils sont réfractaires à toutes les thérapies conventionnelles actuelles.

Nous savons que les cellules souches cancéreuses (CSC) possèdent différentes caractéristiques dont l'autorenouvellement, la capacité à former des tumeurs (tumorigénicité), des métastases et sont résistantes aux thérapies conventionnelles.

Dans ce contexte, nous avons postulé que la mutation BRAF V600E pourrait promouvoir la population de cellules souches cancéreuses. Il en résulterait une augmentation des capacités des résistance et d'initiation métastatique responsable du médiocre pronostic clinique des patients.

L'objectif du projet est donc d'étudier les caractéristiques des CSC dans le contexte d'un CRC en modulant l'activité et l'expression de la protéine kinase mutée BRAF V600E.

3 RESULTATS

« Il ne faut pas attendre d'être parfait pour commencer quelque chose de bien. »

~ Abbé Pierre

Dans cette partie, nous avons décidé de présenter les résultats majeurs afin de mieux exposer les principaux messages du projet. Des résultats complémentaires seront présentés dans la partie discussion. Ces résultats sont majoritairement préliminaires, et participeront aux figures supplémentaires ou à un papier ultérieur.

La mutation BRAF V600E corrèle avec un fort pourcentage de CSC dans le CRC.

La première partie de mon travail a consisté à réunir des évidences qu'il existait une corrélation significativement différente entre la présence de la mutation BRAF V600E dans les tumeurs du côlon et du rectum et une forte proportion de cellules souches cancéreuses. Nous avons dans un premier temps activement participé à la constitution d'une petite cohorte de tumeurs (59 patients au total) portant soit la forme mutées BRAF V600E soit la forme sauvage (BRAF^{wt}) (19 patients porteurs de la mutation BRAF V600E et 40 patients au statut BRAF^{wt}). Ce travail a été réalisé avec l'aide précieuse de Florence Boissière et Evelyne Crapez de l'Unité de Recherche Translationnelle (URT) de l'institut du cancer de Montpellier (ICM). La validation des anticorps dirigés contre les deux marqueurs de CSC, CD44v6 et CD26, a été réalisée avec les mêmes standards que ceux prérequis pour la clinique. Suite au marquage de l'intégralité des lames de tumeurs de la cohorte avec les deux anticorps, une quantification de celui-ci a été réalisée en double aveugle. Pour les deux anticorps le marquage est significativement supérieur dans les tumeurs du CRC portant une mutation BRAF V600E que dans les tumeurs portant une forme sauvage du gène BRAF (Figure 33A). Il ne nous a malheureusement pas été possible de valider ces résultats avec l'anticorps dirigé pour l'isoforme ALDH1A1 car celui-ci n'a pas été validé au préalable. Nous avons ensuite utilisé la banque de lignées cellulaires établies au laboratoire à partir de tumeurs du côlon, de métastases hépatiques et de cellules tumorales circulantes en parallèle avec quelques lignées commerciales de l'ATCC. Sur ces modèles, avons quantifié par cytométrie en flux la proportion de cellules exprimant CD44v6 et CD26 ainsi que celles présentant une activité aldehyde deshydrogénase importante (Aldefluor). Une fois de plus les lignées de CRC portant une mutation BRAF V600E présentaient un pourcentage de cellules positives pour ces 3 marqueurs de CSC supérieur aux cellules tumorales portant la forme sauvage de BRAF (Figure 33B). Ensuite, sachant que les CSC sont des cellules munies de tout un arsenal leur permettant de plus résister aux thérapies conventionnelles que les cellules tumorales non-CSC, nous avons d'une part comparé l'IC50 de nombreuses lignées de cellules de CRC pour une combinaison de chimiothérapies communément donnée aux patients, le FIRI (5FU et irinotecan) en fonction de leur statut mutationnel sur le gène BRAF. D'autre part, sur les mêmes cellules nous avons comparé le niveau d'expression de gènes directement impliqués dans la résistance aux traitements. Les figures 33C et 33D démontrent que les lignées de CRC qui portent la mutation BRAF V600E sont plus résistantes au FIRI et que ceci s'explique notamment par une expression plus importante des gènes impliqués dans la résistance aux chimiothérapies.

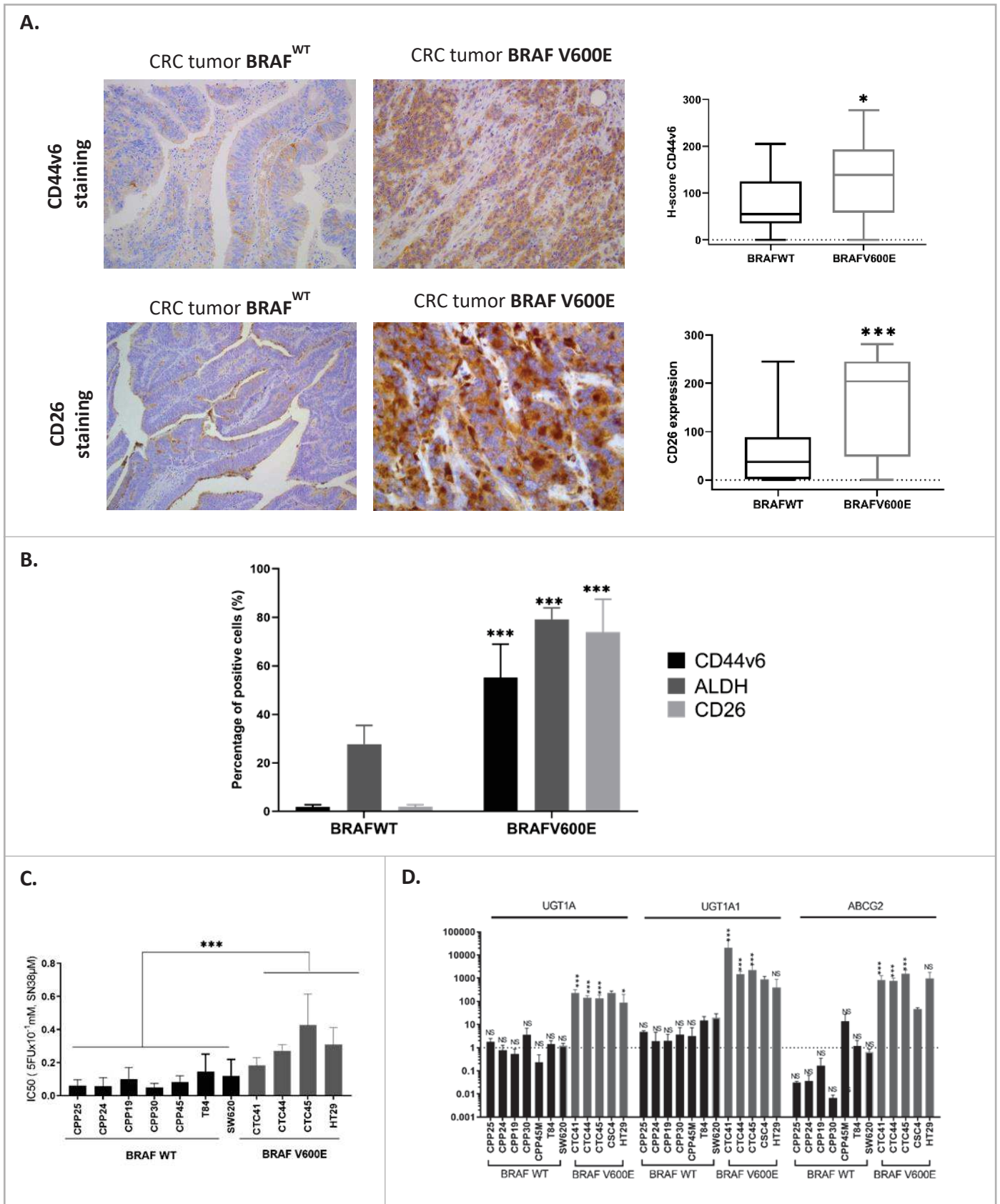


Figure 33: La mutation BRAF V600E corrèle avec un fort phénotype de CSC

A. Marquages en immunohistochimie avec les anticorps anti CD44v6 et CD26 sur des lames de patients et analyses statistiques des résultats (test U de Mann). La cohorte est de 59 patients (19 tumeurs BRAF V600E et 40 BRAF WT). **B.** Expression des marqueurs de CSC (CD44v6, CD26, forte activité de l'ALDH) dans des lignées de CRC (BRAF WT : CPP24, CPP25, CPP44, CPP19, CPP30, CPP45, T84, SW620 ; BRAF V600E : CTC41, CTC44, CTC45, CSC4, et HT29). Analyse statistique : Unpaired t test $n > 4$. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. **C.** IC50 des lignées de CRC pour le FIRI (5FU+SN38). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. **D.** Expression relative des ARNm codant pour des protéines impliquées dans la résistance aux chimiothérapies (UGT1A/1, ABCG2). L'expression des ARNm est exprimée par rapport au niveau moyen d'expression de toutes les lignées cellulaires. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n > 3$, l'analyse statistique a été réalisée par le test U de Mann — Whitney.

L'introduction de la forme BRAF V600E dans des lignées cellulaires portant la forme sauvage promeut une augmentation d'un phénotype de CSC.

Afin de distinguer entre la simple corrélation et la véritable relation de cause à effet entre la mutation BRAF V600E et le phénotype de CSC nous avons introduit la forme mutée de BRAF V600E dans un contexte où seule la forme sauvage de BRAF était exprimée. Afin de s'affranchir d'un effet dû à une surexpression de BRAF (sauvage ou muté) nous avons en parallèle généré une lignée dans laquelle la forme sauvage de BRAF était introduite. Cette lignée constituera notre contrôle idéal pour la suite des expériences. Les figures 34A et 34B montrent par Western Blot que la version mutée BRAF V600E est bien introduite dans le modèle généré et grâce à une approche de FRET, que la phosphorylation de MEK est comparable à celle des lignées cellulaires présentant la mutation BRAF V600E de manière endogène.

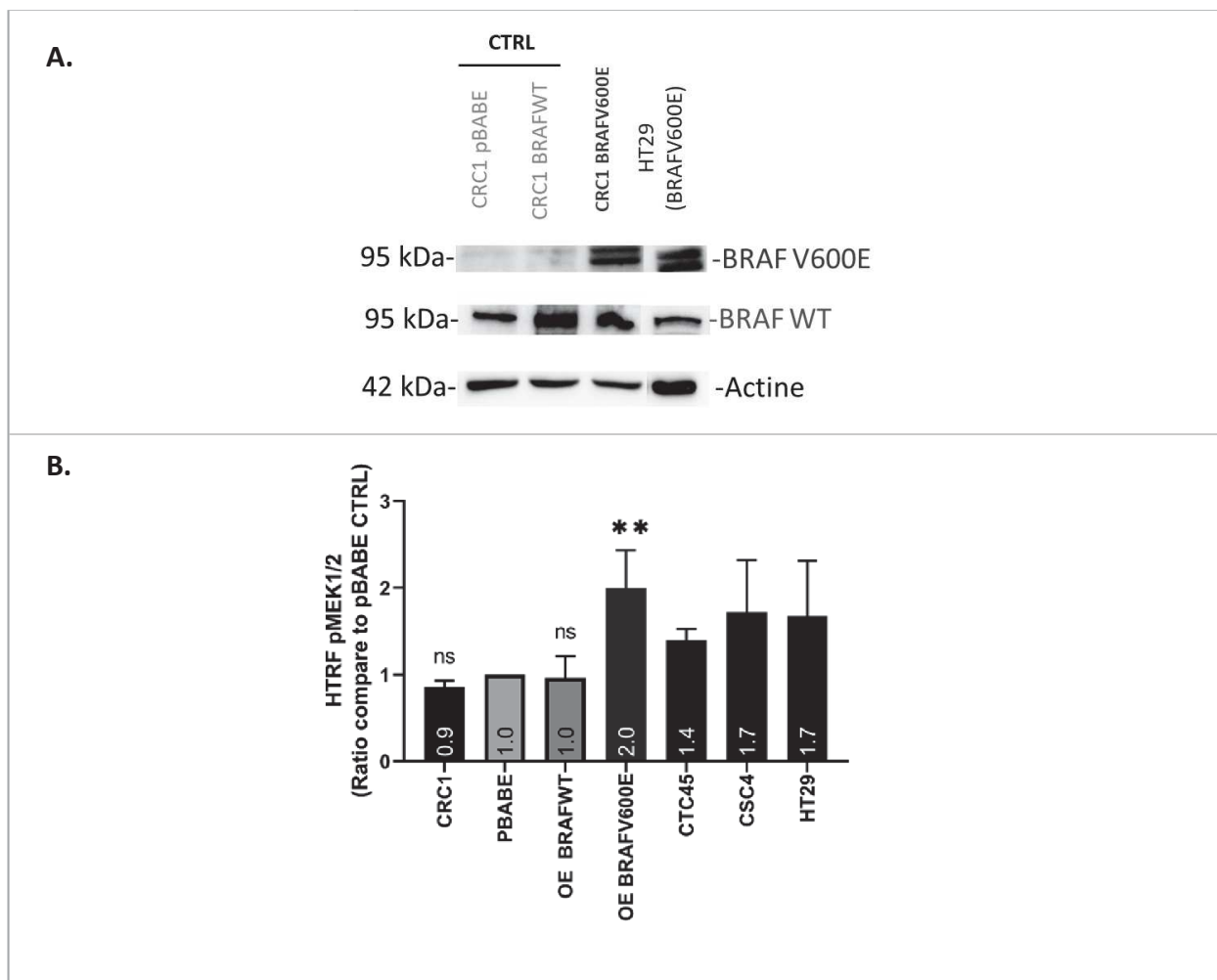


Figure 34 : Validation de la surexpression (OE) de BRAF V600E dans une lignée BRAF WT.

A. Western blot de BRAF V600E des lignées de CRC : CRC1pBABE (lignée BRAF WT, infection virus plasmide vide), CRC1 BRAF WT (surexpression de la forme BRAF WT), CRC1 BRAF V600E (surexpression de BRAF V600E). HT29 lignée possédant la mutation BRAF V600E. **B.** Analyse de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) du niveau d'activité de MEK1/2 (kinases en aval de BRAF). En contrôle d'activité nous avons comparé les lignées présentant la mutation BRAF V600E : HT29, CTC45, et CSC4. Analyse statistique : Unpaired t test n=5 (sauf CTC45, CSC4, HT29 n=2). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm DS. OE = overexpression qui est la traduction du mot surexpression en anglais.

La figure 35A indique que l'introduction de la forme sauvage de BRAF n'a aucune incidence ni sur l'expression du marqueur CD26 (marqueur de CSC) ni sur l'activité enzymatique déshydrogénase ALDH alors que la forme mutée les augmente significativement. Par ailleurs d'un point de vue fonctionnel, seule l'introduction de la forme mutée de BRAF promeut la capacité des cellules à former des sphères ce qui suggère une augmentation du phénotype de CSC (Figure 35B et 35C). Puisque l'expérience de référence pour démontrer fonctionnellement que le potentiel de CSC a été augmenté suite à l'introduction de la forme mutée de BRAF est de challenger les capacités d'initiation tumorale des cellules *in vivo*. Les cellules comportant les différentes constructions ont été injectées en dilution limite (50, 500 et 5000 cellules) en sous cutanée dans des souris nude et le suivi d'initiation tumoral est en cours de réalisation. Par la suite, pour tester l'impact de cette mutation sur l'autorenouveau des CSC une seconde injection des cellules tumorales de la première série de souris sera réalisée.

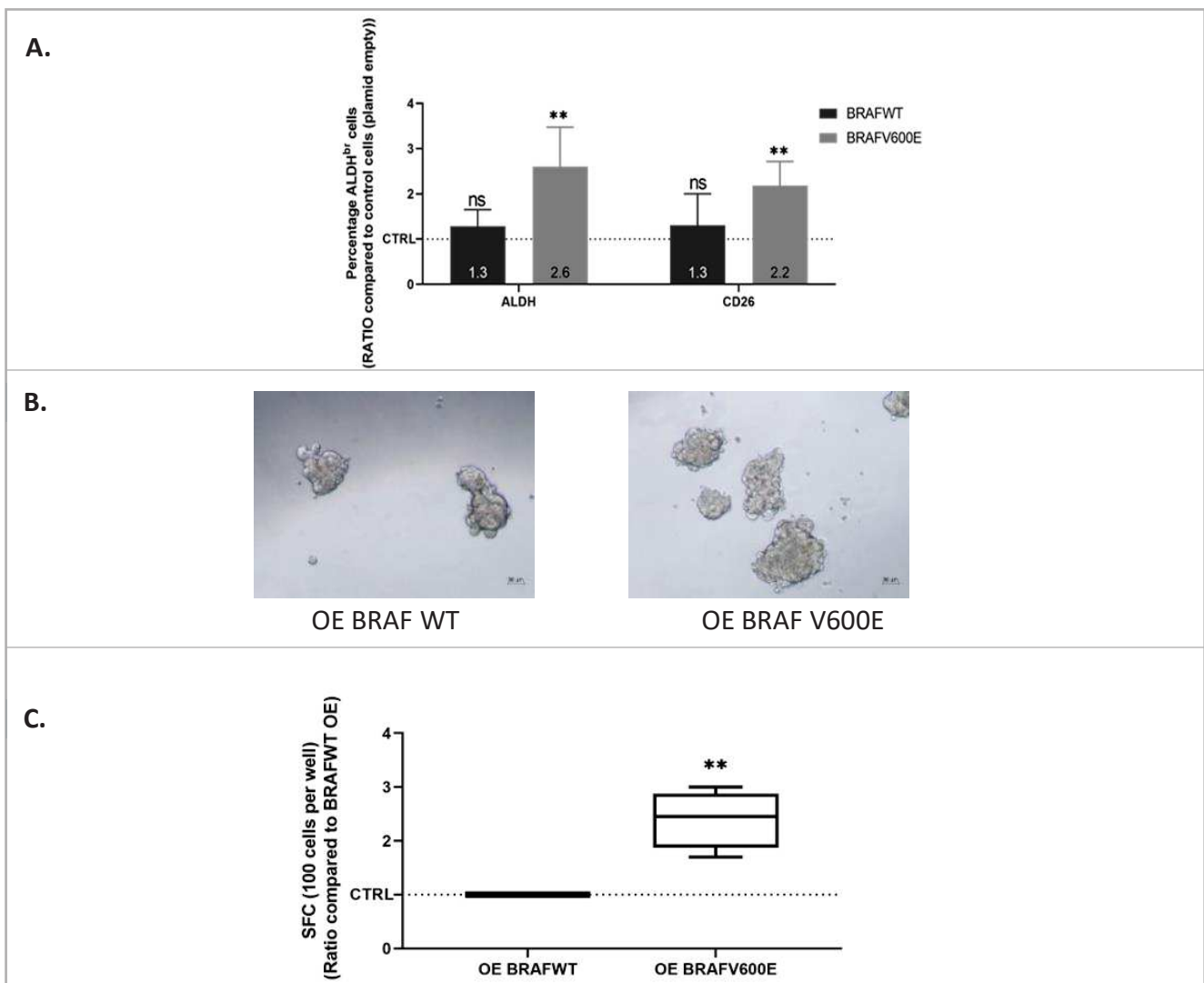


Figure 35 : Augmentation du phénotype de CSC après ajout de la forme BRAF V600E dans une lignée BRAF WT.

A. Expression des marqueurs de CSC (activité de l'ALDH, expression de CD26 dans les lignées CRC1 CTRL, CRC1 BRAF WT (surexprimée), CRC1 BRAF V600E. n=5). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, analyse statistique : Unpaired t test. Les résultats sont relativisés par rapport au CTRL. **B.** Photos de sphères après 7 jours de culture en suspension. OE= surexpression. **C.** Capacité à former des sphères (SFC). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, analyse statistique : Unpaired t test et relativisés par rapport au CTRL (OE BRAF WT) n=4

Afin de poursuivre la caractérisation des cellules de CRC portant une protéine BRAF mutée nous avons ensuite comparé leurs capacités invasives grâce à un test en chambre de Boyden. Les figures 36A et 36B démontrent clairement que la surexpression de la forme sauvage de BRAF augmente l'invasion des cellules tumorales et que cet effet est potentialisé lorsqu'il s'agit de la forme mutée. Des expériences d'injection intrasplénique sont prévues afin de valider cette observation.

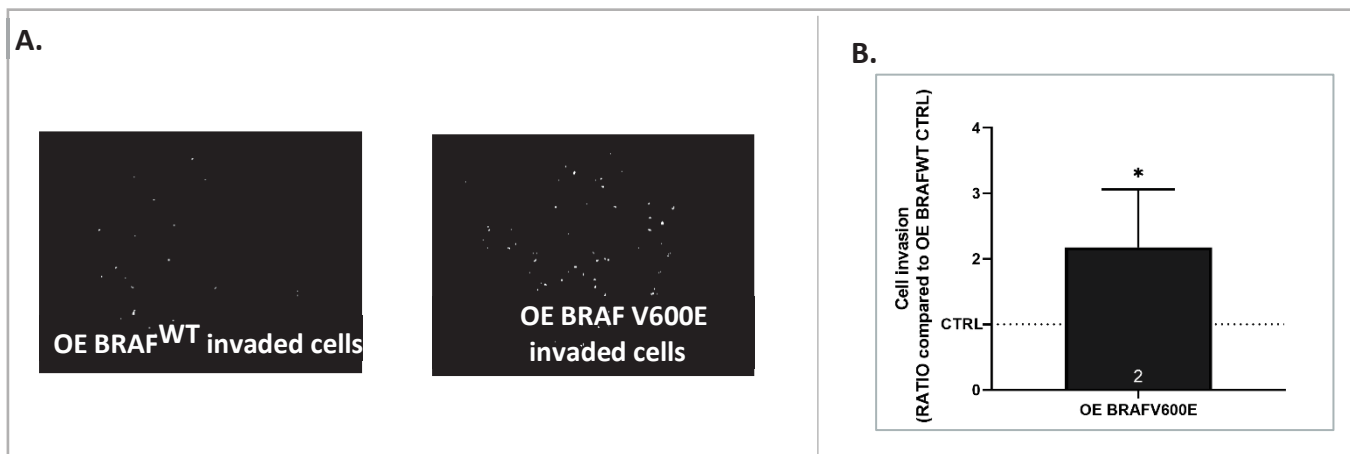


Figure 36 : L'ajout de BRAF V600E augmente les capacités d'invasion cellulaire.

A. Test d'invasion en chambres de Boyden : photos des cellules marquées avec de la calcéine après 48h. B. Quantification des cellules possédant des capacités d'invasion. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, analyse statistique : Unpaired t test et relativisés par rapport au CTRL (OE BRAF WT) n=4

L'inhibition pharmacologique ou génétique de la forme mutée BRAF V600E augmente le phénotype de CSC

Afin de continuer à comprendre la relation de cause à effet de la mutation BRAF V600E et du phénotype de CSC, nous avons étudié l'impact de deux inhibiteurs spécifiques de BRAF V600E (iBRAF V600E, Figure 37A) sur les propriétés de CSC. Dans un premier temps nous avons vérifié par FRET que la phosphorylation de MEK, rendant compte de l'activité de BRAF, était bien inhibée de 50% en présence des inhibiteurs spécifiques de BRAF V600E (Figure 37B).

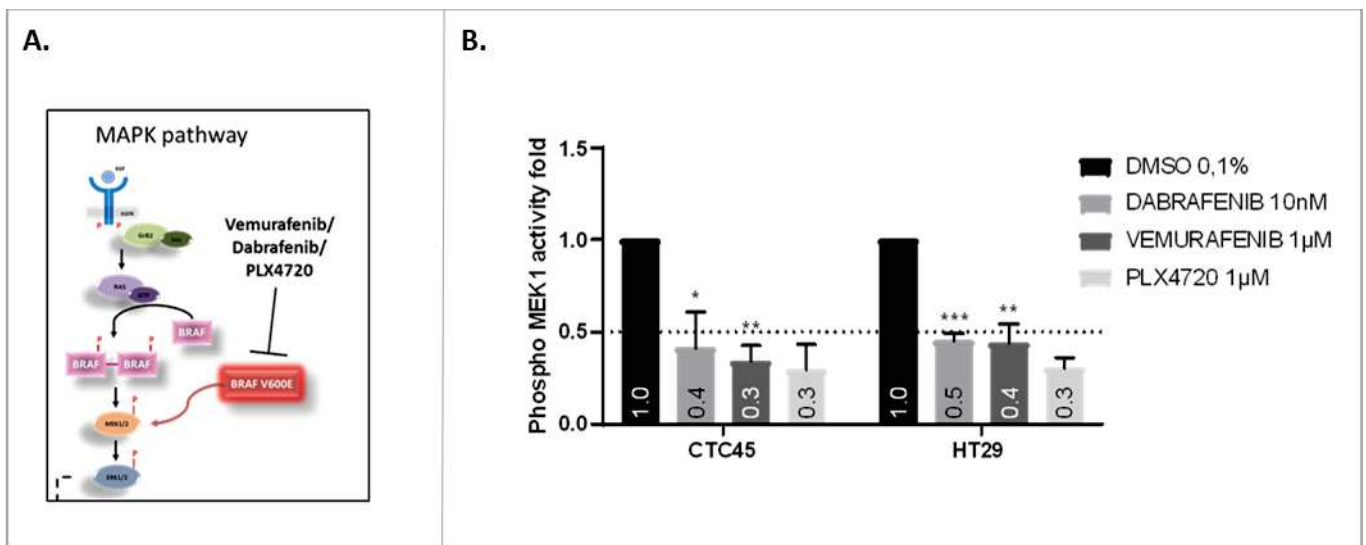


Figure 37: Validation de l'inhibition de BRAF V600E avec des iBRAF V600E

A. Schéma de la voie des MAPK et de l'inhibition pharmacologique de BRAF V600E. **B.** Analyse par FRET de l'activité de MEK1/2 (phosphoMEK1/2) après 72h de traitement avec des iBRAF V600E (Dabrafenib, Vemurafenib, PLX4720). $n > 2$ Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, analyse statistique : Unpaired t test.

De façon surprenante, l'inhibition pharmacologique de BRAF V600E augmente également l'activité aldéhyde déshydrogénase et l'expression de CD26 qui sont deux marqueurs des CSC (Figure 38A). Les 2 inhibiteurs initialement utilisés en clinique (Dabrafenib et Vemurafenib) induisent également une augmentation de la capacité des cellules tumorales de CRC à former des sphères (Figures 38B et 38C). Nous avons ensuite injecté des dilutions limite (50, 500 et 5000) de cellules tumorales de CRC (HT29) avec une mutation BRAF V600E, après traitement de 72 heures au Dabrafenib. Alors qu'aucune différence de prise tumorale n'a été quantifiée lors de la première série d'injections, lorsque les premières tumeurs (du groupe de 500 cellules) ont été dissociées et injectées de nouveau dans d'autres souris ; les souris injectées avec 500 cellules issues des tumeurs provenant de cellules traitées au Dabrafenib ont développé des tumeurs beaucoup plus rapidement (Figure 38D), soit une dizaine de jours avant celles CTRL (non traitées). De plus,

50 jours après l'injection du deuxième groupe de souris, 3 souris sur 5 du groupe contrôle n'avaient pas développé de tumeurs. Dans les deux conditions les groupes de 50 cellules n'ont pas formé de tumeurs.

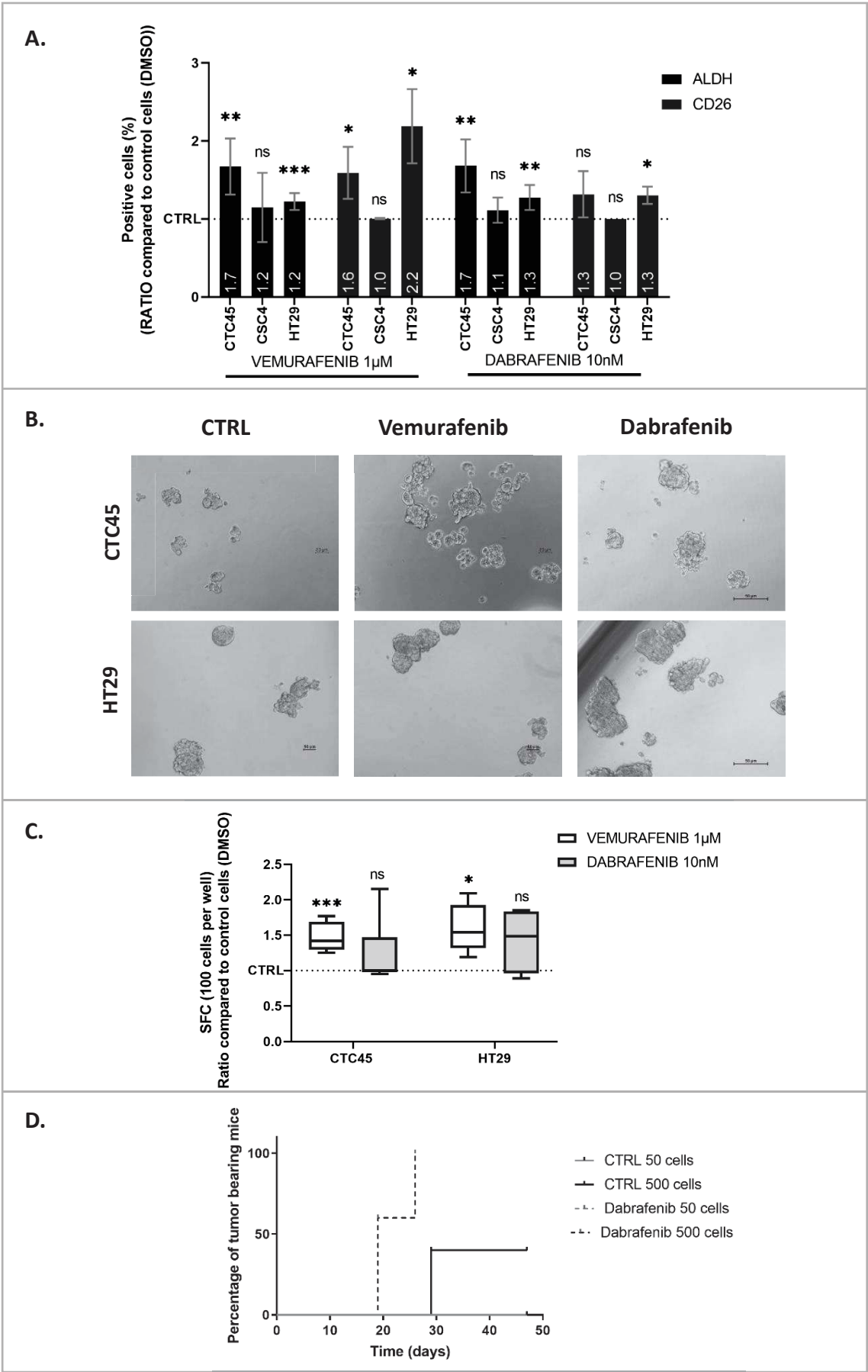


Figure 38 : L'inhibition pharmacologique de BRAF V600E augmente le phénotype de CSC.

A. Activité de l'ALDH et expression de CD26 des lignées portant la mutation BRAF V600E (CTC45, CSC4, HT29) après 72h de traitement avec du Vemurafenib et du Dabrafenib. Les lignées expriment fortement les marqueurs de CSC ce qui rend moins visible l'augmentation induite par le traitement. Par exemple, la lignée CSC4 en condition CTRL exprime à 100% le marqueur CD26, après traitement le niveau d'expression du marqueur est inchangé. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, analyse statistique : Unpaired t test. Les résultats ont été relativisés par rapport au CTRL non traité (DMSO) $n > 3$. **B.** Photos de sphères après 7 jours de culture en suspension pour les lignées CTC45 et HT29 en condition CTRL ou après traitement avec du Vemurafenib ou Dabrafenib. La lignée CSC4 survie en culture en suspension mais ne forment pas de sphères quantifiables. **C.** Capacité à former des sphères (SFC). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, analyse statistique : Unpaired t test. Les résultats ont été relativisés par rapport au CTRL non traité (DMSO) $n > 4$. **D.** Courbe d'apparition des tumeurs dans des souris nudes. Réinjection de cellules après dissociation des tumeurs de la première injection du groupe de 500 cellules. Pour cette seconde injection les dilutions étaient de 500 et 50 cellules. Les conditions de 50 cellules injectées (contrôle ou traités Dabrafenib) n'ont pas formé de tumeur.

Enfin le traitement avec le Dabrafenib des cellules tumorales portant une mutation BRAF V600E induit une augmentation de leurs capacités invasives (figure 39 A et B).

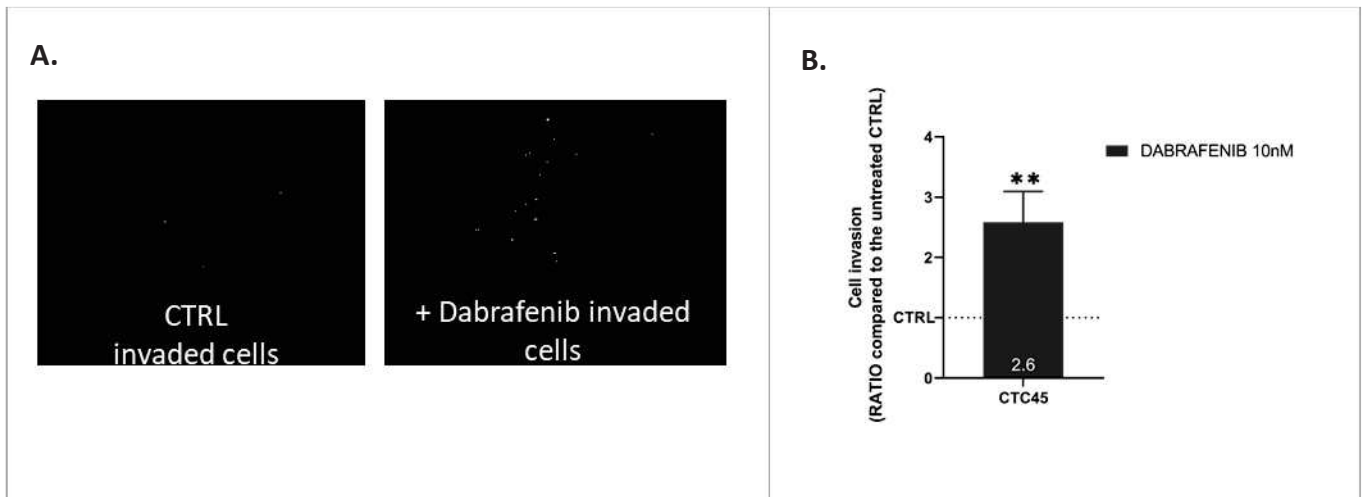


Figure 39 : Augmentation des capacités d'invasion après traitement par du Dabrafenib pour la lignée CTC45

A. Invasion en chambre de Boyden : photos des cellules marquées avec de la calcéine après 48h après la fin du traitement. **B.** Quantification des cellules aux capacités d'invasion). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, analyse statistique : Unpaired t test. Les résultats ont été relativisés par rapport au CTRL non traité (DMSO) $n = 3$.

Les stratégies thérapeutiques récentes dans le CRC proposent une trithérapie visant 3 acteurs clés de la voie des MAPkinases : le récepteur EGFR, MEK et BRAF V600E en utilisant le Cetuximab, le Binimetinib et l'Encorafenib respectivement. Nous avons testé cette combinaison de thérapies ciblées sur le potentiel des CSC. Une fois de plus cette trithérapie augmente non seulement les marqueurs de CSC (CD26 et ALDH) mais aussi la capacité des cellules à former des sphères sur des cellules de CRC portant la mutation BRAF V600E (figures 40A-C).

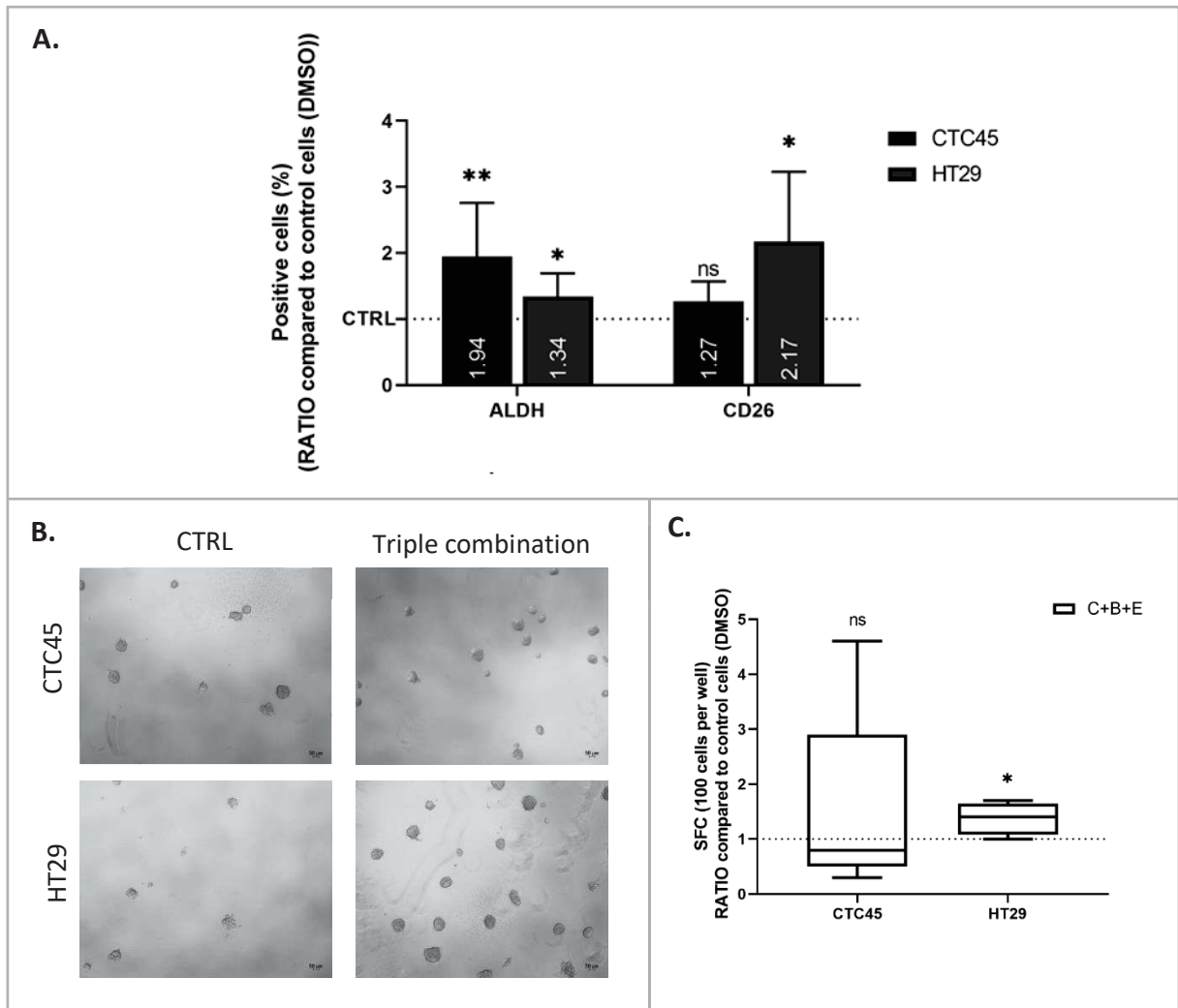


Figure 40 : La triple inhibition de l'EGFR, BRAF et MEK avec du Cetuximab, de l'Encorafenib et du Binimetinib augmente le phénotype de CSC.

A. Quantification des marqueurs de CSC (Forte activité de l'ALDH et expression de CD26) des lignées portant la mutation BRAF V600E (CTC45 et HT29) après 72h de traitement avec la triple combinaison (Cetuximab 50µg/ml ; Binimetinib 15nM ; Encorafenib 15nM). Les résultats sont relativisés par rapport au contrôle non traité. n=5 ; Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD, analyse statistique : Multiple T test. **B.** Photos de sphères après 7 jours de culture en suspension pour les lignées CTC45 et HT29 en condition CTRL ou après traitement (triple combinaison). **C.** Capacité à former des sphères (SFC). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD, analyse statistique : Unpaired t test. Les résultats ont été relativisés par rapport au CTRL non traité (DMSO) n=4.

Afin de s'affranchir de la possibilité d'un effet aspécifique de ces différents inhibiteurs pharmacologiques de la forme mutée BRAF V600E, nous avons inhibé spécifiquement la forme mutée de BRAF par une approche de siRNA. L'inhibition spécifique de l'expression de la forme mutée de la protéine BRAF V600E a été validée par Western Blot (figure 41A) et l'impact de cette inhibition sur la phosphorylation de MEK a été confirmé par FRET (Figure 41B). Les figures 41C à 41E confirment ce que nous avons observé avec les inhibiteurs pharmacologiques sur l'impact de l'inhibition de cette mutation sur l'augmentation du phénotype de CSC.

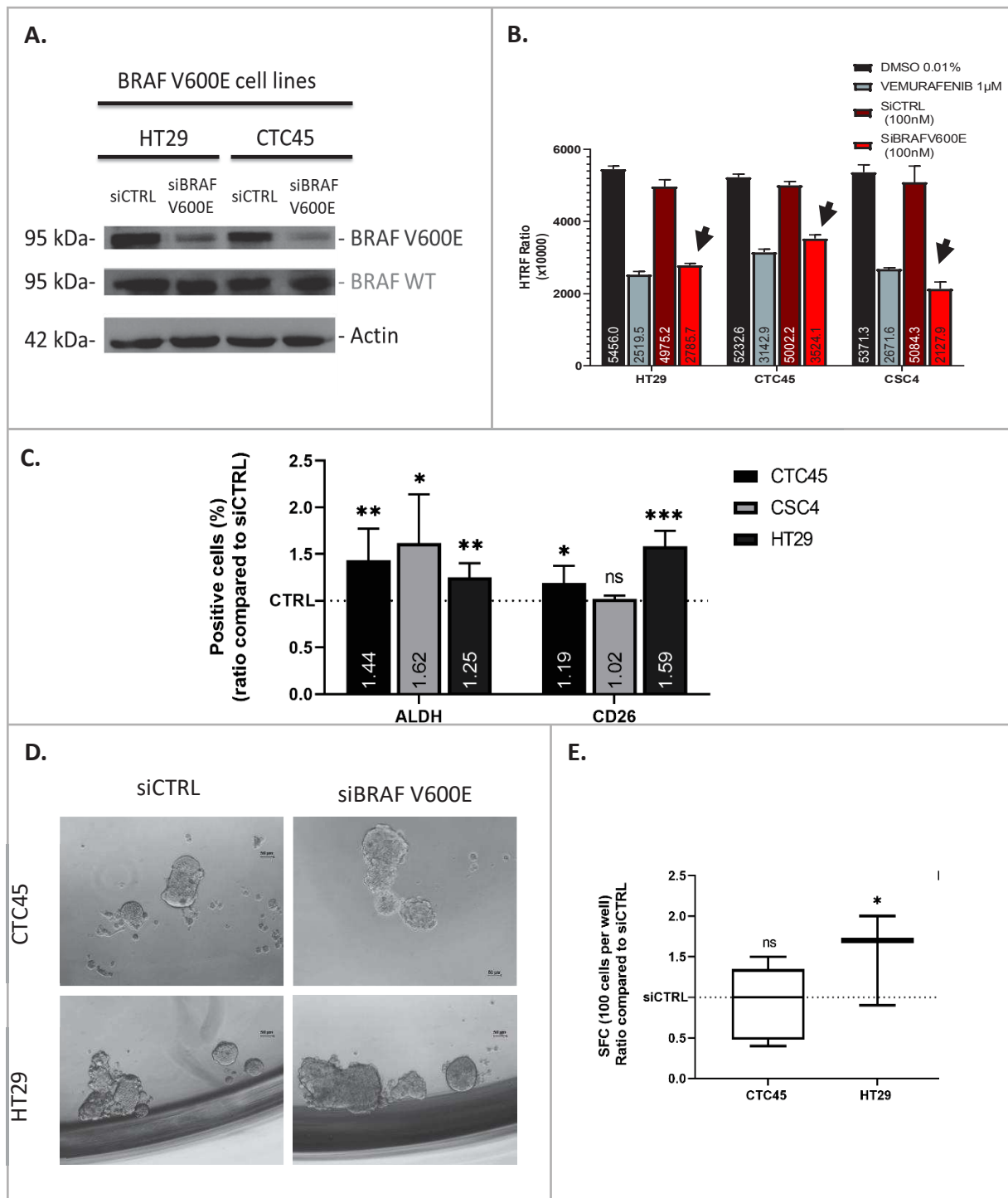


Figure 41 : L'inhibition spécifique de BRAF V600E promeut aussi le phénotype de CSC.

A. Western Blot de BRAF V600E et BRAF WT après 72h de traitement avec un siBRAF V600E des lignées CTC45 et HT29 qui présentent la mutation BRAF V600E. $n=2$ **B.** Analyse par FRET de l'activité de MEK1/2 (phosphoMEK1/2) après 72h de traitement avec un siBRAF V600E ou un iBRAF V600E (Vemurafenib) des lignées CTC45, CSC4, et HT29 ; $n=2$. Figure représentative. **C.** Expression des marqueurs de CSC après 72h de traitement avec un siBRAF V600E des lignées CTC45, CSC4 et HT29. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, analyse statistique : Unpaired T test ; $n>5$. **D.** Photos de sphères après 7 jours de culture en suspension des lignées CTC45 et HT29. **E.** Capacité à former des sphères (SFC). Les résultats ont été relativisés par rapport au siCTRL ; $n=3$. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, analyse statistique : Unpaired T test.

L'activation de la kinase Src serait responsable de l'exacerbation du phénotype CSC en réponse au traitement avec le Dabrafenib

Afin d'élucider le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'activation du phénotype de CSC en réponse au Dabrafenib, une étude de phosphoprotéomique suite au traitement de 2 lignées de CRC mutées sur BRAF a été entreprise en utilisant la technologie Pamgene. Cette technologie détecte l'activité des kinases dans des lysats cellulaires en mesurant la phosphorylation de peptides spécifiques. Des analyses statistiques permettent de fournir une liste des Kinases présentant des fortes modifications d'activité en réponse au Dabrafenib. L'analyse quantitative des peptides phosphorylés communément dans les deux lignées en réponse au Dabrafenib suggère fortement un rétrocontrôle induit par une activation de la kinase Src (figures 42A et 42B). Des études sont en cours afin de validation pour cette activation d'une part et d'autre part pour bloquer ce rétrocontrôle en cotraitant les cellules avec le Dabrafenib et un inhibiteur spécifique de la kinase Src (Bosutinib ou Saracatinib).

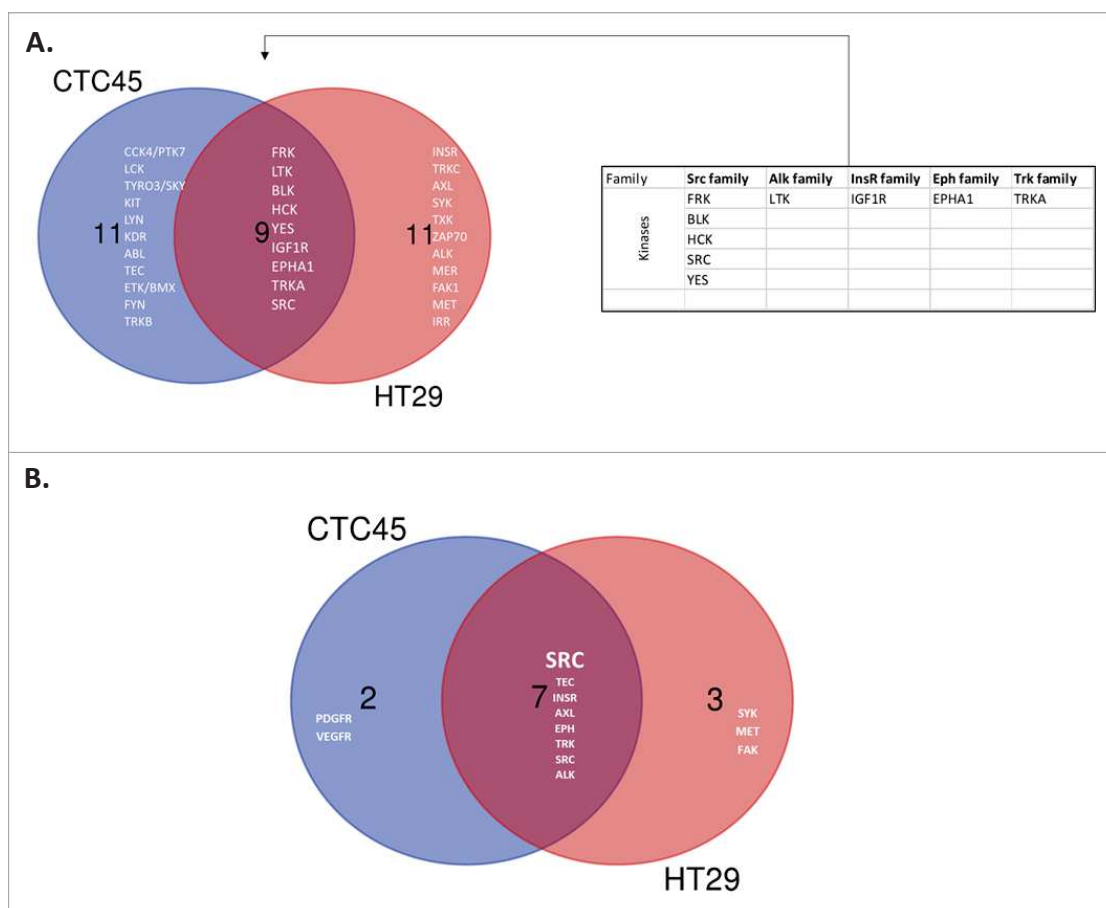


Figure 42 : L'analyse des peptides phosphorylés suggèrent une augmentation d'activité de la voie de signalisation Src

A. Diagramme de Venn des kinases suractivées par le Dabrafenib pour les lignées CTC45 et HT29. Les kinases en commun sont regroupées dans le tableau et classées en fonction de leur voie de signalisation. **B.** Diagramme de Venn des voies de signalisation : la voie des SRC est très active dans les deux lignées après traitements avec du Dabrafenib. D'autres voies de signalisation sont présentes avec une moindre augmentation telles que la voie ALK et InsR.

4 DISCUSSION

Dans ce travail de thèse, nous avons démontré en premier lieu que dans le cancer colorectal (CRC), la mutation BRAF V600E pouvait promouvoir le phénotype de cellules souches cancéreuses (CSC). En effet, la population de CSC est fortement représentée dans les lignées portant la mutation, ce qui suggère une relation entre la voie de signalisation des MAPkinases et la population des CSC. Par la suite, nous avons observé que les stratégies de combinaisons d'inhibiteurs de la voie des MAPkinases qui semblent être prometteuses pour les patients n'impactent pas le phénotype fort de CSC dans le CRC (Figure 43). Ainsi, nous nous attendons à des récurrences des patients traités. Pour finir, nous proposons que la signalisation de la famille des kinases SRC soit activement impliquée dans les processus de résistance du CRC aux inhibiteurs de BRAF V600E.

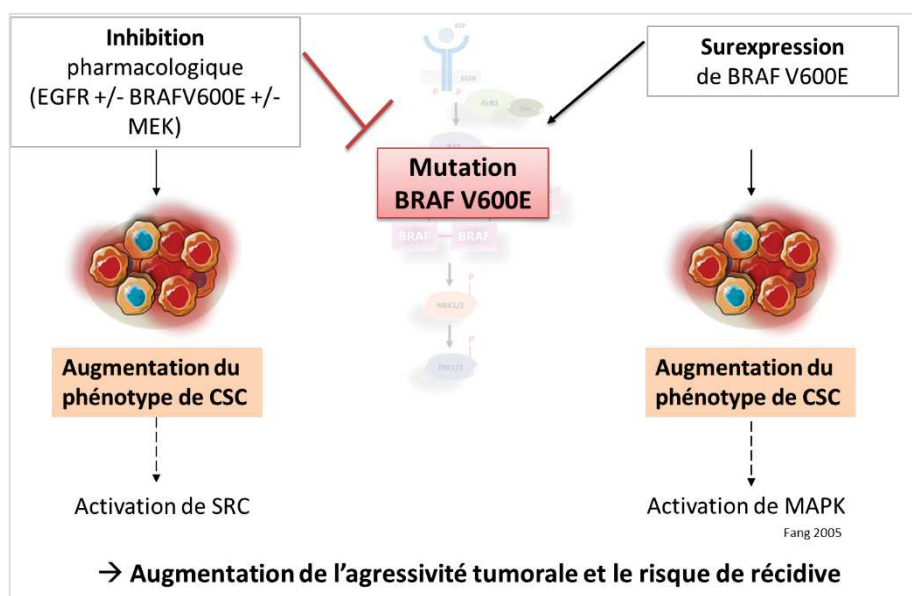


Figure 43: Figure bilan : la mutation BRAF V600E dans le CRC

L'inhibition et la surexpression de BRAF V600E dans le CRC a pour effet d'augmenter le phénotype de CSC dans les cellules tumorales du côlon. La modulation de l'activité de voies de signalisation est activement impliquée dans l'augmentation de l'agressivité tumorale et le risque de récurrence après traitement. Source : O.Villersonce

La mutation BRAF V600E et le phénotype de CSC : de nombreuses études ont étudié le rôle de BRAF V600E en tant qu'oncogène dans de nombreux cancers y compris dans le CRC. Mais peu d'entre elles ont décrit une caractérisation des cellules tumorales du côlon portant une mutation BRAF V600E et notamment un lien avec les CSC. Par exemple, l'étude de l'équipe de Pintzas démontre que l'ajout de BRAF V600E par transfection de plasmide dans une lignée de CRC (Caco-2) est suffisant pour augmenter la capacité d'initiation tumorale des cellules (Oikonomou et al. 2009). Dans ce papier,

l'ajout de BRAF V600E a aussi provoqué des altérations du cycle cellulaire, rendant la multiplication cellulaire plus rapide. De plus, cette insertion a induit la diminution de l'expression des gènes de réparation à l'ADN ce qui a modifié le profil moléculaire des cellules de MSS à MSI. Une autre étude, sur la même lignée cellulaire a démontré que l'ajout ectopique de BRAF V600E par transfection améliore les capacités de migration et d'invasion des cellules (Herr et al. 2015). De plus, dans le modèle d'organoïdes sain, l'induction de BRAF V600E engendre une dysplasie tissulaire et une dédifférenciation cellulaire de type fœtal (Reischmann et al. 2020). Ces études confortent l'ensemble de nos résultats démontrant que la mutation BRAF V600E promouvrait le phénotype de CSC. Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin d'étudier d'autres caractéristiques des CSC telles que la chimiorésistance et la capacité d'initiation tumorale. Nous avons traité des cellules surexprimant la forme BRAF sauvage ou la forme mutée BRAF V600E avec du FIRI (combinaison de chimiothérapies fréquemment administré dans le CRC, 5FU+irinotecan) (Figure 44A). De façon surprenante, dans ce modèle, l'ajout de BRAF V600E semble augmenter la sensibilité des cellules aux FIRI alors que les tumeurs portant la mutation sont très résistantes à tous les traitements (Seligmann et al. 2017). Afin de comprendre ce résultat nous avons émis deux hypothèses :

La première hypothèse est que les cellules ayant subi l'insertion ectopique de BRAF V600E arrêtent leur prolifération cellulaire en présence d'agents de chimiothérapie. Elles seraient bloquées dans la phase de réplication de l'ADN du cycle cellulaire afin de pouvoir réparer les dommages induits par le SN38 (métabolite actif de l'irinotécan). Ainsi lors de l'analyse du test de toxicité cellulaire, il y a moins de cellules vivantes au bout de 72h lors de l'ajout de la protéine mutée.

À l'inverse, la seconde hypothèse est que l'ajout de BRAF V600E augmente la prolifération cellulaire rendant ces cellules plus sensibles aux agents cytotoxiques. En effet, en absence d'un fond génétique permissif à la survie avec des altérations importantes, les cellules finissent par mourir. Nous savons que la cancérogenèse médiée par BRAF V600E implique la mutation des gènes de réparation à l'ADN et des suppresseurs de tumeurs. Ces mutations garantissent la survie de cellules qui ont souvent une forte instabilité génétique. Toutes ces caractéristiques jouent probablement un rôle dans la sensibilité des cellules aux thérapies. Ces deux pistes sont à approfondir avec d'autres lignées cellulaires ainsi qu'avec des expériences de quantification de la prolifération, des analyses de cycle cellulaire et du statut mutationnel des lignées. La figure 44B démontre que l'insertion de BRAF V600E augmente la viabilité des cellules, ce qui laisserait supposer une augmentation de la prolifération cellulaire.

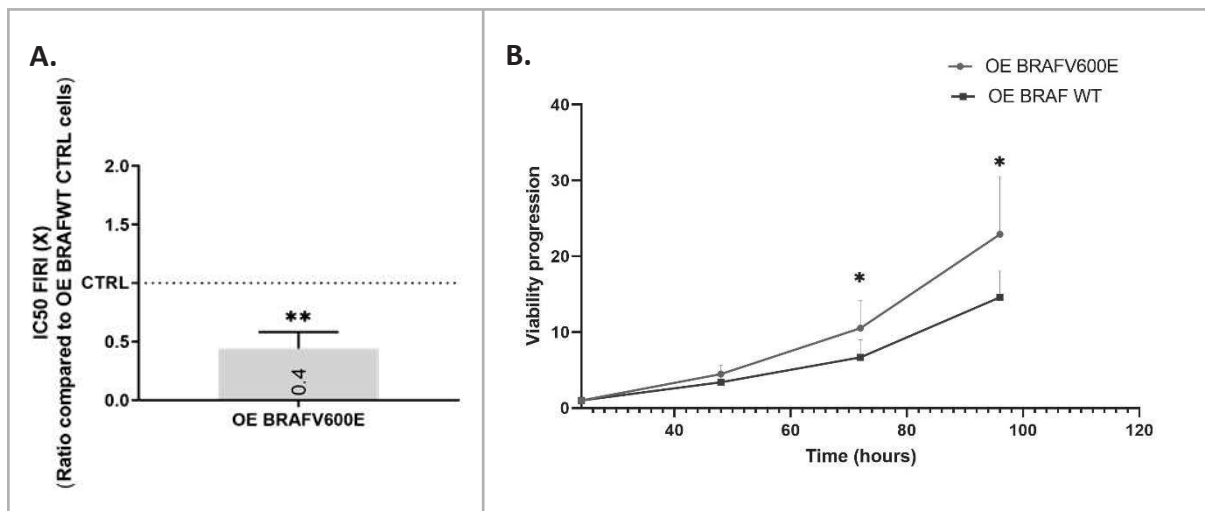


Figure 44: L'ajout de BRAF V600E sensibilise la lignée au FIRI (5 FU+ SN38)

A. IC50 de la lignée CRC1 surexprimant BRAF V600E pour le FIRI (5FU+SN38). Les résultats ont été relativisés par rapport au contrôle (Lignée surexprimant BRAF WT = OE BRAF WT) ; n=3. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, analyse statistique : Unpaired T test. **B.** Viabilité cellulaire des lignées OE BRAF WT et OE BRAF V600E. Les mesures sont réalisées toutes les 24 heures pendant 96 heures. Les résultats ont été relativisés à 24h ; n=6. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, analyse statistique : Unpaired T test.

La monothérapie ciblant BRAF V600E : l'impact de l'inhibition de BRAF V600E, dans la littérature, fournit des résultats discordants.

Par exemple, l'équipe de Brummer en 2015 réalise des expériences d'inhibition (Knock out) inducible et pharmacologique de BRAF V600E sur des lignées de CRC mutées de statut MSS : HT29 et COLO 205. L'équipe propose que le ciblage de BRAF V600E avec des agents pharmacologiques (PLX4720, Vemurafenib, and Dabrafenib) ou par inhibition transcriptionnelle (shARN) diminue fortement l'activation de MEK-ERK ce qui réduit la motilité cellulaire (Herr et al. 2015). L'interprétation finale est que ces lignées cellulaires sont sensibles au ciblage de BRAF V600E. En réalité, les résultats diffèrent en fonction de la lignée, l'expression des protéines de jonction cellulaire impliquées dans le phénotype de migration est augmentée pour HT29 et diminuée pour les COLO 205. Cela signifie que les COLO 205 ont un phénotype moins épithélial, plus mésenchymateux ; elles sont donc plus enclines à migrer. Des expériences supplémentaires sur d'autres lignées cellulaires sont nécessaires afin de conclure. L'équipe de Kopetz, publie des résultats suggérant la résistance des cellules cancéreuses de CRC aux inhibiteurs de BRAF V600E (iBRAF V600E) (Mao et al. 2013). Premièrement, elle démontre que les lignées cellulaires de CRC ont une voie des MAPK-ERK plus active que celles de mélanomes. Cependant, l'activation de MEK-ERK est moins importante. Cela suppose que BRAF V600E à un moins fort pouvoir d'activation de MEK dans le CRC que dans le mélanome. C'est aussi une raison pour laquelle les iBRAFs ont moins d'effet dans le CRC que dans le mélanome. Ensuite, l'équipe démontre que l'inhibition

pharmacologique de BRAF V600E avec PLX4720 (iBRAF V600E) dans le CRC est efficace mais que les mutations activatrices de la voie des PI3K/AKT induisent une résistance.

Pour finir, en 2020, l'équipe de Balaguer démontre que le Dabrafenib (inhibiteur de BRAF V600E utilisé en combinaison dans le CRC) est un fort agoniste de PXR (pregnane X receptor) (Creusot et al. 2020). PXR est un récepteur nucléaire orphelin qui régule le métabolisme des xénobiotiques (molécules d'origine étrangère à l'organisme) dans le foie. Les membres de mon équipe ont démontré qu'il est particulièrement impliqué dans les résistances à l'irinotécan dans le CRC (Raynal et al. 2010). Plus récemment, ils ont également montré que PXR avait une activité exacerbée dans la population des CSC et qu'il était largement impliqué dans la résistance aux traitements (Planque et al. 2016). La forte activation de PXR par le Dabrafenib aurait un impact sur la résistance des cellules à ce traitement. C'est une piste que nous allons envisager avec des analyses des niveaux d'activité de PXR dans plusieurs lignées mutées BRAF V600E et sauvage en absence et en présence du Dabrafenib. Puis nous allons étudier la résistance des cellules cancéreuses à des iBRAF V600E n'activant pas PXR (inhibiteurs obtenus grâce à une collaboration avec l'équipe de Gilles Labesse, CBS2).

De plus, il faut souligner que l'activation de PXR par le Dabrafenib a une forte importance clinique, en effet, cela peut impacter négativement la métabolisation d'autres molécules, dont celles fournies en combinaison. Ces molécules seraient plus rapidement dégradées, et auraient un effet amoindri. Les combinaisons en essai clinique associant le Dabrafenib ont des taux de réponses (proportion de patients avec une réduction objective de la tumeur) généralement plus faibles (en comparaison avec d'autres combinaisons) (Tableau 4).

Tableau 4: Taux de réponse des combinaisons incluant le Dabrafenib dans le CRC

Combinaisons	Taux de réponse
Inhibiteur de RAF+ Inhibiteur de MEK : Dabrafenib + Trametinib (Corcoran et al. 2015)	12%
Inhibiteur de RAF+ inhibiteur de MEK+anti-EGFR Dabrafenib + Trametinib + Panitumumab (Corcoran et al. 2018)	21%

À tous ces travaux s'ajoutent les résultats d'études cliniques qui démontrent une résistance innée (absence de réponse aux traitements) ou « mixte » (réponse courte aux traitements) des patients avec un CRC. La résistance dite « mixte » est issue de mécanismes cellulaires mis en place sur des temps plus longs (Hyman et al. 2015; Gomez-Roca et al. 2014).

Tous ces résultats démontrent que les mécanismes de résistance aux iBRAFs ne sont pas encore bien définis. Des études supplémentaires sur un plus grand nombre de modèles cellulaires fourniront des éléments de compréhension supplémentaires.

Face à la résistance démontrée aux iBRAf V600E, l'équipe de Bernardis propose que la résistance aux IBRAF V600E soit due à une surexpression de l'EGFR et à la suractivation en aval de la voie des PI3K-AKT (mécanisme détaillé [1.3.2.5.2 L'activation par rétroaction directe des TKs](#)) (Prahallad et al. 2012). L'équipe suggère que l'utilisation des iBRAFs et d'inhibiteurs de l'EGFR pourrait sensibiliser les cellules aux traitements. Nous avons expérimenté cette combinaison et avons découvert qu'après seulement quelques jours (72h) la double inhibition n'a pas plus d'effet sur la population de CSC que la simple inhibition (Figure 45A-C). Malgré l'inhibition de l'EGFR les CSC restent résistantes aux iBRAFs. En effet, les expériences de l'équipe de Bernardis sont réalisées sur des temps très courts soit 6h après le traitement et les effets observés sont rapidement perdus. Cela dit, leurs résultats furent à l'origine d'études et d'essais cliniques combinant des iBRAFs à des anti-EGFR. Différentes combinaisons ont été proposées (Cetuximab plus le Vemurafenib, ou Dabrafenib plus le Panitumumab (anti-EGFR)), ainsi que des composés tel que le (BGB-283) qui est un composé benzoimidazole tricyclique fusionné capable d'inhiber simultanément BRAF et l'EGFR (Tang et al. 2015).

Malheureusement la double combinaison confère des taux de réponse faibles (inférieur à 30%) (Caputo et al. 2019). D'autres études concluent que la double inhibition (iBRAFs et anti-EGFR) a bien

un effet sur la voie des MAPK mais avec un degré beaucoup moins important que ceux obtenus par monothérapie dans le mélanome (Corcoran et al. 2015).

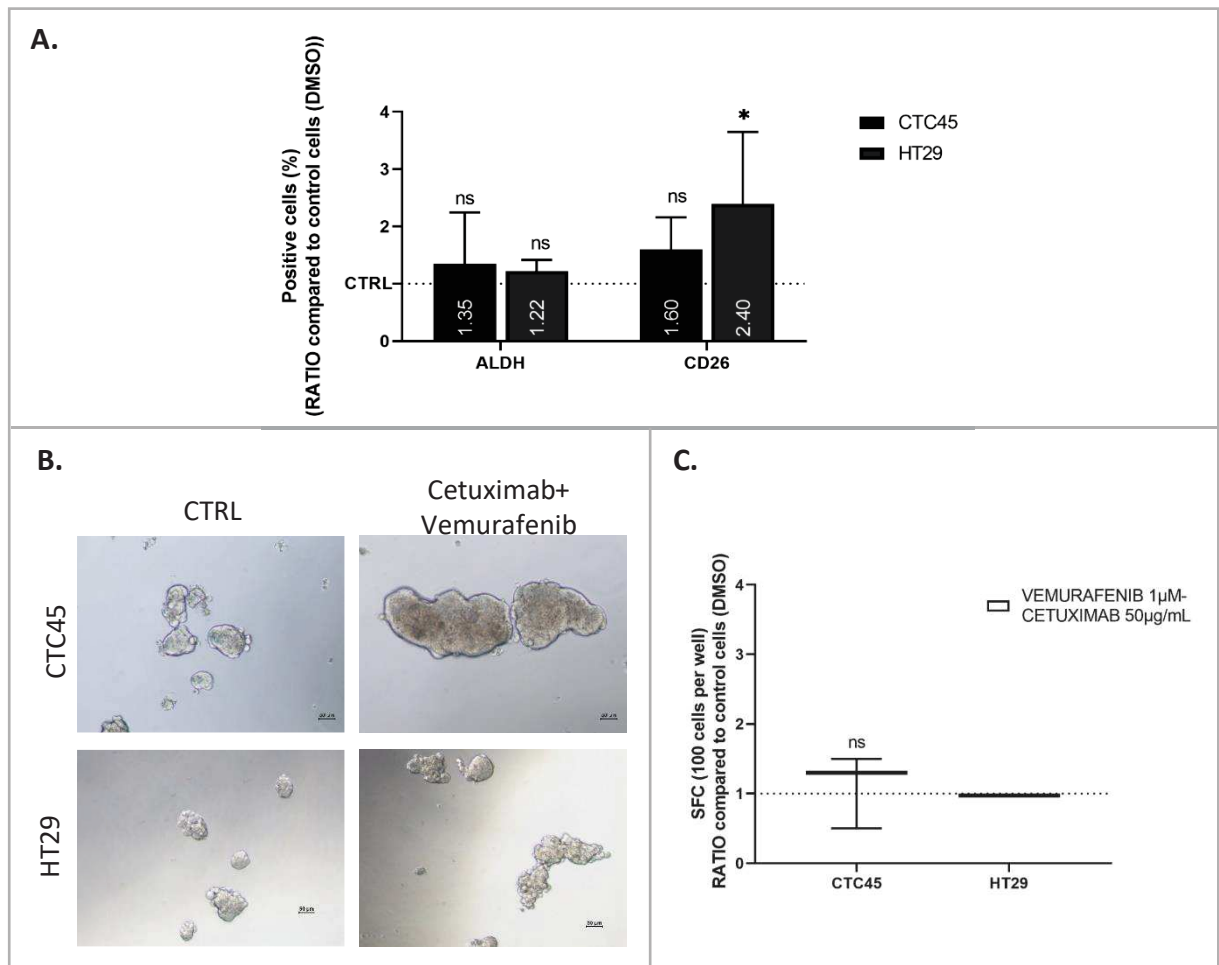


Figure 45: La double thérapie Vemurafenib et Cetuximab ne diminue pas l'expression des marqueurs de CSC

A. Quantification des marqueurs de CSC (Forte activité de l'ALDH et expression de CD26) des lignées portant la mutation BRAF V600E (CTC45 et HT29) après 72h de traitement avec la double combinaison (Vemurafenib 1 μ M et Cetuximab 50 μ g/ml). Les résultats sont relativisés par rapport au contrôle non traité. $n > 3$; Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, analyse statistique : Multiple T test. **B.** Photos de sphères après 7 jours de culture en suspension pour les lignées CTC45 et HT29 en condition CTRL ou après traitement (double combinaison). **C.** Capacité à former des sphères (SFC). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, analyse statistique : Unpaired t test. Les résultats ont été relativisés par rapport au CTRL non traité (DMSO) $n = 3$ ($n = 1$ pour HT29). Résultats préliminaires relativisés par rapport au contrôle non traité $n = 3$. Lignée cellulaire CTC45(BRAF V600E).

Le statut MSI dans le CRC-BRAF V600E : nous avons aussi étudié le phénotype de CSC dans une lignée BRAF V600E de statut MSI, les cellules RKO. Ce sous-type est associé à une bien meilleure survie (plus de 70%) à 5 ans (Samowitz et al. 2005). La stratégie thérapeutique des patients atteints de CRC-MSI-BRAF V600E est l'immunothérapie (Lièvre et al. 2020). En effet, ce sous type est classé CMS1 dans la classification moléculaire (Smeby et al. 2018). Ce groupe est associé à une forte infiltration immunitaire

et a des bons taux de réponse aux traitements (>50%) indépendamment du profil mutationnel de BRAF (Overman et al. 2018).

L'inhibition pharmacologique de la lignée RKO (BRAF V600E-MSI) semble effectivement diminuer la population de CSC (Figure 46). Il nous faudra par la suite, déterminer les mécanismes responsables qui peuvent être la différenciation des CSC ou la mort cellulaire.

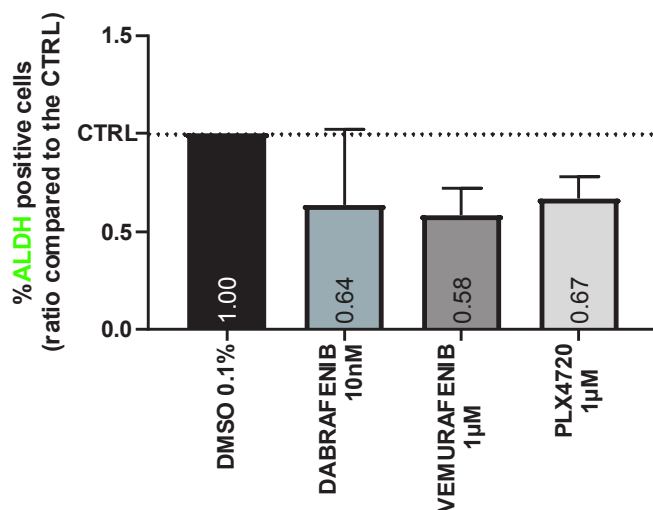


Figure 46: L'inhibition pharmacologique de BRAF V600E dans la lignée MSI, RKO, semble impacter la population des CSC

Résultats préliminaires $n=2$. L'inhibition pharmacologique de l'activité de BRAF V600E avec trois agents différents (Dabrafenib, Vemurafenib et PLX4720). Les cellules sont traitées 72h. Les résultats ont été relativisés par rapport au CTRL (DMSO)

BRAF V600E et la classification moléculaire : La mutation BRAF V600E est généralement retrouvée dans 2 classes moléculaires du CMS : CMS1 (MSI, immunitaire) et CMS4 (mésenchymateux/phénotype souche) (Barras et al. 2017). Les tumeurs CRC-BRAF V600E-MSI appartiennent en majorité à la classe CMS1. Celles de statut MSS sont plus associées à la classe CMS4, elles ont donc une forte signature de cellules souches. De plus, les tumeurs CRC-BRAF V600E-MSS classées CMS4 sont rattachées au sous type d'expression génique BM1 qui est associé à une forte activité de la voie des MAPkinases (Barras et al. 2017). En résumé, les tumeurs BRAF V600E-MSS ont une forte activité de la voie des MAPK et un fort phénotype de CSC, ces informations sont en concordance avec notre étude.

BRAF V600E dans le mélanome : Grâce à une collaboration avec l'équipe d'Alain Eychene à l'institut Curie à Orsay, nous avons analysé l'activité enzymatique de l'ALDH (marqueur de CSC) dans des lignées de mélanome afin de déceler une corrélation entre les mutations BRAF et RAS et les CSC (Figure 47). En comparaison avec les lignées BRAF/RAS sauvages (WT), les lignées BRAF V600E et RAS mutée (RAS MT) semblent avoir une plus forte proportion de CSC ALDH^{élevée}. Les mutations de la voie des MAPkinases dans ce contexte semblent augmenter la population souches ALDH^{élevée}. Cet enrichissement est plus important pour les lignées RAS MT. Nous savons que pour ce cancer, la mutation BRAF V600E est associée à un meilleur pronostic de survie, car ces patients peuvent bénéficier des iBRAFs (Kopetz et al. 2015)

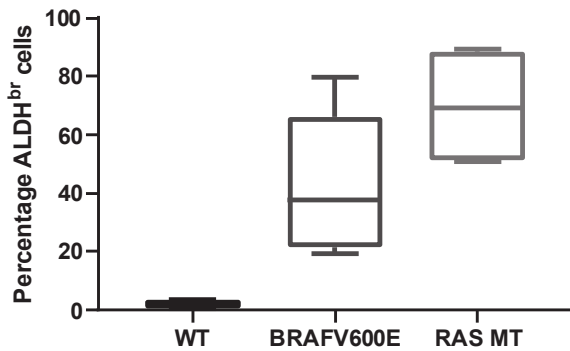


Figure 47: Activité de l'ALDH dans des lignées de mélanomes

Analyse réalisée sur 2 lignées RAS/BRAF sauvage (lignée FON, LEB); 5 lignées RAS mutées (lignée SBCL2, C8161, WM852, WM1361), et 5 lignées BRAF V600E (lignée MEL888, MEL501, SK28, ROB, et DAJU).

Etant donné les assez bons résultats de l'inhibition de BRAF V600E chez les patients avec un mélanome, nous avons entrepris d'analyser le phénotype des cellules après inhibitions pharmacologique et génétique de BRAF V600E sur une lignée de mélanome MEL501 (BRAF V600E) (Figure 48A-B). Les traitements des cellules avec du Vemurafenib ou par inhibition transcriptionnelle (siBRAF V600E) ont radicalement diminué la population de CSC de la lignée (plus fortement que pour la lignée RKO-MSI). Nos résultats sont en concordance avec les données cliniques (Chapman et al. 2011). Les rechutes liées à ce traitement sont causées par la pression de sélection induite par les iBRAF V600E. Cela permet l'apparition de mutations supplémentaires réactivant la voie des MAPkinases ou suractivant celle des PI3K-AKT (H. Shi et al. 2014; Luebker et Koepsell 2019)

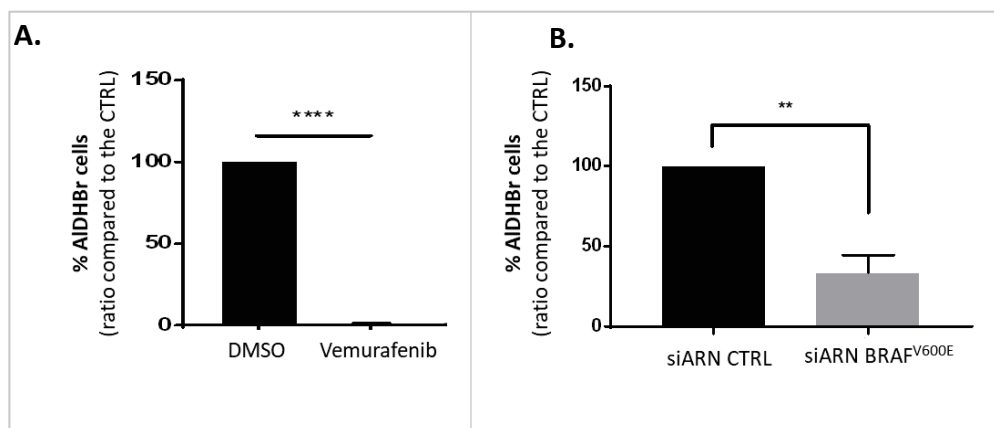


Figure 48: Inhibition pharmacologique et génétique de BRAF V600E dans une lignée de mélanome MEL501 (BRAF V600E).

A. Diminution drastique de la population ALDH^{élevée} après traitement avec du Vemurafenib (iBRAF V600E). Les cellules sont traitées à 5µM pendant 72h. Moyenne ± SEM, n=4, ****p<0,001). **B.** Diminution de la population ALDH^{élevée} après inhibition de l'expression de la protéine BRAF V600E. (moyenne ± SEM, n=3, **p<0,01).

Les études cliniques dans le CRC : la monothérapie ciblant BRAF V600E n'est plus proposée aux patients atteints de CRCm et porteurs de la mutation au vue de son inefficacité sur la survie des

patients. Nos travaux ajoutent l'information supplémentaire qui est l'inefficacité de cette stratégie thérapeutique sur la population de CSC. À la suite de la publication de l'équipe de Bernards, les cliniciens ont proposé comme pour le mélanome, la combinaison d'inhibiteurs d'acteurs de la voie des MAPK. L'idée étant d'empêcher les boucles de rétroaction compensatoire afin d'augmenter le bénéfice clinique. L'étude clinique de BEACON en 2019 a fourni des résultats décrits comme étant encourageants. En effet, elle proposait la triple inhibition de la voie des MAPkinases en ciblant l'EGFR (Cetuximab), BRAF V600E (Encorafenib) et MEK (Binimetinib) (description plus détaillée en [1.3.2.6.3 iBRAF V600E, iMEK et anti-EGFR](#)) (Kopetz et al. 2019). Ce protocole donné en seconde ligne aux patients permet une augmentation de 3 mois de la survie des patients. Il faut cependant souligner que la population de référence a été traitée avec des chimiothérapies ± Cetuximab. Cette double combinaison n'apporte pas de bénéfice clinique ce qui ne permet pas d'évaluer à juste titre les trois mois de bénéfice obtenu (Di Nicolantonio et al. 2008). L'actualisation récente des données ne montre finalement pas de bénéfice en terme de taux de réponse entre la triple combinaison et la double (Encorafenib+ Cetuximab) (Lièvre et al. 2020).

La recherche d'une combinaison idéale semble être fastidieuse car la diaphonie entre les voies de signalisation n'est pas complètement décryptée. De plus, des données non publiées semblent suggérer que l'Encorafenib active également PXR, ce qui pourrait diminuer l'efficacité de la combinaison.

Les stratégies thérapeutiques envisageables :

SRC est un oncogène appartenant à la superfamille des non-récepteurs à tyrosine kinase (SFK). Cette voie de signalisation est activée par la voie des PI3K-AKT, la voie des MAPK, le facteur VEGF, ainsi que des interleukines et des modifications du cytosquelette (Yeatman 2004). La surexpression de la famille des SRC dans des cellules cancéreuses du côlon augmente l'invasion et la migration des cellules sans impacter la prolifération cellulaire (J. Chen et al. 2014). De plus, des études ont corrélé l'activité des SFK aux stades tumoraux. En effet, l'activité de la voie SRC est beaucoup plus élevée dans le CRCm que dans les stades plus précoces (Talamonti et al. 1993; Allgayer et al. 2002). Cette forte activité promeut le développement tumoral et métastatique (Sirvent et al. 2020). SRC est aussi en lien avec la population de CSC dans le CRC (Jin 2020). Le récepteur à l'acide hyaluronique CD44 (marqueur de CSC) active SRC ce qui induit l'inhibition du suppresseur de tumeur mir-203. Cela a pour effet d'augmenter la prolifération et la survie cellulaire.

Ces informations confortent nos résultats, en effet l'inhibition de BRAF V600E avec du Dabrafenib active fortement la voie SRC. Cette voie de signalisation serait impliquée dans la résistance (augmentation du pool de CSC) et dans l'augmentation des capacités d'invasion observées lors des expériences en chambres de Boyden. Des expériences supplémentaires sont nécessaires, comme par

exemple l'étude des capacités de formation métastatique dans des modèles murins (avec des injections de cellules traitées dans la rate et suivi du développement métastatique).

Le ciblage de la voie de signalisation SRC est une option qui a déjà été proposée dans le CRC. Malheureusement, les essais cliniques ciblant SRC dans le CRC ont échoué (Martellucci et al. 2020). En effet la majorité des études ont été réalisées sur des tumeurs avancées et fortement prétraitées. L'absence de stratification des patients et de biomarqueurs prédictifs complique l'analyse des essais cliniques. Afin de réévaluer cette stratégie clinique, des essais cliniques devraient être réalisés sur des patients possédant des tumeurs avec une forte activité de la voie SRC (validée par immunohistochimie).

Il existe des inhibiteurs en phase préclinique de SRC tel que le Dasatinib ou le Bosutinib. Par exemple, le Dasatinib qui est aussi un inhibiteur de la protéine de fusion BCR/ABL a initialement été approuvé par la FDA pour traiter la leucémie myéloïde chronique et la leucémie lymphoblastique aiguë. Le Dasatinib a également une faible spécificité pour différentes cibles que sont les SFK, FYN, YES et Lck (protéines à activité tyrosine kinase). En 2009, l'équipe de Gallick démontre l'efficacité anti-tumorale du Dasatinib en combinaison avec l'oxaliplatine dans le cancer du côlon (Kopetz et al. 2009). En effet, l'oxaliplatine en monothérapie induit une forte activation de SRC, la combinaison avec le Dasatinib bloque cette voie de résistance ce qui inhibe fortement la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*. Cependant, les résultats d'essais en clinique lui décèlent une forte toxicité. À ce jour, l'efficacité clinique de ce composé n'est pas démontrée.

Un des points forts de nos travaux, est la démonstration du fort phénotype de CSC déte nu par les tumeurs et lignées de CRC portant la mutation BRAF V600E. Cette population cellulaire est fortement corrélée aux pronostics des patients (Merlos-Suárez et al. 2011). Il est de plus en plus proposé des stratégies visant à éliminer les CSC. Pour cela les inhibiteurs ciblent des marqueurs spécifiques ou des voies de signalisation spécifiques des CSC (Fanali et al. 2014). L'objectif étant de pouvoir combiner les thérapies conventionnelles avec des agents ciblant les CSC (Figure 49). Néanmoins, des contraintes existent.

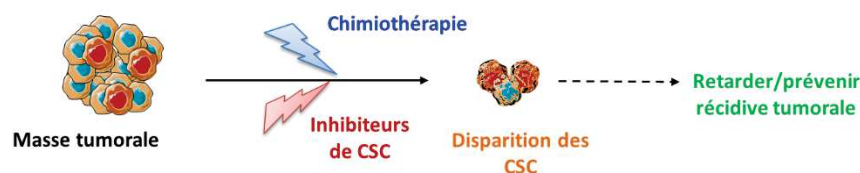


Figure 49 : Stratégie de ciblage des CSC.

L'utilisation d'inhibiteur de CSC en combinaison avec des agents de chimiothérapie serait efficace comme traitement pour le cancer. Source : O. Villeronce

Du point de vue de la tumeur, l'hétérogénéité et la plasticité des CSC augmentent la difficulté d'un ciblage spécifique. En effet, les expériences de ciblage d'un seul marqueur de CSC ne sont pas efficaces et la plasticité cellulaire permet l'apparition par dédifférenciation de cellules CSC résistantes à partir de cellules non-CSC (Zhu et Fan 2018). Pour pallier à cette plasticité, des traitements inducteurs de la différenciation cellulaire pourraient être proposés (Paldino et al., 2014). Ces cellules différenciées auront ainsi une meilleure réponse aux agents de chimiothérapies (Yu et al., 2013).

Cliniquement, cibler les CSC peut être très toxique, c'est le cas du XAV939 inhibiteur de la β -caténine qui a une forte cardiotoxicité (Liu et al. 2018). Inversement, le Niclosamide, qui est aussi un inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine est plutôt bien toléré par les patients (« NCT02519582 » 2018).

D'autres molécules sont en cours d'étude, c'est le cas de la Dihydroartémisinine (DHA) ou de l'ironmycin. Elles induisent la mort des CSC par ferroptose (mort cellulaire nécrotique) respectivement dans le cancer du côlon et du sein (Luo et al. 2018; B. Zhao et al. 2018; Yue Yang et al. 2020). L'avantage est que cette stratégie d'action semble plus spécifique des CSC (Recalcati, Gammella, et Cairo 2019).

En conclusion compte tenu des résultats de mon travail de thèse, dans le CRC le ciblage de la mutation BRAF V600E devrait être contre-indiqué pour les patients atteints de CRC-BRAF V600E-MSS. En effet, nos travaux associés à ceux de la littérature démontrent que cibler BRAF V600E est inefficace et promeut un phénotype de CSC. Les thérapies ciblant les CSC et notamment leur plasticité en association avec de la chimiothérapie pourraient être une combinaison de traitements efficace pour les patients atteints de CRC avec une mutation BRAF V600E.

5 MATERIEL ET METHODE

Lignées cellulaires

La majorité des lignées cellulaires de l'étude ont été établies au laboratoire : nous avons des tumeurs primaires (CPP24, CPP25, CPP44, CRC1), des métastatiques (CPP19, CPP30, CPP45) et des lignées issues de cellules tumorales circulantes (CTC41, CTC44, CTC45, CTC31). En collaboration nous avons obtenu les lignées : CSC4 (équipe de G. Stassi) et les MEL501 (équipe A. Eychene). Nous avons aussi des lignées commerciales issues de l'ATCC ('American Type Culture Collection) : HT29, T84, SW620.

Culture des lignées cellulaires en suspension

Les cellules sontensemencées à faible densité (5 cellules / μ l), en condition de non-adhérence dans des flasques traitées à cet effet (Corning ou coating au poly-2-hydroxyethyl methacrylate (Sigma)) et dans du milieu supplémenté en facteurs de croissance (cf composition des milieux M11) à 37°C. Le milieu est changé 1X par semaine après centrifugation des colosphères à 400g et elles sont dissociées avec de l'accumax (Sigma Aldrich) pendant 45 minutes à 37°C. Le nombre de passage est limité à 10.

Culture des lignées cellulaires en adhérence

Les lignées sont cultivées en condition d'adhérence avec du milieu DMEM (10% SVF, Glutamine 2mM) sans antibiotique. Les cellules sont dissociées avec de la Trypsine en fonction du temps nécessaire (<10 min). Le nombre de passages est limité à 10.

Milieux de culture

Milieu de culture des cellules adhérentes : Dulbecco/s Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) contenant 10% de sérum de veau foetal (Eurobio), 2mmol/l de L-glutamine et 100 unités/mL.

Milieu M11 pour les cellules en suspension : DMEM-F12 avec glutamax (Gibco), 3% de glucose, N2 (Gibco), 20ng/mL d'EGF (R&D), 10ng/mL de Bfgf (R&D) et 20 μ g/mL d'insuline (Sigma Aldrich).

Composant du supplément N2 (Gibco) : Transferrine humaine (Holo), Insuline, Progesterone, Putrescine, Selenite.

Test de sensibilité aux traitements (test de toxicité cellulaire)

5000 cellules sont déposées dans chaque puits d'une plaque 96 puits dans 50 μ l de milieu DMEM. Le lendemain les cellules sont traitées en triplicat par des concentrations croissantes de traitement

pendant 72h. FIRI : mélange de 5FU et SN38 (1X : 50µM 5FU + 0.5µM SN38). La luminescence est lue après lyse avec le kit CellTiterGlo Assay (Promega). Les CI50 sont calculées graphiquement.

Test de viabilité cellulaire

1000 cellules par condition sont déposées dans 3 puits de plusieurs plaques 96 puits et dans 100 µL de milieu DMEM. Le nombre de plaques 96 puits est déterminé en fonction du nombre de points à réaliser. Pour 96h de suivi, il faut une plaque 96 puits par 24h soit 4 plaques. Toutes les 24h, la luminescence est lue après lyse avec le kit CellTiterGlo Assay (Promega).

Traitement des cellules

200 000 cellules en condition d'adhérence sont traitées pendant **72h à l'IC50** de l'agents préalablement déterminée (par test de sensibilité aux traitements).

Les différents agents sont le Vemurafenib, le Dabrafenib, PLX4720, l'Encorafenib, le Cetuximab, le Binimetinib, le FIRI (5FU +SN38).

L'inhibition transcriptionnelle de BRAF V600E (siARN)

Les siCTRL et siBRAF V600E (#11) (Figure 50) sont obtenus par collaboration avec l'équipe Bienvenu (IGF, Montpellier). La validation est décrite dans l'article (Champagne et al. 2020).

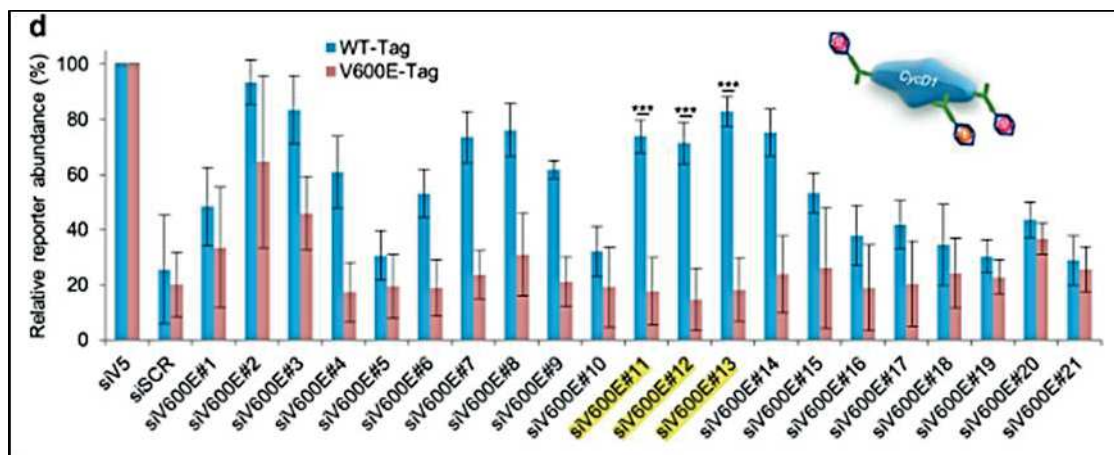


Figure 50 : Analyse HTRF des niveaux protéiques de BRAF WT et BRAF V600E après traitement avec différents siBRAF V600E.

Les cellules sont traitées en condition d'adhérence en suivant le protocole fournit par Invitrogene[®]: https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/Lipofectamine_RNAiMAX_Reag_protocol.pdf

Analyses par cytométrie en flux

Activité de l'ALDH : l'activité enzymatique des ALDH est évaluée par le kit ALDEFUOR™ (Stem Cell Technology) selon le protocole recommandé. Pour l'analyse de l'activité ALDH, le DEAB est utilisé en contrôle pour chaque test et le seuil de positivité est fixé à 0,1% du bruit de fond obtenu en présence de DEAB.

Marquage immunologique des cellules

100 000 cellules sont incubées dans 100µl de PBS-5%BSA et X µl d'anticorps pendant Y min à 4 degrés puis lavées au PBS-5% BSA avant d'être analysées par cytométrie en flux. Le volume d'anticorps X et temps de marquage Y sont déterminés par les protocoles d'usine. Anticorps utilisés : CD44v6-APC (R&D FAB36604), CD26-APC (BDPharmingen 563670). L'isotype contrôle de chaque anticorps est utilisé en contrôle.

Afin d'évaluer la mortalité cellulaire, pour chaque analyse, les cellules sont reprises dans du tampon contenant du sytox blue (invitrogen). L'analyse par cytométrie en flux est réalisée sur la plateforme MRI à l'aide du Miltenyi MACS-QUANT.

Marquage immunologique des coupes de patients

Marquages immunologiques réalisés sur une cohorte de 63 adénocarcinomes colorectaux (20 RAS muté ; 20 BRAF muté et 20 RAS/BRAF sauvage). Anticorps CD26 (Rab mAb Clone EPR20819) et CD44v6 (Clone VFF-18; AbCam Ref ab78960 Mouse Monoclonal IgG1).

Test de formation de sphères (SFC)

Pour quantifier la fréquence en CSC-CIT, les cellules traitées sontensemencées par cytométrie en flux ou manuellement à 100cellules/100µl de milieu M11 en suspension dans une plaque 96 puits. Au bout de 7 jours, les sphères (colosphères) sont quantifiées.

Test d'invasion cellulaire

70 000 cellules sontensemencées dans la chambre supérieure du dispositif dans 250µL de milieu DMEM sans antibiotique. La chambre a été préalablement recouverte de Matrigel (0.5-1.5 mg/mL). Les analyses sont réalisées au bout de 48h après marquage avec de la Calcéine (4µg/ml). Les photos sont effectuées avec le ZEISS OBSERVER 7 de la plateforme MRI (IGH, Montpellier). Les cellules sont quantifiées avec le logiciel image J.

Injections sous-cutanées

1^{ère} injection : injection de 50-500-5000 cellules (contrôle ou traitées Dabrafenib) dans 5 souris nues /condition. (Souris femelles de 6 semaines). Les cellules étaient re-suspendu dans un mélange PBS et

matrigel (50/50). Les souris ont été sacrifiées quand les tumeurs ont atteint 700 mm³. Les tumeurs sous-cutanées issues de l'injection de 500 cellules sont récupérées et lavées avec du PBS 1X froid. La moitié de chaque tumeur est incluse en paraffine et l'autre moitié est dissociée à l'aide du kit de dissociation Mouse Tumor Dissociation Kit (Milteniy).

2nd injection (réinjection des cellules triées issues de la première injection en condition 500 cellules) : injection de 50-500 cellules (PBS/Matrigel (50/50)) dans 5 souris nues /condition. Les tumeurs récupérées sont divisées en deux, la moitié des tumeurs est incluse en paraffine et l'autre congelée.

L'apparition des tumeurs est surveillée tous les deux jours et le suivi de la taille est effectué deux fois par semaine au pied à coulisse.

Analyse d'activité des kinases MEK1/2 et ERK1/2

Utilisation des kits Cisbio : phosphoMEK1/2 Ser218/222 et Phospho-ERK (Thr202/Tyr204). Suivi du protocole fourni par Cisbio. Lecture sur l'analyseur Spark (plateforme Arpege, IGF, Montpellier). Pour chaque expérience, la viabilité cellulaire est évaluée. Les résultats sont relativisés en fonction de la viabilité cellulaire.

Analyse de l'activité des tyrosines kinases après traitement par du Dabrafenib

Un culot d'1 million de cellules (contrôles ou traitées Dabrafenib 72h) par lignée (CTC45 et HT29) est envoyé à l'entreprise Pamgene (<https://pamgene.com/technology/>). L'activité des tyrosines kinases des lysats cellulaires a été déterminée par l'entreprise en utilisant une technologie qui détecte l'activité des kinases dans des lysats cellulaires en mesurant la phosphorylation de peptides spécifiques. Des analyses statistiques permettent ensuite de fournir une liste des Kinases présentant des fortes modifications d'activité en réponse à un traitement.

Western Blot

Les cellules sont lysées avec du tampon de lyse RIPA (RIPA, orthovanadate, NaF, β glycerophosphate, EGTA, DTT) supplémenté avec des inhibiteurs de protéase (Protease Inhibitor Cocktail (Roche)). Pour le Western Blot, les échantillons préalablement dénaturés dans du tampon Laemmli sont mis à migrer sur SDS-PAGE 10% ou 7.5% puis transférés sur membrane par transfert liquide. Les membranes sont bloquées avec du PBS 5% lait pendant 1heure. Les anticorps primaires : Actine (sigma-Aldrich), BRAF V600E (VE1) (Eurobio E19290, dilution 1/50).

Extraction ARN et RT-QPCR

Les ARNm sont extraits sur mini-colonnes (Qiagen). La transcription reverse est effectuée par la SuperScript™ II (Invitrogen). Après dilution des cDNA, nous procédons à la qPCR en temps réel en

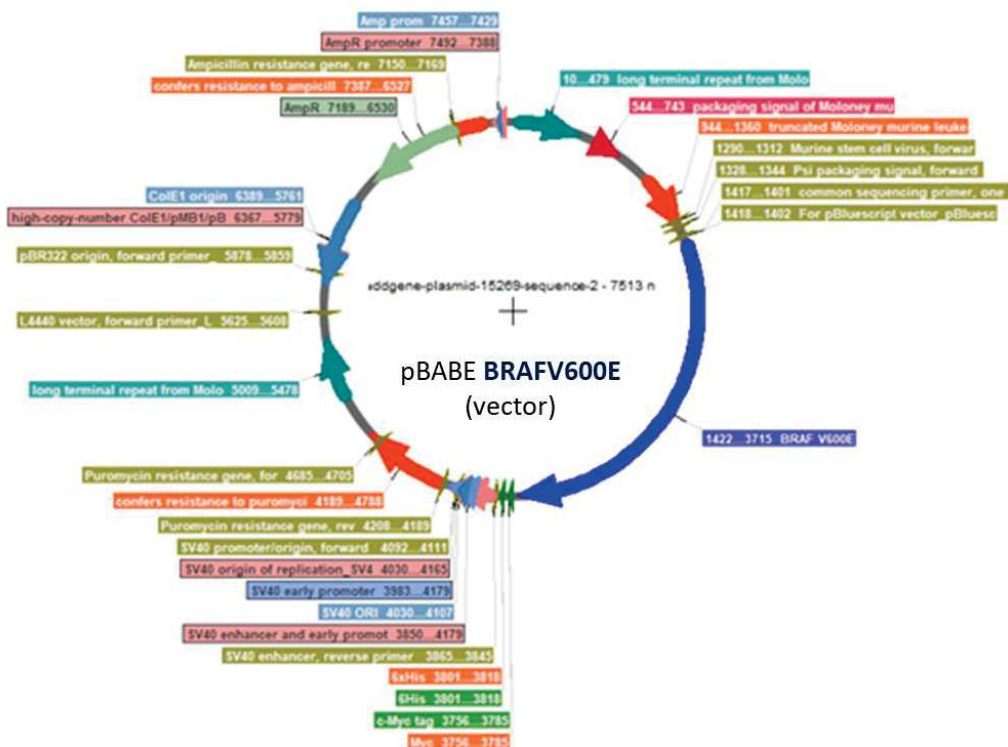
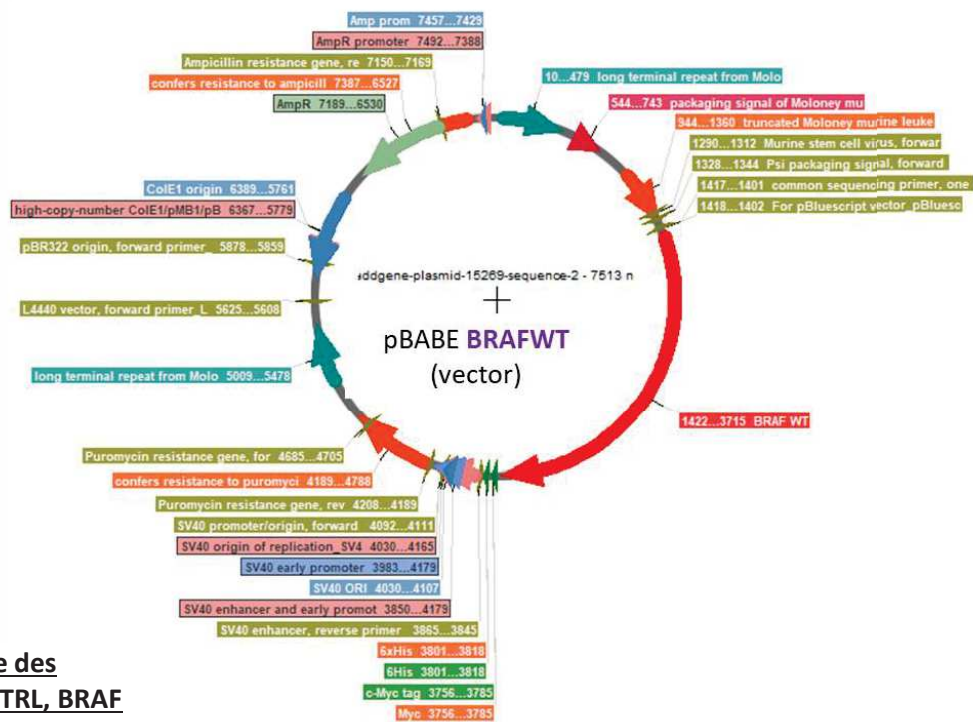
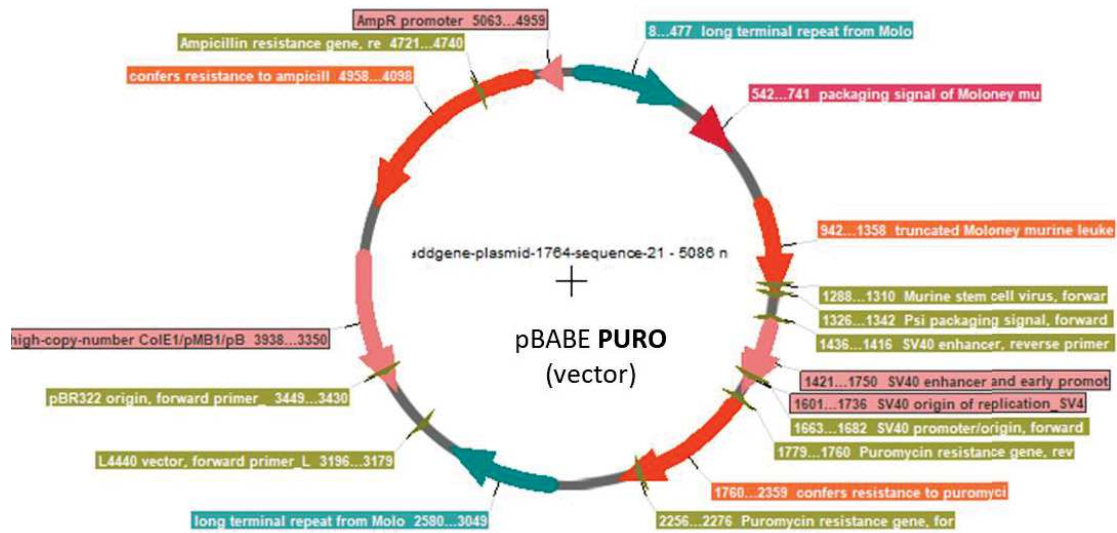


Figure 51: Structure des plasmides pBABE CTRL, BRAFWT, BRAF V600E

6 COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ET COLLABORATION

❖ Orals

2019: IGH pHD students & Postdoc meeting

❖ Posters

2019: IGH pHD students & Postdoc meeting

2018 : CBS2 days

2017 : CBS2 days

❖ Collaborations

AMHR2 Project : Caractérisation de la population exprimant AmHR2 dans le cancer du côlon



Reprogrammation des cellules tumorales après traitement au 5 Fluro-uracile

Jean Jacques DIAZ (CRCL Lyon)

❖ Papiers

« Circulating tumour cells from patients with colorectal cancer have cancer stem cell hallmarks in ex vivo culture” Grillet F, Bayet E, **Villeronce O**, Zappia L, Lagerqvist EL, Lunke S, Charafe-Jauffret E, Pham K, Molck C, Rolland N, Bourgaux JF, Prudhomme M, Philippe C, Bravo S, Boyer JC, Canterel-Thouennon L, Taylor GR, Hsu A, Pascussi JM, Hollande F, Pannequin J. Gut. 2017 Oct;66(10):1802-1810. doi: 10.1136/gutjnl-2016-311447. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27456153; PMCID: PMC5595103.

Sources figures : (Marisa, s. d.; Vermeulen et Snippert 2014; Weledji 2017; Markowitz et Bertagnolli 2009; Nusse et Clevers 2017; Strickler, Wu, et Bekaii-Saab 2017; Melo et al. 2013; Dekker et al. 2019; Guinney et al. 2015; Stintzing et al. 2019; Grillet 2015; Vries, Huch, et Clevers 2010; Carnero et Lleonart 2016; Tomita et al. 2016; Vermeulen et Snippert 2014; Zhou, Liu, et Xue 2012; Lam et al. 2014; Hatina et al. 2019; McCain 2013; Downward 2003; Favre 2014; Wellbrock, Karasarides, et Marais 2004; Lavoie et Therrien 2015; Barras et al. 2017; Tran et al. 2011; Karoulia, Gavathiotis, et Poulikakos 2017)

7 BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed, Nuzhat, Khalid Abubaker, Jock Findlay, et Michael Quinn. 2010. « Epithelial Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell-like Phenotypes Facilitate Chemoresistance in Recurrent Ovarian Cancer ». *Current Cancer Drug Targets* 10 (3): 268-78. <https://doi.org/10.2174/156800910791190175>.
- Allgayer, Heike, Douglas D. Boyd, Markus M. Heiss, Eddie K. Abdalla, Steven A. Curley, et Gary E. Gallick. 2002. « Activation of Src Kinase in Primary Colorectal Carcinoma ». *Cancer* 94 (2): 344-51. <https://doi.org/10.1002/cncr.10221>.
- Amini, Sabrieh, Fardin Fathi, Jafar Mobalegi, Heshmatollah Sofimajidpour, et Tayyeb Ghadimi. 2014. « The Expressions of Stem Cell Markers: Oct4, Nanog, Sox2, Nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in Bladder, Colon, and Prostate Cancer, and Certain Cancer Cell Lines ». *Anatomy & Cell Biology* 47 (1): 1-11. <https://doi.org/10.5115/acb.2014.47.1.1>.
- André, Thierry, Corrado Boni, Lamia Mounedji-Boudiaf, Matilde Navarro, Josep Taberner, Tamas Hickish, Clare Topham, et al. 2004. « Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 350 (23): 2343-51. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032709>.
- Aoki, Yoko, Tetsuya Niihori, Yoko Narumi, Shigeo Kure, et Yoichi Matsubara. 2008. « The RAS/MAPK Syndromes: Novel Roles of the RAS Pathway in Human Genetic Disorders ». *Human Mutation* 29 (8): 992-1006. <https://doi.org/10.1002/humu.20748>.
- Arthur, J. Simon C., et Steven C. Ley. 2013. « Mitogen-Activated Protein Kinases in Innate Immunity ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (9): 679-92. <https://doi.org/10.1038/nri3495>.
- Ashton-Beaucage, Dariel, et Marc Therrien. 2010. « La signalisation RTK/RAS/ERK élargie - Contributions de la génétique à l'assemblage d'un réseau de signalisation ». *médecine/sciences* 26 (12): 1067-73. <https://doi.org/10.1051/medsci/201026121067>.
- Baeuerle, P. A., et O. Gires. 2007. « EpCAM (CD326) Finding Its Role in Cancer ». *British Journal of Cancer* 96 (3): 417-23. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603494>.
- Baker, S. J., A. C. Preisinger, J. M. Jessup, C. Paraskeva, S. Markowitz, J. K. Willson, S. Hamilton, et B. Vogelstein. 1990. « P53 Gene Mutations Occur in Combination with 17p Allelic Deletions as Late Events in Colorectal Tumorigenesis ». *Cancer Research* 50 (23): 7717-22.
- Balduzzi, S, S Mantarro, V Guameri, L Tagliabue, et R D'Amico. s. d. « Efficacité et innocuité du trastuzumab dans le cancer du sein métastatique ». Consulté le 14 septembre 2020. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006242.pub2>.
- Barault, Ludovic, Céline Charon-Barra, Valérie Jooste, Mathilde Funes de la Vega, Laurent Martin, Patrick Roignot, Patrick Rat, et al. 2008. « Hypermethylator Phenotype in Sporadic Colon Cancer: Study on a Population-Based Series of 582 Cases ». *Cancer Research* 68 (20): 8541-46. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1171>.
- Barker, Nick, Rachel A. Ridgway, Johan H. van Es, Marc van de Wetering, Harry Begthel, Maaike van den Born, Esther Danenberg, Alan R. Clarke, Owen J. Sansom, et Hans Clevers. 2009. « Crypt Stem Cells as the Cells-of-Origin of Intestinal Cancer ». *Nature* 457 (7229): 608-11. <https://doi.org/10.1038/nature07602>.
- Barras, David, Edoardo Missiaglia, Pratyaksha Wirapati, Oliver M. Sieber, Robert N. Jorissen, Chris Love, Peter L. Molloy, et al. 2017. « BRAF V600E Mutant Colorectal Cancer Subtypes Based on Gene Expression ». *Clinical Cancer Research* 23 (1): 104-15. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0140>.
- Batlle, Eduard, et Hans Clevers. 2017. « Cancer Stem Cells Revisited ». *Nature Medicine* 23 (10): 1124-34. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>.
- Behbod, Fariba, et Maria d. M. Vivanco. 2015. « Side Population ». In *Mammary Stem Cells: Methods and Protocols*, édité par Maria del Mar Vivanco, 73-81. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2519-3_4.

- Behrens, J. 2005. « The Role of the Wnt Signalling Pathway in Colorectal Tumorigenesis ». *Biochemical Society Transactions* 33 (Pt 4): 672-75. <https://doi.org/10.1042/BST0330672>.
- Benedix, Frank, Rainer Kube, Frank Meyer, Uwe Schmidt, Ingo Gastinger, et Hans Lippert. 2010. « Comparison of 17,641 Patients With Right- and Left-Sided Colon Cancer: Differences in Epidemiology, Perioperative Course, Histology, and Survival ». *Diseases of the colon and rectum* 53 (janvier): 57-64. <https://doi.org/10.1007/DCR.0b013e3181c703a4>.
- Bettington, Mark, Neal Walker, Andrew Clouston, Ian Brown, Barbara Leggett, et Vicki Whitehall. 2013. « The Serrated Pathway to Colorectal Carcinoma: Current Concepts and Challenges ». *Histopathology* 62 (3): 367-86. <https://doi.org/10.1111/his.12055>.
- Binefa, Gemma, Francisco Rodríguez-Moranta, Àlex Teule, et Manuel Medina-Hayas. 2014. « Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine ». *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20 (22): 6786-6808. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i22.6786>.
- Bissell, M, et M Labarge. 2005. « Context, Tissue Plasticity, and Cancer Are Tumor Stem Cells Also Regulated by the Microenvironment? » *Cancer Cell* 7 (1): 17-23. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00375-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00375-7).
- Blume-Jensen, P., et T. Hunter. 2001. « Oncogenic Kinase Signalling ». *Nature* 411 (6835): 355-65. <https://doi.org/10.1038/35077225>.
- Bonnet, Dominique, et John E. Dick. 1997. « Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell ». *Nature Medicine* 3 (7): 730-37. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>.
- Bossennec, Marion, Anthony Di Roio, Christophe Caux, et Christine Ménétrier-Caux. 2018. « MDR1 in immunity: friend or foe? » *Oncoimmunology* 7 (12). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1499388>.
- Bouguenouch, Laila, Imane Samri, Khadija Belhassan, Hanane Sayel, Meriame Abbassi, Sanae Bennis, Dafr Allah Benajah, Adil Ibrahim, Afaf Amarti, et Karim Ouldin. 2016. « Syndrome de Lynch: à propos d'un cas et revue de la littérature ». *The Pan African Medical Journal* 24 (juin). <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.24.142.4398>.
- Braicu, Cornelia, Mihail Buse, Constantin Busuioc, Rares Drula, Diana Gulei, Lajos Raduly, Alexandru Rusu, et al. 2019. « A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer ». *Cancers* 11 (10). <https://doi.org/10.3390/cancers11101618>.
- Brenner, Hermann, Christian Stock, et Michael Hoffmeister. 2014. « Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies ». *The BMJ* 348 (avril). <https://doi.org/10.1136/bmj.g2467>.
- Bretthauer, Michael, et Mette Kalager. 2012. « Colonoscopy as a Triage Screening Test ». *New England Journal of Medicine* 366 (8): 759-60. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1114639>.
- Burotto, Mauricio, Victoria L. Chiou, Jung-Min Lee, et Elise C. Kohn. 2014. « The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective ». *Cancer* 120 (22): 3446-56. <https://doi.org/10.1002/cncr.28864>.
- Cancer Genome Atlas Network. 2012. « Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer ». *Nature* 487 (7407): 330-37. <https://doi.org/10.1038/nature11252>.
- « Cancer Today ». 2018. <http://gco.iarc.fr/today/home>.
- Caputo, Francesco, Chiara Santini, Camilla Bardasi, Krisida Cerma, Andrea Casadei-Gardini, Andrea Spallanzani, Kalliopi Andrikou, Stefano Cascinu, et Fabio Gelsomino. 2019. « BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215369>.
- Carnero, Amancio, et Matilde Leonart. 2016. « The Hypoxic Microenvironment: A Determinant of Cancer Stem Cell Evolution ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 38 Suppl 1: S65-74. <https://doi.org/10.1002/bies.201670911>.
- Carriere, Audrey, Hind Ray, John Blenis, et Philippe P. Roux. 2008. « The RSK Factors of Activating the Ras/MAPK Signaling Cascade ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13 (mai): 4258-75. <https://doi.org/10.2741/3003>.

- Casarsa, Claudia, Saro Oriana, et Danila Coradini. 2008. « The Controversial Clinicobiological Role of Breast Cancer Stem Cells ». *Journal of Oncology* 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/492643>.
- Champagne, Julien, Laetitia K. Linares, Benjamin Maurel, Alexandre Zampieri, Maeva Moreno, Ivanna Fuentes, Emeric Dubois, Dany Severac, Adrien Decorsière, et Frédéric Bienvenu. 2020. « TAG-RNAi Overcomes off-Target Effects in Cancer Models ». *Oncogene* 39 (4): 935-45. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1020-2>.
- Chang, Fung-Wei, Hueng-Chuen Fan, Jui-Ming Liu, Tai-Ping Fan, Jin Jing, Chia-Ling Yang, et Ren-Jun Hsu. 2017. « Estrogen Enhances the Expression of the Multidrug Transporter Gene ABCG2—Increasing Drug Resistance of Breast Cancer Cells through Estrogen Receptors ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (1). <https://doi.org/10.3390/ijms18010163>.
- Chapman, Paul B., Axel Hauschild, Caroline Robert, John B. Haanen, Paolo Ascierto, James Larkin, Reinhard Dummer, et al. 2011. « Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation ». *New England Journal of Medicine* 364 (26): 2507-16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>.
- Chen, Guangming, Chenxi Gao, Xuan Gao, Dennis Han Zhang, Shih-Fan Kuan, Timothy F. Burns, et Jing Hu. 2018. « Wnt/ β -Catenin Pathway Activation Mediates Adaptive Resistance to BRAF Inhibition in Colorectal Cancer ». *Molecular Cancer Therapeutics* 17 (4): 806-13. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0561>.
- Chen, Jiezhong, Aymen Elfiky, Mei Han, Chen Chen, et M. Wasif Saif. 2014. « The Role of Src in Colon Cancer and Its Therapeutic Implications ». *Clinical Colorectal Cancer* 13 (1): 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2013.10.003>.
- Chen, X., T. K. Yeung, et Z. Wang. 2000. « Enhanced Drug Resistance in Cells Coexpressing ErbB2 with EGF Receptor or ErbB3 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277 (3): 757-63. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3731>.
- Chibaudel, Benoist, Christophe Tournigand, Franck Bonnetain, Hubert Richa, Magdalena Benetkiewicz, Thierry André, et Aimery de Gramont. 2015. « Therapeutic strategy in unresectable metastatic colorectal cancer: an updated review ». *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 7 (3): 153-69. <https://doi.org/10.1177/1758834015572343>.
- Chong, H, Hg Vikis, et Kl Guan. 2003. « Mechanisms of Regulating the Raf Kinase Family ». *Cellular Signalling*. mai 2003. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(02\)00139-0](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00139-0).
- Clark, David W., et Komaraiah Palle. 2016. « Aldehyde dehydrogenases in cancer stem cells: potential as therapeutic targets ». *Annals of Translational Medicine* 4 (24). <https://doi.org/10.21037/atm.2016.11.82>.
- Clarke, Michael F., John E. Dick, Peter B. Dirks, Connie J. Eaves, Catriona H. M. Jamieson, D. Leanne Jones, Jane Visvader, Irving L. Weissman, et Geoffrey M. Wahl. 2006. « Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells ». *Cancer Research* 66 (19): 9339-44. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3126>.
- Cohen, Romain, Pascale Cervera, Magali Svrcek, Anna Pellat, Chantal Dreyer, Aimery de Gramont, et Thierry André. 2017. « BRAF-Mutated Colorectal Cancer: What Is the Optimal Strategy for Treatment? » *Current Treatment Options in Oncology* 18 (2): 9. <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0453-5>.
- Cojoc, Monica, Claudia Peitzsch, Ina Kurth, Franziska Trautmann, Leoni A. Kunz-Schughart, Gennady D. Telegeev, Eduard A. Stakhovsky, et al. 2015. « Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by β -Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells ». *Cancer Research* 75 (7): 1482-94. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1924>.
- Corcoran, Ryan B., Thierry André, Chloe E. Atreya, Jan H.M. Schellens, Takayuki Yoshino, Johanna C. Bendell, Antoine Hollebecque, et al. 2018. « Combined BRAF, EGFR, and MEK Inhibition in Patients With BRAFV600E-Mutant Colorectal Cancer ». *Cancer discovery* 8 (4): 428-43. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1226>.
- Corcoran, Ryan B., Chloe E. Atreya, Gerald S. Falchook, Eunice L. Kwak, David P. Ryan, Johanna C. Bendell, Omid Hamid, et al. 2015. « Combined BRAF and MEK Inhibition With Dabrafenib and

- Trametinib in BRAF V600–Mutant Colorectal Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 33 (34): 4023-31. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.2471>.
- Cox, Veronica L., Anas A. Saeed Bamashmos, Wai Chin Foo, Shiva Gupta, Sireesha Yedururi, Naveen Garg, et Hyunseon Christine Kang. 2018. « Lynch Syndrome: Genomics Update and Imaging Review ». *RadioGraphics* 38 (2): 483-99. <https://doi.org/10.1148/rg.2018170075>.
- Creusot, Nicolas, Matthieu Gassiot, Elina Alaterre, Barbara Chiavarina, Marina Grimaldi, Abdelhay Boulahtouf, Lucia Toporova, et al. 2020. « The Anti-Cancer Drug Dabrafenib Is a Potent Activator of the Human Pregnane X Receptor ». *Cells* 9 (7). <https://doi.org/10.3390/cells9071641>.
- D'Abaco, G. M., R. H. Whitehead, et A. W. Burgess. 1996. « Synergy between Apc Min and an Activated Ras Mutation Is Sufficient to Induce Colon Carcinomas ». *Molecular and Cellular Biology* 16 (3): 884-91. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.3.884>.
- Dagenais, Gilles R., Darryl P. Leong, Sumathy Rangarajan, Fernando Lanás, Patricio Lopez-Jaramillo, Rajeev Gupta, Rafael Diaz, et al. 2020. « Variations in Common Diseases, Hospital Admissions, and Deaths in Middle-Aged Adults in 21 Countries from Five Continents (PURE): A Prospective Cohort Study ». *The Lancet* 395 (10226): 785-94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32007-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32007-0).
- Dalerba, Piero, Scott J. Dylla, In-Kyung Park, Rui Liu, Xinhao Wang, Robert W. Cho, Timothy Hoey, et al. 2007. « Phenotypic Characterization of Human Colorectal Cancer Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (24): 10158-63. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703478104>.
- Dankner, Matthew, April A. N. Rose, Shivshankari Rajkumar, Peter M. Siegel, et Ian R. Watson. 2018. « Classifying BRAF Alterations in Cancer: New Rational Therapeutic Strategies for Actionable Mutations ». *Oncogene* 37 (24): 3183-99. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0171-x>.
- Davies, Helen, Graham R. Bignell, Charles Cox, Philip Stephens, Sarah Edkins, Sheila Clegg, Jon Teague, et al. 2002. « Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer ». *Nature* 417 (6892): 949-54. <https://doi.org/10.1038/nature00766>.
- Davies, Samuel, Aline Beckenkamp, et Andréia Buffon. 2015. « CD26 a Cancer Stem Cell Marker and Therapeutic Target ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 71 (avril): 135-38. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.02.031>.
- Dean, Michael. 2009. « Cancer Stem Cells: Implications for Cancer Causation and Therapy Resistance ». *Discovery Medicine* 5 (27): 278-82.
- Deeley, Roger G., et Susan P. C. Cole. 2006. « Substrate Recognition and Transport by Multidrug Resistance Protein 1 (ABCC1) ». *FEBS Letters* 580 (4): 1103-11. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.036>.
- Defossez G, Gautier, Sandra Le Guayader-Peyrou, Zoé Uhry, Pascale Grosclaude, Marc Colonna, Emmanuelle dantony, et et al. 2019. « Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. » 1: 372.
- Dekker, Evelien, Pieter J. Tanis, Jasper L. A. Vleugels, Pashtoon M. Kasi, et Michael B. Wallace. 2019. « Colorectal Cancer ». *Lancet (London, England)* 394 (10207): 1467-80. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0).
- Dembinski, Jennifer L., et Stefan Krauss. 2009. « Characterization and Functional Analysis of a Slow Cycling Stem Cell-like Subpopulation in Pancreas Adenocarcinoma ». *Clinical & Experimental Metastasis* 26 (7): 611. <https://doi.org/10.1007/s10585-009-9260-0>.
- Deng, Shan, Xiaojun Yang, Heini Lassus, Shun Liang, Sippy Kaur, Qunrui Ye, Chunsheng Li, et al. 2010. « Distinct Expression Levels and Patterns of Stem Cell Marker, Aldehyde Dehydrogenase Isoform 1 (ALDH1), in Human Epithelial Cancers ». *PLOS ONE* 5 (4): e10277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010277>.
- Derynck, R., R. J. Akhurst, et A. Balmain. 2001. « TGF-Beta Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression ». *Nature Genetics* 29 (2): 117-29. <https://doi.org/10.1038/ng1001-117>.
- DeVita, Vincent T., et Edward Chu. 2008. « A History of Cancer Chemotherapy ». *Cancer Research* 68 (21): 8643-53. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>.

- Di Nicolantonio, Federica, Miriam Martini, Francesca Molinari, Andrea Sartore-Bianchi, Sabrina Arena, Piercarlo Saletti, Sara De Dosso, et al. 2008. « Wild-Type BRAF Is Required for Response to Panitumumab or Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (35): 5705-12. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.0786>.
- Dinarvand, Peyman, Elizabeth P. Davaro, James V. Doan, Mary E. Ising, Neil R. Evans, Nancy J. Phillips, Jinping Lai, et Miguel A. Guzman. 2019. « Familial Adenomatous Polyposis Syndrome: An Update and Review of Extraintestinal Manifestations ». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 143 (11): 1382-98. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0570-RA>.
- Douillard, Jean-Yves, Kelly S. Oliner, Salvatore Siena, Josep Tabernero, Ronald Burkes, Mario Barugel, Yves Humblet, et al. 2013. « Panitumumab-FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 369 (11): 1023-34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1305275>.
- Downward, Julian. 2003. « Targeting RAS Signalling Pathways in Cancer Therapy ». *Nature Reviews. Cancer* 3 (1): 11-22. <https://doi.org/10.1038/nrc969>.
- Doyle, L. A., W. Yang, L. V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A. K. Rishi, et D. D. Ross. 1998. « A Multidrug Resistance Transporter from Human MCF-7 Breast Cancer Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26): 15665-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15665>.
- Dubois, Manon, Camille Ardin, Fanny André, Arnaud Scherpereel, et Laurent Mortier. 2019. « L'immunothérapie, une révolution en oncologie - Revue de l'efficacité des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ». *médecine/sciences* 35 (12): 937-45. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019225>.
- Dummer, Reinhard, Paolo A Ascierto, Helen J Gogas, Ana Arance, Mario Mandala, Gabriella Liskay, Claus Garbe, et al. 2018. « Encorafenib plus Binimetinib versus Vemurafenib or Encorafenib in Patients with BRAF-Mutant Melanoma (COLUMBUS): A Multicentre, Open-Label, Randomised Phase 3 Trial ». *The Lancet Oncology* 19 (5): 603-15. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30142-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30142-6).
- Dylla, Scott J., Lucia Beviglia, In-Kyung Park, Cecile Chartier, Janak Raval, Lucy Ngan, Kellie Pickell, et al. 2008. « Colorectal Cancer Stem Cells Are Enriched in Xenogeneic Tumors Following Chemotherapy ». *PloS One* 3 (6): e2428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002428>.
- « Encorafenib, Binimetinib and Cetuximab in Subjects With Previously Untreated BRAF-Mutant ColoRectal Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.Gov ». 2020. 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03693170>.
- Fabian, J. R., A. B. Vojtek, J. A. Cooper, et D. K. Morrison. 1994. « A Single Amino Acid Change in Raf-1 Inhibits Ras Binding and Alters Raf-1 Function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (13): 5982-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.13.5982>.
- Fanali, Caterina, Donatella Lucchetti, Marisa Farina, Maddalena Corbi, Valerio Cufino, Achille Cittadini, et Alessandro Sgambato. 2014. « Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: Controversies and perspectives ». *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20 (4): 923-42. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i4.923>.
- Fang, Minggang, Jianhong Ou, Lloyd Hutchinson, et Michael R. Green. 2014. « The BRAF Oncoprotein Functions through the Transcriptional Repressor MAFK to Mediate the CpG Island Methylator Phenotype ». *Molecular Cell* 55 (6): 904-15. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.010>.
- Favre, Gilles. 2014. « Le devenir des thérapeutiques ciblant la voie RAS/RAF/ MEK/ERK en cancérologie : l'exemple des mélanomes ». *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 198 (2): 321-38. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)31345-7](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)31345-7).
- Fearon, Eric R. 2011. « Molecular Genetics of Colorectal Cancer ». *Annual Review of Pathology* 6: 479-507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130235>.
- Flaherty, Keith T., Jeffery R. Infante, Adil Daud, Rene Gonzalez, Richard F. Kefford, Jeffrey Sosman, Omid Hamid, et al. 2012. « Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600

- Mutations ». *The New England Journal of Medicine* 367 (18): 1694-1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1210093>.
- Flaherty, Keith T., Igor Puzanov, Kevin B. Kim, Antoni Ribas, Grant A. McArthur, Jeffrey A. Sosman, Peter J. O'Dwyer, et al. 2010. « Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma ». *The New England journal of medicine* 363 (9): 809-19. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1002011>.
- Fleming, Matthew, Sreelakshmi Ravula, Sergei F. Tatishchev, et Hanlin L. Wang. 2012. « Colorectal Carcinoma: Pathologic Aspects ». *Journal of Gastrointestinal Oncology* 3 (3): 153-73. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030>.
- Fletcher, Jamie I., Rebekka T. Williams, Michelle J. Henderson, Murray D. Norris, et Michelle Haber. 2016. « ABC Transporters as Mediators of Drug Resistance and Contributors to Cancer Cell Biology ». *Drug Resistance Updates* 26 (mai): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.03.001>.
- Foucart, Stéphane. 2020. « Le cancer est en forte progression dans le monde ». *Le Monde.fr*, 4 février 2020. https://www.lemonde.fr/planete/article/2020/02/04/le-cancer-est-en-forte-progression-dans-le-monde_6028298_3244.html.
- Fumagalli, Arianna, Koen C. Oost, Lennart Kester, Jessica Morgner, Laura Bornes, Lotte Bruens, Lisa Spaargaren, et al. 2020. « Plasticity of Lgr5-Negative Cancer Cells Drives Metastasis in Colorectal Cancer ». *Cell Stem Cell* 26 (4): 569-578.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.02.008>.
- Gagné, Jean-François, Valerie Montminy, Patrick Belanger, Kim Journault, Genevieve Gaucher, et Chantal Guillemette. 2002. « Common Human UGT1A Polymorphisms and the Altered Metabolism of Irinotecan Active Metabolite 7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin (SN-38) ». *Molecular Pharmacology* 62 (3): 608-17. <https://doi.org/10.1124/mol.62.3.608>.
- Garnett, Mathew J., et Richard Marais. 2004. « Guilty as Charged: B-RAF Is a Human Oncogene ». *Cancer Cell* 6 (4): 313-19. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.022>.
- Gawlik-Rzemieniewska, Natalia, et Ilona Bednarek. 2015. « The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells ». *Cancer Biology & Therapy* 17 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1121348>.
- Geigl, Jochen B., Anna C. Obenaus, Thomas Schwarzbraun, et Michael R. Speicher. 2008. « Defining 'Chromosomal Instability' ». *Trends in Genetics* 24 (2): 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.11.006>.
- Gerbe, François, Emmanuelle Sidot, Danielle J. Smyth, Makoto Ohmoto, Ichiro Matsumoto, Valérie Dardalhon, Pierre Cesses, et al. 2016. « Intestinal Epithelial Tuft Cells Initiate Type 2 Mucosal Immunity to Helminth Parasites ». *Nature* 529 (7585): 226-30. <https://doi.org/10.1038/nature16527>.
- Ginestier, Christophe, Min Hee Hur, Emmanuelle Charafe-Jauffret, Florence Monville, Julie Dutcher, Marty Brown, Jocelyne Jacquemier, et al. 2007. « ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome ». *Cell Stem Cell* 1 (5): 555-67. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>.
- Gomez-Roca, C. A., J. Delord, C. Robert, M. Hidalgo, R. von Moos, A. Arance, E. Elez, et al. 2014. « Encorafenib (Lgx818), an Oral Braf Inhibitor, in Patients (Pts) with Braf V600E Metastatic Colorectal Cancer (Mrc): Results of Dose Expansion in an Open-Label, Phase 1 Study ». *Annals of Oncology* 25 (septembre): iv182. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu333.38>.
- Goodell, M. A., M. Rosenzweig, H. Kim, D. F. Marks, M. DeMaria, G. Paradis, S. A. Grupp, C. A. Sieff, R. C. Mulligan, et R. P. Johnson. 1997. « Dye Efflux Studies Suggest That Hematopoietic Stem Cells Expressing Low or Undetectable Levels of CD34 Antigen Exist in Multiple Species ». *Nature Medicine* 3 (12): 1337-45. <https://doi.org/10.1038/nm1297-1337>.
- Grady, W. M., A. Rajput, L. Myeroff, D. F. Liu, K. Kwon, J. Willis, et S. Markowitz. 1998. « Mutation of the Type II Transforming Growth Factor-Beta Receptor Is Coincident with the Transformation of Human Colon Adenomas to Malignant Carcinomas ». *Cancer Research* 58 (14): 3101-4.
- Gregorieff, Alex, et Hans Clevers. 2005. « Wnt Signaling in the Intestinal Epithelium: From Endoderm to Cancer ». *Genes & Development* 19 (8): 877-90. <https://doi.org/10.1101/gad.1295405>.

- Grillet, Fanny. 2015. « Identification et caractérisation des cellules tumorales circulantes dans le cancer colorectal ». These de doctorat, Montpellier. <http://www.theses.fr/2015MONT3510>.
- Grillet, Fanny, Elsa Bayet, Olivia Villeronce, Luke Zappia, Ebba Louise Lagerqvist, Sebastian Lunke, Emmanuelle Charafe-Jauffret, et al. 2017. « Circulating Tumour Cells from Patients with Colorectal Cancer Have Cancer Stem Cell Hallmarks in Ex Vivo Culture ». *Gut* 66 (10): 1802-10. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311447>.
- Grimm, Daniela, Johann Bauer, Petra Wise, Marcus Krüger, Ulf Simonsen, Markus Wehland, Manfred Infanger, et Thomas J. Corydon. 2019. « The Role of SOX Family Members in Solid Tumours and Metastasis ». *Seminars in Cancer Biology*, mars. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2019.03.004>.
- Grunt, Thomas W, Alexandra Hebar, Sylvia Laffer, Renate Wagner, Barbara Peter, Harald Herrmann, Alexandra Graf, et al. 2015. « Prominin-1 (CD133, AC133) and dipeptidyl-peptidase IV (CD26) are indicators of infinitive growth in colon cancer cells ». *American Journal of Cancer Research* 5 (2): 560-74.
- Guinney, Justin, Rodrigo Dienstmann, Xin Wang, Aurélien de Reyniès, Andreas Schlicker, Charlotte Sonesson, Laetitia Marisa, et al. 2015. « The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer ». *Nature medicine* 21 (11): 1350-56. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>.
- Gun, Bernardina T. F. van der, Lieuwe J. Melchers, Marcel H. J. Ruiters, Lou F. M. H. de Leij, Pamela M. J. McLaughlin, et Marianne G. Rots. 2010. « EpCAM in Carcinogenesis: The Good, the Bad or the Ugly ». *Carcinogenesis* 31 (11): 1913-21. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq187>.
- Guo, Yan-Jun, Wei-Wei Pan, Sheng-Bing Liu, Zhong-Fei Shen, Ying Xu, et Ling-Ling Hu. 2020. « ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review) ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 19 (3): 1997-2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>.
- Gupta, Riya, Lokesh Kumar Bhatt, Thomas P. Johnston, et Kedar S Prabhavalkar. 2019. « Colon cancer stem cells: Potential target for the treatment of colorectal cancer ». *Cancer Biology & Therapy* 20 (8): 1068-82. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1599660>.
- Gupta, Ruby, Surajit Sinha, et Rabindra N. Paul. 2018. « The Impact of Microsatellite Stability Status in Colorectal Cancer ». *Current Problems in Cancer* 42 (6): 548-59. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2018.06.010>.
- Gustavsson, Bengt, Göran Carlsson, David Machover, Nicholas Petrelli, Arnaud Roth, Hans-Joachim Schmoll, Kjell-Magne Tveit, et Fernando Gibson. 2015. « A Review of the Evolution of Systemic Chemotherapy in the Management of Colorectal Cancer ». *Clinical Colorectal Cancer* 14 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2014.11.002>.
- Hadjimichael, Christiana, Konstantina Chanoumidou, Natalia Papadopoulou, Panagiota Arampatzi, Joseph Papamatheakis, et Androniki Kretsovali. 2015. « Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells ». *World Journal of Stem Cells* 7 (9): 1150-84. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i9.1150>.
- Hagemann, C., et U. R. Rapp. 1999. « Isotype-Specific Functions of Raf Kinases ». *Experimental Cell Research* 253 (1): 34-46. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4689>.
- Hatina, Jiri, Maximilian Boesch, Sieghart Sopper, Michaela Kripnerova, Dominik Wolf, Daniel Reimer, Christian Marth, et Alain G. Zeimet. 2019. « Ovarian Cancer Stem Cell Heterogeneity ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1139: 201-21. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14366-4_12.
- Heidelberger, Charles, N. K. Chaudhuri, Peter Danneberg, Dorothy Mooren, Lois Griesbach, Robert Duschinsky, R. J. Schnitzer, E. Plevin, et J. Scheiner. 1957. « Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds ». *Nature* 179 (4561): 663-66. <https://doi.org/10.1038/179663a0>.
- Heidorn, Sonja J., Carla Milagre, Steven Whittaker, Arnaud Nourry, Ion Niculescu-Duvas, Nathalie Dhomen, Jahan Hussain, et al. 2010. « Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF ». *Cell* 140 (2): 209-21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.040>.

- Henrikson, Nora B., Elizabeth M. Webber, Katrina A. Goddard, Aaron Scrol, Margaret Piper, Marc S. Williams, Doris T. Zallen, et al. 2015. « Family History and the Natural History of Colorectal Cancer: Systematic Review ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 17 (9): 702-12. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.188>.
- Herr, Ricarda, Sebastian Halbach, Miriam Heizmann, Hauke Busch, Melanie Boerries, et Tilman Brummer. 2018. « BRAF Inhibition Upregulates a Variety of Receptor Tyrosine Kinases and Their Downstream Effector Gab2 in Colorectal Cancer Cell Lines ». *Oncogene* 37 (12): 1576-93. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0063-5>.
- Herr, Ricarda, Martin Köhler, Hana Andrlová, Florian Weinberg, Yvonne Möller, Sebastian Halbach, Lisa Lutz, et al. 2015. « B-Raf Inhibitors Induce Epithelial Differentiation in BRAF-Mutant Colorectal Cancer Cells ». *Cancer Research* 75 (1): 216-29. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3686>.
- Herrero, Ana, Berta Casar, Paula Colón-Bolea, Lorena Agudo-Ibáñez, et Piero Crespo. 2016. « Defined Spatiotemporal Features of RAS-ERK Signals Dictate Cell Fate in MCF-7 Mammary Epithelial Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 27 (12): 1958. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-02-0118>.
- Hill, Richard P., et Roberto Perris. 2007. « “Destemming” Cancer Stem Cells ». *Journal of the National Cancer Institute* 99 (19): 1435-40. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm136>.
- Hochedlinger, Konrad, Yasuhiro Yamada, Caroline Beard, et Rudolf Jaenisch. 2005. « Ectopic Expression of Oct-4 Blocks Progenitor-Cell Differentiation and Causes Dysplasia in Epithelial Tissues ». *Cell* 121 (3): 465-77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.018>.
- Huang, Emina H., Mark J. Hynes, Tao Zhang, Christophe Ginestier, Gabriela Dontu, Henry Appelman, Jeremy Z. Fields, Max S. Wicha, et Bruce M. Boman. 2009. « Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Marker for Normal and Malignant Human Colonic Stem Cells (SC) and Tracks SC Overpopulation during Colon Tumorigenesis ». *Cancer Research* 69 (8): 3382-89. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4418>.
- Huh, Jung Wook, Hyeong Rok Kim, Young Jin Kim, Jae Hyuk Lee, Yeon Sun Park, Sang Hyuk Cho, et Jae Kyoon Joo. 2009. « Expression of Standard CD44 in Human Colorectal Carcinoma: Association with Prognosis ». *Pathology International* 59 (4): 241-46. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2009.02357.x>.
- Hyman, David M., Igor Puzanov, Vivek Subbiah, Jason E. Faris, Ian Chau, Jean-Yves Blay, Jürgen Wolf, et al. 2015. « Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations ». *The New England Journal of Medicine* 373 (8): 726-36. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502309>.
- IARC. 2018. « Dernières données mondiales sur le cancer : le fardeau du cancer atteint 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès par cancer en 2018 », 3.
- Issa, Jean-Pierre. 2004. « CpG Island Methylator Phenotype in Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 4 (12): 988-93. <https://doi.org/10.1038/nrc1507>.
- Itzkowitz, Steven H., et Xianyang Yio. 2004. « Inflammation and Cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 287 (1): G7-17. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00079.2004>.
- Iyer, Arun K., Amit Singh, Srinivas Ganta, et Mansoor M. Amiji. 2013. « Role of Integrated Cancer Nanomedicine in Overcoming Drug Resistance ». *Advanced Drug Delivery Reviews, Nanotechnology and drug resistance*, 65 (13): 1784-1802. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.012>.
- Jaggupilli, Appalaraju, et Eyad Elkord. 2012. « Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity ». Review Article. *Clinical and Developmental Immunology*. Hindawi. 30 mai 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/708036>.
- Jamali, Bardia, Maryam Nakhjavani, Leila Hosseinzadeh, Salimeh Amidi, Nastaran Nikounezhad, et Farshad H. Shirazi. 2015. « Intracellular GSH Alterations and Its Relationship to Level of Resistance following Exposure to Cisplatin in Cancer Cells ». *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR* 14 (2): 513-19.

- Jass, J. R. 2007. « Classification of Colorectal Cancer Based on Correlation of Clinical, Morphological and Molecular Features ». *Histopathology* 50 (1): 113-30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x>.
- Jin, Wook. 2020. « Regulation of Src Family Kinases during Colorectal Cancer Development and Its Clinical Implications ». *Cancers* 12 (5). <https://doi.org/10.3390/cancers12051339>.
- Jn, Poynter, Elder Jt, Fullen Dr, Nair Rp, Soengas Ms, Johnson Tm, Redman B, Thomas Ne, et Gruber Sb. 2006. « BRAF and NRAS Mutations in Melanoma and Melanocytic Nevi ». *Melanoma Research*. août 2006. <https://doi.org/10.1097/01.cmr.0000222600.73179.f3>.
- Johnston, P. G., H. J. Lenz, C. G. Leichman, K. D. Danenberg, C. J. Allegra, P. V. Danenberg, et L. Leichman. 1995. « Thymidylate Synthase Gene and Protein Expression Correlate and Are Associated with Response to 5-Fluorouracil in Human Colorectal and Gastric Tumors ». *Cancer Research* 55 (7): 1407-12.
- Kalluri, Raghu, et Robert A. Weinberg. 2009. « The basics of epithelial-mesenchymal transition ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1420-28. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.
- Karouliia, Zoi, Evripidis Gavathiotis, et Poulikos I. Poulikakos. 2017. « New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer ». *Nature reviews. Cancer* 17 (11): 676-91. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.79>.
- Kastrinos, Fay, et Sapna Syngal. 2007. « RECENTLY IDENTIFIED COLON CANCER PREDISPOSITIONS: MYH AND MSH6 MUTATIONS ». *Seminars in oncology* 34 (5): 418-24. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2007.07.005>.
- Keller, Laura, Stefan Werner, et Klaus Pantel. 2019. « Biology and clinical relevance of EpCAM ». *Cell Stress* 3 (6): 165-80. <https://doi.org/10.15698/cst2019.06.188>.
- Kimura, Hideharu, Kazuko Sakai, Tokuzo Arao, Tatsu Shimoyama, Tomohide Tamura, et Kazuto Nishio. 2007. « Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Cetuximab against Tumor Cells with Wild-Type or Mutant Epidermal Growth Factor Receptor ». *Cancer Science* 98 (8): 1275-80. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00510.x>.
- Kinzler, K. W., et B. Vogelstein. 1996. « Lessons from Hereditary Colorectal Cancer ». *Cell* 87 (2): 159-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81333-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81333-1).
- Kobayashi, Shinta, Hisafumi Yamada-Okabe, Masami Suzuki, Osamu Natori, Atsuhiko Kato, Koichi Matsubara, Yu Jau Chen, et al. 2012. « LGR5-Positive Colon Cancer Stem Cells Interconvert with Drug-Resistant LGR5-Negative Cells and Are Capable of Tumor Reconstitution ». *STEM CELLS* 30 (12): 2631-44. <https://doi.org/10.1002/stem.1257>.
- Kolch, Walter. 2000. « Meaningful Relationships : The Regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK Pathway by Protein Interactions », 17.
- Kopetz, Scott, Jayesh Desai, Emily Chan, Joel Randolph Hecht, Peter J. O'Dwyer, Dipen Maru, Van Morris, et al. 2015. « Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 33 (34): 4032-38. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.2497>.
- Kopetz, Scott, Axel Grothey, Rona Yaeger, Eric Van Cutsem, Jayesh Desai, Takayuki Yoshino, Harpreet Wasan, et al. 2019. « Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E–Mutated Colorectal Cancer ». *New England Journal of Medicine* 381 (17): 1632-43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908075>.
- Kopetz, Scott, Donald P. Lesslie, Nikolas A. Dallas, Serk I. Park, Marjorie Johnson, Nila U. Parikh, Michael P. Kim, et al. 2009. « Synergistic Activity of the SRC Family Kinase Inhibitor Dasatinib and Oxaliplatin in Colon Carcinoma Cells Is Mediated by Oxidative Stress ». *Cancer Research* 69 (9): 3842-49. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2246>.
- Koveitypour, Zahra, Farnoush Panahi, Mehrdad Vakilian, Maryam Peymani, Farzad Seyed Forootan, Mohammad Hossein Nasr Esfahani, et Kamran Ghaedi. 2019. « Signaling Pathways Involved in Colorectal Cancer Progression ». *Cell & Bioscience* 9: 97. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0361-4>.
- Krasinskas, Alyssa M. 2011. « EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma ». *Pathology Research International* 2011 (février): 1-6. <https://doi.org/10.4061/2011/932932>.

- Krishna, M., et H. Narang. 2008. « The Complexity of Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) Made Simple ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (22): 3525-44. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8170-7>.
- Kruh, Gary D., et Martin G. Belinsky. 2003. « The MRP Family of Drug Efflux Pumps ». *Oncogene* 22 (47): 7537-52. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206953>.
- Kuhlmann, Jan Dominik, Linda Hein, Ina Kurth, et Pauline Wimberger and Anna Dubrovská. 2015. « Targeting Cancer Stem Cells: Promises and Challenges ». *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 31 décembre 2015. <https://www.eurekaselect.com/133263/article>.
- Kuipers, Ernst J., William M. Grady, David Lieberman, Thomas Seufferlein, Joseph J. Sung, Petra G. Boelens, Cornelis J. H. van de Velde, et Toshiaki Watanabe. 2015. « COLORECTAL CANCER ». *Nature reviews. Disease primers* 1 (novembre): 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>.
- Kuipers, Ernst J., Thomas Rösch, et Michael Bretthauer. 2013. « Colorectal Cancer Screening--Optimizing Current Strategies and New Directions ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 10 (3): 130-42. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.12>.
- l'AFP-Relaxnews. 2019. « Le cancer est devenu la première cause de décès dans les pays riches ». Futura. 2019. <https://www.futura-sciences.com/sante/actualites/cancer-cancer-devenu-premiere-cause-deces-pays-riches-77467/>.
- Lam, Colin Siu-Chi, Alvin Ho-Kwan Cheung, Sunny Kit-Man Wong, Timothy Ming-Hun Wan, Lui Ng, Ariel Ka-Man Chow, Nathan Shiu-Man Cheng, et al. 2014. « Prognostic Significance of CD26 in Patients with Colorectal Cancer ». *PLoS ONE* 9 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098582>.
- Lao, Victoria Valinluck, et William M. Grady. 2011. « Epigenetics and Colorectal Cancer ». *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 8 (12): 686-700. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.173>.
- Lau, Eunice Yuen-Ting, Nicole Pui-Yu Ho, et Terence Kin-Wah Lee. 2017. « Cancer Stem Cells and Their Microenvironment: Biology and Therapeutic Implications ». *Stem Cells International* 2017: 3714190. <https://doi.org/10.1155/2017/3714190>.
- Lavoie, Hugo, et Marc Therrien. 2015. « Regulation of RAF Protein Kinases in ERK Signalling ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16 (5): 281-98. <https://doi.org/10.1038/nrm3979>.
- Lee, Soo Young, Kyung Ae Kim, Chang Hyun Kim, Young Jin Kim, Jae-Hyuk Lee, et Hyeong Rok Kim. 2017. « CD44-ShRNA Recombinant Adenovirus Inhibits Cell Proliferation, Invasion, and Migration, and Promotes Apoptosis in HCT116 Colon Cancer Cells ». *International Journal of Oncology* 50 (1): 329-36. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3801>.
- Li, Xiao-Dong, Mei Ji, Jun Wu, Jing-Ting Jiang, et Chang-Ping Wu. 2013. « Clinical Significance of CD44 Variants Expression in Colorectal Cancer ». *Tumori* 99 (1): 88-92. <https://doi.org/10.1700/1248.13794>.
- Li, Xiao-Lan, Jianbiao Zhou, Zhi-Rong Chen, et Wee-Joo Chng. 2015. « p53 mutations in colorectal cancer- molecular pathogenesis and pharmacological reactivation ». *World Journal of Gastroenterology : WJG* 21 (1): 84-93. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.84>.
- Liang, Jennifer J., Ian Bissett, Matthew Kalady, Ana Bennet, et James M. Church. 2013. « Importance of Serrated Polyps in Colorectal Carcinogenesis ». *ANZ Journal of Surgery* 83 (5): 325-30. <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.2012.06269.x>.
- Lièvre, Astrid, Christelle de la Fouchardière, Emmanuelle Samalin, Stéphane Benoist, Jean-Marc Phelip, Thierry André, et Gérard Lledo. 2020. « Cancers colorectaux avec mutation V600E de BRAF : où en sommes-nous ? ». *Bulletin du Cancer* 107 (9): 881-95. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2020.04.017>.
- Lind, M. J. 2008. « Principles of Cytotoxic Chemotherapy ». *Medicine* 36 (1): 19-23. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2007.10.003>.
- Linnekamp, Janneke F., Sander R. van Hooff, Pramudita R. Prasetyanti, Raju Kandimalla, Joyce Y. Buikhuisen, Evelyn Fessler, Prashanthi Ramesh, et al. 2018. « Consensus molecular subtypes of colorectal cancer are recapitulated in in vitro and in vivo models ». *Cell Death and Differentiation* 25 (3): 616-33. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0011-5>.

- Liu, Mo, Jian Tu, Julian A Gingold, Celine Shuet Lin Kong, et Dung-Fang Lee. 2018. « Cancer in a dish: progress using stem cells as a platform for cancer research ». *American Journal of Cancer Research* 8 (6): 944-54.
- Lm, Caronia, Phay Je, et Shah Mh. 2011. « Role of BRAF in Thyroid Oncogenesis ». *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 15 décembre 2011. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1155>.
- Lo, Murphy, Smith S, Chen Rh, Fingar Dc, et Blenis J. 2002. « Molecular Interpretation of ERK Signal Duration by Immediate Early Gene Products ». *Nature Cell Biology*. août 2002. <https://doi.org/10.1038/ncb822>.
- Lochhead, Paul, Aya Kuchiba, Yu Imamura, Xiaoyun Liao, Mai Yamauchi, Reiko Nishihara, Zhi Rong Qian, et al. 2013. « Microsatellite Instability and BRAF Mutation Testing in Colorectal Cancer Prognostication ». *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 105 (15): 1151-56. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt173>.
- Lombardi, L., F. Morelli, S. Cinieri, D. Santini, N. Silvestris, N. Fazio, L. Orlando, G. Tonini, G. Colucci, et E. Maiello. 2010. « Adjuvant Colon Cancer Chemotherapy: Where We Are and Where We'll Go ». *Cancer Treatment Reviews* 36 Suppl 3 (novembre): S34-41. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(10\)70018-9](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(10)70018-9).
- Longley, D. B., et P. G. Johnston. 2005. « Molecular Mechanisms of Drug Resistance ». *The Journal of Pathology* 205 (2): 275-92. <https://doi.org/10.1002/path.1706>.
- Loupakis, Fotios, Chiara Cremolini, Gianluca Masi, Sara Lonardi, Vittorina Zagonel, Lisa Salvatore, Enrico Cortesi, et al. 2014. « Initial Therapy with FOLFOXIRI and Bevacizumab for Metastatic Colorectal Cancer ». *New England Journal of Medicine* 371 (17): 1609-18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1403108>.
- Luebker, Stephen A., et Scott A. Koepsell. 2019. « Diverse Mechanisms of BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma Identified in Clinical and Preclinical Studies ». *Frontiers in Oncology* 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00268>.
- Luo, Yan, Man-Ju Che, Cong Liu, Hua-Ge Liu, Xiang-Wei Fu, et Yun-Peng Hou. 2018. « Toxicity and Related Mechanisms of Dihydroartemisinin on Porcine Oocyte Maturation in Vitro ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 341: 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.01.002>.
- Luu, Lee-Jen, et Timothy J. Price. 2019. « BRAF Mutation and Its Importance in Colorectal Cancer ». *Advances in the Molecular Understanding of Colorectal Cancer*, janvier. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82571>.
- Lynch, Henry T., Jane F. Lynch, Patrick M. Lynch, et Thomas Attard. 2008. « Hereditary Colorectal Cancer Syndromes: Molecular Genetics, Genetic Counseling, Diagnosis and Management ». *Familial Cancer* 7 (1): 27-39. <https://doi.org/10.1007/s10689-007-9165-5>.
- Ma, Lixin, Lihua Dong, et Pengyu Chang. 2019. « CD44v6 Engages in Colorectal Cancer Progression ». *Cell Death & Disease* 10 (1): 30. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1265-7>.
- Mandalà, Mario, et Christiane Voit. 2013. « Targeting BRAF in Melanoma: Biological and Clinical Challenges ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 87 (3): 239-55. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.01.003>.
- Manhas, J., A. Bhattacharya, S. K. Agrawal, B. Gupta, P. Das, S. V. S. Deo, S. Pal, et S. Sen. 2016. « Characterization of Cancer Stem Cells from Different Grades of Human Colorectal Cancer ». *Tumor Biology* 37 (10): 14069-81. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5232-6>.
- Manikandan, Palrasu, et Siddavaram Nagini. 2018. « Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review ». *Current Drug Targets* 19 (1): 38-54. <https://doi.org/10.2174/1389450118666170125144557>.
- Mao, Muling, Feng Tian, John M. Mariadason, Chun C. Tsao, Robert Lemos, Farshid Dayyani, Y. N. Vashisht Gopal, et al. 2013. « Resistance to BRAF Inhibition in BRAF-Mutant Colon Cancer Can Be Overcome with PI3K Inhibition or Demethylating Agents ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (3): 657-67. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1446>.

- Marcato, Paola, Cheryl A. Dean, Carman A. Giacomantonio, et Patrick W. K. Lee. 2011. « Aldehyde Dehydrogenase: Its Role as a Cancer Stem Cell Marker Comes down to the Specific Isoform ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (9): 1378-84. <https://doi.org/10.4161/cc.10.9.15486>.
- Marcato, Paola, Cheryl A. Dean, Da Pan, Rakhna Araslanova, Megan Gillis, Madalsa Joshi, Lucy Helyer, et al. 2011. « Aldehyde Dehydrogenase Activity of Breast Cancer Stem Cells Is Primarily Due to Isoform ALDH1A3 and Its Expression Is Predictive of Metastasis ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 29 (1): 32-45. <https://doi.org/10.1002/stem.563>.
- Marisa, Laetitia. s. d. « Classification et caractérisation des cancers colorectaux par approches omiques », 231.
- Markowitz, Sanford D., et Monica M. Bertagnolli. 2009. « Molecular Basis of Colorectal Cancer ». *New England Journal of Medicine* 361 (25): 2449-60. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804588>.
- Masciarelli, S., G. Fontemaggi, S. Di Agostino, S. Donzelli, E. Carcarino, S. Strano, et G. Blandino. 2014. « Gain-of-Function Mutant P53 Downregulates MiR-223 Contributing to Chemoresistance of Cultured Tumor Cells ». *Oncogene* 33 (12): 1601-8. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.106>.
- McCain, Jack. 2013. « The MAPK (ERK) Pathway ». *Pharmacy and Therapeutics* 38 (2): 96-108.
- McCormick, Frank. 2010. « How Blocking Raf Activates the MAPK Pathway ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 23 (2): 187-89. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00680.x>.
- Medema, Jan Paul, et Louis Vermeulen. 2011. « Microenvironmental Regulation of Stem Cells in Intestinal Homeostasis and Cancer ». *Nature* 474 (7351): 318-26. <https://doi.org/10.1038/nature10212>.
- Melo, Felipe De Sousa E, Louis Vermeulen, Evelyn Fessler, et Jan Paul Medema. 2013. « Cancer heterogeneity—a multifaceted view ». *EMBO Reports* 14 (8): 686-95. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.92>.
- Merlos-Suárez, Anna, Francisco M. Barriga, Peter Jung, Mar Iglesias, María Virtudes Céspedes, David Rossell, Marta Sevillano, et al. 2011. « The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse ». *Cell Stem Cell* 8 (5): 511-24. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.02.020>.
- Miquel, Catherine, Francesco Borrini, Sophie Grandjouan, Anne Aupérin, Jérôme Viguier, Valérie Velasco, Pierre Duvillard, Françoise Praz, et Jean-Christophe Sabourin. 2005. « Role of *Bax* Mutations in Apoptosis in Colorectal Cancers With Microsatellite Instability ». *American Journal of Clinical Pathology* 123 (4): 562-70. <https://doi.org/10.1309/JQ2X3RV3L8F9TGYW>.
- Modest, D. P., S. Pant, et A. Sartore-Bianchi. 2019. « Treatment Sequencing in Metastatic Colorectal Cancer ». *European Journal of Cancer* 109 (mars): 70-83. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.12.019>.
- Mojarad, Ehsan Nazemalhosseini, Peter JK Kuppen, Hamid Asadzadeh Aghdai, et Mohammad Reza Zali. 2013. « The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer ». *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench* 6 (3): 120-28.
- Montagut, Clara, Sreenath V. Sharma, Toshi Shioda, Ultan McDermott, Matthew Ulman, Lindsey E. Ulkus, Dora Dias-Santagata, et al. 2008. « Elevated CRAF as a Potential Mechanism of Acquired Resistance to BRAF Inhibition in Melanoma ». *Cancer Research* 68 (12): 4853-61. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6787>.
- Monteverde, Martino, Gerard Milano, Giuliana Strola, Monica Maffi, Laura Lattanzio, Daniela Vivenza, Federica Tonissi, Marco Merlano, et Cristiana Lo Nigro. 2015. « The Relevance of ADCC for EGFR Targeting: A Review of the Literature and a Clinically-Applicable Method of Assessment in Patients ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 95 (2): 179-90. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.02.014>.
- Morath, I., T. N. Hartmann, et V. Orian-Rousseau. 2016. « CD44: More than a Mere Stem Cell Marker ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 81 (décembre): 166-73. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein, et K. W. Kinzler. 1997. « Activation of Beta-Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in Beta-Catenin or

- APC ». *Science (New York, N.Y.)* 275 (5307): 1787-90. <https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1787>.
- Morrison, D. K. 2001. « KSR: A MAPK Scaffold of the Ras Pathway? » *Journal of Cell Science* 114 (9): 1609-12.
- Najafi, Masoud, Keywan Mortezaee, et Jamal Majidpoor. 2019. « Cancer Stem Cell (CSC) Resistance Drivers ». *Life Sciences* 234 (octobre): 116781. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116781>.
- Nappi, Anna, Massimiliano Berretta, Carmela Romano, Salvatore Tafuto, Antonino Cassata, Rossana Casaretti, Lucrezia Silvestro, et al. 2018. « Metastatic Colorectal Cancer: Role of Target Therapies and Future Perspectives ». *Current Cancer Drug Targets* 18 (5): 421-29. <https://doi.org/10.2174/1568009617666170209095143>.
- « NCT02519582 ». 2018. Drug Trial to Investigate the Safety and Efficacy of Niclosamide Tablets in Patients With Metastases of a Colorectal Cancer Progressing After Therapy - No Study Results Posted - ClinicalTrials.Gov. 2018. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02519582>.
- Neo, Jaclyn H, Eleanor I Ager, Peter W Angus, Jin Zhu, Chandana B Herath, et Christopher Christophi. 2010. « Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases ». *BMC Cancer* 10 (avril): 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-134>.
- Netgen. 2007. « Place de la chirurgie dans le traitement du cancer du sein métastatique d'emblée ». *Revue Médicale Suisse*. 2007. <https://www.revmed.ch/RMS/2007/RMS-130/32661>.
- Nguyen, Long H., Ajay Goel, et Daniel C. Chung. 2020. « Pathways of Colorectal Carcinogenesis ». *Gastroenterology, Colorectal Cancer: Recent Advances & Future Challenges*, 158 (2): 291-302. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.059>.
- Nguyen, Minhhuyn T., et David S. Weinberg. 2016. « Biomarkers in Colorectal Cancer Screening ». *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 14 (8): 1033-40. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2016.0109>.
- Nishikawa, Shimpei, Masamitsu Konno, Atsushi Hamabe, Shinichiro Hasegawa, Yoshihiro Kano, Katsuya Ohta, Takahito Fukusumi, et al. 2013. « Aldehyde dehydrogenasehigh gastric cancer stem cells are resistant to chemotherapy ». *International Journal of Oncology* 42 (4): 1437-42. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1837>.
- Novellasedemunt, Laura, Pedro Antas, et Vivian S. W. Li. 2015. « Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 309 (8): C511-21. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00117.2015>.
- Nusse, Roel, et Hans Clevers. 2017. « Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities ». *Cell* 169 (6): 985-99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>.
- O'Brien, Catherine A., Aaron Pollett, Steven Gallinger, et John E. Dick. 2007. « A Human Colon Cancer Cell Capable of Initiating Tumour Growth in Immunodeficient Mice ». *Nature* 445 (7123): 106-10. <https://doi.org/10.1038/nature05372>.
- O'Brien, Michael J., Shi Yang, Christopher S. Huang, Courtney Shepherd, Sandra Cerda, et Francis A. Farraye. 2008. « The Serrated Polyp Pathway to Colorectal Carcinoma ». *Diagnostic Histopathology* 14 (2): 78-93. <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2007.12.003>.
- Ogino, Shuji, Kaori Shima, Jeffrey A. Meyerhardt, Nadine J. McCleary, Kimmie Ng, Donna Hollis, Leonard B. Saltz, et al. 2012. « Predictive and Prognostic Roles of BRAF Mutation in Stage III Colon Cancer: Results from Intergroup Trial CALGB 89803 ». *Clinical Cancer Research* 18 (3): 890-900. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2246>.
- Oikonomou, Eftychia, Eleni Makrodouli, Maria Evagelidou, Tobias Joyce, Lesley Probert, et Alexander Pintzas. 2009. « BRAFV600E Efficient Transformation and Induction of Microsatellite Instability Versus KRASG12V Induction of Senescence Markers in Human Colon Cancer Cells ». *Neoplasia (New York, N.Y.)* 11 (11): 1116-31.
- Ojha, Rani, Shalmoli Bhattacharyya, et Shrawan K. Singh. 2015. « Autophagy in Cancer Stem Cells: A Potential Link Between Chemoresistance, Recurrence, and Metastasis ». *BioResearch Open Access* 4 (1): 97-108. <https://doi.org/10.1089/biores.2014.0035>.

- Okada, Hitoshi, et Tak W. Mak. 2004. « Pathways of Apoptotic and Non-Apoptotic Death in Tumour Cells ». *Nature Reviews Cancer* 4 (8): 592-603. <https://doi.org/10.1038/nrc1412>.
- O'Neil, Bert H., John M. Wallmark, David Lorente, Elena Elez, Judith Raimbourg, Carlos Gomez-Roca, Samuel Ejadi, et al. 2017. « Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma ». *PLoS ONE* 12 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189848>.
- Overman, Michael J., Sara Lonardi, Ka Yeung Mark Wong, Heinz-Josef Lenz, Fabio Gelsomino, Massimo Aglietta, Michael A. Morse, et al. 2018. « Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 36 (8): 773-79. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.9901>.
- « Oxaliplatin ». 2012. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548456/>.
- Pagès, G, P Lenormand, G L'Allemain, J C Chambard, S Meloche, et J Pouysségur. 1993. « Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (18): 8319-23.
- Paldino, Emanuela, Valentina Tesori, Patrizia Casalbore, Antonio Gasbarrini, et Maria Ausiliatrice Puglisi. 2014. « Tumor Initiating Cells and Chemoresistance: Which Is the Best Strategy to Target Colon Cancer Stem Cells? » *BioMed Research International* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/859871>.
- Pan, Guangjin, et James A. Thomson. 2007. « Nanog and Transcriptional Networks in Embryonic Stem Cell Pluripotency ». *Cell Research* 17 (1): 42-49. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310125>.
- Pang, Roberta, Wai Lun Law, Andrew C. Y. Chu, Jensen T. Poon, Colin S. C. Lam, Ariel K. M. Chow, Lui Ng, et al. 2010. « A Subpopulation of CD26+ Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity in Human Colorectal Cancer ». *Cell Stem Cell* 6 (6): 603-15. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.001>.
- Papin, C., A. Denouel, G. Calothy, et A. Eychène. 1996. « Identification of Signalling Proteins Interacting with B-Raf in the Yeast Two-Hybrid System ». *Oncogene* 12 (10): 2213-21.
- Parsons, D. Williams, Tian-Li Wang, Yardena Samuels, Alberto Bardelli, Jordan M. Cummins, Laura DeLong, Natalie Silliman, et al. 2005. « Mutations in a Signalling Pathway ». *Nature* 436 (7052): 792-792. <https://doi.org/10.1038/436792a>.
- Patai, Árpád V. 2013. « Serrated Pathway: Alternative Route to Colorectal Cancer ». *World Journal of Gastroenterology* 19 (5): 607. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i5.607>.
- Patriarca, Carlo, Roberto Maria Macchi, Anja K. Marschner, et Hakan Mellstedt. 2012. « Epithelial Cell Adhesion Molecule Expression (CD326) in Cancer: A Short Review ». *Cancer Treatment Reviews* 38 (1): 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.04.002>.
- Pearce, Daniel J., et Dominique Bonnet. 2007. « The Combined Use of Hoechst Efflux Ability and Aldehyde Dehydrogenase Activity to Identify Murine and Human Hematopoietic Stem Cells ». *Experimental Hematology* 35 (9): 1437-46. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.06.002>.
- Peinado, Héctor, David Olmeda, et Amparo Cano. 2007. « Snail, Zeb and BHLH Factors in Tumour Progression: An Alliance against the Epithelial Phenotype? » *Nature Reviews Cancer* 7 (6): 415-28. <https://doi.org/10.1038/nrc2131>.
- Phelip, Jean-Marc. 2018. « Cancer du côlon : classification moléculaire et anatomique nécessaire à la décision thérapeutique », 8.
- Pierre, Stéphane, Anne-Sophie bats, et Xavier Coumoul. 2011. « Understanding SOS (Son of Sevenless) ». *Biochemical Pharmacology* 82 (9): 1049-56. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.072>.
- Planque, Chris, Fatemeh Rajabi, Fanny Grillet, Pascal Finetti, François Bertucci, Meritxell Gironella, Juan José Lozano, et al. 2016. « Pregnane X-receptor promotes stem cell-mediated colon cancer relapse ». *Oncotarget* 7 (35): 56558-73. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10646>.

- Poulsen, M.L.M, et M.L Bisgaard. 2008. « MUTYH Associated Polyposis (MAP) ». *Current Genomics* 9 (6): 420-35. <https://doi.org/10.2174/138920208785699562>.
- Prahallad, Anirudh, Chong Sun, Sidong Huang, Federica Di Nicolantonio, Ramon Salazar, Davide Zecchin, Roderick L. Beijersbergen, Alberto Bardelli, et René Bernards. 2012. « Unresponsiveness of Colon Cancer to BRAF(V600E) Inhibition through Feedback Activation of EGFR ». *Nature* 483 (7387): 100-103. <https://doi.org/10.1038/nature10868>.
- Prasanna, Thiru, Christos S. Karapetis, David Roder, Jeanne Tie, Robert Padbury, Timothy Price, Rachel Wong, et al. 2018. « The Survival Outcome of Patients with Metastatic Colorectal Cancer Based on the Site of Metastases and the Impact of Molecular Markers and Site of Primary Cancer on Metastatic Pattern ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 57 (11): 1438-44. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1487581>.
- Punt, Cornelis J. A., Miriam Koopman, et Louis Vermeulen. 2017. « From Tumour Heterogeneity to Advances in Precision Treatment of Colorectal Cancer ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 14 (4): 235-46. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.171>.
- Pylayeva-Gupta, Yuliya, Elda Grabocka, et Dafna Bar-Sagi. 2011. « RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web ». *Nature reviews. Cancer* 11 (11): 761-74. <https://doi.org/10.1038/nrc3106>.
- Quail, Daniela F., et Johanna A. Joyce. 2013. « Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis ». *Nature Medicine* 19 (11): 1423-37. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>.
- Quintana, Elsa, Mark Shackleton, Michael S. Sabel, Douglas R. Fullen, Timothy M. Johnson, et Sean J. Morrison. 2008. « Efficient tumor formation by single human melanoma cells ». *Nature* 456 (7222): 593-98. <https://doi.org/10.1038/nature07567>.
- Rad, Roland, Juan Cadiñanos, Lena Rad, Ignacio Varela, Alexander Strong, Lydia Kriegl, Fernando Constantino-Casas, et al. 2013. « A Genetic Progression Model of BrafV600E-Induced Intestinal Tumorigenesis Reveals Targets for Therapeutic Intervention ». *Cancer Cell* 24 (1): 15-29. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.014>.
- Rajagopalan, Harith, Alberto Bardelli, Christoph Lengauer, Kenneth W. Kinzler, Bert Vogelstein, et Victor E. Velculescu. 2002. « Tumorigenesis: RAF/RAS Oncogenes and Mismatch-Repair Status ». *Nature* 418 (6901): 934. <https://doi.org/10.1038/418934a>.
- Raman, M., W. Chen, et M. H. Cobb. 2007. « Differential Regulation and Properties of MAPKs ». *Oncogene* 26 (22): 3100-3112. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210392>.
- Rawla, Prashanth, Tagore Sunkara, et Adam Barsouk. 2019. « Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors ». *Przegląd Gastroenterologiczny* 14 (2): 89-103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>.
- Raynal, Caroline, Jean-Marc Pascussi, Géraldine Leguelinel, Cyril Breuker, Jovana Kantar, Benjamin Lallemand, Sylvain Poujol, et al. 2010. « Pregnane X Receptor (PXR) Expression in Colorectal Cancer Cells Restricts Irinotecan Chemosensitivity through Enhanced SN-38 Glucuronidation ». *Molecular Cancer* 9 (mars): 46. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-46>.
- Recalcati, Stefania, Elena Gammella, et Gaetano Cairo. 2019. « Dysregulation of Iron Metabolism in Cancer Stem Cells ». *Free Radical Biology & Medicine* 133: 216-20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.015>.
- Reischmann, Nadine, Geoffroy Andrieux, Ricarda Griffin, Thomas Reinheckel, Melanie Boerries, et Tilman Brummer. 2020. « BRAFV600E drives dedifferentiation in small intestinal and colonic organoids and cooperates with mutant p53 and Apc loss in transformation ». *Oncogene* 39 (38): 6053-70. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01414-9>.
- Reya, Tannishtha, et Hans Clevers. 2005. « Wnt Signalling in Stem Cells and Cancer ». *Nature* 434 (7035): 843-50. <https://doi.org/10.1038/nature03319>.
- Ricci-Vitiani, Lucia, Eros Fabrizi, Elisabetta Palio, et Ruggero De Maria. 2009. « Colon Cancer Stem Cells ». *Journal of Molecular Medicine* 87 (11): 1097. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0518-4>.
- Ricci-Vitiani, Lucia, Dario G. Lombardi, Emanuela Pillozzi, Mauro Biffoni, Matilde Todaro, Cesare Peschle, et Ruggero De Maria. 2007. « Identification and Expansion of Human Colon-Cancer-Initiating Cells ». *Nature* 445 (7123): 111-15. <https://doi.org/10.1038/nature05384>.

- Richard, Vinitha, Madhumathy G. Nair, T. R. Santhosh Kumar, et M. Radhakrishna Pillai. 2013. « Side Population Cells as Prototype of Chemoresistant, Tumor-Initiating Cells ». *BioMed Research International* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/517237>.
- Ritt, Daniel A., Daniel M. Monson, Suzanne I. Specht, et Deborah K. Morrison. 2010. « Impact of Feedback Phosphorylation and Raf Heterodimerization on Normal and Mutant B-Raf Signaling ». *Molecular and Cellular Biology* 30 (3): 806-19. <https://doi.org/10.1128/MCB.00569-09>.
- Robey, Robert W., Kristen M. Pluchino, Matthew D. Hall, Antonio T. Fojo, Susan E. Bates, et Michael M. Gottesman. 2018. « Revisiting the role of efflux pumps in multidrug-resistant cancer ». *Nature reviews. Cancer* 18 (7): 452-64. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>.
- Rosen, Lee S., Ira A. Jacobs, et Ronald L. Burkes. 2017. « Bevacizumab in Colorectal Cancer: Current Role in Treatment and the Potential of Biosimilars ». *Targeted Oncology* 12 (5): 599-610. <https://doi.org/10.1007/s11523-017-0518-1>.
- Roseweir, Antonia K., Donald C. McMillan, Paul G. Horgan, et Joanne Edwards. 2017. « Colorectal Cancer Subtypes: Translation to Routine Clinical Pathology ». *Cancer Treatment Reviews* 57 (juin): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.04.006>.
- Roskoski, Robert. 2010. « RAF Protein-Serine/Threonine Kinases: Structure and Regulation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399 (3): 313-17. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.092>.
- . 2018. *Pharmacological Research* 135 (septembre): 239-58. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.013>.
- Saito, Seiya, Hirohisa Okabe, Masayuki Watanabe, Takatsugu Ishimoto, Masaaki Iwatsuki, Yoshifumi Baba, Youhei Tanaka, Junji Kurashige, Yuji Miyamoto, et Hideo Baba. 2013. « CD44v6 expression is related to mesenchymal phenotype and poor prognosis in patients with colorectal cancer ». *Oncology Reports* 29 (4): 1570-78. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2273>.
- Samowitz, Wade S., Carol Sweeney, Jennifer Herrick, Hans Albertsen, Theodore R. Levin, Maureen A. Murtaugh, Roger K. Wolff, et Martha L. Slattey. 2005. « Poor Survival Associated with the BRAF V600E Mutation in Microsatellite-Stable Colon Cancers ». *Cancer Research* 65 (14): 6063-69. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0404>.
- Santos, António J.M., Yuan-Hung Lo, Amanda T. Mah, et Calvin J. Kuo. 2018. « The Intestinal Stem Cell Niche: Homeostasis and Adaptations ». *Trends in cell biology* 28 (12): 1062-78. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.08.001>.
- Sanz-Garcia, Enrique, Tamara Saurí, Josep Taberner, et Teresa Macarulla. 2015. « Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of aflibercept for the treatment of colorectal cancer ». *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 11 (6): 995-1004. <https://doi.org/10.1517/17425255.2015.1041920>.
- Scalise, Paola, Annalisa Mantarro, Francesca Pancrazi, et Emanuele Neri. 2016. « Computed Tomography Colonography for the Practicing Radiologist: A Review of Current Recommendations on Methodology and Clinical Indications ». *World Journal of Radiology* 8 (5): 472. <https://doi.org/10.4329/wjr.v8.i5.472>.
- Schirripa, Marta, Paola Biason, Sara Lonardi, Nicoletta Pella, Maria Simona Pino, Federica Urbano, Carlotta Antoniotti, et al. 2019. « Class 1, 2, and 3 BRAF-Mutated Metastatic Colorectal Cancer: A Detailed Clinical, Pathologic, and Molecular Characterization ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 25 (13): 3954-61. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0311>.
- Schmohl, Jörg U., et Daniel A. Vallera. 2016. « CD133, Selectively Targeting the Root of Cancer ». *Toxins* 8 (6): 165. <https://doi.org/10.3390/toxins8060165>.
- Seligmann, J. F., D. Fisher, C. G. Smith, S. D. Richman, F. Elliott, S. Brown, R. Adams, et al. 2017. « Investigating the Poor Outcomes Of BRAF-Mutant Advanced Colorectal Cancer: Analysis from 2530 Patients in Randomised Clinical Trials ». *Annals of Oncology* 28 (3): 562-68. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw645>.

- Seppälä, T. T., J. P. Böhm, M. Friman, L. Lahtinen, V. M. J. Väyrynen, T. K. E. Liipo, A. P. Ristimäki, et al. 2015. « Combination of Microsatellite Instability and BRAF Mutation Status for Subtyping Colorectal Cancer ». *British Journal of Cancer* 112 (12): 1966-75. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.160>.
- Sewing, A., B. Wiseman, A. C. Lloyd, et H. Land. 1997. « High-Intensity Raf Signal Causes Cell Cycle Arrest Mediated by P21Cip1 ». *Molecular and Cellular Biology* 17 (9): 5588-97. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.9.5588>.
- Shi, Guilai, et Ying Jin. 2010. « Role of Oct4 in Maintaining and Regaining Stem Cell Pluripotency ». *Stem Cell Research & Therapy* 1 (5): 39. <https://doi.org/10.1186/scrt39>.
- Shi, Hubing, Willy Hugo, Xiangju Kong, Aayoung Hong, Richard C. Koya, Gatien Moriceau, Thinle Chodon, et al. 2014. « Acquired Resistance and Clonal Evolution in Melanoma during BRAF Inhibitor Therapy ». *Cancer Discovery* 4 (1): 80-93. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0642>.
- Shmelkov, Sergey V., Jason M. Butler, Andrea T. Hooper, Adilia Hormigo, Jared Kushner, Till Milde, Ryan St Clair, et al. 2008. « CD133 Expression Is Not Restricted to Stem Cells, and Both CD133+ and CD133- Metastatic Colon Cancer Cells Initiate Tumors ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (6): 2111-20. <https://doi.org/10.1172/JCI34401>.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, et Ahmedin Jemal. 2019. « Cancer Statistics, 2019 ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 69 (1): 7-34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>.
- Singh, A., et J. Settleman. 2010. « EMT, Cancer Stem Cells and Drug Resistance: An Emerging Axis of Evil in the War on Cancer ». *Oncogene* 29 (34): 4741-51. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.215>.
- Singh, Anju, Hailong Wu, Ping Zhang, Christine Happel, Jinfang Ma, et Shyam Biswal. 2010. « Expression of ABCG2 (BCRP), a Marker of Stem Cells, is Regulated by Nrf2 in Cancer Cells That Confers Side Population and Chemoresistance Phenotype ». *Molecular cancer therapeutics* 9 (8): 2365-76. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0108>.
- Singh, Surendra, Chad Brocker, Vindhya Koppaka, Ying Chen, Brian C. Jackson, Akiko Matsumoto, David C. Thompson, et Vasilis Vasiliou. 2013. « Aldehyde Dehydrogenases in Cellular Responses to Oxidative/Electrophilic Stress ». *Free Radical Biology & Medicine* 56 (mars): 89-101. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010>.
- Sirvent, Audrey, Rudy Mevizou, Dana Naim, Marie Lafitte, et Serge Roche. 2020. « Src Family Tyrosine Kinases in Intestinal Homeostasis, Regeneration and Tumorigenesis ». *Cancers* 12 (8). <https://doi.org/10.3390/cancers12082014>.
- Smeby, J., A. Sveen, M. A. Merok, S. A. Danielsen, I. A. Eilertsen, M. G. Guren, R. Dienstmann, A. Nesbakken, et R. A. Lothe. 2018. « CMS-Dependent Prognostic Impact of KRAS and BRAFV600E Mutations in Primary Colorectal Cancer ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 29 (5): 1227-34. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy085>.
- Snover, Dale C. 2011. « Update on the Serrated Pathway to Colorectal Carcinoma ». *Human Pathology* 42 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.humphath.2010.06.002>.
- Sousa e Melo, Felipe de, Antonina V. Kurtova, Jonathan M. Harnoss, Noelyn Kljavin, Joerg D. Hoeck, Jeffrey Hung, Jeffrey Eastham Anderson, et al. 2017. « A Distinct Role for Lgr5+ Stem Cells in Primary and Metastatic Colon Cancer ». *Nature* 543 (7647): 676-80. <https://doi.org/10.1038/nature21713>.
- Soysal, S. D., S. Muenst, T. Barbie, T. Fleming, F. Gao, G. Spizzo, D. Oertli, C. T. Viehl, E. C. Obermann, et W. E. Gillanders. 2013. « EpCAM Expression Varies Significantly and Is Differentially Associated with Prognosis in the Luminal B HER2(+), Basal-like, and HER2 Intrinsic Subtypes of Breast Cancer ». *British Journal of Cancer* 108 (7): 1480-87. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.80>.
- Stintzing, S, P Wirapati, H -J Lenz, D Neureiter, L Fischer von Weikersthal, T Decker, A Kiani, et al. 2019. « Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) trial ». *Annals of Oncology* 30 (11): 1796-1803. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz387>.

- Strassburg, Christian P., Sandra Kalthoff, et Ursula Ehmer. 2008. « Variability and Function of Family 1 Uridine-5'-Diphosphate Glucuronosyltransferases (UGT1A) ». *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 45 (6): 485-530. <https://doi.org/10.1080/10408360802374624>.
- Strickler, John H., Christina Wu, et Tanios Bekaii-Saab. 2017. « Targeting BRAF in Metastatic Colorectal Cancer: Maximizing Molecular Approaches ». *Cancer Treatment Reviews* 60 (novembre): 109-19. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.08.006>.
- Strumberg, Dirk, et Beate Schultheis. 2012. « Regorafenib for Cancer ». *Expert Opinion on Investigational Drugs* 21 (6): 879-89. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.684752>.
- Sun, Qiu, et Wenjing Wang. 2019. « Structures of BRAF–MEK1–14-3-3 Sheds Light on Drug Discovery ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 4 (1): 1-2. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0096-z>.
- Sveen, Anita, Scott Kopetz, et Ragnhild A. Lothe. 2020. « Biomarker-Guided Therapy for Colorectal Cancer: Strength in Complexity ». *Nature Reviews Clinical Oncology* 17 (1): 11-32. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0241-1>.
- Szakács, Gergely, Jill K. Paterson, Joseph A. Ludwig, Catherine Booth-Genthe, et Michael M. Gottesman. 2006. « Targeting Multidrug Resistance in Cancer ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 5 (3): 219-34. <https://doi.org/10.1038/nrd1984>.
- Szaryńska, Magdalena, Agata Olejniczak, Jarosław Kobiela, Piotr Spsychalski, et Zbigniew Kmiec. 2017. « Therapeutic strategies against cancer stem cells in human colorectal cancer ». *Oncology Letters* 14 (6): 7653-68. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7261>.
- Tabernero, Josep, Robin Van Geel, Tormod Kyrre Guren, Rona D. Yaeger, Anna Spreafico, Jason Edward Faris, Takayuki Yoshino, et al. 2016. « Phase 2 results: Encorafenib (ENCO) and cetuximab (CETUX) with or without alpelisib (ALP) in patients with advanced BRAF-mutant colorectal cancer (BRAFM CRC). » *Journal of Clinical Oncology* 34 (15_suppl): 3544-3544. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.3544.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, et Shinya Yamanaka. 2007. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors ». *Cell* 131 (5): 861-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
- Talamonti, M. S., M. S. Roh, S. A. Curley, et G. E. Gallick. 1993. « Increase in Activity and Level of Pp60c-Src in Progressive Stages of Human Colorectal Cancer. » *The Journal of Clinical Investigation* 91 (1): 53-60. <https://doi.org/10.1172/JCI116200>.
- Tang, Zhiyu, Xi Yuan, Rong Du, Shing-Hu Cheung, Guoliang Zhang, Jing Wei, Yuan Zhao, et al. 2015. « BGB-283, a Novel RAF Kinase and EGFR Inhibitor, Displays Potent Antitumor Activity in BRAF-Mutated Colorectal Cancers ». *Molecular Cancer Therapeutics* 14 (10): 2187-97. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0262>.
- Testa, Ugo, Elvira Pelosi, et Germana Castelli. 2018. « Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells ». *Medical Sciences* 6 (2). <https://doi.org/10.3390/medsci6020031>.
- Tilg, Herbert, Timon E. Adolph, Romana R. Gerner, et Alexander R. Moschen. 2018. « The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer ». *Cancer Cell* 33 (6): 954-64. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.004>.
- Todaro, Matilde, Miriam Gaggianesi, Veronica Catalano, Antonina Benfante, Flora Iovino, Mauro Biffoni, Tiziana Apuzzo, et al. 2014. « CD44v6 Is a Marker of Constitutive and Reprogrammed Cancer Stem Cells Driving Colon Cancer Metastasis ». *Cell Stem Cell* 14 (3): 342-56. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.009>.
- Tomita, Hiroyuki, Kaori Tanaka, Takuji Tanaka, et Akira Hara. 2016. « Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer ». *Oncotarget* 7 (10): 11018-32. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6920>.
- Torlakovic, Emina, Eva Skovlund, Dale C. Snover, Goran Torlakovic, et Jahn M. Nesland. 2003. « Morphologic Reappraisal of Serrated Colorectal Polyps ». *The American Journal of Surgical Pathology* 27 (1): 65-81. <https://doi.org/10.1097/00000478-200301000-00008>.

- Toyota, Minoru, Nita Ahuja, Mutsumi Ohe-Toyota, James G Herman, Stephen B Baylin, et Jean-Pierre J Issa. 1999. « CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 6.
- Tran, Ben, Scott Kopetz, Jeanne Tie, Peter Gibbs, Zhi-Qin Jiang, Christopher H Lieu, Atin Agarwal, Dipen M Maru, Oliver Sieber, et Jayesh Desai. 2011. « Impact of BRAF Mutation and Microsatellite Instability on the Pattern of Metastatic Spread and Prognosis in Metastatic Colorectal Cancer ». *Cancer* 117 (20): 4623-32. <https://doi.org/10.1002/cncr.26086>.
- Trzpis, Monika, Pamela M. J. McLaughlin, Lou M. F. H. de Leij, et Martin C. Harmsen. 2007. « Epithelial Cell Adhesion Molecule: More than a Carcinoma Marker and Adhesion Molecule ». *The American Journal of Pathology* 171 (2): 386-95. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070152>.
- Tsai, James, John T. Lee, Weiru Wang, Jiazhong Zhang, Hanna Cho, Shumeye Mamo, Ryan Bremer, et al. 2008. « Discovery of a Selective Inhibitor of Oncogenic B-Raf Kinase with Potent Antimelanoma Activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (8): 3041-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711741105>.
- Vaiopoulos, Aristides G., Ioannis D. Kostakis, Michael Koutsilieris, et Athanasios G. Papavassiliou. 2012. « Colorectal Cancer Stem Cells ». *STEM CELLS* 30 (3): 363-71. <https://doi.org/10.1002/stem.1031>.
- Van Cutsem, Eric, Claus-Henning Köhne, István Láng, Gunnar Folprecht, Marek P. Nowacki, Stefano Cascinu, Igor Shchepotin, et al. 2011. « Cetuximab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin as First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: Updated Analysis of Overall Survival According to Tumor KRAS and BRAF Mutation Status ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (15): 2011-19. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.5091>.
- Varga, Julia, et Florian R. Greten. 2017. « Cell Plasticity in Epithelial Homeostasis and Tumorigenesis ». *Nature Cell Biology* 19 (10): 1133-41. <https://doi.org/10.1038/ncb3611>.
- Vazquez, Alexei, Elisabeth E. Bond, Arnold J. Levine, et Gareth L. Bond. 2008. « The Genetics of the P53 Pathway, Apoptosis and Cancer Therapy ». *Nature Reviews Drug Discovery* 7 (12): 979-87. <https://doi.org/10.1038/nrd2656>.
- Vermeulen, Louis, et Hugo J. Snippert. 2014. « Stem Cell Dynamics in Homeostasis and Cancer of the Intestine ». *Nature Reviews Cancer* 14 (7): 468-80. <https://doi.org/10.1038/nrc3744>.
- Visvader, Jane E., et Geoffrey J. Lindeman. 2008. « Cancer Stem Cells in Solid Tumours: Accumulating Evidence and Unresolved Questions ». *Nature Reviews. Cancer* 8 (10): 755-68. <https://doi.org/10.1038/nrc2499>.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits, et J. L. Bos. 1988. « Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development ». *The New England Journal of Medicine* 319 (9): 525-32. <https://doi.org/10.1056/NEJM198809013190901>.
- Vries, Robert G. J., Meritxell Huch, et Hans Clevers. 2010. « Stem Cells and Cancer of the Stomach and Intestine ». *Molecular Oncology* 4 (5): 373-84. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.05.001>.
- Wahab, S. M. Riajul, Farhadul Islam, Vinod Gopalan, et Alfred King-Yin Lam. 2017. « The Identifications and Clinical Implications of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer ». *Clinical Colorectal Cancer* 16 (2): 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2017.01.011>.
- Wan, Paul T. C., Mathew J Garnett, S. Mark Roe, Sharlene Lee, Dan Niculescu-Duvaz, Valerie M Good, Cancer Genome Project, et al. 2004. « Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF ». *Cell* 116 (6): 855-67. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00215-6).
- Wang, Jianhua, Jiajia Shen, Chi Huang, Meng Cao, et Lizong Shen. 2019. « Clinicopathological Significance of BRAFV600E Mutation in Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis ». *Journal of Cancer* 10 (10): 2332-41. <https://doi.org/10.7150/jca.30789>.
- Wang, W. S., P. M. Chen, et Y. Su. 2006. « Colorectal Carcinoma: From Tumorigenesis to Treatment ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63 (6): 663-71. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5425-4>.

- Wang, Y-D, N Cai, X-L Wu, H-Z Cao, L-L Xie, et P-S Zheng. 2013. « OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway ». *Cell Death & Disease* 4 (8): e760. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.272>.
- Weber, C. K., J. R. Slupsky, H. A. Kalmes, et U. R. Rapp. 2001. « Active Ras Induces Heterodimerization of CRaf and BRaf ». *Cancer Research* 61 (9): 3595-98.
- Weiswald, L-B, S Richon, P Validire, M Briffod, R Lai-Kuen, F P Cordelières, F Bertrand, et al. 2009. « Newly characterised ex vivo colospheres as a three-dimensional colon cancer cell model of tumour aggressiveness ». *British Journal of Cancer* 101 (3): 473-82. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605173>.
- Weledji, Elroy Patrick. 2017. « Centralization of Liver Cancer Surgery and Impact on Multidisciplinary Teams Working on Stage IV Colorectal Cancer ». *Oncology Reviews* 11 (2). <https://doi.org/10.4081/oncol.2017.331>.
- Wellbrock, Claudia, Maria Karasarides, et Richard Marais. 2004. « The RAF Proteins Take Centre Stage ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 (11): 875-85. <https://doi.org/10.1038/nrm1498>.
- Whitmarsh, Alan J. 2007. « Regulation of Gene Transcription by Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Mitogen-Activated Protein Kinases: New Insights on Regulation, Function and Role in Human Disease*, 1773 (8): 1285-98. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.011>.
- Williams, Roger D., et James W. Dickey. 1969. « Physiology of the Colon and Rectum ». *The American Journal of Surgery* 117 (6): 849-53. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(69\)90074-9](https://doi.org/10.1016/0002-9610(69)90074-9).
- Wood, Laura D., D. Williams Parsons, Siân Jones, Jimmy Lin, Tobias Sjöblom, Rebecca J. Leary, Dong Shen, et al. 2007. « The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers ». *Science (New York, N.Y.)* 318 (5853): 1108-13. <https://doi.org/10.1126/science.1145720>.
- Xie, Yuan-Hong, Ying-Xuan Chen, et Jing-Yuan Fang. 2020. « Comprehensive Review of Targeted Therapy for Colorectal Cancer ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5: 22. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>.
- Yaeger, Rona, Andrea Cercek, Joanne F. Chou, Brooke E. Sylvester, Nancy E. Kemeny, Jadlyn F. Hechtman, Marc Ladanyi, et al. 2014. « BRAF Mutation Predicts for Poor Outcomes after Metastectomy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer ». *Cancer* 120 (15): 2316-24. <https://doi.org/10.1002/cncr.28729>.
- Yamagishi, Hidetsugu, Hajime Kuroda, Yasuo Imai, et Hideyuki Hiraishi. 2016. « Molecular Pathogenesis of Sporadic Colorectal Cancers ». *Chinese Journal of Cancer* 35 (janvier): 4. <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0066-y>.
- Yang, Shen-Hsi, Andrew D. Sharrocks, et Alan J. Whitmarsh. 2003. « Transcriptional Regulation by the MAP Kinase Signaling Cascades ». *Gene* 320 (novembre): 3-21. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00816-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00816-3).
- . 2013. « MAP Kinase Signalling Cascades and Transcriptional Regulation ». *Gene* 513 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.033>.
- Yang, Yingchi, Dong Wang, Lan Jin, Guocong Wu, Zhigang Bai, Jin Wang, Hongwei Yao, et Zhongtao Zhang. 2018. « Prognostic Value of the Combination of Microsatellite Instability and BRAF Mutation in Colorectal Cancer ». *Cancer Management and Research* 10: 3911-29. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S169649>.
- Yang, Yue, Xiaoman Li, Ting Wang, Qianqian Guo, Tao Xi, et Lufeng Zheng. 2020. « Emerging agents that target signaling pathways in cancer stem cells ». *Journal of Hematology & Oncology* 13 (1): 60. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00901-6>.
- Yao, Zhan, Neilawattie M. Torres, Anthony Tao, Yijun Gao, Lusong Luo, Qi Li, Elisa de Stanchina, et al. 2015. « BRAF mutants evade ERK dependent feedback by different mechanisms that determine their sensitivity to pharmacologic inhibition ». *Cancer cell* 28 (3): 370-83. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.08.001>.
- Yasuda, Kazuyo, Toshihiko Torigoe, Rena Morita, Takahumi Kuroda, Akari Takahashi, Junichi Matsuzaki, Vitaly Kochin, et al. 2013. « Ovarian Cancer Stem Cells Are Enriched in Side Population and

- Aldehyde Dehydrogenase Bright Overlapping Population ». *PLOS ONE* 8 (8): e68187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068187>.
- Yeaman, Timothy J. 2004. « A Renaissance for SRC ». *Nature Reviews Cancer* 4 (6): 470-80. <https://doi.org/10.1038/nrc1366>.
- Young, Amy, Jesse Lyons, Abigail L. Miller, Vernon T. Phan, Irma Rangel Alarcón, et Frank McCormick. 2009. « Chapter 1 Ras Signaling and Therapies ». In *Advances in Cancer Research*, 102:1-17. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(09\)02001-6](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(09)02001-6).
- Yu, Ling, Zhengfu Fan, Shuo Fang, Jian Yang, Tian Gao, Bruno M. Simões, Rachel Eyre, Weichun Guo, et Robert B. Clarke. 2016. « Cisplatin selects for stem-like cells in osteosarcoma by activating Notch signaling ». *Oncotarget* 7 (22): 33055-68. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8849>.
- Yuan, T. L., et L. C. Cantley. 2008. « PI3K Pathway Alterations in Cancer: Variations on a Theme ». *Oncogene* 27 (41): 5497-5510. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.245>.
- Yuryev, A., M. Ono, S. A. Goff, F. Macaluso, et L. P. Wennogle. 2000. « Isoform-Specific Localization of A-RAF in Mitochondria ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (13): 4870-78. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.13.4870-4878.2000>.
- Zarour, Luai R., Sudarshan Anand, Kevin G. Billingsley, William H. Bisson, Andrea Cercek, Michael F. Clarke, Lisa M. Coussens, et al. 2017. « Colorectal Cancer Liver Metastasis: Evolving Paradigms and Future Directions ». *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 3 (2): 163-73. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.01.006>.
- Zhao, Bin, Xin Li, Ye Wang, et Peng Shang. 2018. « Iron-Dependent Cell Death as Executioner of Cancer Stem Cells ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 37 (1): 79. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0733-3>.
- Zhao, Jihe. 2016. « Cancer Stem Cells and Chemoresistance: The Smartest Survives the Raid ». *Pharmacology & therapeutics* 160 (avril): 145-58. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.02.008>.
- Zheng, Hua-Chuan. 2017. « The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers ». *Oncotarget* 8 (35): 59950-64. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048>.
- Zhou, Dang-xia, Yun-xia Liu, et Ya-hong Xue. 2012. « Expression of CD44v6 and Its Association with Prognosis in Epithelial Ovarian Carcinomas ». Research Article. Pathology Research International. Hindawi. 23 février 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/908206>.
- Zhu, Pingping, et Zusen Fan. 2018. « Cancer Stem Cells and Tumorigenesis ». *Biophysics Reports* 4 (4): 178-88. <https://doi.org/10.1007/s41048-018-0062-2>.
- Zouiten-Mekki, Lilia, Meriem Serghini, Monia Fekih, Lamia Kallel, Samira Matri, Nadia Ben Mustapha, Jalel Boubaker, et Azza Filali. 2013. « Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ». *médecine/sciences* 29 (12): 1145-50. <https://doi.org/10.1051/medsci/20132912019>.

