



HAL
open science

De la caractérisation des Cellules Initiant le Cancer Colorectal vers un biomarqueur pronostique et de surveillance des sujets traités pour cancer colorectal

Niki Christou

► To cite this version:

Niki Christou. De la caractérisation des Cellules Initiant le Cancer Colorectal vers un biomarqueur pronostique et de surveillance des sujets traités pour cancer colorectal. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2017. Français. NNT : 2017LIMO0007 . tel-03880321

HAL Id: tel-03880321

<https://theses.hal.science/tel-03880321>

Submitted on 1 Dec 2022

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.



Université de Limoges

Ecole Doctorale BIOSANTE

Laboratoire EA3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Biologie

Présentée et soutenue par
NIKI CHRISTOU

Le Vendredi 3 Mars 2017

De la caractérisation des Cellules Initiant le Cancer Colorectal vers un biomarqueur pronostique et de surveillance des sujets traités pour cancer colorectal

Thèse co-dirigée par les Pr Muriel MATHONNET et Pr Serge BATTU

JURY :

Président du jury

M. Denis VALLEIX, Doyen de la Faculté de médecine de Limoges,
PU PH, Service de Chirurgie Digestive Générale et
Endocrinienne, CHRU Limoges

Rapporteurs

M. Majid KHATIB, DR2, Laboratoire De l'Angiogenèse et du Microenvironnement
des Cancers, INSERM U1029, Université de Bordeaux

M. Mehdi OUAISSI, PU PH, Service de Chirurgie Digestive et Colorectale, Université
de Tours

Examineurs

M. Christophe MARIETTE, PU PH, Université de Lille

M. Serge BATTU, PU, Université de Limoges

Mme. Muriel MATHONNET PU PH, EA3842, Université de Limoges



A mes grands-parents,



Remerciements

A Monsieur le Professeur Denis VALLEIX,

Chef de Service, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier du Service de Chirurgie Digestive Générale et Endocrinienne, CHRU Limoges

Doyen de la Faculté de Médecine, Université de Limoges

Vous m'avez fait l'honneur de bien vouloir assurer la présidence de cette thèse.

Je tiens à vous exprimer mes plus vifs remerciements pour l'ensemble de vos conseils, votre aide, votre écoute et votre disponibilité tout au long de mon parcours, malgré vos très nombreuses charges.

Comme le disait Thalès, parce que « le temps met tout en lumière », « ὁ χρόνος κάνει κάθε φως », que ce travail me permette de vous exprimer mon profond respect et ma très sincère reconnaissance.

A Monsieur Majid KHATIB,

DR2, Laboratoire De l'Angiogenèse et du Microenvironnement des Cancers, INSERM U1029, Université de Bordeaux

Recevez Monsieur, mes plus sincères remerciements pour m'avoir fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être rapporteur. Je tiens à vous exprimer ma plus profonde reconnaissance.

A Monsieur Mehdi OUAISSI,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier du Service de Chirurgie Digestive et Colorectale, Université de Poitiers

Recevez Monsieur, mes plus sincères remerciements pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse en qualité de rapporteur de mon travail, pour le temps consacré à l'examen de cette thèse.

A Monsieur le Professeur Christophe MARIETTE,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier du Service de Chirurgie Digestive et Générale, Université de Lille

Recevez Monsieur, mes plus sincères remerciements pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinateur. Soyez assuré de toute mon estime et de mon profond respect.



A Madame le Professeur Muriel MATHONNET,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier du Service de Chirurgie Digestive Générale et Endocrinienne, CHRU Limoges

Faculté de Médecine, Université de Limoges, Laboratoire EA 3842 « Homéostasie cellulaire et Pathologies »,

Directrice de Thèse

Madame, je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Un grand merci pour votre disponibilité, votre soutien, ainsi que vos nombreux et précieux conseils.

A Monsieur le Professeur Serge BATTU,

Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, Laboratoire EA 3842, « Homéostasie cellulaire et Pathologies »,

Co-directeur de Thèse

Je te remercie pour toute la disponibilité dont tu as fais preuve à mon égard, pour tes précieux conseils et remarques constructives. Merci pour ta confiance et ton soutien.

A Madame le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier au Laboratoire d'Immunologie, CHRU Limoges

Faculté de Médecine, Université de Limoges, Directrice du laboratoire EA 3842, « Homéostasie cellulaire et Pathologie »

Madame, je vous remercie de m'avoir gentiment accueillie au sein du laboratoire EA 3842. Soyez assurée de ma plus profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Aurélie PERRAUD,

Ingénieur de Recherche au CHRU de Limoges

Faculté de Médecine, Université de Limoges, Laboratoire EA 3842 « Homéostasie cellulaire et Pathologies »

Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris, ta disponibilité, tes conseils, ta patience.

Je remercie bien évidemment toute mon équipe au sein du laboratoire, doctorants et statutaires, qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Merci à toutes et tous : Barbara, Mireille, Danielle, Fabrice pour leur gentillesse et leur disponibilité.



Merci à tous les doctorants qui m'ont subie pendant ces trois années formidables à l'EA 3842 : merci pour vos conseils lors de mes innombrables western blots et proteome array...

Merci à l'EA 3842 de m'avoir fait rencontrer et adopter la compagnie méditerranéo-brésilio-périgourdine : vous comptez énormément pour moi...vous êtes à jamais dans mon cœur...

Merci à tous mes autres amis : de près comme de loin mais heureusement skype et whatsapp me rapprochent de vous... Merci pour votre soutien de chaque instant...

A vous ma famille : ma sœur Fanny, mes parents, sans qui je ne suis rien... Vous êtes mon moteur...

Enfin mes derniers mots seront adressés à ceux qui me manquent énormément et à qui je dédie ce travail...A mes grands-parents ...



SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION	12
Chapitre I. Généralités – données de la littérature sur le cancer colorectal (CCR) 13	
1. Epidémiologie	13
2. Lésions pré cancéreuses	17
3. Histoire naturelle, cancérogénèse.....	19
a. Voie de l’instabilité chromosomique – Chromosomal instability (CIN)	20
b. Voie de l’instabilité des loci de microsatellites (cancers RER+ ou MSI).....	21
c. Voie « CpG island methylator phenotype » (CIMP).....	21
4. Classification des CCR	24
5. Bases thérapeutiques des CCR	25
a. Chirurgie.....	25
b. Radiothérapie	25
c. Chimiothérapie	26
d. Thérapies ciblées.....	28
Chapitre II. Les cellules initiant le cancer colorectal (CIC)	30
1. Les cellules souches intestinales (CSI) saines.....	30
1.1 Caractéristiques des cellules souches intestinales	30
1.2. Voies de régulation des cellules souches intestinales saines	31
a. La voie Wnt.....	31
b. La voie PTEN-PI3K-Akt.....	32
c. La voie BMP	33
d. La voie Notch.....	33
e. La voie Hedgehog.....	33
2. Les cellules initiatrices de cancer (CIC)	34
2.1. Carcinogénèse colorectale, le modèle de la cellule « souche » initiant le cancer.....	34
2.2. Carcinogénèse et dérégulations des voies de signalisation	36
2.3. Niche tumorale	37
2.4. Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), métastases et résistance aux thérapies	37
3. Méthodes d’identification et d’isolement des CIC.....	39
3.1 Méthodes d’identification et de caractérisation.....	39
a. Caractérisation phénotypique	39
b. Caractérisation fonctionnelle	40
3.2 Méthodes d’isolement	42
Chapitre III. E cadhérine, marqueur de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT).....	46
1. E cadhérine, marqueur d’adhésion intercellulaire.....	46
1.1. E cadhérine, structure	46
1.2. E cadhérine, fonction	47
a. Fonction contrôlée par le domaine EC	47
b. Fonction contrôlée par le domaine CD.....	47
c. Dynamique de l’adhésion intercellulaire via la E cadhérine.....	48
d. Perte de fonction et début du processus tumoral.....	48



2. E cadhérine et cancérogénèse	50
2.1. Altérations structurelles du gène CDH1	51
2.2. Dérégulations transcriptionnelles de CDH1	51
2.3. Dérégulations post traductionnelles de la E cadhérine	52
2.4. E cadhérine et dérégulations des voies de signalisation au sein de la carcinogénèse colorectale.....	52
3. E cadhérine et cancer colorectal	53
4. Article 1, Revue : La E cadhérine, biomarqueur pronostique du cancer colorectal? 55	
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	71
RESULTATS	73
Chapitre I. Caractérisation des fractions de Sdfff : analyses <i>in vitro</i> : étude de la chimio-sensibilité des fractions de sdfff	74
1. Matériel.....	74
2. Méthodes	75
3. Résultats	77
Chapitre II. Nouveaux modèles <i>ex ovo</i> et <i>in vivo</i> de CCR à partir de cellules initiatrices de tumeurs triées par Sdfff	78
1. Article 2, Le modèle de la membrane chorio-allantoïdienne de poulet (CAM)	78
.....	87
2. Le modèle de la souris immunodéprimée, SCID	89
2.1. Matériel.....	89
2.2. Méthodes	89
2.3. Résultats	94
A. Greffes sous cutanées	94
B. Greffes intra cæcales.....	99
Chapitre III. Le domaine extra cellulaire de la E cadhérine relié à l'invasivité du CCR : un nouveau biomarqueur sérique de résistance et de surveillance des rechutes ?	101
Article 3, Le domaine extra cellulaire de la E cadhérine relié à l'invasivité du CCR : un nouveau biomarqueur sérique de résistance et de surveillance des rechutes ?.....	101
DISCUSSION	146
I. <i>In Vitro</i> : Comportement des deux types de CIC selon le protocole de chimiothérapie	146
II. <i>Ex ovo</i> : Comportement des deux types de CIC après greffes sur la CAM	146
III. <i>In vivo</i> : Comportement des deux types de CIC après greffes sur la souris SCID	148
1. Greffes sous-cutanées.....	148
2. Greffes intra cæcales.....	149
IV. E cadhérine, marqueur de sous types de CIC mais également biomarqueur diagnostique, pronostique et de surveillance de la carcinogénèse colorectale ?	150
CONCLUSION - PESPECTIVES	152
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	155
Annexes	168



Table des illustrations.....	175
Table des tableaux.....	176
Table des matières.....	177

LISTE DES ABREVIATIONS

-A-

- * AFT : Adénomes Festonnés Traditionnels
- * AFS : Adénomes Festonnés Sessiles
- * APC : Adenomatous polyposis coli
- * APPR : puces à protéines en phase inverse
- * ASCO : American Society of Clinical Oncology
- * ALCAM: Activated Leucocyte Cell Adhesion Molecule
- * ALDH : Aldéhyde Déshydrogénase
- * AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
- * APC : Adenomatous Polyposis Coli
- * ATCC: American Type Culture Collection

-B-

- * BMP : Bone Morphogenic Protein
- * BSA : Bovine Serum Albumine

-C-

- * CCR : Cancer Colorectal
- * CIN : Chromosomal instability
- * CRCSC : Cancer Colorectal Subtyping Consortium
- * CMS : Consensus Molecular Subtype
- * CIC : Cellule Initiant le Cancer
- * CSI : Cellule Souche Intestinale
- * CSC : Cellule Souche Cancéreuse
- * CAM : Membrane Chorio-Allantoïdienne

-D-

- * DMSO : Diméthylsulfoxyde

-E-

- * EMT : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
- * EpCAM : Molécule d'Adhésion Epithéliale Cellulaire



- * ED : Embryonic Day
- * EGF : Epidermal Growth Factor

-F-

- * FOLFOX : 5 Fluorouracile - acide folinique - Oxaliplatine
- * FACS : Fluorescent Activated Cells Sorting
- * FFF : Field Flow Fractionation

-H-

- * HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer
- * HES : Hematoxyline Eosine Safran

-I-

- * INCA: Institut National du Cancer

-L-

- * LOH: Loss of Heterozygoty

-M-

- * MMR : Mismatch Repair
- * MSI : MicroSatellite Instability
- * MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
- * MACS: Magnetic Activated Cell Sorting
- * MMPs : Métalloprotéinases
- * MTT : 3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

-N-

- * NNK : 4-(méthylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
- * NF-κB : Nuclear Factor Kappa B
- * NOD/SCID : Non Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency

-O-

- * Oct 3/4 : Octamer-binding transcription factor 3/4



-P-

- * PAF: Polypose Adénomateuse Familiale
- * PT : Pic Total
- * PBS : Phosphate Buffer Saline
- * PFA : paraformaldéhyde
- * PI3K : Phosphatidyl Inositol 3-Kinase

-R-

- * RER : Replicator Error
- * ROS : Reactive Oxygen Species
- * RTKs : Récepteurs à Tyrosine Kinase

-S-

- * SdFFF : Sedimentation Field Flow Fractionation
- * SSR : Survie sans récurrence
- * SG : Survie globale
- * SAR : Survie après récurrence
- * SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency
- * SNA: Sambucus Nigra
- * SVF : Sérum de Veau Foetal

-T-

- * TNM : Tumor-Node-Metastasis

-V-

- * VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
- * VM : Volume Mort

5-FU : 5-FluoroUracile



INTRODUCTION

Le **cancer colorectal** (CCR) correspond au troisième cancer le plus fréquent chez l'homme, après les poumons et la prostate, et au deuxième chez la femme, après le cancer du sein. Il est la seconde cause de mortalité par cancer en France et dans le monde.

Il touche des personnes de plus de 50 ans dans 95 % des cas. Le pronostic associé aux CCR est étroitement lié au stade de développement au moment du diagnostic.

En dépit de l'amélioration des outils de dépistage et thérapeutiques, la survie relative à cinq ans tous stades confondus, reste faible puisque selon une étude des Registres de cancers du réseau Francim, pour les cas de CCR diagnostiqués entre 1995 et 1997, la survie relative était de seulement 57 % à 5 ans après diagnostic établi et stade tumoral déterminé.

Cet échappement thérapeutique caractérisé par la progression de la maladie sous traitement adapté ou par la survenue de récurrences chez des patients à priori guéris, semble être en rapport avec une pression de sélection relative aux différents traitements utilisés. Cela serait lié à la présence ou la persistance de cellules tumorales capables d'initier la maladie conférant alors un potentiel invasif et de résistance thérapeutique particuliers.

Ces **cellules initiant le cancer** (CIC) représenteraient moins de 5 % de la masse tumorale. Leur isolement est difficile.

La technique de « **Sedimentation Field Flow Fractionation** » (SdFFF), technique innovante basée sur les propriétés biophysiques intrinsèques cellulaires (taille, densité..) et non sur des techniques d'immunomarquage (pouvant modifier l'homéostasie cellulaire), permet d'isoler ces CIC évitant ainsi toute altération physiologique de celles-ci.

Dans un travail antérieur, au sein du laboratoire EA3842, grâce à cette méthode, des CIC de CCR humains ont pu être isolées et caractérisées fonctionnellement. Des CIC à la fois quiescentes et activées ont alors pu être mises en évidence.

Notre étude s'inscrit dans la continuité de ce travail avec pour objectif la caractérisation de ces CIC à la fois ***in vitro*** puis ***in vivo*** sur le **modèle de la membrane chorio-allantoïdienne de poulet** (CAM) et de la **souris immunodéprimée SCID** (Severe Combined Immuno Deficiency).

Notre travail a ainsi montré qu'à partir de CIC ayant des états d'activation différents, des tumeurs avec des propriétés opposées ont pu être formées sur nos deux modèles.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes focalisés sur un marqueur prépondérant au sein du processus invasif tumoral mis en évidence par les études précédentes, à savoir la **E cadhérine**.

L'étude de son expression a été effectuée à la fois ***in vitro*** au sein de **lignées cellulaires de CCR** mais également ***in vivo*** au sein de **sérums et tissus de patients opérés de CCR**, avant et après application de chimiothérapie de type 5 Fluorouracile.

La **forme extracellulaire de la E cadhérine** avec un poids moléculaire de 55 kDa semble correspondre à un marqueur d'invasion du CCR et pourrait constituer à l'avenir un bon marqueur de surveillance des sujets opérés de CCR voir un bon marqueur pronostique de la maladie.



1. Epidémiologie

L'incidence du cancer colorectal (CCR), premier des cancers digestifs, a touché 40 500 personnes en 2011 en France et a entraîné 17 500 décès (INCA, Janvier 2012). Il correspond au troisième cancer le plus fréquent (deuxième pour la femme après le cancer du sein et troisième pour l'homme après le cancer de la prostate et celui des poumons). De manière plus précise, en 2012, selon les estimations GLOBOCAN (1) il y avait 1 360 602 nouveaux cas de CRC dans le monde entier (3^{ème} cancer le plus répandu dans le monde entier, ce qui représente 9,7% de tous les cancers en dehors des cancers de la peau non-mélanome), et 447 136 nouveaux cas de CCR en Europe (2^{ème} cancer le plus répandu, ce qui représente 13,0% de tous les cancers en dehors des cancers de la peau non-mélanome). En 2012, il y avait environ 693 933 décès par CRC dans le monde entier (8,5% du nombre total de décès par cancer, 4^{ème} cause la plus fréquente de décès liés au cancer), et 214 866 décès par CRC en Europe (12,2% du nombre total de décès par cancer, 2^{ème} cause la plus fréquente de décès liés au cancer). La prévalence du CCR à 5 ans (c'est-à-dire le nombre de patients atteints de CCR encore en vie cinq ans après le diagnostic) en 2012 a été estimé à 3 543 582 dans le monde (68,2 survivants CRC pour 100 000 habitants) et 1 203 943 en Europe (192,3 survivants CCR pour 100 000 habitants). En 2012, le risque cumulatif de CCR chez les personnes âgées de moins de 75 ans était de 1,95% dans le monde entier (2,36% chez les hommes, 1,57% chez les femmes) et 3,51% en Europe (4,48% chez les hommes, 2,73% chez les femmes).

Il existe une grande variation géographique de l'incidence dans le monde et les modèles géographiques sont très similaires chez les hommes et les femmes : les taux d'incidence varient de dix fois dans les deux sexes dans le monde entier, les taux les plus élevés estimés étant en Australie / Nouvelle-Zélande (Age-Standardised Rates (ASR) 44,8 et 32,2 pour 100 000 habitants chez les hommes et les femmes, respectivement), et les plus faibles en Afrique de l'Ouest (4,5 et 3,8 pour 100 000 habitants). Au total, environ 65 % de tous les nouveaux cas ont été observés dans des pays à revenu élevé (**Figure 1**).



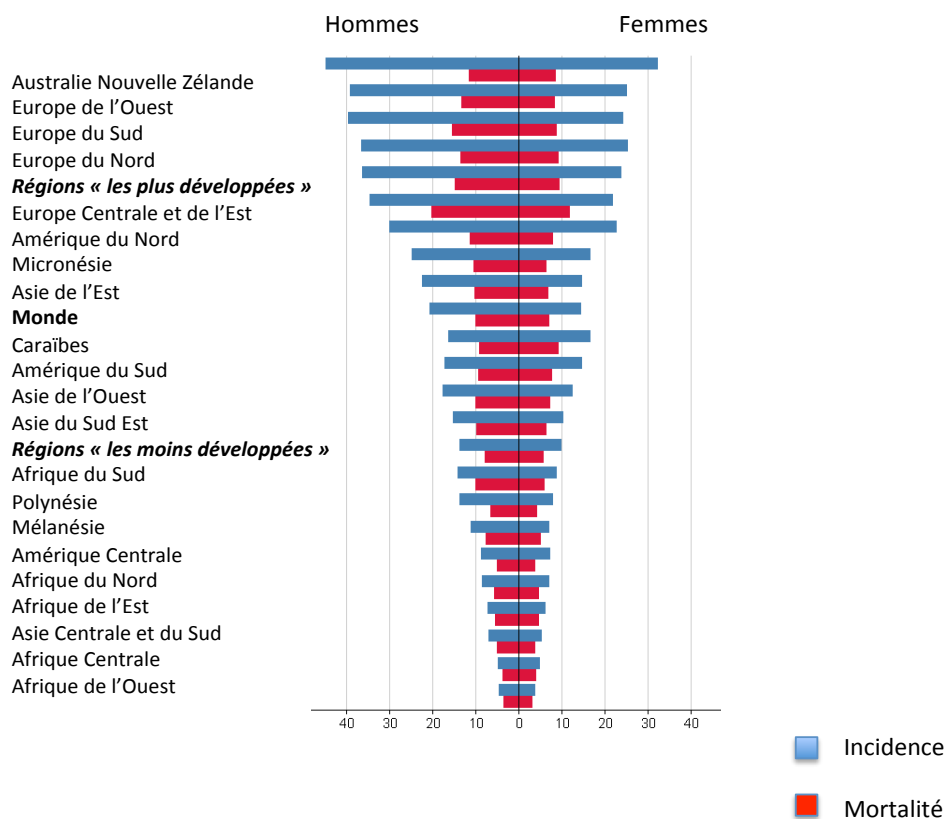


Figure 1 : Estimation des taux de mortalité et d'incidence standardisés sur l'âge du cancer colorectal pour 100,000 habitants, données issues de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 2012

Le CCR affecte principalement les personnes âgées de plus de 50 ans, l'âge moyen de survenue étant de 65 ans.

En France, un programme de dépistage a été organisé au sein du plan cancer 2009-2013 selon deux procédures.

La première correspond à un programme de dépistage organisé communautaire proposé dans le cadre d'une campagne nationale d'un dépistage ciblé sur l'âge (50-74 ans) par un test de recherche de sang occulte dans les selles. Ce test est depuis mars 2015 plus sensible et spécifique. En effet, il s'agit dorénavant d'un test immunologique {deux tests quantitatifs, FOB-Gold™ (Beckman Coulter, USA), et OC-Sensor™ (Eiken, Japon)} et un test semi-quantitatif, Magstream™ (Fujirebio, Japon), contrairement au précédent qui correspondait à « un test au gaïac », Hemoccult II®. Il permet ainsi de trier au sein d'une population cible apparemment en bonne santé les hommes ou les femmes ayant un saignement occulte dans les selles et donc susceptibles d'avoir un CCR.

La deuxième procédure correspond à un dépistage individuel opportuniste : un homme ou une femme étant invité(e) à se faire dépister lors de son recours aux soins, le médecin consultant ayant identifié chez ce(cette) dernier(ière) soit des antécédents personnels ou familiaux de sur-risque de CCR soit des signes fonctionnels nécessitant la mise en œuvre de la procédure de dépistage individuel par coloscopie.

Les deux principales causes de CCR sont génétiques et environnementales.

Il correspond à l'un des principaux cancers pour lequel les causes modifiables peuvent être facilement identifiées.

- **Contexte environnemental**

- ✓ **Lieu de Vie – Mode de vie**

Celles-ci ont été mises en exergue à partir d'études de migrants et de leurs descendants. Ainsi les migrants provenant de pays à faible risque de CCR vers des pays à fort risque de CCR tendent à avoir une incidence de CCR proche de celle du pays d'accueil.

Par exemple, l'incidence du cancer colorectal chez les descendants des migrants japonais aux États-Unis se rapproche ou dépasse celle de la population blanche, et est trois ou quatre fois plus élevée que chez « les Japonais du Japon » (2).

A part l'origine migratoire, il existe d'autres facteurs géographiques influençant l'incidence du CCR comme la résidence urbaine « courante » différente du lieu de naissance (3). Cette augmentation est plus importante pour les hommes et pour le cancer colique.

- ✓ **Facteurs nutritionnels**

Le régime alimentaire influence le risque de CCR et les changements d'habitudes alimentaires pourraient réduire jusqu'à 70% ce risque (4).

Les graisses animales particulièrement utilisées en Occident, constituent un facteur favorisant, par la formation d'une flore bactérienne capable de dégrader les sels biliaires en composés potentiellement carcinogènes (5). La consommation de viande rouge est également associée au risque de CCR en lien avec la présence de fer (6).

De plus, la cuisson à haute température des viandes, produit des amines hétérocycliques ainsi que des hydrocarbures aromatiques polycycliques carcinogènes (7).

La faible consommation de fruits et légumes représente un facteur de risque de CCR (*National Institutes of Health, What You Need To Know About Cancer of the Colon and Rectum. Bethesda, MD: U.S. Department of Health and Human Services & National Institutes of Health; 2006.*)

Des différences également concernant le régime riche en fibres ou non pourraient être responsable des différences géographiques d'incidence du CCR (3).

- ✓ **Activité physique**

Le surpoids et l'inactivité physique sont associés à un risque majoré de CCR.

Au long cours, l'activité physique régulière augmente l'activité métabolique, abaisse la pression artérielle et l'insulinorésistance (8) (9). La voie de la carcinogénèse impliquée par la diminution d'activité physique serait probablement peu en lien avec la dérégulation de la voie Wnt - β caténine (10).

- ✓ **Tabagisme**

Dans 12% des cas, le CCR semble être lié au tabagisme (11).

Le carcinogène spécifique au tabac, NNK (4-(méthylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone), active la dissémination métastatique du CCR par $\alpha 7$ -nAChR.

La E cadhérine, l'une des molécules caractéristique de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et dont nous allons détailler plus loin son rôle primordial dans la carcinogénèse, a été supprimée après traitement par NNK. Deux répresseurs



transcriptionnels de la E cadhérine, Snail et ZEB-1 dans les cellules cancéreuses coliques, ont été activés après incubation avec NNK (**Figure 2**) (12).

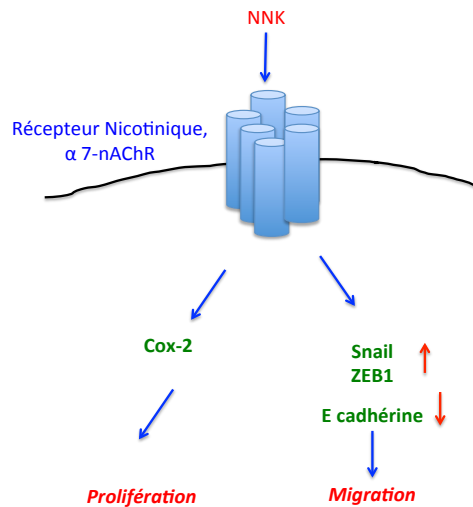


Figure 2 : Schéma général d'action du carcinogène spécifique du tabac : NNK, d'après Wei et al, (12)

✓ **Consommation d'alcool**

La consommation régulière d'alcool semble être associée à une augmentation du risque de développer un CCR. Il prédispose à la formation d'un CCR à un âge jeune (13). Les métabolites de l'alcool tels que l'acétaldéhyde peuvent être carcinogènes.

Alcool et tabac peuvent interagir : le tabac entraînerait des mutations spécifiques de l'ADN moins bien réparées en présence d'alcool (14). L'alcool agirait également comme un solvant permettant une pénétration plus facile des molécules carcinogènes au sein des cellules muqueuses.

✓ **Autres facteurs de risque : l'acromégalie**

Chez un homme ou une femme ayant une acromégalie, le risque d'adénome et de cancer colorectal est multiplié par 2 à 3. Les mécanismes en cause sont liés à la sécrétion en excès d'hormone de croissance qui stimule la production du facteur de croissance IGF1 et la prolifération cellulaire (15).

• **Contexte génétique**

Le CCR résulte de l'impact de facteurs environnementaux sur un terrain génétiquement prédisposé.

Plus rarement, le CCR peut résulter d'une inflammation chronique.

L'importance relative de ces facteurs varie selon les cas et classiquement trois niveaux de risque sont décrits.

- ✓ **Le niveau moyen** : risque moyen de la population dans son ensemble, estimé à 3,5 %.
- ✓ **Le niveau élevé** : risque des sujets ayant des antécédents personnels d'adénome ou de CCR, ou celui des sujets ayant un ou plusieurs parents du premier degré atteint(s) d'un CCR ou d'un adénome de plus de 1 cm. Chez ces

derniers, le risque net avant 74 ans varie de 6 à 10 % selon le nombre de parents atteints et l'âge minimum auquel la maladie a été découverte chez les apparentés. Les sujets atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, Rectocolite Ulcéro-Hémorragique (RCUH) et maladie de Crohn, sont aussi des sujets à risque élevé en cas de pancolite.

- ✓ **Le niveau très élevé** : est caractérisé par le risque des sujets appartenant à une famille atteinte de cancers à transmission héréditaire autosomale dominante.
 - Un peu moins de 1 % des CCR sont dus à la **Polypose Adénomateuse Familiale (PAF)**. Elle est caractérisée par la présence de centaines ou de milliers d'adénomes au niveau du côlon ou du rectum et est liée à deux types de mutations :
 - une transmission autosomique dominante à forte pénétrance d'une mutation du gène *APC* (5q21-q22)
 - une transmission autosomique récessive de la mutation du gène *MUTYH* (1p34.1)Dans les deux cas, il existe des manifestations extra-coliques bénignes et malignes qui peuvent être responsables d'une morbidité importante (tumeur desmoïde et tumeur duodénale). Des formes atténuées ont été observées avec les deux mutations.
En l'absence de traitement, le risque de CCR est de 100 %. La fréquence cumulée de cancer sur le rectum restant après colectomie serait comprise, entre 5 % et 10 % à 50 ans et entre 14 % et 30 % à 60 ans.
 - Selon les études, 1 à 5 % des CCR sont des **cancers héréditaires sans polypose (HNPCC : « Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer »)**, nouvelle dénomination du Syndrome de Lynch (mutation délétère des gènes codant pour des protéines de la réparation des mésappariements des bases de l'ADN hMSH2 ou hMLH1).

2. Lésions pré cancéreuses

Ainsi le CCR est un problème de santé publique par sa fréquence et sa gravité. Plus de 90% des CCR sont des adénocarcinomes (du grec « adéno » qui signifie glande et « carcino » qui signifie cancer). Ces derniers se développent à partir des glandes - appelées glandes de Lieberkühn - tapissant l'intérieur de la paroi du côlon et du rectum.

Il existe plusieurs types d'adénocarcinomes (Société Française de Pathologie). Les plus fréquents, (95 %) sont les adénocarcinomes lieberkühniens. Il existe d'autres formes rares comme les adénocarcinomes mucineux ou colloïdes et les adénocarcinomes, dits à cellules en bague à chaton représentant en moyenne 15 à 20 %. Ceux-ci sont plus fréquents à droite et chez les personnes âgées. Leur présence impose de rechercher une instabilité micro-satellitaire, de faire une enquête familiale pouvant alors entraîner une modification de la prise en charge thérapeutique.

Les CCR sont localisés pour 50 % d'entre eux au niveau recto sigmoïdien. Dans les pays occidentaux, 60 à 80 % des CCR, en particulier au sein de ces localisations distales, résultent de la transformation d'un adénome. Les adénomes se répartissent à peu près également entre le côlon droit et le côlon gauche. En revanche, un tiers seulement des CCR est situé dans le côlon droit.

Selon les données d'autopsie, un tiers de la population est porteur d'un adénome à l'âge de 65 ans. Sur 1000 adénomes, 100 atteindront la taille de 1 cm et 25 deviendront des cancers dans un délai de 10 à 20 ans. Outre la taille, le risque de transformation dépend de la structure histologique. La présence de foyers cancéreux dans les adénomes tubuleux est de 1,3 %, de 11,6 % dans les adénomes tubulo-villeux et de 14,4 % dans les adénomes vilieux. Il arrive exceptionnellement (0,3 %) que des adénomes de petite taille subissent directement une transformation cancéreuse.

Une nouvelle entité a été décrite récemment, l'**adénome festonné** (moins de 2 % des polypes colorectaux) qui associe des caractéristiques des polypes adénomateux (ou adénome : polype avec dysplasie) et des polypes hyperplasiques (polype sans dysplasie caractérisé par un simple allongement des cryptes). Ces lésions festonnées comportent les adénomes festonnés traditionnels (AFT) (**Figure 3A**) et les adénomes festonnés sessiles (AFS) (**Figure 3B**).

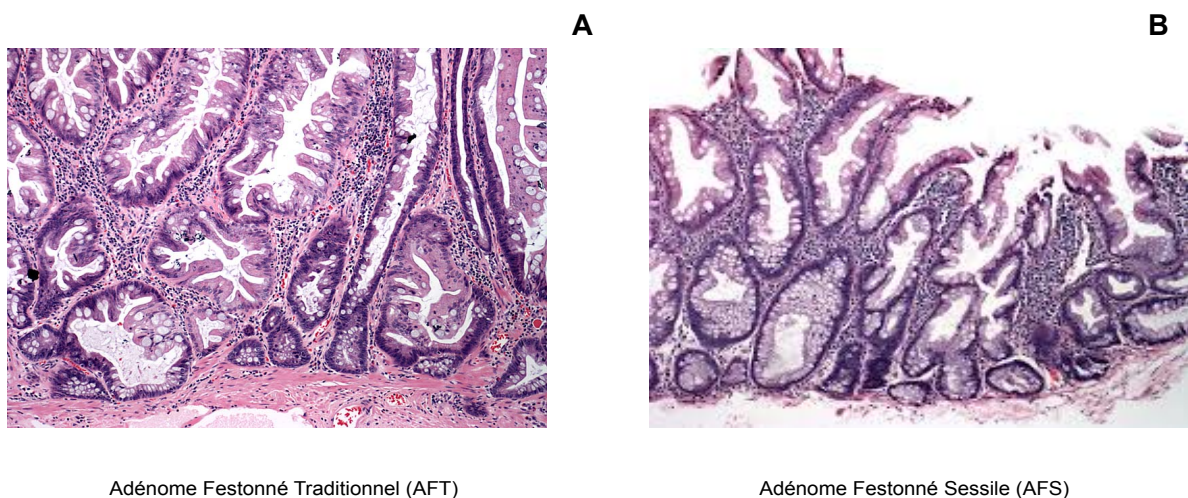


Figure 3: Coupe histologique d'adénome festonné traditionnel (3A) et Sessile (3B)

Ils sont classés avec les polypes hyperplasiques mais s'en distinguent en histologie par l'aspect dentelé des cryptes, caractéristiques des lésions hyperplasiques, qui va jusqu'à la base des cryptes (qui même s'horizontalisent pour les AFS) et par leur potentiel de dégénérescence via une voie dite « festonnée » de la cancérogénèse. Cette voie festonnée est différente pour les AFT (mutation *K-RAS*) et pour les AFS (mutation *BRAF*). Cette carcinogénèse liée aux adénomes festonnés diffère donc de la voie classique propre (que nous détaillerons dans le paragraphe suivant) aux autres types de lésions adénomateuses (16) (**Tableau 1**).

	Voie des polypes festonnés	Voie des adénomes classiques
Lésions initiales	Adénomes festonnés classiques Adénomes festonnés traditionnels	Polype adénomateux plan, sessile ou pédiculé
Anomalies moléculaires	Mutations activatrices de B-raf CIMP Phénotype MSI	Mutations inactivatrices du gène APC Mutations activatrices de K-ras Phénotype LOH
Phénotype tumoral	Adénocarcinomes proximaux de phénotype MSI-H	Adénocarcinomes de phénotype MSS

Tableau 1 : Différences à l'échelle phénotypique et génotypique des polypes festonnés versus adénomateux, d'après Buecher et al, (16)

Ce sont surtout les AFS qui, à défaut d'être bien visibles, doivent retenir l'attention : ils siègent dans le côlon droit, sont souvent plans et difficiles à distinguer même sessiles (le taux d'AFS « omis » peut dépasser 50%).

Après exérèse par polypectomie endoscopique, les adénomes peuvent récidiver. Le taux de récurrence à 3 ans des adénomes de plus de 1 cm de diamètre se situe autour de 3 %. Il est maintenant démontré que la polypectomie endoscopique diminue la mortalité et l'incidence du CCR (17).

L'ensemble de ces données épidémiologiques atteste donc de la complexité dans la formation du CCR.

3. Histoire naturelle, cancérogénèse

A première vue, le CCR semble correspondre à une entité homogène où des étapes se succèdent : hyperprolifération de l'épithélium colique, foyer de cryptes aberrantes, polype adénomateux, dysplasie, cancer *in situ*, adénocarcinome invasif et métastases (18). Cependant il apparaît beaucoup plus complexe et hétérogène à tous niveaux. En effet, certains CCR dits cancers *de novo* pourraient apparaître directement, sans être précédés par une tumeur bénigne détectable. En fait, la fréquence des cancers *de novo* semble faible et un certain nombre d'entre eux serait développé sur des adénomes plans difficiles à détecter.

Au total, cette hétérogénéité tumorale peut être définie par différents éléments :

- Des lésions précancéreuses très diverses: adénomes plans et festonnés, polyposes hyperplasiques et hamartomateuses, cancers *de novo*,
- Des localisations particulières, influençant le pronostic: rectum, côlons distal et proximal,
- Une évolutivité, un pronostic et une chimiosensibilité variables.

Cependant, des altérations génétiques et moléculaires très variables peuvent aussi être impliquées.



A l'échelle moléculaire, le développement d'un adénome puis d'un CCR correspond à l'accumulation progressive de mutations de gènes au sein du noyau des cellules épithéliales coliques: activation d'oncogènes et inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs.

Il existe deux principales voies de cancérogénèse colorectale, qui résultent d'une instabilité génétique: l'une, la plus fréquente, à l'échelon chromosomique (instabilité chromosomique), l'autre, à l'échelon des nucléotides (instabilité des loci de microsatellites).

Ces deux voies distinctes à l'échelle moléculaire donnent des lésions semblables au plan morphologique (les adénomes) mais avec une évolution différente vers le cancer, plus importante dans la voie de l'instabilité micro satellitaire (19).

a. Voie de l'instabilité chromosomique – Chromosomal instability (CIN)

Elle correspond au mécanisme moléculaire de cancérogenèse le plus fréquent : il concerne 80 à 85 % des CCR sporadiques et il est observé de façon typique au cours de la PAF. Elle est caractérisée par des déséquilibres généralisés dans le nombre de chromosomes (aneuploïdie), et perte d'hétérozygotie (LOH). Cela peut résulter de défauts à la fois de ségrégation chromosomique, de stabilité de télomères, ou de réponse aux dommages de l'ADN.

Ces tumeurs « CIN » présentent alors un ensemble caractéristique de mutations sur les gènes suppresseurs de tumeurs, *APC*, mais également sur les protooncogènes, *K-RAS* activant les voies de signalisation d'initiation et de progression du CCR (20).

Le gène *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) sur le chromosome 5q21 correspond à un gène suppresseur de tumeur. Sa mutation constitutionnelle est responsable de la PAF. La mutation de ce gène est précoce dans le développement du CCR et active la voie de signalisation Wnt ; Le gène *APC* produit une large protéine avec de multiples domaines fonctionnels régulant différenciation, adhésion, polarité, migration, développement, apoptose, et ségrégation chromosomique. Il interagit avec deux molécules prépondérantes dans la voie Wnt : glycogène synthase kinase-3 β (GSK-3 β) et β -caténine. Son inactivation entraîne une hyperprolifération des cellules de l'épithélium colique.

La mutation du gène *K-RAS* est elle aussi précoce dans la séquence adénome-cancer. Dans 30 à 50% des CCR, on le retrouve muté (21). Il agit sur différents effecteurs régulant l'activité cellulaire : MAPKKKs (croissance, différenciation, survie, apoptose), TIAM1 (organisation du cytosquelette, mobilité cellulaire), PI3K (apoptose, survie cellulaire), RAF (prolifération cellulaire), Rai-GDS (transformation cellulaire, trafic vésiculaire, inflammation, survie cellulaire). Proto-oncogène, sa mutation activatrice entraîne une augmentation de l'activité cellulaire avec transformation - hyperprolifération des cellules épithéliales en adénome.

Le gène suppresseur de tumeur *TP 53*, localisé sur le bras court du chromosome 7, est le coordinateur central des réponses cellulaires au stress dont les dommages de l'ADN, les signaux aberrants de prolifération, le stress oxydatif. Il code pour une protéine (p 53) dont le rôle est d'être le « gardien du génome ». Elle contrôle la transcription de multiples gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADN, l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, la sénescence, l'angiogénèse, la réponse immunitaire, la différenciation cellulaire, la mobilité, et la migration. La mutation inactivatrice de ce gène est plus tardive dans le développement du CCR autorisant la survenue d'altérations génétiques multiples.

b. Voie de l'instabilité des loci de microsatellites (cancers RER+ ou MSI)

Ce mécanisme moléculaire de cancérogenèse concerne 15 % des CCR sporadiques et est observé de façon typique dans le cadre du Syndrome de Lynch (HNPCC : 3% des cas).

Ces cancers sont appelés RER+ (replication error) ou MSI (microsatellite instability). Les cellules cancéreuses ont un contenu en ADN normal (diploïdie), n'ont pas de pertes chromosomiques mais présentent des anomalies au niveau des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN, *MMR* (mismatch repair). Les composants de ce système de réparation comprennent : ATPases hMSH2, hMSH6, hMSH3, hMLH1, hPMS2, hPMS1, et hMLH3 (22).

Ces gènes codent pour des protéines dont le rôle est de détecter et de réparer les erreurs de réplication de l'ADN survenues au cours de la mitose. La mutation ou la méthylation de la région promotrice des gènes *MMR* induit une déficience de ce système de réparation et les mutations vont s'accumuler, préférentiellement au niveau des microsatellites, régions du génome particulièrement sujettes aux erreurs de réplication.

La cellule acquiert un phénotype « hypermutateur » prédisposant à la survenue de mutations dans certains oncogènes (gène pro-apoptotique *BAX*) ou gènes suppresseurs de tumeurs (gène codant le récepteur de type II du TGF β). La chronologie des mutations des cancers RER+ est mal connue : la mutation du récepteur de type II du TGF β apparaît la plus précoce.

Au plan clinique, les cancers MSI sont plus souvent localisés dans le côlon proximal (côlon transverse et côlon droit), moins bien différenciés mais de meilleur pronostic (23).

Les CCR peuvent être classés en 3 groupes selon le degré d'instabilité des microsatellites :

- Les cancers MSI-H avec un haut niveau d'instabilité (marqueurs d'instabilité $\geq 30\%$),
- Les cancers MSI-L avec un faible niveau d'instabilité (marqueurs d'instabilité $< 30\%$),
- Les cancers MSS (microsatellite stable) n'ayant pas d'instabilité.

Les cancers MSI-H ont un meilleur pronostic spontané que les cancers MSI-L et MSS, indépendamment du stade tumoral. Ils sont associés à un moindre risque de métastases. Ce mécanisme de cancérogenèse est également souvent associé avec la voie « CpG island methylator phenotype » (CIMP).

c. Voie « CpG island methylator phenotype » (CIMP)

L'hyperméthylation des îlots CpG de la région promotrice entraîne l'inactivation transcriptionnelle des gènes suppresseurs de tumeurs ou impliqués dans le cycle cellulaire.

Des mutations au sein du gène *BRAF* semblent être un événement précoce dans les tumeurs CIMP. La mutation *BRAF* V600E est fortement corrélée avec l'hyperméthylation de *MLH1* et correspond à 18,7% des cas de CCR sporadiques. De plus, l'hyperméthylation de *MLH1* est présente dans 80% des cas de CCR MSI-H sporadiques avec une perte d'expression et sans mutation germinale connue au sein des gènes *MMR* (24).

Récemment, plusieurs équipes (25) (26) (27) (28) (29) (30), ont essayé de déterminer les anomalies moléculaires d'un certain nombre de tumeurs colorectales pour permettre

l'élaboration de classifications moléculaires. L'objectif serait de pouvoir proposer une adaptation thérapeutique aux différents sous-types moléculaires tumoraux rencontrés.

Six groupes d'experts ayant chacun leur classification indépendante ont ainsi partagé leurs données pour élaborer une seule et même classification. Cette analyse sur le CCR Subtyping Consortium (CRCSC) est le premier exemple d'une comparaison à grande échelle de sous-types de cancers, effectuée sur une base communautaire (31).

Les corrélations clinico-moléculaires se faisaient sur,

- d'une part : l'âge, le sexe, le site tumoral, le stade, le statut des microsatellites, des mutations, les altérations du nombre de copies, les puces à protéines en phase inverse (APPR) ;
- d'autre part : les taux de survie sans récurrence (SSR), la survie globale (SG), la survie après une récurrence (SAR).

Les données et échantillons histologiques transmis étaient ceux de 11 études internationales. L'âge médian était de 66 ans (21– 98), 55% d'hommes, avec 41% de tumeurs du côlon droit, 45% de tumeurs du côlon gauche, et 14% de tumeurs rectales, de tous stades (I:11%; II:38%; III:41%; IV:10%). 83% de tumeurs étaient MSS. La médiane de SG était de 55 mois (0–270) et la médiane de SSR de 41 mois (0–270). Cette analyse a permis de dégager 4 sous-types biologiquement distincts nommés Consensus Molecular Subtype (CMS) ayant des implications pronostiques (**Figure 4**) (**Tableau 2**).

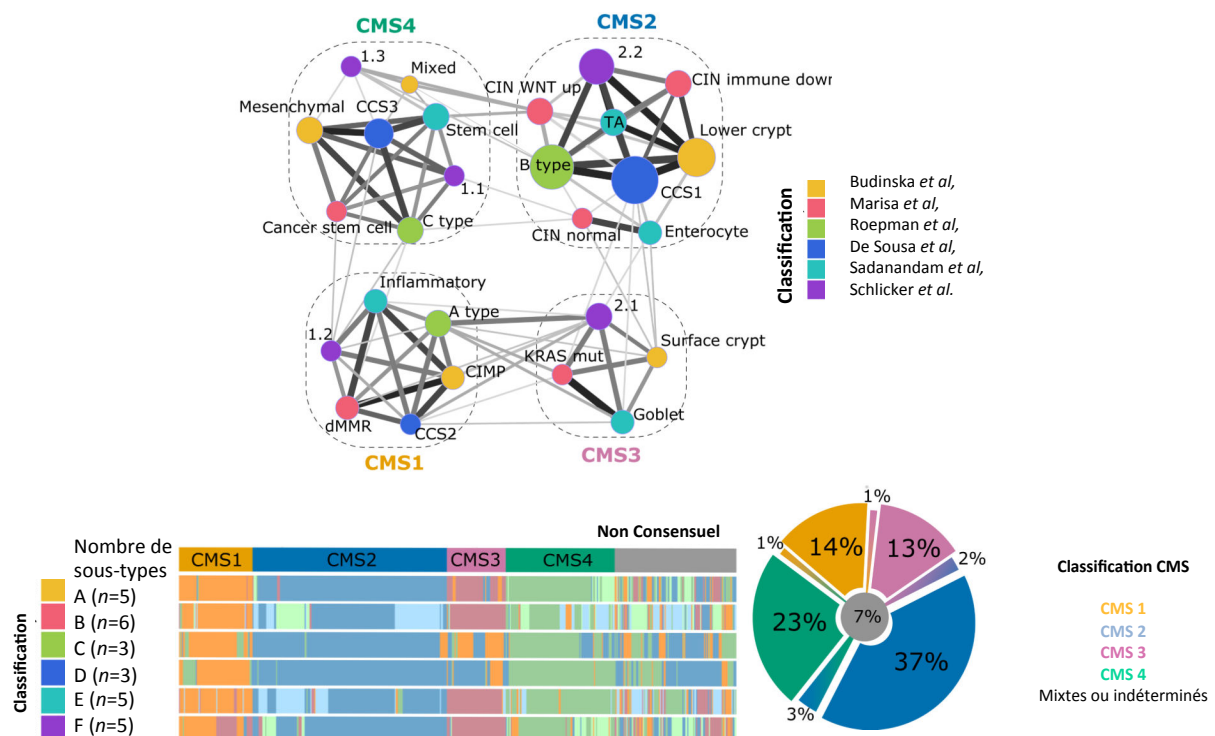


Figure 4 : D'après Guinney et al (31), identification des sous types moléculaires de CCR

CMS1	14%	MSI	Multiples mutations MSI Hyperméthylations Mutations <i>BRAF</i>	Femme Côlon droit Haut grade	Faible survie à la rechute
CMS2	37%	Canonique	Type épithélial Taux élevé d'altérations somatiques du nombre de copies MSS Mutations <i>p53</i> Activation WNT/MYC	Côlon Gauche	Longs survivants
CMS3	13%	Dérégulation métabolique	MSS 90% Type épithélial Mutations RAS Amplification MYC Faible taux d'altérations somatiques du nombre de copies		Survies intermédiaires
CMS4	23%	Mésenchymateux	Type Mésenchymateux MSS Taux élevé d'altération de copies Activation voie TGF β /VEGF Surexpression NOTCH3	Patients jeunes Stades avancés	Faible survie globale et sans progression

Tableau 2 : Les quatre sous types de cancers colorectaux, d'après Guinney et al (31)

Devant des voies de cancérogenèse multiples, et des pronostics à long terme distincts, des entités basées sur les aspects cliniques et paracliniques du CCR ont dû être réalisées dans le but de hiérarchiser les thérapeutiques.

4. Classification des CCR

Chaque cancer se définit en fonction de sa localisation dans le côlon ou le rectum, de sa profondeur dans la paroi (composée de 4 couches définies ci-dessous), de l'atteinte ou non des relais ganglionnaires et de la présence ou non de métastases au niveau d'autres organes selon la classification p TNM (*pathology Tumor Node Metastasis*) (32) (**Annexe 1**). Quatre stades de développement tumoral sont décrits (**Figure 5**).

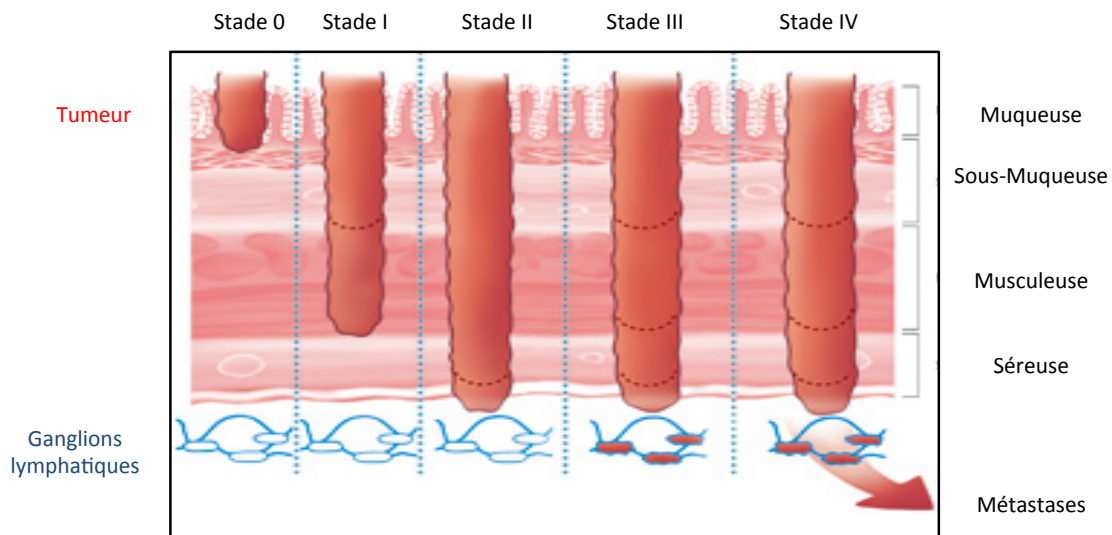


Figure 5 : Les différents stades du Cancer Colorectal, d'après l'Institut National du Cancer, 2016

Les stades I et II correspondant à des atteintes locales de la muqueuse, sous-muqueuse et musculeuse, sont généralement dits de « bon pronostic ». Le stade III se traduit par une atteinte régionale avec envahissement ganglionnaire. Enfin, le stade IV est défini par la présence de métastases à distance, principalement retrouvées dans le foie et les poumons. Ces deux derniers stades sont dits de « mauvais pronostic ».

Tous stades confondus, la survie à **1 an** est de 79 % et à 5 ans de seulement 56 %. Le taux de survie relative à **5 ans** varie alors en fonction de la classification TNM :

- 94 % pour les cancers diagnostiqués au stade I ;
- 80 % au stade II ;
- 47 % au stade III ;
- 5 % au stade IV.

Selon ces différents stades de la maladie, les stratégies temporelles des thérapeutiques vont varier mais vont reposer principalement sur chirurgie – chimiothérapie et radiothérapie.

5. Bases thérapeutiques des CCR

a. Chirurgie

La chirurgie représente le seul traitement curatif des CCR. Les indications sont établies en fonction notamment de la localisation, du stade, de l'histologie et de l'état général (critères d'opérabilité et de résécabilité : Thésaurus National de cancérologie Digestive, TNCD).

• Chirurgie et tumeurs coliques

Le côlon, par définition anatomique, est situé en amont de la jonction recto-sigmoïdienne : à plus de 15 cm de la marge anale en rectoscopie et au-dessus du corps de la 3^{ème} vertèbre sacrée (de profil au-dessus du promontoire). Le traitement chirurgical des cancers du côlon non métastatiques repose sur l'exérèse de la tumeur primitive avec des marges de côlon sain (minimum 5 cm), associée à l'exérèse des vaisseaux et du mésocôlon contenant les ganglions lymphatiques.

Le type de l'intervention (pouvant être réalisée par coelioscopie), dépend du siège tumoral : hémicolectomie (droite ou gauche), sigmoïdectomie éventuellement étendue au haut rectum, avec rétablissement en général immédiat de la continuité.

• Chirurgie et tumeurs rectales

Selon la localisation de la tumeur sur le rectum, on peut distinguer :

- *Au niveau du haut rectum (10 à 15 cm de la marge anale)*, l'intervention consiste en une exérèse de la tumeur et du mésorectum jusqu'à 5 cm sous le pôle inférieur de la lésion tumorale et une anastomose colorectale ;
- *Dans les cancers du moyen rectum (5 à 10 cm de la marge anale)*, les indications de conservation sphinctérienne doivent être aussi larges que possible, en respectant les règles de sécurité carcinologique (marge rectale distale de 2 cm au minimum, exérèse totale du méso-rectum) ;
- *Dans les lésions basses qui envahissent le sphincter ou qui en sont distantes de moins d'un cm (moins de 4 cm de la marge anale)*, l'amputation abdomino-périnéale avec exérèse totale du mésorectum est habituellement la seule solution ;

b. Radiothérapie

Elle utilise des radiations ionisantes pour permettre la destruction de cellules cancéreuses. Son but est d'éviter la récurrence locale.

• Radiothérapie et tumeurs coliques

Le cancer colique a plus tendance à se propager vers des organes secondaires. Ainsi, la radiothérapie n'est pas indiquée dans le cancer colique. En revanche, elle est parfois utilisée pour traiter certaines métastases isolées ou pour soulager certains symptômes

causés par la tumeur, lorsque celle-ci n'a pas pu être enlevée (douleur, saignement dans le côlon...).

- **Radiothérapie et tumeurs rectales**

Le cancer du rectum, quant à lui, a tendance à récidiver localement. Ainsi, la radiothérapie lui est souvent associée. A noter que les cancers du rectum sus péritonéal (cancers du haut rectum) doivent être considérés comme des cancers du côlon et pris en charge de la même manière.

La radiothérapie concernant les tumeurs des moyen et bas rectum aura alors trois principaux objectifs :

- Réduire la taille tumorale avant chirurgie pour améliorer son exérèse (radiothérapie pré-opératoire ou néo adjuvante plus ou moins associée à une chimiothérapie rendant les cellules cancéreuses plus sensibles aux rayons ionisants), et majorer le taux de conservation sphinctérienne
- Détruire les cellules tumorales pouvant demeurer après la chirurgie (tumeurs en résection, R1 ou pN1-2) (radiothérapie adjuvante)
- Réduire les symptômes liés au cancer : douleurs, saignements

Pour ces tumeurs du bas et du moyen rectum, l'intérêt d'une radio-chimiothérapie longue ou radiothérapie externe seule courte néo-adjuvante (pré-opératoire) a été démontré pour les tumeurs T3 ou T4. Si le patient ayant une tumeur localement avancée n'a pas reçu de radiothérapie pré-opératoire, une radio-chimiothérapie post-opératoire doit être prescrite, à base de 5 Fluorouracile (5 FU) administré en continu pendant la radiothérapie. L'avantage de la chimiothérapie adjuvante post-opératoire seule dans le cancer du rectum n'est pas démontré comme il l'est pour le cancer du côlon (*Recommandation : Haute Autorité de Santé. Choix des thérapeutiques du cancer du rectum, Novembre 2005*).

c. Chimiothérapie

Les principales molécules utilisées sont le 5 FU et l'oxaliplatine.

- **Chimiothérapie et tumeurs coliques**

Concernant les cancers coliques, l'examen d'au moins 12 ganglions est recommandé. L'indication d'une chimiothérapie adjuvante pour les patients présentant un stade II est à discuter au cas par cas avec évaluation du rapport bénéfice-risque (toxicités des molécules) en connaissant le statut MSI ou MSS de la tumeur. En effet, le bénéfice en survie étant modéré, il doit inciter à séparer les stades II selon leur risque de récurrence :

- *Risque faible ou modéré de récurrence* : tumeurs MSI ou tumeur MSS avec un ou plusieurs des facteurs suivants : T3, analyse de plus de 12 ganglions, absence d'embolies veineux, périnerveux et/ou lymphatiques, tumeur bien ou moyennement différenciée, et absence de perforation,
- *Risque élevé* : tumeurs MSS avec un ou plusieurs des facteurs suivants : T4, analyse de moins de 12 ganglions, présence d'embolies veineux, périnerveux



et/ou lymphatiques, tumeur peu différenciée, perforation et pour certains occlusion révélatrice.

Les recommandations de la société américaine de cancérologie (ASCO) constituent une aide utile à la discussion avec le patient (33).

- *En cas de statut MSI ou en l'absence de facteurs de mauvais pronostic reconnus* : aucune chimiothérapie n'est administrée,
- *En cas de facteurs de mauvais pronostic reconnus* (T4, nombre de ganglions examinés < 12, tumeur peu différenciée, invasion veineuse lymphatique ou périnerveuse, perforation et pour certains occlusion) : une chimiothérapie peut être proposée aux patients n'ayant pas de comorbidité, en bon état général avec une tumeur MSS. En l'absence de preuve de niveau A d'efficacité et de consensus dans cette situation, la prudence est souhaitable ainsi que l'explication aux patients de la balance bénéfice/risque dans leur cas. Les schémas thérapeutiques proposés doivent avoir peu de risque toxique.

• **Chimiothérapie et tumeurs rectales**

Concernant les cancers du rectum, le traitement post-opératoire dépendra de l'analyse anatomopathologique de la pièce opératoire et du traitement pré-opératoire.

- Pour les cancers du *haut rectum*, l'indication d'une chimiothérapie adjuvante sera la même que pour les cancers du côlon,
- Pour les cancers du *moyen* et du *bas rectum*, le traitement adjuvant sera discuté en fonction du stade pTNM de la pièce de résection, de la présence d'une résection R1 et de l'administration ou non d'une radiothérapie ou radiochimiothérapie néoadjuvante.

Une chimiothérapie néoadjuvante ne sera proposée qu'en cas de cancer colo-rectal avec des métastases associées, le plus souvent hépatiques. Elle permet de contrôler la maladie générale pour permettre ensuite une chirurgie efficace. Il s'agit alors d'une chirurgie combinée, associant un geste colo-rectal et un geste hépatique, qui peut être faite en une fois ou le plus souvent en 2 voire 3 temps.

• **Molécules utilisées dans le CCR**

Les protocoles utilisés dans le CCR, dans le cadre de l'AMM, associent principalement :

- Pour les *stades non métastatiques* : le 5-fluoro-uracile (5 FU), l'oxaliplatine, l'irinotécan, la capécitabine, la leucovorine (acide folinique), la mitomycine C ;
- Pour les *stades métastatiques* : l'oxaliplatine, l'irinotécan, le 5-FU, la leucovorine (acide folinique), la capécitabine, le raltitrexed, l'uracile-tegafur, la mitomycine C (ainsi que des traitements ciblés tels que le bevacizumab (Avastin®), le cetuximab (Erbitux®) et le panitumumab (Vectibix®) que nous allons expliciter dans le paragraphe suivant).

Les trois principales molécules utilisées sont ainsi le 5 FU, l'oxaliplatine, et l'irinotécan avec chacune des mécanismes d'action différents.

- Le *5 Fluorouracile (5 FU)*, antimétabolite, analogue des bases pyrimidiques, est transformé en métabolites actifs qui s'incorporent dans

la biosynthèse des acides nucléiques et la perturbent. Il est métabolisé notamment :

- en 5-fluorodéoxyuridine monophosphate, 5-FdUMP, qui, en formant un complexe ternaire avec la N-méthylène-tétrahydrofolate (acide folinique) et la thymidylate synthase, bloque la synthèse de thymidine et par là-même la synthèse de DNA, ce qui freine la croissance cellulaire. La formation de ce complexe ternaire 5-FdUMP-acide folinique-enzyme explique que l'association d'acide folinique au 5-FU potentialise l'inhibition de la thymidylate synthase par ce dernier.
 - en FU-monophosphate, FUMP, puis en FU-triphosphate, FUTP, qui, incorporé à la place de l'uracile dans l'ARN, provoque des erreurs de lecture du code génétique.
 - en métabolite inactif par la dihydropyrimidine déhydrogénase. Chez les individus présentant une déficience en cette enzyme, l'efficacité mais aussi la toxicité du 5-FU est très augmentée et sa posologie doit être réduite.
- L'*oxaliplatine*, sel de platine agit par son activité alkylante (les agents alkylants agissent directement sur l'ADN par incorporation d'un radical méthyle) mais provoque également la formation de « ponts » intra-chaîne et inter-chaîne au niveau de l'ADN.
 - L'*irinotécan*, (Campto®), anti Topoisomérase de type I empêche la réplication de l'ADN.

d. Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées, sont basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Elles ont permis des améliorations pour le traitement des stades avancés (stade IV, présence de métastases) mais pas pour les stades II ou III (essai AVANT, 2012) (34). Elles ciblent directement les mécanismes impliqués entre autres dans l'angiogenèse tumorale en agissant sur les facteurs sécrétés impliqués dans la signalisation activant l'angiogenèse mais aussi sur les mécanismes qui stimulent la division cellulaire et donc le développement tumoral (les facteurs de croissance). Ces thérapies sont utilisées en association avec la chimiothérapie.

- **Thérapies ciblées sur la voie de signalisation Wnt**

Différentes protéines de cette voie peuvent être bloquées : la porcupine bloquée par IWP (35), la bêta caténine bloquée par Pyvinium pamoate, CCT031374, CCT036477 et CCT070535; Sphingadiene et Enigmol (36).

- **Thérapies ciblées sur la voie de signalisation EGF R**

Deux voies principales dépendent de l'activation de l'EGFR: la voie Ras / Raf / MEK / ERK et la voie PI3K / PTEN / AKT / mTOR.

- **Concernant la voie Ras /MAPK (Raf / MEK / ERK)**

- *Le cetuximab* (37), agit en se fixant sur les récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor), jouant le rôle d'inhibiteur compétitif, empêchant la fixation du ligand sur le récepteur et donc son activation. L'activation de l'EGFR (**Annexe 2**) est

classiquement corrélée à des phénomènes associés à la progression tumorale, incluant la prolifération, l'angiogenèse, la formation de métastases ainsi que l'inhibition de l'apoptose corrélés à des facteurs pronostics péjoratifs. Le cetuximab peut être pris seul ou en association avec d'autres médicaments comme l'irinotécan. Van Cutsem *et al*, ont démontré sa possibilité d'améliorer la réponse antitumorale de la chimiothérapie (FOLFIRI : association d'un antimétabolite analogue des bases pyrimidiques, le 5 FU, et d'un inhibiteur de l'ADN topoisomérase 1, l'irinotécan) et de diminuer le risque de progression du CCR métastatique. Cependant l'action du cetuximab est limitée aux patients *K-RAS* sauvage (38).

- Le *panitumumab* (39) a le même mode d'action que le cetuximab induisant une internalisation de l'EGFR. Tous deux sont indiqués en l'absence de mutation du gène *K-RAS* (38).

- **Concernant la voie PI3K / PTEN / AKT / mTOR : encore à l'étude**

Les données du registre des essais cliniques (ClinicalTrials.gov) ont montré que différents inhibiteurs de la voie PI3K ont été testés, incluant : des inhibiteurs de PI3K (XL147, PX866 et BKM120), d'AKT (perifosine, GDC0941) et de mTOR (MK2206, VQD-0002, CCI-779 et rapamycine ou ses analogues). Cependant, l'inhibition de mTOR peut conduire à des réactions d'activation de la MAPK de manière dépendante de la voie PI3K (40). La présence de boucles de rétroaction dans les cellules cancéreuses a posé des problèmes dans le ciblage de la signalisation PI3K pour le traitement du CCR. Par conséquent, l'utilisation combinée de thérapies est nécessaire à l'amélioration de l'efficacité des inhibiteurs de la signalisation PI3K.

- **Thérapies ciblées sur l'angiogénèse tumorale**

Le bevacizumab ou Avastin™ (41), est un anticorps monoclonal de type IgG1 qui se lie au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, requis pour la néo-angiogénèse tumorale) et inhibe de ce fait la liaison du VEGF à ses récepteurs, Flt-1 (VEGFR-1) et KDR (VEGFR-2), situés à la surface des cellules endothéliales. Il est constitué d'une partie constante d'origine humaine et d'une partie variable d'origine murine. Il est associé à des médicaments de chimiothérapie dont il peut améliorer l'efficacité (42). Il présente néanmoins de possibles effets secondaires sérieux : perforations digestives, hémorragies, hypertension artérielle, complications thrombo-emboliques.

- **Thérapies ciblées sur la mécanistique inflammatoire**

Depuis de nombreuses années, le lien entre maladies inflammatoires chroniques intestinales et carcinogénèse colorectale a été fait (43). Lors de cette inflammation chronique, différentes cytokines et chemokines sont produites et améliorent la survie de cellules pré cancéreuses en activant la voie NF-κB, voie prépondérante dans l'apoptose, la promotion et le maintien tumoral. Différentes études ont montré que NF-κB était la cible des anti inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (44). D'autres études ont pu montrer que l'utilisation régulière d'AINS permettait de diminuer l'incidence et la mortalité de patients atteints de CCR (45).

Malgré l'ensemble de ces traitements mis en œuvre, des récives tumorales demeurent. Cela se traduit par la présence au niveau cellulaire et moléculaire de mécanismes de résistance, parmi lesquels, la notion de «cellules initiant le cancer», est au centre des préoccupations scientifiques du moment.

Chapitre II. Les cellules initiant le cancer colorectal (CIC)

Afin d'expliquer l'**hétérogénéité tumorale** à l'échelle cellulaire, deux hypothèses modélisant la transformation maligne ont été proposées (46).

D'une part, le *modèle stochastique* dans lequel chaque cellule de la tumeur peut être transformée et donner un clone tumoral, composé de cellules qui ont toutes la capacité de proliférer de façon indéfinie et d'évoluer, en réponse à l'accumulation de nouvelles altérations oncogéniques. Il en résulte la formation d'une tumeur ayant accumulé de multiples mutations et dans laquelle apparaît une sélection de clones résistants.

D'autre part, le *modèle hiérarchique* dans lequel seule une cellule « souche » ou progénitrice peut être à l'origine de l'oncogenèse. Ainsi, seules les cellules « souches » cancéreuses vont proliférer de façon indéfinie et donneront naissance à l'hétérogénéité tumorale.

L'hypothèse la plus étudiée à l'heure actuelle sur l'origine du CCR repose sur la présence de ces cellules « souches » appelée également **Cellules Initiant le Cancer (CIC)**, cellules partageant les caractéristiques des cellules souches normales.

1. Les cellules souches intestinales (CSI) saines

1.1 Caractéristiques des cellules souches intestinales

Les cellules souches « normales » sont situées à la base des cryptes intestinales (47) (unités fonctionnelles de l'intestin, en continu renouvellement - les cellules épithéliales du côlon étant remplacées environ tous les 5 jours). Elles sont capables de se diviser sur un mode symétrique pour assurer leur auto-renouvellement, ou sur un mode asymétrique, pour générer les cellules progénitrices des cellules intestinales différenciées (cellules sécrétrices ou cellules caliciformes, entérocytes ou colonocytes et cellules entéro-endocrines) qui remontent le long des cryptes et sont ensuite éliminées par apoptose, dans la lumière colique en 2 à 3 semaines (48). Elles sont indispensables à la dynamique de la muqueuse colique (**Figure 6**). Néanmoins, elles constituent seulement en moyenne 1 % des cellules totales de la crypte (49).

Ces cellules souches sont définies par les caractéristiques suivantes: l'**auto-renouvellement**, la **multi potentialité**, une **prolifération quasi illimitée** dans le temps, l'état souche par l'expression de **marqueurs de cellules souches embryonnaires** (50) (51) ainsi que la **division asymétrique**.

Pour le maintien de l'ensemble de ces propriétés, le rôle du microenvironnement intestinal ou niche est primordial. Celui-ci comprend des composants cellulaires et extra-cellulaires assurant des conditions optimales au maintien de ces CSI : sécrétions de cytokines, facteurs de croissance, interactions cellulaires (52) (53).



Au sein de l'épithélium de la muqueuse colique, **deux pools** de cellules souches intestinales ont été suggérés (54): un pool de CSI *quiescentes* servant de « réserve » et un pool de CSI « *activées* », cyclantes «prêtes à recevoir et répondre à des signaux de régulation provenant des cellules stromales» ou voisines.

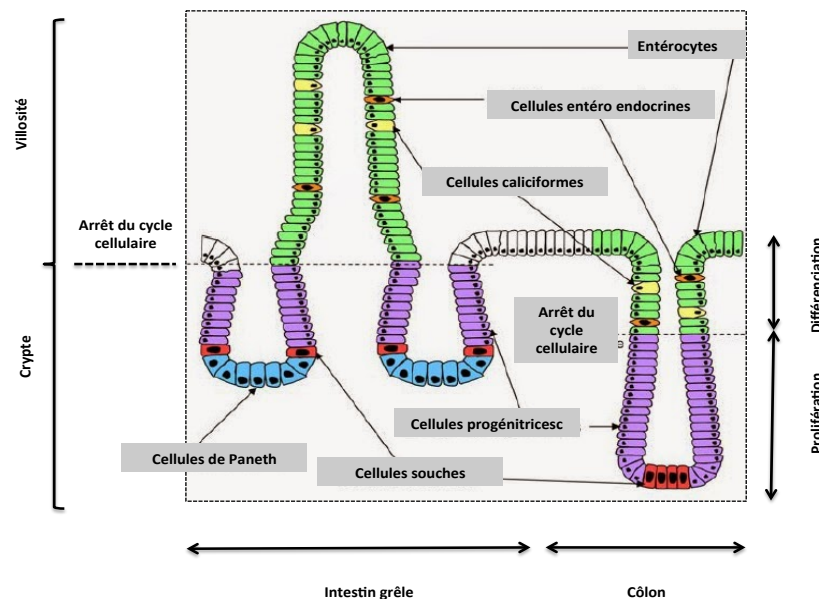


Figure 6 : Organisation des cellules au sein de la crypte intestinale, d'après Thèse de G. Chatel

Différentes voies de signalisation permettent la régulation de l'homéostasie de ces cellules souches. La balance des mécanismes de prolifération, différenciation, migration va être régie par des activations ou inhibitions de différents signaux au sein de voies intrinsèques ou extrinsèques de signalisation telles que : les voies Wnt/bêta caténine, PTEN- PI3K-AKT, BMP, Notch et Hedgehog.

1.2. Voies de régulation des cellules souches intestinales saines

a. La voie Wnt

Son rôle a pu être mis en évidence par deux approches réciproques à savoir par son inhibition ou son activation. La délétion du facteur de transcription Tcf4, effecteur clé de la voie dans les cellules souches intestinales (55) ou l'expression de Dickkopf-1 (Dkk-1), inhibiteur spécifique de cette voie, entraîne l'absence du compartiment cryptique (56). En l'absence de Wnt (**Figure 7A**), la β -caténine est incluse dans un complexe protéique comprenant l'axine, APC et la kinase GSK3- β (glycogène synthase kinase 3 β). Elle est phosphorylée par cette dernière, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome. La β -caténine peut aussi être liée à la cadhérine et contrôler l'adhérence intercellulaire. En présence du ligand Wnt (**Figure 7B**) lié au complexe récepteur frizzled/LRP, la β -caténine se dissocie du complexe APC/Axine/GSK, n'est pas phosphorylée, et migre dans le noyau où elle se lie aux facteurs de transcription LEF/TCF, ce qui déclenche la transcription de gènes cibles (gènes codant entre autres pour MMP3, MMP7, ADAM10, Twist, Slug, c-Myc, cycline D1, Fibronectine....) (57).

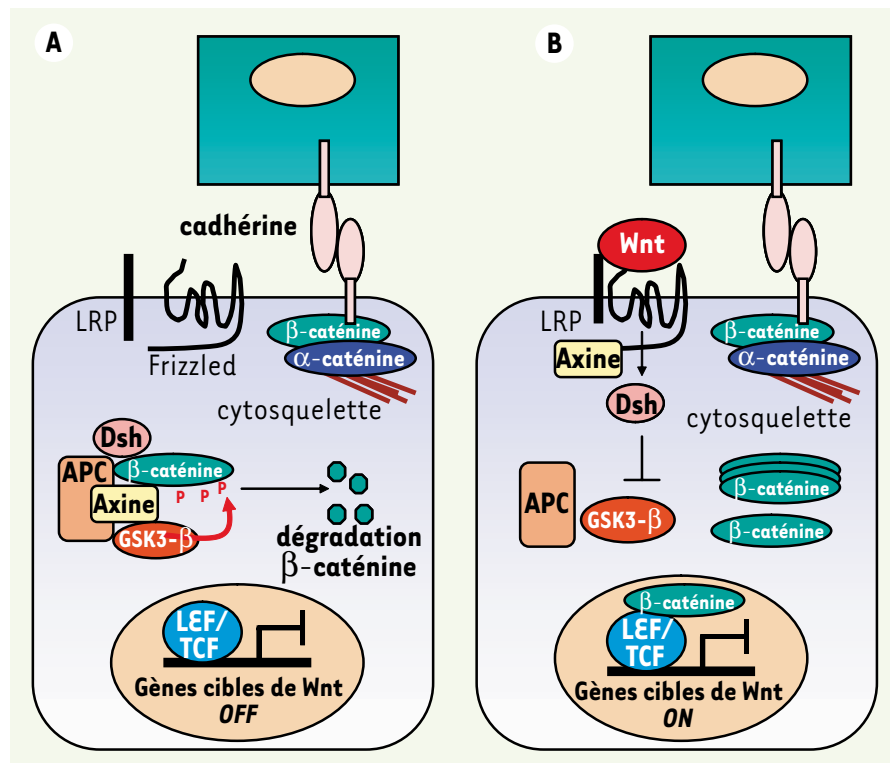


Figure 7 : La voie de signalisation Wnt, d'après Reya et al, 2005 (57)

La cascade Wnt est ainsi prépondérante concernant la destinée des cellules le long de la crypte intestinale (58). L'identification de nombreuses cibles faisant partie de la voie Wnt-bêta caténine indique l'implication de cette voie dans la régulation des CSI mais explique également les effets différentiels en fonction des types cellulaires et notamment selon leur localisation le long de l'axe de la crypte intestinale (48).

b. La voie PTEN-PI3K-Akt

La voie PI3K/AKT (Figure 8) joue un rôle important dans un certain nombre de fonctions cellulaires, notamment la régulation de la glycogénèse, la régulation de la taille de la cellule, la migration, l'apoptose et la prolifération. Cette voie peut être activée, soit directement par activation du récepteur à activité tyrosine-kinase EGFR (ou autre), soit par l'intermédiaire de la protéine RAS. Il existe donc un lien étroit entre la voie de signalisation RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT, par l'intermédiaire de RAS. Les connexions qui existent entre ces deux voies sont, en fait, probablement plus complexes encore et font aussi intervenir d'autres voies de signalisation intracellulaire comme la voie de la phospholipase C (PLC γ), la voie STAT et la voie Src/FAK.

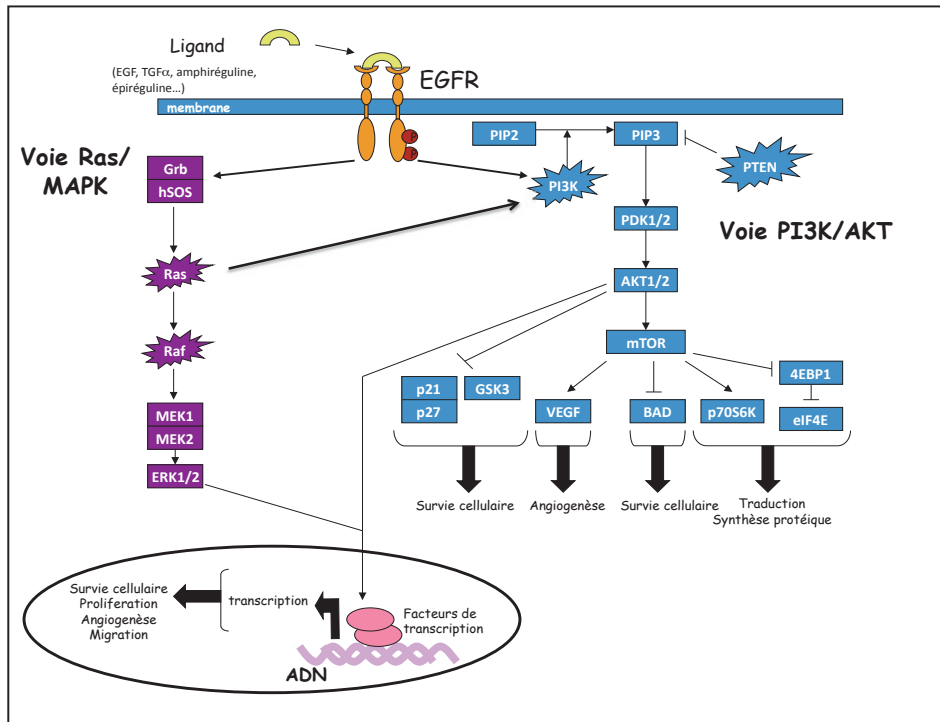


Figure 8 : Interconnexion des voies de signalisation PI3K-AKT et RAS-MAPK, d'après Lièvre et al, 2010 (59)

c. La voie BMP

L'inhibition de la voie BMP (Bone Morphogenic protein) semble être un événement nécessaire pour la conservation de l'état souche. En effet, son activation indiquée par la phosphorylation des protéines SMAD est retrouvée majoritairement dans les cellules intestinales différenciées (48).

d. La voie Notch

Notch correspond à une molécule transmembranaire. Elle comprend 4 récepteurs (notch 1, etc). Lui sont attribués 5 ligands (delta 1-3-4 ou jagged 1-2). Lorsque Notch interagit avec son ligand, la partie intracellulaire de Notch est clivée (Notch IntraCellular Domain, NCID), et est transloquée dans le noyau, activant la transcription de différents gènes. La signalisation Notch est essentielle dans les cryptes pour maintenir l'état indifférencié et prolifératif des cellules progénitrices.

e. La voie Hedgehog

Une autre voie importante dans le contrôle de la prolifération cellulaire des cellules de l'épithélium intestinal est celle de Hedgehog.

Trois homologues sont connus chez les vertébrés, soit Dhh (Desert Hedgehog), Shh (Sonic Hedgehog) et Ihh (Indian Hedgehog). Tous les membres de cette famille lient les récepteurs homologues, Ptc-1 et Ptc-2 (Patched), présents au niveau des cellules mésenchymateuses. En absence de ligands, les récepteurs Ptc régulent négativement l'activité d'un récepteur transmembranaire appelé Smo (Smoothened). Par contre, en présence d'un ligand Hedgehog, les récepteurs Ptc n'inhibent plus Smo et stabilisent le facteur de transcription Gli (Glioblastoma) en empêchant sa dégradation par le protéasome (60). Les protéines de la famille Gli transloquent alors vers le noyau et activent la transcription de gènes cibles comme les cyclines D1 et D2. Par ailleurs, le blocage du signal Hedgehog par la surexpression d'une protéine inhibitrice HHIP (HedgeHog Interacting Protein) résulte en une absence complète des villosités et à la présence d'un épithélium intestinal pseudo-stratifié hautement prolifératif (61). La signalisation Hedgehog de l'épithélium vers le mésenchyme est nécessaire à l'établissement du compartiment villositaire et à la restriction de la prolifération dans les régions intervillositaires.

2. Les cellules initiatrices de cancer (CIC)

L'hypothèse sur l'origine du CCR repose principalement sur la transformation d'une ou plusieurs cellules souches intestinales saines (CSI) en Cellules Initiant le Cancer (CIC), via des dérégulations des voies de l'homéostasie cellulaire ou des mutations de l'ADN (62). Ainsi, une faible proportion de cellules au sein de la tumeur aurait la capacité d'initier le processus tumoral mais aussi de l'accroître (63). Les CIC sont caractérisées par un cycle de renouvellement plus lent que les cellules coliques normales. Cette quiescence relative leur permet de résister aux traitements qui ciblent les cellules en division. Toutefois, cette résistance aux thérapies, chimio ou radiothérapie, semble multifactorielle et reste encore mal élucidée.

Par conséquent, ces cellules constituent un modèle très intéressant pour étudier le mécanisme de développement du CCR, tant au niveau de son origine qu'au niveau de la résistance aux traitements (64).

2.1. Carcinogénèse colorectale, le modèle de la cellule « souche » initiant le cancer

La carcinogénèse colorectale résulte d'altérations génétiques, épigénétiques mais aussi d'interactions avec le microenvironnement entraînant la formation d'un phénotype aberrant colique. « La cellule originelle », devenant la première cellule tumorale par acquisition de mutations, peut être explicitée par deux modèles.

D'une part, le modèle stochastique dans lequel toute cellule tumorale est capable d'initier et de propager la tumorigénèse (l'hétérogénéité tumorale s'expliquant par l'accumulation de mutations génétiques avec influence microenvironnementale).

D'autre part, le modèle de la cellule initiatrice de cancer dans lequel une faible proportion de cellules à l'intérieur de la tumeur est capable d'initier la propagation tumorale (l'hétérogénéité venant de la capacité de ces CIC multipotentes à former une grande variété de progéniteurs et de cellules différenciées).

- **Le modèle stochastique**

Dans ce modèle, chaque cellule au sein de la tumeur peut, de manière égale, être à l'origine de l'initiation et de la progression tumorale. Les cellules épithéliales normales développent une mutation oncogénique favorisant alors une hyperplasie. Certaines de ces cellules hyperplasiques peuvent devenir « la cellule originelle tumorale » développant des mutations oncogéniques à l'origine de la transformation cellulaire cancéreuse. (**Figure 9A**)

- **Le modèle hiérarchique**

Ce modèle désigne un sous-ensemble de cellules souches cancéreuses biologiquement distinctes au sein de la population totale cellulaire cancéreuse. Les cellules souches normales ont un pouvoir limité de prolifération et peuvent donner naissance à des cellules progénitrices se différenciant en types cellulaires variés. Si elles échappent aux phénomènes de régulation, elles deviennent des cellules initiant le cancer (CIC) capables d'auto renouvellement et de production de cellules progénitrices cancéreuses. Il en est de même pour les cellules progénitrices qui, échappant aux voies de régulation, deviennent des cellules progénitrices cancéreuses donnant alors naissance à des cellules peu différenciées. (**Figure 9**)

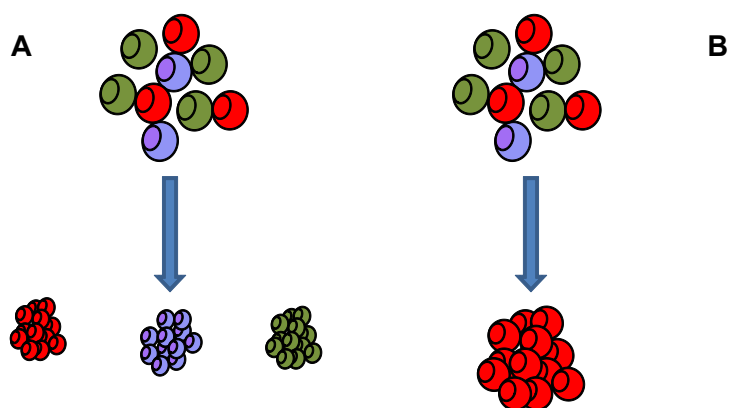


Figure 9 : Modèles stochastique et hiérarchique, Tirino et al, (65)

- A. Modèle stochastique : quelque soit le type cellulaire au sein de la tumeur, celui-ci est capable de former une nouvelle tumeur
- B. Modèle hiérarchique : seulement quelques cellules peuvent générer une nouvelle tumeur (cellules en rouge)

- ***La plasticité cellulaire a permis de relier ces deux modèles en un modèle unique***

La plasticité cellulaire permet une interconversion entre stade cellulaire différencié et stade cellulaire « souche ». Par conséquent, ce modèle de cancérogénèse à deux têtes est faux puisque d'une part, des cellules organisées selon le système hiérarchique sont le plus souvent et de manière transitoire entre deux stades, d'autre part, le système stochastique est capable de générer de manière hiérarchique des populations cellulaires organisées. Ainsi, selon le génotype et les signaux du microenvironnement reçus par les cellules progénitrices, au moins dans les tissus épithéliaux, ces cellules peuvent se différencier et entrer ainsi dans le pool des CIC pour retrouver la capacité de repopulation tumorale à long terme (66).

2.2. Carcinogénèse et dérégulations des voies de signalisation

La tumorigénèse peut commencer lorsque six marqueurs sont identifiables au sein des cellules, d'après *Hanahan et Weinberg* (67) :

- Indépendance vis à vis des signaux de prolifération provenant de l'environnement
- Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs
- Résistance à l'apoptose
- Prolifération illimitée (perte de la sénescence)
- Capacité à induire l'angiogénèse
- Capacité d'invasion tissulaire et de dissémination (métastases)

L'évènement initial de la cancérogénèse sous entend des anomalies génétiques entraînant une instabilité de l'ADN suivie par une moindre activité des gènes supresseurs de tumeurs. On retrouve en premier lieu une augmentation de l'expression de la β caténine au sein de l'épithélium colique normal permettant l'activation de la voie Wnt, la stabilisation de la β caténine et la liaison à la partie C terminale de la protéine 1 (CtBP1). De plus, l'inactivation du gène *APC* contribue à l'initiation de la formation adénomateuse. L'activation de *KRAS* et la localisation intranucléaire de la β caténine agissent alors de manière synergique pour promouvoir la transformation des adénomes en carcinomes (68). Puis des pertes de fonctions ou mutations de *TP53* contribuent à son développement (69). Existence ensuite des altérations de différentes voies telles que celles des MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt/molecular target of rapamycin (mTOR), NF- κ B (nuclear factor-kappa B), Myc et polycomb group (PcG) protein comme B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (BMI-1) (70).

La coopération entre ces différents signaux joue un rôle primordial au niveau de l'autorenouvellement, la prolifération, la survie, l'invasion et la progression métastatique des CIC, des cellules progénitrices de cancer et de leurs descendants.

Ainsi, au sein de ce processus tumoral, les CIC provenant de cellules souches normales ayant subi de multiples mutations vont également recevoir des signaux. Ceux-ci ne favoriseront pas seulement leur croissance mais modifieront aussi le microenvironnement ou niche tumorale.

2.3. Niche tumorale

De manière comparable aux CSI, les CIC résident dans un environnement propice, c'est-à-dire comportant des éléments promoteurs de la tumorigénèse (71). Il existe des interactions entre le microenvironnement et les CSI: des altérations génétiques ou épigénétiques peuvent favoriser la transformation maligne des CSI mais aussi du microenvironnement et l'inverse est possible (72) (73). D'autre part, une « niche » intestinale saine peut empêcher la formation tumorale, même si les CSI sont en cours de transformation (74). Les cellules au sein de la niche tumorale produisent des facteurs qui stimulent l'auto-renouvellement des CIC, induisent l'angiogenèse, et permettent le recrutement de cellules stromales et immunitaires sécrétant alors des facteurs supplémentaires pour favoriser l'invasion tumorale et la formation de métastases. Au sein de cette niche, se présentent ainsi : des fibroblastes associés au cancer (« cancer-associated fibroblasts », CAFs), des cellules souches mésenchymateuses, des cellules inflammatoires, des CIC et des cellules non cancéreuses. L'hypoxie régnant au sein de la tumeur et donc de la niche tumorale favorise la survie des CIC et la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (Mesenchymal-Epithelial Transition), EMT, grâce aux voies de réponse de stress activées (ROS : « reactive oxygen species »).

2.4. Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), métastases et résistance aux thérapies

Les CIC représentent donc les cellules au sein de la tumeur permettant sa propagation. Pour former des métastases à distance, les cellules doivent être capables de se détacher de la tumeur pour entrer dans la circulation générale (intravasation) puis se propager et former des tumeurs secondaires (extravasation) (75). Les métastases, responsables d'environ 90 % de mortalité associée aux cancers, sont donc liées à un phénomène d'envahissement, de colonisation par la tumeur primitive. Cela est en partie lié à une dé-différenciation cellulaire possible grâce à une activation aberrante d'un programme d'EMT. Les cellules acquièrent donc le phénotype « stem cell » leur permettant la mobilité, base du processus métastatique (76).

Cela est en grande partie relié à de multiples facteurs de transcription tels que SNAIL, ZEB et TWIST. SNAIL, par exemple, est un facteur transcriptionnel en doigt de zinc et entraîne une répression de l'expression de E cadhérine dans différents types de cancers tels que les cancers du sein, de la vessie, de l'estomac.

Les cellules doivent alors acquérir pour se propager des caractéristiques de motilité et d'invasion accrues et donc de multipotence comme les cellules « souches ». L'EMT

permet ainsi aux cellules épithéliales fixes et polarisées, qui sont reliées latéralement par l'intermédiaire de plusieurs types de jonctions et qui normalement interagissent avec la membrane basale, de subir des changements biochimiques multiples : perte de l'adhésion cellulaire, perte de la polarité apex-base, remodelage du cytosquelette, acquisition des caractéristiques mésenchymateuses telles que le renforcement de la capacité migratoire, l'invasivité, la résistance élevée à l'apoptose et l'augmentation de la production de composants de la matrice extracellulaire. Ce processus d'EMT, qui consiste en la transformation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses, ayant des propriétés de migration et d'invasion accrues, semble être régulé par les voies de signalisation des CSI (73). Des voies de signalisation majeures incluant TGF β , Wnt ... sont ainsi impliquées dans l'EMT et jouent un rôle primordial dans la progression tumorale (77).

La voie de signalisation TGF β -Smad représente un moteur essentiel et hétérogène dans l'EMT et la carcinogénèse colorectale (78). Les ligands du TGF β provoquent la dimérisation des récepteurs TRI et TRII au sein de la membrane, ce qui conduit à la phosphorylation des protéines Smad (79). Activées, Smad2 et Smad3 se déplacent vers le noyau avec Smad4 pour servir de régulateur transcriptionnel (80). Des altérations des récepteurs de TGF et de la signalisation de Smad ont été détectées dans les adénomes avancés et affectent 40-50% de tous les CCR (81). La perte de Smad4 se produit dans 30% des CCR métastatiques et est significativement corrélée à la perte de la E cadhérine et à des niveaux accrus de caténine (82).

La voie de signalisation Wnt contribue également à la progression du CCR et à la régulation de l'EMT. Son activation aberrante est caractéristique des CCR avec mutations au niveau d'APC ou de la bêta caténine. En effet, il existe une augmentation de la bêta caténine nucléaire au sein des cellules tumorales de phénotype mésenchymateux subissant une EMT active au niveau du front tumoral accompagnée à des changements dans l'expression de la E cadhérine (76).

Différentes études ont pu également montrer le rôle de la voie de signalisation RAS – ERK 1- ERK 2 au sein de l'EMT des CCR. Par exemple, les oncogènes *BRAF* et *RAS*, régulent les RhoGTPases pour médier migration et invasion cellulaires, seuls, ou en relation avec la voie TGF bêta (83).

L'activation de la voie PI3K-AKT à travers des mutations de PI3CA ou la perte de PTEN est associée à la progression tumorale colorectale (84).

Cependant, la cellule sous le phénotype mésenchymateux ne pourra pas proliférer et donner des métastases, c'est la raison pour laquelle elle se retrouve dans l'obligation de subir une nouvelle transition mais cette fois-ci de type mésenchymateuse-épithéliale (TME).

Ce phénomène est tellement important que les laboratoires pharmaceutiques s'intéressent de très près à des molécules empêchant cette transformation mésenchymateuse vers le phénotype épithélial. En effet, on remarque qu'entre 30 et 40% des patients, lorsqu'ils se présentent, sont déjà métastatiques. Et s'il n'y a pas de métastases, il y a au moins des cellules tumorales circulantes. Tant que ces cellules n'ont

pas subi le processus de transformation mésenchymateux vers le phénotype épithélial, la formation de métastases peut être évitée. Pour cette raison, de nombreux médicaments en cours d'essai pour stopper cette transformation, sont à l'étude, suggérant la « réversibilité du système d'EMT » :

Le processus global d'EMT permet donc aux CIC de produire des progéniteurs plus différenciés mais aussi de convertir des cellules n'initiant pas le cancer en CIC. Par conséquent, l'ensemble de ces éléments concourt à une variation au fil du temps de la population CIC et peut conduire à une résistance aux thérapies.

Cependant, en raison de leur nombre restreint au sein des tumeurs, les CIC restent difficiles à étudier. C'est pourquoi des techniques permettant leur isolement et caractérisation doivent être mises au point.

3. Méthodes d'identification et d'isolement des CIC

La plupart des techniques d'identification des CIC se base sur la mise en évidence de leurs marqueurs d'indifférenciation comme l'EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), molécule d'adhésion calcium indépendante exprimée à la surface basolatérale de la plupart des cellules épithéliales, mais aussi le CD44, molécule d'adhésion ayant des rôles pléiotropes dans la signalisation cellulaire, la migration et le « homing » (73). En fait, leur identification combine non pas une mais plusieurs de leurs caractéristiques.

3.1 Méthodes d'identification et de caractérisation

a. Caractérisation phénotypique

✓ Tumorigénicité

La principale caractéristique des CIC est leur capacité à développer des tumeurs après greffe au sein d'hôtes immunodéficients. Celles-ci ressemblant à la tumeur d'origine et donnant naissance à des cellules de différentes lignées composant le tissu d'origine.

Mais identifier et caractériser des CIC dépend également d'autres éléments.

✓ Marqueurs de stemness

Les CIC sont indifférenciées et n'expriment donc que peu de marqueurs de différenciation. Leur identification repose alors principalement sur la mise en évidence de plusieurs **marqueurs d'indifférenciation ou de « stemness »** dont certains sont encore controversés. Plusieurs molécules ont été proposées.

Le **CD 133 ou prominin-1**, une glycoprotéine transmembranaire, a été la première utilisée (85) comme marqueur permettant l'enrichissement de cellules capables de régénérer la tumeur au sein de leucémies. Il a été démontré que des cellules CD133⁺ sont capables de reformer une tumeur chez les souris immunodéprimées (86) (87). Cependant, son utilisation est controversée puisque des cellules CD 133⁻ ont également été capables de régénérer la tumeur (88) (89).

Le **CD44** est une glycoprotéine transmembranaire impliquée au sein de la carcinogénèse par ses rôles dans la migration, l'agrégation cellulaire et la croissance

tumorale (90)(91). Il existe différentes formes de CD 44 (92). Il est décrit comme un marqueur robuste car une diminution de son expression empêcherait l'initiation de la tumeur *in vivo*. Il est fortement exprimé au sein de colosphères (cf paragraphe suivant) en association avec le CD 133 et ces dernières sont alors beaucoup plus tumorigéniques après xénogreffes chez l'animal (93).

L'**EpCAM**, glycoprotéine transmembranaire, intervient dans l'adhésion cellulaire. De nombreux articles ont démontré que les cellules CD44⁺/EpCAM^{high} correspondaient aux CIC (94).

Le **CD 166 ou ALCAM** appartenant à la superfamille des immunoglobulines, correspond également à une molécule d'adhésion (95). Son expression sur la membrane des cellules de CCR est associée à un faible taux de survie (96). Il est exprimé en association avec le CD 44 et l'EpCAM au sein des CIC chez l'animal.

Le **Lgr5 (leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5)**, membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G et cible de la voie Wnt, est considéré par de nombreux auteurs comme un marqueur idéal de CIC et représente par conséquent une cible thérapeutique potentielle des CCR (97).

De fait, il n'existe pas de marqueur parfait et unique pour identifier les CIC. Il est alors communément admis qu'il est indispensable de retrouver plusieurs marqueurs exprimés en association pour identifier les CIC. Mais cela est insuffisant et il est également primordial que cette expression de marqueurs « stemness » soit associée à d'autres propriétés.

✓ **Expression de gènes « souches » et facteurs transcriptionnels**

Les facteurs transcriptionnels Oct 4, Nanog et Sox 2 sont les plus souvent analysés car ils permettent le maintien de l'état de **pluripotence caractéristique des cellules souches**.

D'autres facteurs transcriptionnels tels que Bmi-1, Snail, Twist peuvent être recherchés. La surexpression de Bmi-1 favorise à la fois l'**autorenouvellement** et la **chimiorésistance** (98). Snail et Twist sont essentiels pour le processus de **Transition Epithélio-mésenchymateuse** (EMT). Twist appartient à la famille des facteurs de transcription à motifs hélice-boucle-hélice et régule l'expression des gènes de la différenciation, adhésion et prolifération cellulaires (99). Snail appartient à la famille des facteurs de transcription en doigt de zinc promouvant EMT, invasion et processus métastatique dans de nombreuses tumeurs (100). Snail induit l'EMT en réprimant l'expression de la E cadhérine, molécule d'adhésion cellulaire, dans de nombreux types de cancers tels que sein, vessie, estomac et colorectal.

b. Caractérisation fonctionnelle

Il existe d'autres méthodes d'identification de ces CIC à partir de leurs propriétés fonctionnelles intrinsèques.

✓ **Phénotype « Side population », SP**

Ainsi, il est possible de détecter le phénotype cellulaire « SP, side Population », distinct par un faible marquage Hoeschst 33342 (101). Cette population a été ainsi nommée

du fait de sa position au sein du diagramme de cytométrie en flux. D'autre part, le faible marquage est lié à la présence d'ATP-binding cassette (ABC) transporteurs permettant son efflux. Les chimiothérapies sont alors également le substrat de ces pompes à efflux suggérant un des mécanismes de chimiorésistance de ces CIC. Cependant des CIC ont été retrouvées dans la population « non SP » suggérant que le système d'efflux est insuffisant pour détecter des CIC.

✓ **Division asymétrique**

D'autre part, la propriété de division asymétrique des CIC a été utilisée. Elles sont le plus souvent quiescentes avec de faibles taux de prolifération et leurs divisions sont asymétriques avec la production de deux cellules filles : l'une restant souche et l'autre se différenciant. PKH26 et PKH6 sont des colorants lipophiles qui marquent la membrane cellulaire et se répartissent équitablement au sein des deux cellules filles après la division cellulaire. Alors qu'une cellule en division lente conserve efficacement le colorant, les cellules en division plus rapide perdent ou diluent le colorant de membrane rapidement. Comme les CIC sont dormantes et subissent une division asymétrique, elles conservent le marquage plus longtemps que les cellules filles différenciées qui se divisent rapidement. Cette technique est utilisée pour isoler les cellules souches cancéreuses provenant d'ostéosarcome et de cancer du sein (102).

✓ **Activité ALDH**

Une autre méthode a également été mise au point. En effet, a été démontrée chez les CIC, une forte activité ALDH (aldéhyde déshydrogénase) au sein de tumeurs du sein, coliques et pulmonaires (103). ALDH est une isoenzyme cytosolique impliquée dans la détoxification d'aldéhydes intra cellulaires, entraînant une résistance aux chimiothérapies. De manière plus précise, cette enzyme intervient dans le métabolisme de l'acide rétinoïque et joue un rôle dans le contrôle de la différenciation cellulaire. Cette activité peut être mesurée et utilisée pour isoler les cellules la possédant, en utilisant un *kit* commercial (*kit* ALDEFLUOR, *Stem cell technologies*). Ce *kit* contient un substrat fluorescent spécifique de l'ALDH (BAAA) qui permet de discriminer les cellules exprimant l'activité enzymatique, qui sont fluorescentes (ALDEFLUOR-positives), et les cellules n'exprimant pas cette activité, qui ne sont pas (ou peu) fluorescentes. Cette technique a déjà été utilisée afin d'isoler les CIC dans des pathologies aussi diverses que les leucémies ou le myélome multiple (104). Dans le cas du cancer du sein, il a été démontré que seules les cellules ALDEFLUOR-positives issues de tumeurs humaines et greffées dans la souris NOD/SCID sont tumorigènes et reconstituent l'hétérogénéité de la tumeur initiale, ce qui reflète les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation de ces cellules.

✓ **Clonogénicité et formation de sphères**

Les CIC sont capables de former des colonies à partir d'une seule cellule plus efficacement que leurs descendants (105) et à croître sous forme de sphères (en 3 Dimensions) dans des conditions de culture non adhérentes (106).

✓ **Multipotentialité**

Il s'agit d'une des caractéristiques des cellules souches « saines ». Elles sont donc capables de se différencier vers l'ensemble des composants cellulaires présents dans la tumeur.



✓ Chimiorésistance

Les CIC survivent à toute intervention thérapeutique, entraînant récurrences tumorales et progression tumorale sous forme de métastases. Cette résistance est le fait de multiples phénomènes notamment la quiescence et la présence de protéines résistantes associées telles que ALDH ou les transporteurs ABC.

Afin de travailler sur cette population si particulière, des méthodes d'isolement ont été développées.

3.2 Méthodes d'isolement

Différentes techniques existent à l'heure actuelle pour permettre l'isolement de ces CIC. Le tri de ces cellules peut se faire par Fluorescent-Activated Cell Sorting (FACS) c'est-à-dire immunomarquage associé à de la cytométrie en flux ou par Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS), à savoir par l'utilisation de billes magnétiques couplées à des anticorps qui permettent de capturer les cellules à l'aide d'une colonne. Ces techniques, bien qu'avantageuses et largement utilisées, présentent un inconvénient majeur qui est l'utilisation d'anticorps pouvant activer ou modifier les cellules, et notamment les CIC.

Une technique originale, appartenant à la grande famille des méthodes séparatives de la **FFF (Field Flow Fractionation)** est actuellement utilisée au sein de l'EA3842. Ainsi, la **SdFFF (Sedimentation Field Flow Fractionation)**, a l'avantage de ne pas utiliser le marquage par anticorps (107). Développée dans la fin des années 1960 par J.C. Giddings, la FFF (Field Flow Fractionation) est souvent présentée comme l'une des méthodes séparatives les plus polyvalentes (108). En effet, la grande variété de champs utilisables (**Tableau 3**) (109), de configurations instrumentales, de modes d'élution, permet d'envisager une infinité de conditions expérimentales à mettre en œuvre pour le tri, la séparation et la caractérisation de polymères, de poudres, d'émulsions, de colloïdes, de nanoparticules ou de bioparticules dont la taille varie de 1 nm à 100 µm (110).

La FFF correspond ainsi à une « superfamille » de techniques mettant en œuvre un principe commun dans un ensemble de dispositifs instrumentaux différents selon la nature des champs appliqués (**Tableau 3**).

Champs	Technique
Gravité terrestre	<i>FFF gravitationnelle : GFFF</i>
Champ multigravitationnel	<i>FFF multigravitationnelle ou de sédimentation : SdFFF</i>
Thermique (gradient)	<i>FFF thermique : ThFFF</i>
Gradient hydrodynamique	<i>FFF hydrodynamique : FIFFF / Hollow Fiber FIFFF (HF5)</i>
Electrique	<i>FFF électrique : EIFFF</i>
Magnétique	<i>FFF magnétique : MgFFF</i>
Acoustique	<i>FFF acoustique : AcFFF</i>

Tableau 3 : Principaux champs mis en œuvre en FFF

Cette même « superfamille » se trouve rattachée à celle plus vaste des méthodes chromatographiques au travers de son mécanisme de séparation basé sur l'élution différentielle des particules, et à celle des techniques basées sur l'application d'un champ telles que l'ultracentrifugation, l'élutriation ou l'électrophorèse (109).

La FFF, et en particulier la SdFFF (Sedimentation Field Flow Fractionation), partage avec la CLHP (Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance) une grande partie de son instrumentation (pompes, injecteurs, détecteurs ...), mais où la CLHP met en œuvre une colonne remplie de phase stationnaire, la FFF utilise un canal parallélépipédique ne contenant aucun remplissage, phase stationnaire ou préparation de surface.

Cette technique de tri, la SdFFF (**Figure 10**), se base essentiellement sur les propriétés biophysiques intrinsèques des cellules (taille, densité, déformabilité...).

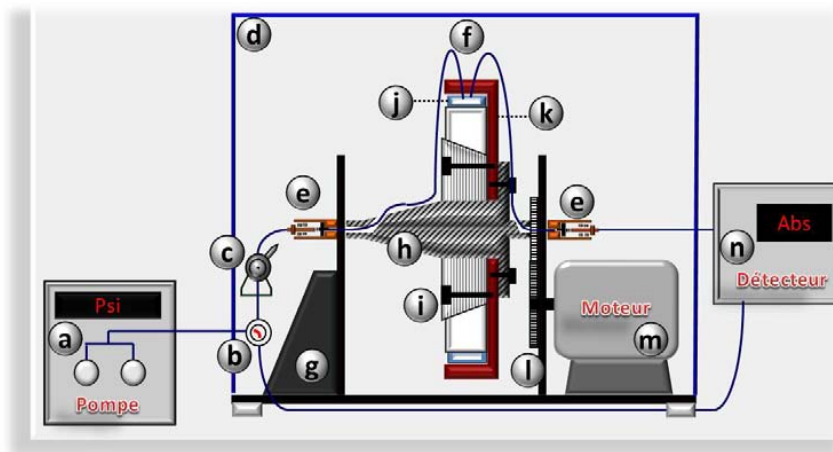
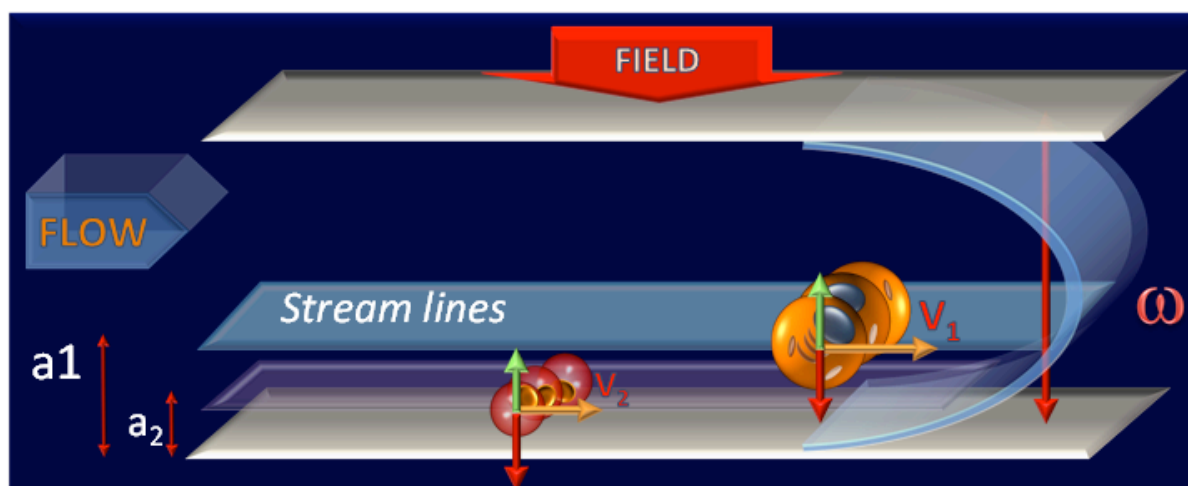


Figure 10 : Schéma général d'un appareil de SdFFF

a : pompe isocratique pour CLHP ; *b* : vanne 4 voies (relaxation / nettoyage) ; *c* : vanne d'injection (type Rhéodyne®) ; *d* : système de protection ; *e* : joints tournants d'entrée et de sortie ; *f* : tubulure Peek® d'entrée et de sortie du bol ; *g* : statif en aluminium ; *h* : rotor et bol de centrifugation ; *i* : système de serrage du canal ; *j* : système canal / contre-canal ; *k* : bol de centrifugation ; *l* : engrenages ; *m* : moteur électrique ; *n* : détecteur spectrophotométrique UV-Visible de type CLHP.

Il s'agit donc d'une méthode d'isolation cellulaire «label-free», ne nécessitant aucun marquage des cellules au préalable donc aucune modification physiologique de celles-ci. Cette technique de séparation cellulaire repose sur l'action simultanée de l'écoulement d'un fluide dans un canal de faible épaisseur et l'effet d'un champ externe appliqué perpendiculairement au canal, permettant ainsi l'élu­tion différentielle des fractions cellulaires (111) (112) en fonction de leurs propriétés (**Figure 11**).



a = distance entre le centre de gravité des particules et l'accumulation sur les parois du canal. Cela dépend de la taille, de la densité, de la forme et de la rigidité.

Figure 11 : Mécanisme général

Un fractogramme (**Figure 12**) correspondant à l'élution des cellules les plus larges et/ou les moins denses en premier (fraction F1) et les cellules les plus petites et/ou les plus denses en dernier (fraction F3) est alors obtenu.

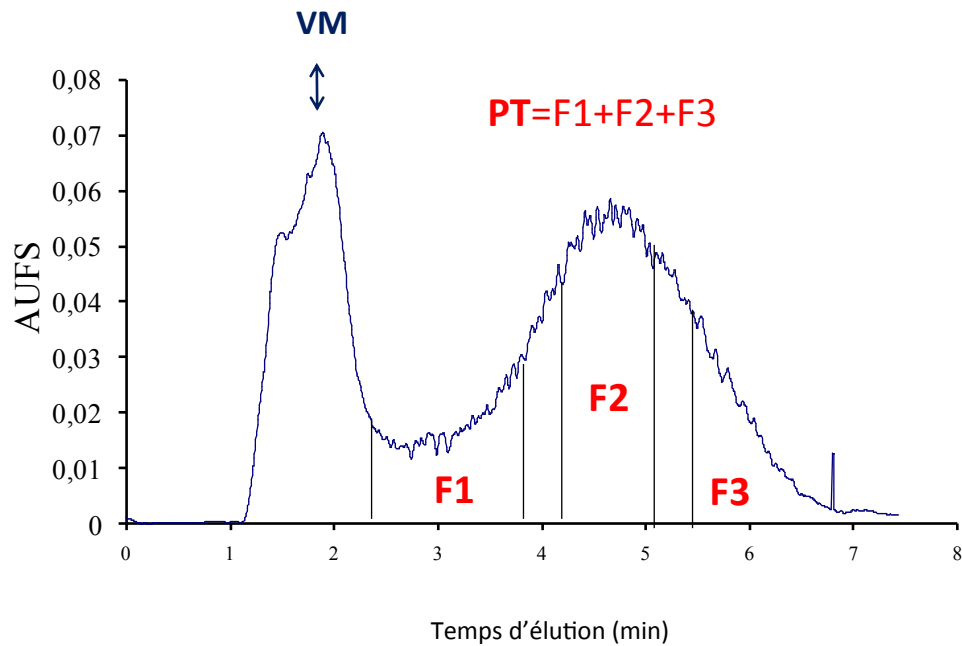


Figure 12 : Exemple de fractogramme d'élution pour la lignée cellulaire de cancer colorectal, WiDr, par SdFFF

AUFS : Aire au-dessous de la courbe

VM : Volume mort

F1 : 1^{ère} fraction éluee

F2 : 2^{ème} fraction éluee

F3 : 3^{ème} fraction éluee

PT : Pic total = F1 + F2 + F3

Chapitre III. E cadhérine, marqueur de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT)

Les CIC correspondent ainsi à un élément indispensable à la fois à la promotion tumorale mais également au processus de dissémination tumorale. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), mécanisme versatile, participe à la progression tumorale. Ainsi, par l'hypoxie tissulaire au sein de la tumeur, le mécanisme d'EMT est induit avec activation de facteurs de transcription tels que Twist, Snail, Zeb....Snail en particulier, entraîne la perte d'expression de la E cadhérine, marqueur d'adhésion intercellulaire, au sein de la tumeur, participant ainsi à la dissémination de la maladie.

1. E cadhérine, marqueur d'adhésion intercellulaire

1.1. E cadhérine, structure

La E cadhérine est un membre des cadhérines classiques avec la cadhérine « neurale » (N-Cad), la cadhérine placentaire (P-Cad), et la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-Cad). Le gène codant pour cette protéine, *CDH1* (Figure 13), a été cloné et caractérisé en 1995 par Berx *et al* (113). Il contient 16 exons et a été localisé par différentes méthodes sur le chromosome 16q22.1 (114) (113).

La E cadhérine est une **glycoprotéine transmembranaire calcium-dépendante** localisée au sein des jonctions adhérentes à la surface basolatérale des cellules épithéliales. Elle est impliquée dans les interactions cellule-cellule (115). Elle est composée d'un domaine cytoplasmique, d'un domaine transmembranaire (TM) à passage unique et d'un domaine extracellulaire (EC) qui se compose de cinq sous-domaines répétés en tandem « cadhérine-motifs », chacun composé d'environ 110 acides aminés (**Figure 13**).

L'ectodomaine NH2 terminal sert de médiateur à la liaison avec les cadhérines présentes à la surface des cellules voisines.

Les quatre interdomaines des sous-domaines EC sont caractérisés par des domaines de liaison avec le calcium. En effet, la fonction de la E cadhérine nécessite la présence de calcium pour rigidifier le domaine EC, stabilisant ainsi la protéine, évitant la protéolyse, et permettant sa propre localisation (116).

Le domaine cytoplasmique (CD) de la E cadhérine, à très grande variabilité, interagit avec les molécules de caténine qui médient sa liaison à l'actine du cytosquelette (115). Ce complexe est alors appelé cadhésome (117) et intègre des signaux provenant à la fois des milieux intra et extra cellulaires (118) (119).

Au cours du développement, elle contribue à la morphogénèse des dérivés de l'endoderme et du neurectoderme, du tube digestif (120), des reins et du remodelage de la peau.

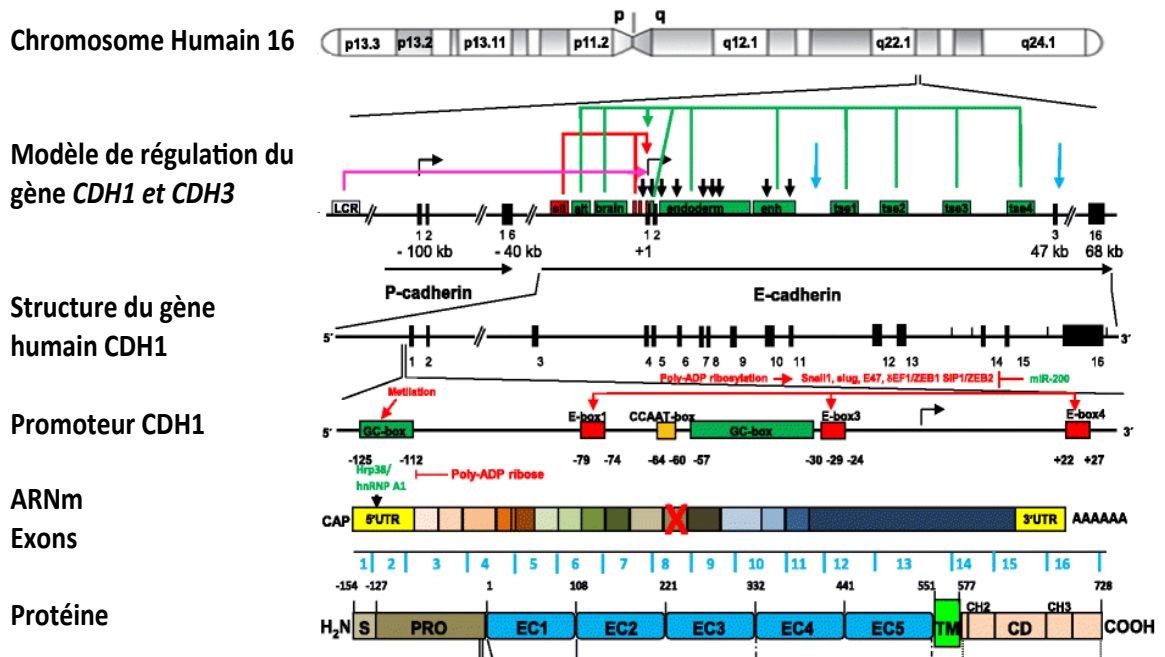


Figure 13 : Le gène de la E cadhérine et sa protéine, d'après Izaguirre et al, (119)

1.2. E cadhérine, fonction

a. Fonction contrôlée par le domaine EC

Le clivage du prodomaine de 130 acides aminés de la E cadhérine immature permet le passage d'une forme non adhésive à une forme fonctionnelle (121). L'endoprotéase spécifique de ce clivage n'a pas encore été identifiée mais la pro protéine E cadhérine contient un motif « furin clivable » (SSPGLRRQKR) (122) (**Figure 13**). La E cadhérine mature, elle, est inactivée par le clivage de son domaine EC par des métalloprotéinases (123) au sein d'un processus nommé « ectodomain shedding », connu pour promouvoir l'invasion (124).

b. Fonction contrôlée par le domaine CD

Dans les adhésions fonctionnellement actives, les complexes de E cadhérine forment des jonctions adhérentes avec les composants intra cellulaires.

Les interactions se font avec de multiples protéines cytoplasmiques telles que : β caténine ou γ caténine, α caténine et p120 caténine (p120-ctn) (125). La β -caténine se lie directement aux 72 acides aminés distaux du domaine CD de la E cadhérine par l'intermédiaire d'un « noyau » de 30 acides aminés, s'attachant indirectement à l' α -caténine (126). p120-ctn se lie de manière indépendante aux 29 acides aminés proximaux du domaine CD (127). L' α caténine s'attache quant à elle à l'actine du cytosquelette et à de multiples autres protéines renforçant ainsi l'adhésion inter cellulaire (128).

Ce domaine intracellulaire CD peut être également clivé formant différents fragments. Ainsi, pendant l'apoptose ou l'influx calcique, Presenilin 1 (PS1)/ γ secretase (129) et

caspace 3 (130) (cette dernière relarguant un fragment de 25 kDa) le clivent. Alors que β et γ caténines permettent les interactions entre cadhérines et actine du cytosquelette au niveau des jonctions adhérentes, les membres de la sous-famille p120-ctn induisent le regroupement latéral des cadhérines (131) et l'attache avec des entités de signalisation ou de régulation telles que kinases et phosphatases. Parmi ces dernières, on retrouve en particulier des kinases de la famille Src (SFK), phosphorylant la E cadhérine sur des résidus tyrosine créant ainsi un domaine d'interaction avec la ligase E3-ubiquitine Hakai favorisant ubiquitinylation et dégradation du complexe E cadhérine et par la suite, rupture des contacts cellule-cellule (132).

c. Dynamique de l'adhésion intercellulaire via la E cadhérine

Les cellules épithéliales formant les jonctions adhérentes sont fondées sur des contacts homophiliques entre clusters de E cadhérine. L'interaction avec des nectines inhibent l'endocytose de la E cadhérine à travers afadin, Rap 1, et p120-ctn et augmente leur concentration au niveau des sites d'adhésion inter cellulaire. Après la trans-interaction entre E cadhérines, les jonctions formées déclenchent l'activation de la voie PI3K-AKT-protéine Kinase B. Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate (PIP3) est généré, et des facteurs d'échange nucléotidiques à base de guanine sont recrutés à la membrane, activant alors Rac 1 et Cdc 42, et réduisant l'activation de Rho. Il s'ensuit ainsi une stimulation de la membrane et de la dynamique de l'actine, adjacente au site initial de contact, augmentant la probabilité d'engagement de nouvelles protéines E cadhérine. L'Alpha-caténine s'homodimérise et est relarguée du complexe E cadhérine-caténine pour s'accrocher et antagoniser Arp2/3, facilitant la formation d'une ceinture de filaments d'actine non ramifiés. Pendant que les vinculine, afadine et alpha-actinine se lient au cytosquelette d'actine, la β -caténine et p120-ctn se lient également au cytosquelette de tubuline pour acheminer les vésicules de E cadhérine-caténine nouvellement synthétisées et de E cadhérine recyclées d'endosomes vers les sites d'adhésion. En aval de Rac et Cdc42, IQGAP1 se lie à la β -caténine, qui pourrait se localiser dans les replis membranaires et contrôler l'internalisation de la cadhérine via SNX-1, empêchant la dégradation lysosomale de la E cadhérine ainsi que son recyclage à la surface cellulaire pour le maintien des jonctions adhérentes. La liaison de p120-ctn recouvre le domaine juxta-membranaire de la cadhérine inhibant RhoA localement et la liaison du complexe adaptateur qui recrute les cadhérines au sein d'un « noyau revêtu ». Ainsi, la E cadhérine est retenue dans des domaines de jonction membranaires plasmiques. Pendant ce temps, l'accumulation de PtdIns (3,4,5) P3 au sein de la membrane signale la formation et l'expansion de la surface baso-latérale, tandis que Rac1 favorise la polarité cellulaire et la formation de lumen, l'arrêt du cycle cellulaire des cellules épithéliales confluentes et la survie des cellules épithéliales polarisées. De manière concomitante, la E cadhérine diminue l'activation du récepteur tyrosine kinase dépendant à un ligand, comme l'EGFR stabilisant les contacts cellules-cellules.

d. Perte de fonction et début du processus tumoral

Lors de la perte de la E cadhérine, la β caténine n'a plus d'appui, et elle ne peut plus interagir avec la E cadhérine. Cette perte d'interaction va entraîner la présence de α caténine et de β caténine libres dans la cellule qui peuvent être ubiquitinylées et être dégradées par le système du protéasome ou être transloquées dans le noyau (le plus souvent) pour aller rencontrer les facteurs de transcription (Tcf, LEF TFs) entraînant la mise

en place d'un complexe de transcription actif pour les gènes cibles du complexe. On passe alors d'une molécule de structure à une molécule d'activation nucléaire.

La majorité des cancers (environ 80-90%) provient des cellules épithéliales. Normalement, les cellules épithéliales sont étroitement interconnectées avec différentes structures jonctionnelles incluant jonctions serrées, jonctions adhérentes et desmosomes qui sont intimement associés avec l'actine et le cytosquelette. Pour permettre la création et le maintien de ces jonctions, des interactions homophiliques calcium dépendantes médiées par la E cadhérine dans la zonula adherens sont primordiales. L'activité de la E cadhérine dépend de son interaction avec les caténines (alpha, beta et gamma) qui lui permettent sa liaison avec le cytosquelette. Ainsi, une interruption dans le complexe E cadhérine-caténines peut également causer une perte de l'adhésion cellulaire. Des mutations autres que celles de la E cadhérine peuvent donc affecter l'adhésion cellulaire médiée par la E cadhérine.

Le contrôle de l'expression de la E-cadherine peut ainsi rassembler différents mécanismes :

- Répression de la transcription par Snail, Slug, SIP1, Twist, dEF1, E12/E47 : rôle important dans l'arrêt de l'expression de la E cadhérine, si on sur-exprime un de ces facteurs de transcription, en moins de 24h il n'y a plus de E cadhérine qui sera exprimée.
Ces facteurs de transcription jouent un rôle très important dans l'EMT,
- Mutation de la β caténine : plus d'interaction avec la E cadhérine,
- Clivage protéolytique du domaine extracellulaire de la E cadhérine par les métalloprotéinases (MMPs) : il n'y aura donc plus d'interaction avec les autres cellules,
- Perturbation du cytosquelette,
- Augmentation de la dégradation intracellulaire,
- Perte de la E cadhérine pour être remplacée par la N cadhérine : c'est le « Cadherin Switch », associé au phénotype observé *in vitro* : EMT

Lors de cette transition épithélio-mésenchymateuse, différentes modifications cellulaires et moléculaires vont alors se présenter. Il y aura perte de la cytokératine (spécifique aux cellules épithéliales), de la E cadhérine, et de la polarité cellulaire. La cellule tumorale va alors passer d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux et acquérir un phénotype proche de celui des fibroblastes, une mobilité, des capacités d'invasion, une augmentation d'expression des gènes trouvés spécifiquement dans le phénotype mésenchymateux grâce aux facteurs de transcription, une forte expression de la N cadhérine, une augmentation de la sécrétion de protéase : MMP2, MMP9, une augmentation de l'expression de la vimentine, de la fibronectine, de l'expression du récepteur de PDGF et de $\alpha\beta 6$ intégrine.

2. E cadhérine et cancérogénèse

De multiples études ont relié la perte de la fonction d'adhésion de la E cadhérine à la survenue de la plupart des cancers épithéliaux tels que les cancers : colorectal, prostate, sein, poumon, rein, estomac, œsophage, foie.

La diminution d'expression de la E cadhérine est donc corrélée à des paramètres de malignité tels que la progression tumorale, la perte de différenciation, le caractère invasif et la présence de métastases (133). La perte d'adhésion cellulaire liée à cette diminution d'expression de E cadhérine va ainsi permettre aux cellules de se dissocier de la tumeur primaire, envahir les tissus environnants, et migrer vers des sites à distance.

Plusieurs mécanismes entraînent la perte de fonction de la E cadhérine.

Des délétions et des mutations inactivatrices du gène de cette molécule en sont un exemple parmi tant d'autres. C'est le cas des mutations germinales du gène de la E cadhérine, *CDH -1* (localisé sur le bras long du chromosome 16, en position 22), au sein de cancers familiaux gastriques.

Mais il existe également des modifications épigénétiques, une augmentation de la protéolyse et de l'endocytose (115).

Des études sur la perte d'hétérozygotie (LOH) du chromosome 16q 21-22 ont permis de relier E cadhérine et cancer. En effet, de multiples travaux ont montré la fréquence de LOH de 16q au sein de tumeurs gastriques, prostatiques, hépatocellulaires mais également au sein de carcinomes oesophagiens. Cependant, les mutations du gène de la E cadhérine sont rares au sein de cancers vésicaux, coliques, pulmonaires, thyroïdiens, ovariens ou de l'endomètre (134).

L'hyperméthylation du promoteur du gène est un événement épigénétique important associé à la perte d'expression de la E cadhérine. L'étude du gène de la E cadhérine a permis de montrer une méthylation aberrante de l'ADN au sein d'au moins huit types de cancers et sont corrélés à une baisse de l'expression de la E cadhérine (135).

Différents répresseurs transcriptionnels de la E cadhérine ont également été reliés à la progression tumorale de multiples cancers. L'augmentation de l'expression de Snail commune dans les carcinomes canaux de sein est fortement rattachée à une diminution de l'expression du gène de la E cadhérine.

D'autres mécanismes peuvent perturber la fonction de la E cadhérine lors de circonstances pathologiques. Selon la littérature (115), la E cadhérine membranaire subit une endocytose et est recyclée sur de nouveaux sites pour permettre de nouveaux contacts. L'activation anormale de protooncogènes comme *Src* et *EGFR*, entraînent une augmentation de la phosphorylation des résidus tyrosine du domaine cytoplasmique de la E cadhérine. Est alors recrutée la E3-ubiquitin ligase Hakai augmentant l'endocytose et la dégradation ubiquitine -dépendante de la E cadhérine (134).

De plus, des métalloprotéinases, incluant la stromelysine-1 (MMP3), la matrilysine (MMP7), MMP9, et MT1-MMP (MMP14), clivent l'ectodomaine de la E cadhérine près de la membrane plasmique (136). Plusieurs autres protéases, telles que la kallikréine sérine-protéase 7 peuvent être impliquées, comme décrits dans les adénocarcinomes du pancréas.



Cette expression facilite l'invasion par les cellules tumorales par clivage et libération de la E cadhérine soluble (137).

L'ensemble de ces exemples montre que la perte d'expression de la E cadhérine est un phénomène hétérogène et dépendant de différents mécanismes que nous allons expliciter et classer plus largement dans les paragraphes suivants.

2.1. Altérations structurelles du gène CDH1

L'expression anormale ou diminuée du gène *CDH1* permet aux cellules tumorales d'envahir les tissus environnants comme il l'a été démontré dans de multiples cancers humains notamment gastriques et mammaires.

Dans les cancers du sein, la diminution d'expression de la E cadhérine est spécifique aux carcinomes lobulaires (138). Des mutations somatiques tronquées du gène *CDH1* ont été retrouvées au niveau du domaine extra cellulaire (139). Des mutations germinales sont par contre rarement retrouvées au sein de carcinomes lobulaires invasifs du sein avec ou sans cancer diffus gastrique associé (140).

Concernant les tumeurs gastriques, la diminution d'expression de la E cadhérine se produit dans la majorité des cas (141).

L'absence ou l'aberrance d'expression de la E cadhérine peut être causée dans les cas de cancers gastriques sporadiques diffus ou mixtes par des mutations somatiques au niveau de la région centrale du gène *CDH1* entraînant un saut de l'exon 8 ou 9 dans 20 à 60% des cas (142).

Dans les formes héréditaires de cancer gastrique diffus, ce sont les mutations germinales du gène *CDH1* qui sont en cause (143).

2.2. Dérégulations transcriptionnelles de CDH1

La surexpression de répresseurs de la E cadhérine ont été décrits au sein de cancers (144). Peinado *et al*, ont démontré la répression de l'expression de la E cadhérine par Snail, à travers le recrutement d'un complexe multimoléculaire, composé par mSin3A et HDAC1/2 corepresseurs du promoteur de la E cadhérine. D'autres études ont montré que la répression de *CDH1* par Snail dépendait de complexes impliquant des histones (145).

Les MicroRNAs (miRNAs) semblent également être impliqués dans la régulation du gène *CDH1*.

Les membres de la famille miR-200 semblent réguler l'expression de la E cadhérine en ciblant directement les répresseurs transcriptionnels de la E cadhérine, à savoir ZEB1 et ZEB2 (146). L'inhibition des taux d'expression endogènes de miR-200 conduit à une diminution de la répression de ZEB1 et ZEB2, une réduction des taux d'expression de mRNA de E cadhérine et par conséquent, à l'acquisition d'une morphologie de type mésenchymateux et à une augmentation de la capacité cellulaire migratoire.

La régulation de la E cadhérine peut se faire également par les miR-9 et miR-11(147).

miR-9 a été retrouvé exprimé au sein de carcinomes hépatocellulaires avec métastases contrairement à ceux sans métastases.

En dehors de toutes ces modifications d'expression ou de fonction de la E cadhérine, le mécanisme le plus largement étudié et probablement le plus fréquent conduisant à une régulation négative de *CDH1* est l'hyperméthylation de son promoteur. Cela a été décrit aussi bien dans le cadre de cancers épithéliaux (en particulier au sein des cancers gastriques), qu'au sein des cancers non épithéliaux comme les leucémies aiguës myéloïdes.

2.3. Dérégulations post traductionnelles de la E cadhérine

Des études récentes, ont montré que la régulation du « trafficking » de la E cadhérine était associée à la progression des tumeurs épithéliales.

Au sein de cancers gastriques diffus héréditaires (CGDH), des mutations de non-sens fonctionnellement inactives ont été retrouvées : R749W et E757K, régulées par le Reticulum Endoplasmique associé à la dégradation (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation : ERAD), et prématurément dégradé par le protéasome (148). ERAD est le mécanisme par lequel les protéines mal repliées nouvellement synthétisées sont transportées à partir du RE vers le cytosol, et sont dégradées par le système ubiquitine-protéasome (149). Ces mutations R749W et E757K associées au CGDH interfèrent avec le pliage de la E cadhérine et proviennent des protéines mal repliées qui sont reconnues par la machinerie de ERAD, déclenchant leur dégradation, et conduisant par conséquent à la perte d'expression et de fonction de la E cadhérine (148).

Il existe néanmoins d'autres preuves impliquant la dérégulation du trafficking de la E cadhérine dans la progression tumorale. Ainsi, Hrs (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) est impliqué dans le trafficking lysosomal de la E cadhérine, et sa perturbation impacte la dégradation de la E cadhérine en inhibant la tumorigénèse chez la souris NUDE et la formation des métastases (150).

Des glycosylations aberrantes sont également impliquées définissant le stade de la progression tumorale. Ainsi, la glycosylation a été démontrée récemment comme un mécanisme de dérégulation de la E cadhérine au sein du cancer (151) : la E cadhérine afficherait un motif de N-glycosylation modifiée lors de l'acquisition du phénotype tumoral. De plus, la glycosylation de la E cadhérine par GnT-III semblerait être impliquée dans la suppression de métastases au sein de mélanomes (150).

2.4. E cadhérine et dérégulations des voies de signalisation au sein de la carcinogénèse colorectale

La carcinogénèse médiée par la E cadhérine implique l'activation aberrante de voies de signalisation mais également l'interaction aberrante avec d'autres molécules (composants du cytosquelette, intégrines et récepteurs de facteurs de croissance) (152).

La E cadhérine peut entrer en compétition avec l'activité transcriptionnelle médiée β ctn/ TCF de la voie canonique WNT, augmentant ainsi la prolifération (153). Cependant il est rare que la perte de fonction de la E cadhérine entraîne une accumulation intranucléaire de β ctn et une augmentation de la prolifération cellulaire dans les tumeurs primaires même si la mutation de la E cadhérine (V832M) est localisée dans le domaine reliant la β ctn (154). Une autre signalisation associant E cadhérine - β ctn concerne la régulation de l'organisation

du cytosquelette qui est médiée par l'activité des membres de la famille de petites GTPases ayant des conséquences directes sur les filaments d'actine (155). Rho, Rac et Cdc42 y sont impliqués.

De plus, la E-cadherine semble être colocalisée avec de multiples Récepteurs à tyrosine Kinase (RTKs) au niveau basolatéral de cellules épithéliales polarisées mais forme également de multiples complexes avec elles (156). Un grand nombre d'études au sein de la littérature indique que de multiples RTK peuvent inhiber l'adhésion cellulaire reliée à la E cadherine et ainsi induire l'EMT (132). Dans l'autre sens, la E cadherine peut elle aussi inhiber l'activation et la signalisation des RTK (157). Ainsi l'activation de EGFR peut être inhibée par la E cadherine responsable d'adhésion cellulaire (158) mais la E cadherine peut également activer transitoirement EGFR lorsque les contacts cellulaires sont formés (156). Il a été mis en évidence que la E cadherine altère l'affinité de liaison du ligand EGF pour EGFR, et chaque fois que la E cadherine est délétée, l'interaction de la E cadherine avec EGFR est perturbée. Ainsi, la E cadherine altère les voies de signalisation EGFR, c-Met et IGF-1R à travers leurs récepteurs apparentés (157). D'autres études ont démontré au sein des mutations germinales de faux-sens (réparties dans toute la protéine) des CGDH qu'il s'agit du domaine extracellulaire de la E cadherine qui est nécessaire pour l'interaction avec EGFR, altérant ainsi l'activation du récepteur pour son ligand (159). La liaison de la E cadherine à EGFR bloque alors la voie de signalisation en aval entraînant ainsi l'activation de GTPase RhoA et par conséquent augmente la mobilité cellulaire.

La perte de fonction de la E cadherine est associée à une augmentation du comportement invasif des cellules. Un grand nombre d'études a montré une corrélation entre les taux d'expression des métalloprotéases MMP2 et MMP9 et la progression tumorale (160). Outre cette activité des MMP dans la progression tumorale, elles seraient également connues pour inactiver le clivage du domaine extra cellulaire de la E cadherine désigné par le terme de « ectodomain shedding » (135) (161). Les fragments extracellulaires de la E cadherine ont été proposés comme promoteurs de l'invasion cellulaire cancéreuse en interférant avec la fonction de la E cadherine au sein des cellules contenant des complexes intacts E cadherine/caténine (135)(161).

Dans le processus d'invasion cellulaire, lorsque les cellules tumorales se détachent du tissu originel, pénètrent la membrane baso cellulaire et envahissent la matrice interstitielle, la survie cellulaire dépend de signaux provenant du microenvironnement comme par exemple ceux issus des molécules d'adhésion cellulaires (162). Ainsi, la perte de fonction de la E cadherine rend les cellules résistantes aux différents stimuli d'apoptose (163). *In vitro*, la E cadherine rendrait les cellules plus sensibles à un agent apoptotique, le taxol, et serait associée à une diminution du taux d'expression de la protéine anti apoptotique Bcl-2. L'étude de Ferreira *et al*, en 2012, (164), a permis de montrer la relation entre déficience de la E cadherine, activation aberrante de Notch-1, surexpression de Bcl-2 et augmentation de la survie cellulaire.

3. E cadherine et cancer colorectal

De nombreuses études ont observé une expression anormale de la E cadherine dans les tissus tumoraux (165).

Il existe une diminution globale de l'expression de la E cadhérine par rapport à la muqueuse adjacente normale. La majorité des études, et en particulier récentes, a montré une liaison entre perte d'expression de la E cadhérine et invasion par le CCR (166), mais cela semble rarement être attribué à une mutation du gène de la E cadhérine (167).

Il s'agit plutôt d'évènements épigénétiques qui doivent être considérés comme l'hyperméthylation du promoteur du gène *CDH1*, résultant en une mise sous silence de la transcription. Cette hyperméthylation a ainsi été davantage observée au sein des CCR associés à des colites ulcéreuses comparés aux CCR sporadiques (168).

Le mécanisme de dérégulation est par conséquent sans doute plutôt en relation avec des modifications post-traductionnelles comme Kitadai *et al* suggèrent (169). De même, Kokura *et al*, ont décrit la perte de la E cadhérine dans des conditions d'anoxie-réoxygénation dans des lignées cellulaires humaines de CCR. Aucune réduction de la quantité totale de E cadhérine n'a été trouvée, suggérant qu'il n'y avait pas de réduction vraie, mais plutôt une redistribution-internalisation de la E cadhérine de surface et ainsi, un défaut de liaison au cytosquelette (170). En outre, la E cadhérine étant connue pour être clivée (171), toutes ces données suggèrent un changement dans ses zones de distribution entre les compartiments intra et extracellulaires.

Chez les patients atteints de CCR, la E cadhérine est exprimée sous forme soluble dans le compartiment extracellulaire c'est-à-dire le sérum. La quantité de E cadhérine Soluble (sE cadhérine) a alors été retrouvée augmentée avec l'extension de la maladie (172).

Il est important de noter que lorsque l'expression de la E cadhérine décroît au niveau du front tumoral, elle semble par contre être ré exprimée au sein du tissu tumoral métastatique et est négativement corrélée avec la positivité de la β -caténine nucléaire et/ou cytoplasmique ainsi que la positivité de Slug nucléaire (173).

Au total, toutes les analyses concordent vers une augmentation des taux sériques de E cadhérine avec une diminution concomittante de l'expression de la forme totale de la E cadhérine au sein des tissus tumoraux.

