

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2014

Thèse n°

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN MEDECINE

(décret du 16 janvier 2004)

présentée et soutenue publiquement
le 12 décembre 2014 à Poitiers
par Madame Marion JEANTET-LAURENT

Titre

Hétérogénéité des mutations dans le cancer colorectal

COMPOSITION DU JURY

Président : Monsieur le Professeur Jean-Michel GOUJON

Membres : Monsieur le Professeur Pierre LEVILLAIN
Monsieur le Professeur Jean-Pierre RICHER
Monsieur le Maître de Conférences David TOUGERON

Directeur de thèse : Madame le Professeur Lucie KARAYAN-TAPON

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2014

Thèse n°

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN MEDECINE

(décret du 16 janvier 2004)

présentée et soutenue publiquement
le 12 décembre 2014 à Poitiers
par Madame Marion JEANTET-LAURENT

Titre

Hétérogénéité des mutations dans le cancer colorectal

COMPOSITION DU JURY

Président : Monsieur le Professeur Jean-Michel GOUJON

Membres : Monsieur le Professeur Pierre LEVILLAIN
Monsieur le Professeur Jean-Pierre RICHER
Monsieur le Maître de Conférences David TOUGERON

Directeur de thèse : Madame le Professeur Lucie KARAYAN-TAPON



LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

1. AGIUS Gérard, bactériologie-virologie
2. ALLAL Joseph, thérapeutique
3. BATAILLE Benoît, neurochirurgie
4. BENSADOUN René-Jean, oncologie – radiothérapie (en disponibilité 1 an à compter de janvier 2014)
5. BRIDOUX Frank, néphrologie
6. BURUCOA Christophe, bactériologie - virologie
7. CARRETIER Michel, chirurgie générale
8. CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
9. CHRISTIAENS Luc, cardiologie
10. CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
11. DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
12. DEBIAIS Françoise, rhumatologie
13. DROUOT Xavier, physiologie
14. DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
15. EUGENE Michel, physiologie (surnombre jusqu'en 08/2016)
16. FAURE Jean-Pierre, anatomie
17. FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
18. GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
19. GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
20. GILBERT Brigitte, génétique
21. GOMBERT Jean-Marc, immunologie
22. GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
23. GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion
24. GUILLET Gérard, dermatologie
25. GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
26. HADJADJ Samy, endocrinologie et maladies métaboliques
27. HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
28. HERPIN Daniel, cardiologie
29. HOUETO Jean-Luc, neurologie
30. INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
31. IRANI Jacques, urologie
32. JABER Mohamed, cytologie et histologie
33. JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
34. JAYLE Christophe, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
35. KARAYAN-TAPON Lucie, oncologie
36. KEMOUN Gilles, médecine physique et réadaptation (en détachement 2 ans à compter de janvier 2014)
37. KITZIS Alain, biologie cellulaire
38. KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
39. LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
40. LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
41. LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
42. LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques
43. MACCHI Laurent, hématologie
44. MARECHAUD Richard, médecine interne
45. MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire
46. MEURICE Jean-Claude, pneumologie
47. MIGEOT Virginie, santé publique
48. MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
49. MIMOZ Olivier, anesthésiologie - réanimation
50. MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
51. NEAU Jean-Philippe, neurologie
52. ORIOT Denis, pédiatrie
53. PACCALIN Marc, gériatrie
54. PAQUEREAU Joël, physiologie
55. PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
56. PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
57. PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
58. POURRAT Olivier, médecine interne
59. PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
60. RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire
61. RICHER Jean-Pierre, anatomie
62. RIGOARD Philippe, neurochirurgie
63. ROBERT René, réanimation
64. ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
65. ROBLOT Pascal, médecine interne
66. RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
67. SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (surnombre jusqu'en 08/2017)
68. SILVAIN Christine, hépato-gastro-entérologie
69. SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
70. TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
71. TOUCHARD Guy, néphrologie
72. TOURANI Jean-Marc, oncologie
73. WAGER Michel, neurochirurgie

**Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens
Hospitaliers**

1. ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
2. ARIES Jacques, anesthésiologie - réanimation
3. BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie - virologie
4. BEN-BRIK Eric, médecine du travail
5. BILAN Frédéric, génétique
6. BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
7. CASTEL Olivier, bactériologie - virologie - hygiène
8. CATEAU Estelle, parasitologie et mycologie
9. CREMNITER Julie, bactériologie - virologie
10. DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie - réanimation
11. DIAZ Véronique, physiologie
12. FAVREAU Frédéric, biochimie et biologie moléculaire
13. FRASCA Denis, anesthésiologie - réanimation
14. HURET Jean-Loup, génétique
15. LAFAY Claire, pharmacologie clinique
16. SAPANET Michel, médecine légale
17. SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
18. THILLE Arnaud, réanimation
19. TOUGERON David, hépato-gastro-entérologie

Professeur des universités de médecine générale

GOMES DA CUNHA José

Professeurs associés de médecine générale

BINDER Philippe
VALETTE Thierry

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

BIRAULT François
BOUSSAGEON Rémy
FRECHE Bernard
GIRARDEAU Stéphane
GRANDCOLIN Stéphanie
PARTHENAY Pascal
VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

DEBAIL Didier, professeur certifié
PERKINS Marguerite, maître de langue étrangère

Professeurs émérites

1. DORE Bertrand, urologie (08/2016)
2. FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie – virologie (08/2015)
3. GIL Roger, neurologie (08/2017)
4. MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (08/2016)
5. MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (08/2017)
6. MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (08/2017)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

1. ALCALAY Michel, rhumatologie
2. BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
3. BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
4. BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
5. BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
6. BECC-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
7. BEGON François, biophysique, Médecine nucléaire
8. BOINOT Catherine, hématologie - transfusion
9. BONTOUX Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
10. BURIN Pierre, histologie
11. CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
12. CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
13. CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
14. CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
15. DABAN Alain, oncologie radiothérapie (ex-émérite)
16. DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
17. DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
18. DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
19. FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
20. GOMBERT Jacques, biochimie
21. GRIGNON Bernadette, bactériologie
22. GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
23. JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
24. KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
25. KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
26. LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
27. LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
28. MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
29. MARILLAUD Albert, physiologie
30. MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
31. POINTREAU Philippe, biochimie
32. REISS Daniel, biochimie
33. RIDEAU Yves, anatomie
34. SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
35. TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
36. TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
37. VANDERMARCCQ Guy, radiologie et imagerie médicale

Remerciements

Monsieur le Professeur Pierre LEVILLAIN

Merci de m'avoir accueillie dans votre service. Merci pour votre disponibilité et votre enseignement. Merci d'avoir accepté de juger mon travail.

Monsieur le Professeur Jean-Michel GOUJON

Merci pour votre disponibilité, votre enseignement, vos encouragements. Merci pour toute votre aide. Merci d'avoir accepté de juger mon travail.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre RICHER.

Merci pour votre disponibilité. Merci d'accepter de juger mon travail.

Monsieur le Maître de Conférences David TOUGERON

Merci pour vos conseils. Merci pour votre aide et votre disponibilité. Merci d'accepter de juger mon travail.

Madame le Professeur Lucie KARAYAN-TAPON

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail. Merci pour votre confiance et votre disponibilité. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre service de Cancérologie Biologique et de m'avoir fait découvrir cette discipline.

Madame le Professeur Gaëlle FROMONT

Merci d'avoir accepté d'encadrer la partie anapath de mon travail. Merci pour votre enseignement, votre exigence et votre disponibilité.

Madame Céline ARCHAIMBAULT

Merci de ta participation pour la technique anapath et biologique. Merci de ta disponibilité. Tu as été un maillon essentiel.

Monsieur Christophe MONEGIER DU SORBIER

Merci de votre patience et de votre disponibilité. Merci de réitérer des explications déjà données.

Monsieur Olivier RENAUD

Merci de ta personnalité unique. Merci de ta disponibilité.

Monsieur Serge MILIN

Merci de tes remarques « toujours flatteuses » sans oublier l'arbre décisionnel. Merci de ta disponibilité.

Monsieur Eric FROUIN

Merci, grâce à toi les livres de dermatopath ont siégé sur ma table de nuit. Ils hantent mes songes. Merci de ton enseignement, de ta disponibilité.

Michaël, ce fut très agréable de travailler à tes côtés. Merci de ta disponibilité et de ton aide notamment en informatique. Tu as mis la barre haute.

Merci Alix d'avoir accepté de partager ton bureau et de m'avoir supportée. « La base de l'enseignement est la répétition » surtout avec moi. Merci de ta patience, de ton enseignement et de ta joie de vivre.

A mes co-internes,

Céline, Mathilde, Audelaure, Marie, Cynthia, Arnaud, Johan, Sarah et Stéphanie. Merci pour ces moments passés.

Merci Martine, ton timbre de voie unique retentit dans le service.

Merci à Brigitte, Catherine, Catherine (la charentaise !), Céline, Elodie, Emilie, Julie, Liliane Marie-Noëlle, Marina, Sylvie et Véronique pour votre bonne humeur, votre disponibilité, votre patience et votre gentillesse. Vous rattrapez « parfois » mes étourderies avec pour monnaie d'échange des petites douceurs.

Merci Cécile, Claudine et Dominique pour votre patience, votre disponibilité. Vous avez l'ouïe avertie pour comprendre et retranscrire notre dialecte anapath.

Merci Alice et Céline pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre bonne humeur.

Merci Claire pour ton aide, ta très grande patience, ta disponibilité.

Merci Ulrich pour tes explications et ta disponibilité. Merci Karline pour ta disponibilité.

Merci Céline, Estelle, Mélanie, Pierre, Seb, Florence, Séverine et Nico de m'avoir acceptée et supportée dans votre bureau. Merci pour votre joie de vivre et votre enthousiasme. Merci de votre temps passé pour la partie technique de ma thèse.

Merci Pépita pour ta bonne humeur, tes fous rires communicatifs et ta joie de vivre.

Merci Nathalie pour avoir accepté de partager ton bureau (de le voir envahir plus exactement !).

Merci Monsieur Chomel pour vos conseils.

Un grand merci à Anaïs, collègue devenue Amie. Mille mercis de ton aide, ta disponibilité, ta patience. Merci de supporter un « boulet ». A nos soirées « Mojito » à venir...sans oublier Albéric ...et Wifi...

Merci Ponneytte (je n'ai pas pu résister). Toujours partante pour une soirée filles. Merci de ton amitié et de ton enthousiasme. A nos prochaines soirées « Mojito »...

Merci Jean-Pierre Da Costa pour ton aide précieuse et ton accessibilité.

Merci aux Dr Rousseau, votre accueil, votre gentillesse, votre disponibilité, votre patience et votre exigence m'ont permis de trouver ma voie.

Je dédie ce travail à mon grand-père Jeannot.

Un immense merci à mon mari. Merci Antoon de ton Amour sans condition, ton Soutien de tous les instants depuis plus de 10 ans. Merci de ta participation, de ton aide. Sans toi je n'y serai pas arrivée.

Merci à mon fils adoré et chéri Amaury. Tu illumines mes jours...Et mes nuits.

Merci à mes parents, grâce à vous je suis là aujourd'hui avec mes défauts...Et mes qualités... Vous m'avez transmis que le bonheur était dans les choses simples de la vie : une balade à vélo avec un arrêt au stand B..... , au bord de l'océan.

Merci Didi de me supporter depuis...ta naissance. Ton premier mot m'était adressé...N...

Merci à mes beaux parents de m'avoir accueillie comme leur fille alors que je vous ai pris votre seul et unique fils ! Merci de votre soutien, de votre aide et de votre gentillesse. Merci Raymonde pour la relecture orthographique de ce travail.

Merci Mamie pour tous ces moments passés. Merci José pour votre gentillesse.

Merci Pépé Dédé et Mémé Germaine de m'avoir accueillie au sein de votre famille. Merci de votre gentillesse.

Merci Tatan Ginette, James, Nanou, Jérôme, Anaïs (je t'ai pris ton cousin !) et Mathys de m'avoir accueillie. Merci de votre gentillesse.

Merci Mémé Odette et André pour votre gentillesse.

Merci Frédérique, tu m'as vue grandir. Merci de ta patience et de ta gentillesse.

Merci Minou de ton amitié. Nos nombreuses différences font la richesse de ce lien.

Merci Sylvain, notre amitié à résister au cours de PCEM 1, à l'externat et à l'ECN. Merci pour tous ces moments passés en stage à explorer les faces cachées de l'hôpital, en garde aux urgences à apprendre à brancarder....Merci pour ces soirées ...Et à celles à venir....

Merci Vivi pour ton amitié.

Merci Dodo pour ta personnalité unique et ta gentillesse.

Merci Sophie, Yorick pour votre amitié et ces moments passés autour d'une table et d'un verre ou plusieurs de vin à refaire le monde.

Merci Liz, Frans, Sophie, Damien, Carine, Lionnel, Véro, Zozo, Marion et Pierre pour votre amitié, ces soirées pantagruéliques arrosées ; sans oublier la bouilla...Au pays du Rosé... !

Merci au Goisin et aux Goisines pour votre amitié, les apéros improvisés et les repas « top chef ».

Merci Math et Micka pour votre amitié et ces soirées épicuriennes.

Merci Céline « Claire » et PO pour votre amitié et gentillesse.

Merci Mélanie pour ton soutien et ton amitié.

Merci à la BrowBrow Family....

Table des matières

<i>Abréviations</i>	1
<i>Table des illustrations</i>	5
<i>Introduction</i>	7
I. Généralités	8
A. Epidémiologie, incidence et mortalité	8
B. Symptômes	10
C. Programme national de dépistage organisé du CCR	10
D. Facteurs de risques exogènes	11
E. Détermination des groupes à risques	12
1. Niveau de risque moyen	12
2. Niveau de risque élevé	12
<i>a. Sujets aux antécédents personnels d'adénome ou de CCR</i>	12
<i>b. Sujets aux antécédents familiaux d'adénome ou de CCR</i>	13
<i>c. Sujets aux antécédents de maladie inflammatoire chronique de l'intestin</i>	13
<i>d. Sujets atteints d'acromégalie</i>	14
3. Niveau de risque très élevé	14
<i>a. Le syndrome de Lynch</i>	14
<i>b. La polypose adénomateuse familiale</i>	16
<i>c. Le syndrome de Peutz-Jeghers</i>	17
<i>d. La polypose juvénile</i>	17
<i>e. La polypose hyperplasique</i>	17
II. Anatomopathologie	19
A. Lésions pré néoplasiques	19
1. Foyers de cryptes aberrantes	19
2. L'adénome	20
<i>a. Polype hyperplasique</i>	20
<i>b. Adénome festonné sessile</i>	20
<i>c. Adénome festonné traditionnel</i>	21
<i>d. Polype mixte</i>	21
<i>e. Adénome tubuleux</i>	22
<i>f. Adénome vilieux</i>	23
<i>g. Adénome tubulo-vilieux</i>	23
B. Définition de la dysplasie	23
C. Adénocarcinome	24
D. Classification pTNM des carcinomes colorectaux (AJCC, 7ème édition 2009)	29
III. Carcinogénèse et mécanismes	31
A. Instabilité chromosomique	33
B. Instabilité des microsatellites	33
C. Hyperméthylation des îlots CpG (Cytosine-Phosphate-Guanine)	35
D. Les différentes voies de signalisation impliquées dans la cancérogénèse colique	36
1. La voie de signalisation WNT	36
2. La voie de signalisation du TGF- β	37
3. La voie de signalisation de la protéine P53	38
4. La voie de signalisation RAS	39
E. Vers des classifications moléculaires	44
IV. Facteurs Pronostiques	45

A.	Le degré d'infiltration pariétale	45
B.	L'envahissement ganglionnaire	45
C.	Le nombre de ganglions examinés.....	45
D.	La marge de résection	46
E.	Le degré de différenciation	46
F.	Le sous type histologique	46
G.	Les emboles vasculaires et lymphatiques et engainements périvénereux	46
H.	Les dépôts tumoraux « satellites ».....	47
I.	CCR opérés en urgence	47
J.	L'antigène Carcino-Embryonnaire (ACE).....	48
K.	Lymphocytes T cytotoxiques	48
L.	L'instabilité des microsatellites	48
M.	Le gène KRAS.....	49
N.	Le gène BRAF.....	49
V.	Traitements	50
A.	Critères d'opérabilité et de résécabilité	50
A.	Traitement chirurgical	50
B.	Traitement endoscopique.....	51
C.	Stratégie thérapeutique, stade TNM et mutation RAS	51
1.	Stade I	51
2.	Stade II	51
3.	Stade III.....	53
4.	Stade IV (M+), (83).....	53
a.	<i>Métastases hépatiques résécables</i>	53
b.	<i>Métastases extra-hépatiques résécables</i>	54
c.	<i>Métastases à la limite de la résécabilité</i>	54
d.	<i>Métastases « jamais résécables »</i>	55
5.	Statut sauvage du gène RAS	56
a.	<i>Le cetuximab</i>	56
b.	<i>Le panitumumab</i>	56
	Objectifs de l'étude	58
	Matériels et Méthodes	60
I.	Sélection des patients.....	60
II.	Sélection tumorale	61
III.	Macrodissection	61
IV.	Détermination du pourcentage de cellules tumorales.....	61
V.	Protocole d'analyse.....	62
A.	Déparaffinage (de la macrodissection) et extraction d'ADN	62
B.	Préparation de mix PCR pour pyroséquençage.....	63
C.	Amplification.....	63
D.	Pyroséquençage des produits de PCR.....	63
E.	Analyse des résultats	67
1.	Les analyses effectuées avec le kit Therascreen KRAS PyroKit CE (Qiagen)	67
2.	Les analyses « techniques établies sur site »	68
3.	Interprétation biologique	69
	Résultats.....	71
I.	Caractéristiques anatomopatologiques et cliniques des 18 patients	71

II. Caractéristiques moléculaires des 18 patients :	72
A. Description des différents groupes	72
1. Groupe I. Analyse KRAS 12-13 initiale : WT	72
2. Groupe II. Analyse KRAS 12-13 Initiale : PLLM	72
3. Groupe III. Analyse KRAS 12-13 Initiale : Mutée	74
B. Synthèse des analyses moléculaires des 18 patients	75
1. Hétérogénéité spatiale	75
<i>a. Patients avec un clone sauvage et un clone fortement muté dans des zones tumorales différentes</i>	75
<i>b. Patients avec un clone sauvage et un clone faiblement muté (PLLM) dans des zones tumorales différentes</i>	76
2. Hétérogénéité mutationnelle.....	76
<i>Discussion</i>	81
<i>Bibliographie</i>	85
<i>Annexes</i>	93
SERMENT	97

Abréviations

ACE : Antigène Carcino-Embryonnaire

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AKT: Protein Kinase B

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

APC : Anaphase Promoting Complex

ATP : Adénosine Triphosphate

BAX : Bcl-2–Associated X protein

BMPRA1 : Bone Morphogenetic Protein Receptor, type IA

BRAF : v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

CCR : Cancer ColoRectal

CDK6 : Cell Division Protein Kinase 6

CDX2 : CauDal type homeoboX 2

CHIP : Chimiothérapie Hyperthermique IntraPéritonéale

CIMP : CpG Island Methylator Phenotype

CIMP-H : CpG Island Methylator Phenotype Hight

CIP : Chimiothérapie IntraPéritonéale

CIS : Carcinome In Situ

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CpG : Cytosine-Phosphate-Guanine

CTC : Cellules Tumoraes Circulantes

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EPN : Engainements périnerveux

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

FCA : Foyers de Cryptes Aberrantes

GAP : GTPase Activating Factor

GDP : Guanosine-Di-Phosphate

GEF : Guanine nucléotide Exchange Factors

GIST : Gastro Intestinale Stromal Tumor

Grb2 : Growth factor Receptor-Bound protein 2

GSK3 β : Glucogen Synthétase Kinase3 β

GTP : Guanosine-Tri-Phosphate

HB-EGF : Heparin-Binding Epidermal Growth Factor

HER : Human Epidermal growth factor Receptor

HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor-2

HES : Hémalun-Erythrosine-Safran

hMLH1 : MutL Homolog Human 1

hMSH2 : MutS Homolog Human 2

hMSH6 : MutS Homolog Human 6

HNPCC : Syndrome de Lynch/Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer

hPMS1 : Human Postmeiotic Segregation Increased 1

hPMS2 : Human Postmeiotic Segregation Increased 2

HRAS : Harvey RAS

IGF : Insulin-like Growth Factor

INCa : Institut National du Cancer

KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog

LKB1 : Liver Kinase B1

LOH : Loss Of Hétérozygoty

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MDM2 : Mouse Double Minute 2 homolog

MEK : MAPK-ERK-Kinase

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MM : Musculaire muqueuse

MMR : MisMatch Repair

MSI : Micro Satellite Instability

MSI-H : High-Frequency Microsatellite Instability

MSS : Microsatellite Stability

MUTYH : MutY Homolog

NIE : Néoplasie Intra-Epithéliale

NIEBG : Néoplasie Intra-Epithéliale de Bas Grade

NIEHG : Néoplasie Intra-Epithéliale de Haut gGrade

NGS : Next-Generation Sequencing

NRAS : Neuroblastoma RAS

PAF : Polypose Adénomateuse Familiale

PCR : Polymerase Chain Reaction

PI3K : Phosphatidyl Inositol 3-Kinase

PLLM : Potentiel Low Level Mutation

PMS2 : PostMeiotic Segregation2

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

RAF : Rat Fibrosarcoma viral oncogene homolog

RAS : Rat Sarcoma viral oncogene homolog

RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire

RER : Replicative Error

SH2 : Src Homology-2

SMAD4 : Mothers Against Decapentaplegic homolog 4

STK11 : Sérine-Thréonine Kinase 11

TCF/LEF : T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor

TGF beta : Transforming Growth Factor beta

TGF-4 : Transforming Growth Factor 4

TGFBR2 : Transforming Growth Factor, Beta Receptor II

TGF- α : Transforming Growth Factor Alpha

TNCD : Thésaurus National de Cancérologie Digestive

TNM : Tumor, Nodes, Metastasis

TTF-1 : Thyroid Transcription Factor-1

VELIPI : Emboli and Lymphatic and Perineural Invasion

WNT : WiNgless-Type mouse mammary tumor virus integration site

WT : WildType

Table des illustrations

Figures :

Figure 1 : Caractéristiques histologiques d'adénomes coliques, différenciation et infiltration trans pariétale et ganglionnaire de CCR	28
Figure 2 : Stade du Cancer Colorectal	30
Figure 3 : Principales altérations génétiques conduisant au CCR (31)	32
Figure 4: Voie de signalisation WNT (51)	36
Figure 5: Voie de signalisation TGF β , adaptée d'après(53)	38
Figure 6 : Famille des récepteurs de l'EGF (ErbB ou HER) (55).....	40
Figure 7 : Activation du récepteur à l'EGFR et des voies de signalisation intracellulaire en aval (55).	40
Figure 8 : Forme active et inactive de la protéine RAS (55).	42
Figure 9: Schéma simplifié de la voie RAS/MAPK (55).....	42
Figure 10: Schéma général simplifié des voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT(55)	44
Figure 11 : Mécanismes du cetuximab et du panitumumab d'après Lièvre A. (99)	57
Figure 12 : Station de travail Qiagen pour la préparation des échantillons	64
Figure 13: Illustration du système d'aspiration « hérisson » (Manuel du kit theascreen KRAS 12-13, KRAS 61 Pyro 07/2011)	65
Figure 14 : Schéma de la cartouche de réactif PyroMark Q24 Cartridge	66
Figure 15 : Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotypage sauvage des codons 12 et 13 (KRAS Exon 2)	70
Figure 16 : Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotypage sauvage des codons 61 (KRAS Exon 3).....	70
Figure 17 : Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant une mutation GGT \rightarrow GAT (substitution d'une Glycine par un Acide aspartique au niveau du codon 12 (KRAS Exon 2).....	70

Tableaux :

Tableau 1 : Incidence et mortalité estimées des cancers (5 principales localisations) en France en 2012.....	9
Tableau 2 : Taux d'incidence et de mortalité en France selon l'année.	9
Tableau 3 : Incidence (nombre de cas et taux d'incidence spécifique) du cancer colorectal par classe d'âge et par sexe en France en 2012.....	9
Tableau 4: Evolution des taux de participation au dépistage organisé du cancer colorectal depuis 2009-2010 chez les 50-74 ans en France.	11
Tableau 5 : Estimation de l'augmentation du risque de cancer colorectal par portion de viandes rouges ou de charcuteries pour les relations jugées convaincantes (8).....	12
Tableau 6 : Estimation de la diminution du risque de cancer du côlon pour les individus les plus actifs par rapport aux moins actifs pour les relations jugées convaincantes (8)	12
Tableau 7 :Critères morphologiques pour le diagnostic différentiel de polypes festonnés (15).....	22
Tableau 8 : Classification de Vienne modifiée en 2002 (25)	24
Tableau 9 : Grade histo-pronostique des adénocarcinomes.....	25
Tableau 10 : Classification pTNM des CCR selon la 7ème version (29).....	29

<i>Tableau 11 : LoB et LoD déterminées pour des mutations spécifiques (Manuel du kit theascreen KRAS 12-13, KRAS 61 Pyro 07/2011)</i>	67
<i>Tableau 12 : Caractéristiques clinique et anatomopathologique des patients</i>	71
<i>Tableau 13: 8 patients présentant une hétérogénéité tumorale</i>	77
<i>Tableau 14 : Résultats des analyses KRAS 12-13, 61,146, NRAS 12-13, 61 et BRAF.....</i>	78
<i>Tableau 15: Résultats du test de spearman.....</i>	80

Graphiques :

<i>Graphique 1 : Relation entre le pourcentage de cellules tumorales et le pourcentage de mutation</i>	79
<i>Graphique 2 : Relation entre l'infiltration tumorale et le pourcentage de mutation.....</i>	80

Annexes :

<i>Annexe 1: Le code génétique présente les codons et les acides aminés correspondants</i>	93
<i>Annexe 2: Acides aminés et abréviations</i>	94
<i>Annexe 3 : Compte rendu anatomopathologique standardisé 12/2011 (Inca).....</i>	96

Introduction

Par sa fréquence et sa gravité, le cancer colorectal (CCR) est un enjeu majeur de santé publique. En France, en 2012, un peu plus de 40 000 CCR ont été diagnostiqués et plus de 17 000 personnes en sont mortes (Institut national du cancer : INCa). Le pronostic du CCR reste mauvais malgré tous les progrès réalisés ces dernières décennies en matière de prévention, de moyens diagnostiques et de thérapeutiques. Le taux de survie à 10 ans est de 50% tout stade confondu (INCa). De plus, le diagnostic du CCR est souvent fait à un stade avancé.

Plus de 80% des CCR sont diagnostiqués après 60 ans.

Le CCR est le plus souvent une maladie sporadique, il ne s'agit d'une pathologie héréditaire que dans 5% des cas.

Les adénocarcinomes représentent plus de 90% des CCR (1).

Les 10% restants sont essentiellement représentés par les tumeurs neuroendocrines, les lymphomes B et les GIST (Gastro Intestinale Stromal Tumor).

Le CCR se développe le plus souvent sur un adénome préexistant après une période de latence de plusieurs années.

Les principaux facteurs exogènes identifiés à ce jour dans l'étiologie du CCR sont l'alimentation et le manque d'activité physique.

La cancérogénèse du CCR est de mieux en mieux comprise grâce aux nouvelles techniques de biologie moléculaire. Ainsi, grâce à une meilleure connaissance des altérations oncogéniques, la recherche a permis notamment de développer des nouvelles thérapeutiques ciblées de plus en plus efficaces et d'identifier aussi des facteurs prédictifs de résistance à certaines thérapies.

I. Généralités

A. Epidémiologie, incidence et mortalité

Dans le monde, en 2008, le CCR est le quatrième cancer le plus fréquent chez l'homme après le poumon, la prostate et l'estomac et le troisième chez la femme après le sein et le col utérin. On estime à 1,23 million le nombre de nouveaux cas de CCR (9,7% des cancers totaux) (2,3).

En Europe (27 pays), le CCR constitue le troisième cancer le plus fréquent chez l'homme et le deuxième chez la femme. Le taux d'incidence est de 40 pour 100 000 hommes et de 24,9 pour 100 000 femmes mais on note une variabilité importante de 15,4 en Grèce à 60,7 en Europe de l'Est (République Tchèque, Hongrie et Slovénie) pour 100 000 hommes et de 11,5 en Grèce à 35,2 pour 100 000 femmes au Danemark et en Norvège.

En France, en 2012, le CCR arrive en troisième position pour les deux sexes confondus, en terme d'incidence avec 42 152 cas après le cancer de la prostate avec 53 465 cas et le cancer du sein avec 48 763 cas (**Tableau 1**). Le taux d'incidence est de 38,4 pour 100 000 hommes et de 23,7 pour 100 000 femmes avec un rapport homme/femme de 1,5. Depuis plus de 20 ans, cette incidence est en constante augmentation, due en partie au vieillissement de la population (**Tableau 2**). L'incidence du CCR augmente significativement après l'âge de 50 ans. L'âge moyen au diagnostic est de 70 ans chez l'homme et de 73 ans chez la femme (2012) (**Tableau 3**).

En France, le CCR est la deuxième cause de décès par cancer avec 17 722 décès (9 275 hommes et 8 447 femmes en 2012) après le cancer du poumon (29 949 décès) (**Tableau 1**). Le taux de mortalité (standardisé monde) en 2012 est de 13,3 pour 100 000 hommes et de 7,9 pour les femmes (**Tableau 2**). Ces taux de mortalité sont légèrement en dessous de la moyenne de l'Union-Européenne. Les taux les plus élevés sont retrouvés dans les pays de l'Europe de l'Est.

Malgré un allongement de la survie globale de manière significative au cours de la dernière décennie, l'âge moyen de décès en 2012 est de 75 ans chez l'homme et de 79 ans chez la femme. La survie des patients diagnostiqués entre 1989 et 2004 est de 79% à 1 an (80% chez l'homme et 79% chez la femme), 56% à 5 ans (56% chez l'homme et 57% chez la femme) et 50% à 10 ans (48% chez l'homme et 52% chez la femme). La survie est corrélée au stade de la maladie au moment du diagnostic.

Localisations	Incidence		Mortalité	
	Effectif*	Contribution à l'ensemble des cancers (en %)	Effectif	Contribution à l'ensemble des cancers (en %)
Prostate*	53 465	15,0	8 876	6,0
Sein	48 763	13,7	11 886	8,0
Côlon-rectum	42 152	11,9	17 722	11,9
Poumons	39 495	11,1	29 949	20,2
Tous les cancers	355 534	100,0	148 378	100,0

Tableau 1 : Incidence et mortalité estimées des cancers (5 principales localisations) en France en 2012

* Compte tenu des fluctuations récentes de l'incidence du cancer de la prostate les résultats postérieurs à la dernière année observée par les registres (2009) ne sont pas présentés. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides, INCa 2013

Année	1980	1990	2000	2005	2010	2012
Incidence Homme	34,7	38,1	39,4	39,2	38,8	38,4
Incidence Femme	23	24,5	24,6	24,3	23,9	23,7
Mortalité Homme	19,9	18,2	16	14,9	13,8	13,3
Mortalité Femme	12,5	10,6	9,2	8,6	8,1	7,9

Tableau 2 : Taux d'incidence et de mortalité en France selon l'année.

Taux standardisé monde pour 100 000 personnes-année. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides, INCa 2013

Classe d'âge	Nb de nouveaux cas- Homme	Nb de nouveaux cas- Femme	Taux d'incidence spécifique- Homme*	Taux d'incidence spécifique- Femme*
0-14	3	7	0,1	0,1
15-19	5	10	0,3	0,5
20-24	14	21	0,7	1,1
25-29	31	39	1,6	2
30-34	62	71	3,1	3,5
35-39	117	129	5,8	6,4
40-44	244	258	11,2	11,7
45-49	512	487	23,7	21,8
50-54	1042	853	50,4	39,4
55-59	1909	1360	96,7	64,7
60-64	3120	1929	159,2	92,1
65-69	3530	1998	231,5	119,9
70-74	3339	2023	311,6	160,2
75-79	3524	2656	374,1	209,5
80-84	3182	3041	438,2	260,3
86-89	1876	2566	451,9	303,2
90-94	635	1225	411,8	297,7
95-++	81	253	327,2	226,6

Tableau 3 : Incidence (nombre de cas et taux d'incidence spécifique) du cancer colorectal par classe d'âge et par sexe en France en 2012

* Taux standardisé monde pour 100 000 personnes-année. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides, INCa 2013

B. Symptômes

Les CCR se développent le plus souvent de façon silencieuse, sans provoquer de symptômes particuliers, pouvant rester longtemps imperceptibles. Cependant, certains signes peuvent être révélateurs d'un cancer et doivent conduire à une consultation médicale tels que des troubles persistants ou soudains du transit intestinal (constipation soudaine, diarrhée qui se prolonge, augmentation du volume abdominal, tension au niveau du rectum ...), des saignements (selles recouvertes ou mêlées de sang) et des douleurs abdominales (douleurs fréquentes et constantes).

Au fur et à mesure que la tumeur grossit, ces symptômes peuvent s'aggraver et entraîner des complications telle qu'une occlusion intestinale ou une péritonite. En cas d'évolution de la maladie, il peut subvenir une altération de l'état de santé général (cachexie, asthénie, perte d'appétit ...).

C. Programme national de dépistage organisé du CCR

Le dépistage du CCR fait l'objet d'un programme national organisé par les pouvoirs publics. Tous les deux ans, les hommes et les femmes de 50 à 74 ans sont invités à réaliser un test de dépistage remis par leur médecin traitant. En l'absence de symptôme, il est établi qu'en faisant un test de recherche de sang occulte dans les selles tous les 2 ans entre 50 et 74 ans, suivi d'une coloscopie en cas de positivité, il est possible de diminuer de 15 à 20% la mortalité par CCR si la participation de la population atteint 50% (4-6).

Le test de dépistage est un test de recherche de sang occulte dans les selles qui est un test au gâiac (test Hemoccult II®). Il est réalisé au domicile par le patient qui effectue un prélèvement sur 3 selles consécutives de 2 petits fragments de la taille d'un grain de riz qu'il dépose sur une plaquette. Ces plaquettes sont envoyées au centre de lecture à l'aide de l'enveloppe préaffranchie fournie avec le test.

Dès 2007, 23 départements pilotes étaient engagés dans le programme de dépistage organisé du CCR. Fin 2010, 95 départements avaient invité au moins une fois la population cible à s'y soumettre. Sur la période 2010-2011, plus de 17 millions de personnes âgées de 50 à 74 ans ont été invitées à se faire dépister (Ensemble des territoires français à l'exception de Mayotte). Cinq millions d'entre elles ont réalisé le test, soit un taux de participation de 32.1% (34% chez les femmes et 30% chez les hommes). L'étude montre que les personnes de plus de 60 ans adhèrent davantage au programme que les individus jeunes.

Cette estimation est stable par rapport à l'année précédente, elle reste cependant inférieure aux recommandations européennes qui sont de 45% au minimum (**Tableau 4**).

	Ensemble	Femme	Homme
Données 2010-2011 sur l'ensemble des territoires français*	32,1 %	34,0 %	30,0 %
Données 2009-2010 sur 95 départements	33,8 %	36,5 %	31,4 %

Tableau 4: Evolution des taux de participation au dépistage organisé du cancer colorectal depuis 2009-2010 chez les 50-74 ans en France.

**A l'exception de Mayotte devenue département d'Outre-mer le 31 mars 2011, <http://lesdonnees.e-cancer.fr/>*

Les données de l'étude pilote de 2007 (22 départements) ont montré que le CCR a été détecté chez 3 289 personnes, soit un taux de 2,2 cancers pour 1 000 personnes dépistées. Parmi les 3 289 personnes atteintes d'un cancer, 1 933 cancers invasifs ont été détectés dont 42% étaient de stade I, 24% de stade II, 24% stade III et 10% étaient des cancers métastasés (7).

Selon les données de 2010-2011, le pourcentage de tests positifs est de 2,6% parmi les tests analysables. La Guyane (4,8%) et l'Eure (4%) sont les deux départements qui ont les taux positifs les plus élevés, tandis que les Pyrénées-Atlantiques et la Martinique présentent les taux de tests positifs les plus bas (1,7%). On constate que le taux de tests positifs est moins élevé dans les départements pilotes (2,4%) que dans les autres départements (2,7%). Ces résultats sont en faveur d'une diminution de la prévalence des lésions précancéreuses ou cancéreuses dans les départements impliqués depuis plusieurs années dans le dépistage.

D. Facteurs de risques exogènes

L'égalité devant le risque de cancer, quel qu'il soit, n'existe pas. L'alimentation joue très certainement un rôle important dans le développement du cancer du côlon notamment un apport calorique trop important sous forme de graisses animales et la présence d'une obésité (**Tableau 5**) (8). En revanche, on note un rôle protecteur par la consommation régulière de fibres (légumes, fruits, céréales) et par l'exercice physique régulier (**Tableau 6**) (9). Le tabac est un facteur d'apparition des adénomes (4) et l'alcool favoriserait leur augmentation de taille (7). Le risque d'être atteint d'un gros polype est dix fois plus élevé chez un sujet ayant fumé plus de 20 paquets/année et buvant plus de trois quart de litre de vin par jour.

	Pourcentage d'augmentation du risque de cancer colorectal*** par portion par jour	Taille de la portion
Viandes Rouges	29	100g
Charcuteries	21	50g

Tableau 5 : Estimation de l'augmentation du risque de cancer colorectal par portion de viandes rouges ou de charcuteries pour les relations jugées convaincantes (8)

* Dans le rapport on entend par viandes rouges les viandes de bœuf, veau, mouton, agneau, porc et chèvre.

** Le terme charcuteries désigne ici la catégorie des « processed meat » qui prend en compte toutes les viandes conservées par fumaison, séchage, salage, ou addition de conservateurs (y compris les viandes hachées si elles sont conservées chimiquement, corned beef...).

*** Significatif pour cette localisation. Une augmentation de risque de cancers de 29 % correspond à un risque relatif estimé à 1,29.

Type d'activité physique*	Pourcentage de diminution du risque de CCR pour les individus les plus actifs par rapport aux moins actifs**
Activité physique totale	23
Activité physique professionnelle	29
Activité physique de loisirs	18
Intensité de l'activité physique de loisirs	20

Tableau 6 : Estimation de la diminution du risque de cancer du côlon pour les individus les plus actifs par rapport aux moins actifs pour les relations jugées convaincantes (8)

*L'activité physique totale recouvre l'activité physique professionnelle (travail en exploitation agricole, manutention...), domestique (travaux ménagers, jardinage...), de loisir (jogging, danse...) et celle liée aux transports (à pied, à vélo...).

** Significatif pour cette localisation. Une diminution de risque de cancer du côlon de 23 % correspond à un risque relatif estimé à 0,77.

E. Détermination des groupes à risques

1. Niveau de risque moyen

Il concerne les personnes de la population générale de plus de 50 ans sans antécédent de CCR ou autres cancers favorisants.

2. Niveau de risque élevé

a. Sujets aux antécédents personnels d'adénome ou de CCR

Le risque de CCR chez les sujets atteints d'adénome dépend des caractéristiques de l'adénome initial.

Les sujets présentant un adénome avancé (taille > 10mm et/ou une composante villositaire > 25% et/ou une dysplasie de haut grade et/ou un carcinome *in situ*) ont un taux de récurrence d'adénome à 5 ans de 12,2%. Comparativement, les sujets ayant un adénome non avancé ont un taux de récurrence de 2,4% (10).

Ces sujets présentant un adénome avancé ont également un risque de CCR augmenté de 3,6 fois et de 6,6 fois si ces adénomes sont multiples. Comparativement, les sujets atteints d'un ou plusieurs adénomes de moins de 1cm ou d'adénomes tubuleux ont un risque de CCR de 0,5 (11).

Les sujets ayant un CCR ont un risque d'un nouveau CCR significativement plus élevé dans les 5 premières années suivant le traitement du CCR initial. Dans l'étude de Yun et al. portant sur 1 838 CCR, il a été montré que le risque de récurrence locale est de 8,5% (12).

b. Sujets aux antécédents familiaux d'adénome ou de CCR

Il existe un sur-risque de CCR dans la fratrie et chez les enfants d'une personne ayant eu un adénome avancé. Ce sur-risque est probablement proche du sur-risque de CCR lorsqu'il y a un antécédent familial de CCR.

Chez un homme ou une femme ayant un antécédent familial de CCR, le risque de développer un CCR dépend du nombre de parents touchés, de l'âge du ou des cas index et du degré de parenté avec ce ou ces derniers (13):

- 2,5 si un seul parent au 1^{er} degré a eu un CCR.
- 4,25 si plusieurs parents ont un CCR.
- 3,87 si le CCR du parent a été diagnostiqué avant l'âge de 45 ans.
- 2,25 si le CCR du parent a été diagnostiqué entre 45 et 59 ans.

c. Sujets aux antécédents de maladie inflammatoire chronique de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces maladies touchent environ une personne sur mille à un âge compris entre 20 et 30 ans (incidence de 5 cas/100 000 habitants/an).

Dans la maladie de Crohn, l'augmentation du risque de CCR est observée après 7 à 10 ans d'évolution, notamment en cas d'atteinte colique au-delà du sigmoïde. Le risque de CCR varie avec l'âge de début de la maladie de Crohn avec une augmentation du risque de 3% si la maladie débute à 30 ans et de 10% si elle débute à 45 ans (13).

Dans le cas de la rectocolite hémorragique, l'augmentation du risque de CCR est observée après 7 à 10 ans d'évolution. Il est estimé à 2% après 10 ans, 8% après 20 ans et 18% après 30 ans. A durée égale, le risque de CCR est d'autant plus élevé que la maladie commence jeune (13).

d. Sujets atteints d'acromégalie

Chez un sujet atteint d'acromégalie, le risque d'adénome et de CCR est multiplié par 2 à 3 (13).

3. Niveau de risque très élevé

Le CCR est le plus souvent une maladie sporadique, il ne s'agit d'une pathologie héréditaire que dans 5% des cas. Le niveau de risque très élevé se définit par le risque qu'un sujet appartenant à une famille atteinte de cancers héréditaires développe un CCR. L'importance est d'identifier ces familles atteintes de cancers héréditaires afin d'organiser une consultation d'oncogénétique pour dépister et prendre en charge ces sujets à risque très élevé.

Les deux principales maladies sont le syndrome de Lynch/Hereditary non polyposis colorectal cancer (HNPCC) et la polypose adénomateuse familiale (PAF).

a. Le syndrome de Lynch

Le syndrome de Lynch est la forme la plus fréquente des CCR héréditaires. Sa transmission est autosomique dominante avec une pénétrance incomplète (70%). Ce syndrome se caractérise par une mutation germinale d'un gène appartenant à la famille DNA mismatch repair ou MMR. Ces gènes codent pour des protéines de réparation des mésappariements de réplication de l'ADN. Les gènes concernés sont hMLH1, hMSH2, hMSH6, PMS2. L'inactivation de ces gènes conduit à un phénotype particulier appelé instabilité des microsatellites (micro satellite instability (MSI)) présent dans les cellules tumorales, détecté par génotypage de l'ADN.

Les sujets atteints d'un syndrome de Lynch ont un risque augmenté de développer un CCR à un âge jeune (< 45 ans, 42 ans chez les hommes et 47 ans chez les femmes) (14), mais également un CCR synchrone et métachrone. Ils sont également plus à risque de développer d'autres cancers : cancer de l'endomètre, ovaire, intestin grêle, uretère ou cavités excrétrices rénales.

L'étude de Bonadona et al. a montré un risque cumulé de CCR à 70 ans chez les sujets atteints d'un syndrome de Lynch avec une mutation de MLH1 de 41%, de MSH2 de 48% et de MSH6 de 12%. Concernant le cancer de l'endomètre le risque est de 54% pour MLH1, 21% MSH2 et de 16% pour MSH6 selon la même étude. Les sujets ayant une mutation hMLH1 ou hMSH2 ont un risque plus élevé de cancer que les sujets MSH6 muté (15). L'étude de Stoffel et al., menée sur 147 familles ayant un syndrome de Lynch, a quant à elle montré un risque cumulé de CCR de 66,1% chez l'homme et de 42,7% chez la femme. Le risque cumulé de cancer de l'endomètre était de 39,4%. Chez les femmes, le risque cumulé de CCR et de cancer de l'endomètre était de 73,4% (9).

Une autre étude a montré que le risque de CCR chez les sujets ayant un syndrome de Lynch serait de 80% et le risque de cancer rectal métachrone 12 ans après colectomie serait de 12% (13).

Le contexte familial a fait émerger des critères cliniques du syndrome de Lynch qui sont les critères d'Amsterdam et de Bethesda. Les critères d'Amsterdam définis en 1991 et modifiés en 1999, sont des critères très sélectifs, utiles pour réaliser des études épidémiologiques du syndrome. Ceux de Bethesda, révisés en 2004, sont beaucoup moins sélectifs permettant de détecter beaucoup plus de familles à risque, mais avec une perte de spécificité importante. (16–18) :

Critères d'Amsterdam (tous les critères doivent être présents) :

- Au moins 3 apparentés avec un CCR ou un cancer du spectre étroit du syndrome de Lynch (Cancer CCR, de l'endomètre, de l'intestin grêle, de l'uretère et du bassin)
- Au moins un des cas est apparenté au premier degré des deux autres
- Au moins deux générations successives sont affectées
- Au moins un des cas est diagnostiqué avant 50 ans
- Le diagnostic de PAF doit être exclu
- Les diagnostics doivent être vérifiés par un examen histopathologique

Critères de Bethesda (au moins 1 critère doit être présent) :

- Patient ayant un CCR diagnostiqué avant 50 ans
- Patient avec deux cancers synchrones ou métachrones appartenant au spectre large du syndrome de Lynch (CCR, de l'endomètre, de l'estomac, de l'ovaire, du pancréas, de l'uretère et du bassinet, des voies biliaires, tumeurs sébacées et intestin grêle) quel que soit l'âge
- Patient avec un CCR avec un phénotype MSI-H diagnostiqué avant 50 ans
- 2 cancers du spectre large du syndrome de Lynch chez 2 apparentés au 1^{er} degré dont l'un à moins de 50 ans
- 3 cancers du spectre large du syndrome de Lynch chez 3 apparentés au 1^{er} ou 2^{ème} degré quel que soit l'âge

b. La polypose adénomateuse familiale

La PAF est une pathologie héréditaire à transmission autosomique dominante et pénétrance complète. Dans 20 à 30% des cas, cette affection survient *de novo*. Elle représente 1% des CCR. Cette maladie se caractérise par une mutation germinale délétère du gène APC (anaphase promoting complex) situé sur le bras long du chromosome 5. La position des mutations sur le gène conditionne la gravité de certaines manifestations de la maladie. Cette affection se caractérise par le développement précoce (puberté) de nombreux adénomes coliques (>100) d'évolution rapidement défavorable. Elle est associée à un risque augmenté d'adénomes duodénaux, de l'ampoule de Vater, de tumeurs desmoïdes, de polypes glandulo-kystique gastriques, d'hypertrophie congénitale de l'épithélium pigmentaire rétinien.

Les sujets qui sont suspectés d'avoir une PAF doivent bénéficier d'une consultation d'oncogénétique dès le plus jeune âge. Il s'agit des sujets ayant plus de 10 adénomes synchrones ou plus de 5 adénomes et des antécédents familiaux d'adénomes au 1^{er} degré ou chez un apparenté de moins de 60 ans.

Les sujets atteints de la PAF ont une colectomie totale préventive (coloprotectomie) vers l'âge de 20 ans, car en l'absence de traitement le risque de CCR est de 100%. Le risque cumulé de cancer sur le rectum restant après colectomie est compris entre 5 et 10% à 50 ans et entre 14 et 30% à 60 ans.

Il existe deux autres formes de polypose adénomateuse familiale dites atténuées car la majorité des sujets atteints de ces formes atténuées ont moins de 100 adénomes coliques. La première forme est une maladie autosomique récessive. Il s'agit d'une mutation germinale bi-allélique du gène *MUTYH* qui est un gène de réparation de l'ADN. La seconde forme est une mutation du gène *APC* sur une localisation différente de la PAF.

c. Le syndrome de Peutz-Jeghers

Il s'agit d'une polypose hamartomateuse de l'ensemble du tube digestif qui s'accompagne d'une lentiginose labiale de la muqueuse buccale, de la sphère anale et des doigts. C'est une affection rare, et sa prévalence est probablement inférieure à 1 sur 50 000. Il confère un risque de CCR, de tumeurs de l'ovaire (cellules de la granulosa), du testicule (cellules de Sertoli), du col utérin et du pancréas. Un gène a été mis en cause *STK11* (Sérine-Thréonine Kinase 11) /*LKB1* (Liver kinase B1).

d. La polypose juvénile

La polypose juvénile est une polypose hamartomateuse rare caractérisée par la présence de polypes hamartomateux dans le tractus digestif. La polypose juvénile est transmise selon un mode autosomique dominant et est associée à des mutations des gènes *SMAD 4* (Mothers against decapentaplegic homolog 4) et *BMPRIA* (Bone morphogenetic protein receptor, type IA). Le risque cumulé de développer une tumeur est de 20 % à 35 ans et de 68 % après l'âge de 60 ans.

e. La polypose hyperplasique

Il s'agit d'une entité rare définie dans la classification OMS par la présence d'au moins 5 polypes hyperplasiques dans le côlon proximal, 2 d'entre eux mesurant plus de 10 mm de diamètre ou d'un nombre quelconque de polypes hyperplasiques dans le colon proximal, chez un patient ayant un parent au 1^{er} degré porteur d'une polypose hyperplasique ou plus de 30 polypes hyperplasiques quelle que soit leur taille et répartis sur l'ensemble du côlon. Moins d'une centaine d'observations de polyposes hyperplasiques ont été rapportées à ce jour dans la littérature avec une égale fréquence chez les hommes et les femmes, les lésions étant découvertes à un âge moyen de 50 ans. Environ 40 à 50% des sujets ont un adénocarcinome du côlon associé (15).

Certains auteurs différencient 2 variétés :

- Le Type I caractérisé par la présence de multiples adénomes festonnés sessiles (plus de 5, au niveau du côlon proximal, associés ou non à des adénomes festonnés traditionnels, de polypes mixtes ou des adénomes classiques). Dans cette entité, les polypes festonnés présenteraient un phénotype CIMP (CpG island methylator phenotype) avec des mutations de BRAF (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B). La muqueuse colique normale à distance présenterait également des anomalies de méthylation.

- Le Type II caractérisé par la présence de plus d'une trentaine de polypes hyperplasiques, de petite taille et répartis sur l'ensemble du cadre colique, avec un risque de dégénérescence moindre.

II. Anatomopathologie

Les adénocarcinomes représentent plus de 90% des CCR (1). Ils compliquent un adénome dans 60 à 80% des cas.

A. Lésions pré néoplasiques

1. Foyers de cryptes aberrantes

Les foyers de cryptes aberrantes (FCA) sont des lésions microscopiques de la muqueuse mise en évidence par la chromoendoscopie à l'aide du bleu de méthylène montrant un aspect élargi des cryptes avec une augmentation de l'espace inter cryptique. La classification morphologique des FCA est histologique, différenciant les FCA hyperplasiques et dysplasiques définis par stratification des noyaux, une présence de mitoses dans les deux tiers supérieurs des cryptes et une raréfaction des cellules caliciformes. La densité des FCA est augmentée au niveau du côlon gauche de patients atteints de CCR et dans les pièces opératoires de patients atteints de PAF. Les FCA dysplasiques sont plus fréquents chez les patients atteints de PAF, ou en dehors de cette pathologie au niveau du côlon droit par rapport au côlon gauche. Le nombre de FCA est augmenté dans les formes dysplasiques ou dans les FCA de patients atteints de CCR par rapport à ceux atteints de polyadénomes. Les mutations somatiques du gène *APC* sont constantes dans les FCA de patients atteints de PAF et absente dans les autres cas. Une mutation somatique du gène *KRAS* (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) est présente dans 75% des FCA de patients atteints ou non de PAF, la mutation *KRAS* est d'autant plus fréquente que les FCA ne sont pas dysplasiques. L'expression de la β -caténine au niveau nucléaire ou cytoplasmique est augmentée dans les FCA dysplasiques par rapport aux FDA hyperplasiques. Le nombre de FCA dans le côlon gauche augmente avec l'âge. Les FCA sont plus fréquentes quelque soit l'âge chez les patients atteints de CCR ou de polypes adénomateux par rapport à ceux indemnes de pathologie colique. La fréquence des FCA dysplasiques est augmentée chez les patients atteints de CCR ou de polyadénome.

2. L'adénome

L'adénome est une tumeur épithéliale bénigne avec ou sans dysplasie, il en existe 5 types histologiques. A part de ces adénomes, le polype hyperplasique quand il est unique, de petite taille (<1 cm) et situé au niveau du côlon gauche ne dégénère pas. Cependant quand ce dernier rentre dans le cadre de la polypose hyperplasique (entité rare), il peut subir une transformation maligne.

a. Polype hyperplasique

Le polype hyperplasique siège le plus souvent au niveau du colon gauche (95% des cas), notamment au niveau du recto-sigmoïde. Il se présente généralement sous la forme de lésions sessiles ou polypoïdes (mesurant moins de 5 mm).

En histologie, c'est une lésion saillante avec une architecture festonnée, prédominant aux 2/3 supérieurs des cryptes. Les cryptes sont bordées de cellules hypersécrétantes ou éosinophiles et de cellules caliciformes en nombre variable. Les noyaux sont disposés à la partie basale des cellules, sans atypie notable. L'activité mitotique est minime, limitée aux cellules de la partie basale des cryptes.

A leur partie basale, les cryptes sont rectilignes et étroites, bordées de cellules régénératives au cytoplasme plus basophile. Il existe d'assez nombreuses cellules endocrines à la partie basale des cryptes. Des dépôts collagènes épais sont souvent présents sous la membrane basale, à la partie superficielle des polypes hyperplasiques (15).

b. Adénome festonné sessile

L'adénome festonné sessile se trouve le plus souvent au niveau du côlon droit, mais peut être diagnostiqué au niveau du côlon gauche. Il se présente habituellement sous la forme de lésions sessiles, souvent d'assez grande taille (en moyenne 10 mm).

En histologie, l'adénome festonné sessile se présente sous la forme d'une lésion saillante avec une architecture festonnée intéressant toute la hauteur des cryptes. Les glandes sont parfois ramifiées et souvent dilatées à la partie basale, tendant à se disposer en L ou en T inversé par rapport à la musculaire muqueuse (MM). Il peut parfois exister une hernie localisée, une extrusion de glandes groupées en lobules à travers la MM, réalisant des aspects de « polype hyperplasique inversé ». A la partie basale, les glandes sont bordées de cellules matures sécrétantes et éosinophiles avec quelques cellules caliciformes et des cellules de type

fovéolaire gastrique. Les noyaux sont disposés à la partie basale des cellules avec parfois une discrète pseudo stratification. Le noyau est souvent augmenté de volume avec une chromatine vésiculeuse et comporte fréquemment un nucléole proéminent. Les mitoses sont rares mais peuvent être visibles jusqu'à la partie superficielle de la lésion. Les cellules régénératives sont absentes ou seulement présentes sur une partie des cryptes. Les cellules endocrines sont rares voire absentes. Les dépôts de collagène sous la membrane basale sont habituellement absents ou peu marqués. La sous-muqueuse en regard comporte souvent des foyers de métaplasie adipeuse (15).

c. Adénome festonné traditionnel

L'adénome festonné traditionnel est la variante la plus rare des polypes festonnés. L'adénome festonné traditionnel siège le plus souvent au niveau du côlon gauche et se présente sous la forme d'une lésion polypoïde villeuse.

En histologie, l'architecture festonnée est particulièrement marquée, intéressant toute la hauteur des cryptes. Les glandes ne sont pas dilatées à leur partie basale, mais peuvent présenter, par place, des modifications architecturales avec des bifurcations et des aspects polyadénoïdes, réalisant ainsi des lésions de néoplasie intra-épithéliale (NIE).

A la différence des adénomes festonnés sessiles, il existe à la périphérie des cryptes, des petits bourgeonnements correspondant à des petites formations cryptiques ectopiques.

Les cryptes sont bordées de cellules au cytoplasme très éosinophile. Les noyaux sont souvent pseudostratifiés. Ils sont augmentés de volume, hyperchromatiques ou avec une chromatine vésiculeuse et comportent souvent un nucléole «proéminent». Les mitoses sont présentes sur toute la hauteur de la lésion. Les dépôts de collagène sous la membrane basale sont habituellement absents (15).

Les critères morphologiques du polype hyperplasique, de l'adénome festonné sessile et de l'adénome festonné traditionnel sont résumés dans le **Tableau 7**.

d. Polype mixte

Le polype mixte est une tumeur rare associant un contingent festonné à type de polype hyperplasique ou d'adénome festonné sessile, et un contingent adénomateux plus classique, d'architecture tubuleuse ou tubulo-villeuse, avec des glandes bordées de cellules cylindriques au cytoplasme basophile, aux noyaux augmentés de volume, atypiques, pseudostratifiés, avec

une augmentation de l'activité mitotique. Certains de ces polypes mixtes correspondent à des tumeurs de collision entre un polype hyperplasique et un adénome dysplasique classique. Les autres correspondraient au développement de lésions dysplasiques « classiques » au sein d'un polype festonné, notamment un adénome festonné sessile (15).

	Polype hyperplasique	Adénome festonné sessile	Adénome festonné traditionnel
Localisation	Côlon gauche	Côlon droit> côlon gauche	Côlon gauche> côlon droit
Taille	< 5 mm	Moyenne 10 mm	Moyenne 10 mm
Architecture festonnée	Moitié supérieure des cryptes	Focalement, toute la hauteur des cryptes	Très marquée toute la hauteur des cryptes
Dilatations glandulaires avec aspect en L ou en T inversé	Absentes	Présentes	Absentes
Formations cryptiques ectopiques	Absentes	Absentes	Présentes
Cellules	Cylindriques au cytoplasme éosinophile, nombreuses cellules caliciformes	Cylindriques au cytoplasme éosinophile, cellules caliciformes	Cylindriques au cytoplasme éosinophile, noyau volumineux à chromatine vésiculeuse ou hyperchromatique
Mitoses	1/3 inférieur des cryptes	Eparses, parfois moitié supérieure des cryptes	Nombreuses, toute la hauteur des cryptes jusqu'au 1/3 supérieur de la lésion
Dysplasie	Absents	Possibles	Présents
Dépôts de collagène sous la basale	Souvent	Parfois	Habituellement absents
Mutations	BRAF>KRAS	BRAF+++	KRAS

Tableau 7 : Critères morphologiques pour le diagnostic différentiel de polypes festonnés (15)

e. Adénome tubuleux

L'adénome tubuleux est le plus fréquent des adénomes, il représente entre 68 et 87% des adénomes. Il s'agit d'une prolifération épithéliale de type glandulaire. Les cellules sont dédifférenciées, avec un noyau augmenté de volume, hyperchromatique, avec une anisocaryose variable et un cytoplasme basophile. La mucosécrétion est diminuée. La prolifération épithéliale se fait de la surface vers la profondeur. Il contient plus de 80% de composante tubuleuse. Il peut être en dysplasie de bas grade ou de haut grade (19–21).

f. Adénome vilieux

L'adénome vilieux est une lésion dite «en doigts de gants » faite d'axes conjonctifs non ramifiés entre eux bordés par un épithélium dysplasique. La prolifération s'étend de la musculaire muqueuse vers la lumière colique. Un adénome vilieux est défini par une composante vilieuse > 80% (13).

g. Adénome tubulo-vilieux

L'adénome tubulo-vilieux associe un contingent tubuleux et un contingent vilieux. Le contingent vilieux est compris entre 20 et 79% (13). Les travaux de Fung et Goldman estiment que la composante vilieuse est présente dans 35 à 75% des adénomes mesurant plus de 1 cm de grand axe (22).

B. Définition de la dysplasie

Dans les lésions dysplasiques, on observe une rupture de la balance prolifération-différenciation. Dans une cellule normale, l'arrêt de la prolifération est nécessaire à l'initiation du processus de différenciation dite terminale, celui au cours duquel la cellule acquiert ses caractéristiques structurales et fonctionnelles terminales. Dans les lésions dysplasiques, l'expansion du compartiment prolifératif et l'augmentation du nombre de cellules proliférantes entraînent l'apparition de troubles de la maturation et de la différenciation cellulaire. Dans un épithélium normal, les cellules en excès ou parvenues en fin de vie sont éliminées par apoptose. Dans les lésions dysplasiques, la perte de sensibilité à l'apoptose des cellules néoplasiques permet l'augmentation du nombre total de cellules ce qui entraîne la restructuration de l'épithélium et l'apparition de troubles architecturaux (23).

En 2000, l'étude de Schlemper et al. explicite une nouvelle terminologie des dysplasies avec la classification de Vienne (24), cette classification a été modifiée en 2002 par Dixon (25). Elle est présentée dans le **Tableau 8**.

La néoplasie intra-épithéliale de bas grade (NIEBG) regroupe l'ancienne dysplasie légère et modérée :

- Persistance d'une mucosécrétion qui est diminuée
- Pseudostratification des noyaux jusqu'au ¾ de l'épithélium
- Pléomorphisme nucléaire peu marqué

La néoplasie intra-épithéliale de haut grade (NIEHG) ou carcinome in situ (CIS) :

- Perte de la mucosécrétion
- Pseudostratification sur toute la hauteur de l'épithélium
- Pléomorphisme nucléaire marqué

Carcinome intra-muqueux :

NIEHG avec invasion de la lamina propria sans ou avec invasion de la MM mais sans invasion de la sous-muqueuse.

Catégorie	Diagnostic
1	Pas de néoplasie
2	Indéfini pour la néoplasie
3	Néoplasie de bas grade
4	Néoplasie de haut grade 4.1 dysplasie de haut grade 4.2 carcinome in situ (non invasif) 4.3 suspicion de carcinome intra-muqueux 4.4 carcinome intra-muqueux
5	carcinome infiltrant la sous-muqueuse

Tableau 8 : Classification de Vienne modifiée en 2002 (25)

C. Adénocarcinome

L'adénocarcinome a une croissance endoluminale circonférentielle exophytique, bourgeonnante souvent accompagnée d'une ulcération et infiltre la paroi colique pouvant aller jusqu'à la séreuse. La plupart des adénocarcinomes a un aspect relativement homogène bien que des zones de nécrose puissent se voir. La tumeur se propage par extension transmurale, par contiguïté, par voie lymphatique et sanguine.

Il s'agit d'une prolifération tumorale glandulaire plus ou moins bien différenciée, infiltrante (**Tableau 9**). Les glandes sont bordées par des cellules cylindriques au noyau augmenté de volume, hyperchromatique avec un rapport nucléo-cytoplasmique augmenté, une anisocaryose variable. La mucosécrétion est le plus souvent diminuée voire absente.

Grade histo-pronostique	% de la tumeur ayant une architecture glandulaire
Adénocarcinome bien différencié	plus de 95% de la tumeur est d'architecture glandulaire
Adénocarcinome moyennement différencié	50à 95% de la tumeur est d'architecture glandulaire
Adénocarcinome peu différencié	moins de 49% de la tumeur est d'architecture glandulaire

Tableau 9 : Grade histo-pronostique des adénocarcinomes

La caractéristique principale du CCR est le dépassement de la musculaire muqueuse et l'invasion de la sous muqueuse. Plus de 90% des CCR sont des adénocarcinomes (2). Les lésions avec les caractéristiques morphologiques de l'adénocarcinome qui sont limitées à la muqueuse sans invasion de la sous-muqueuse par dépassement de la musculaire muqueuse n'ont pratiquement aucun risque de métastase. Ces lésions sont guéries quand elles sont retirées en totalité. Les termes de NIEHG et de carcinome intra-muqueux sont souvent utilisés pour éviter des sur-traitements inappropriés.

Il existe plusieurs entités d'adénocarcinome en dehors de la forme classique d'adénocarcinome lieberkühnien :

- L'adénocarcinome mucineux : cette désignation est utilisée si plus de 50% de la lésion est composée de mucine. Il s'agit de plage de mucine au sein desquelles flottent des structures acineuses carcinomateuses ou des groupes de cellules carcinomateuses ou des cellules isolées carcinomateuses. Dans ce type histopathologique, il est plus fréquemment retrouvé une instabilité des microsattellites par rapport aux autres formes.

- Le carcinome à cellules indépendantes se définit par la présence de plus de 50% de cellules tumorales indépendantes. Ces cellules sont dites en bague à chaton car le noyau est refoulé en périphérie par une vacuole de mucine intra-cytoplasmique.

- Le carcinome adénosquameux présente les caractéristiques à la fois du carcinome épidermoïde et de l'adénocarcinome soit avec des zones distinctes, soit mélangées. Il faut plus que des foyers de différenciation malpighienne pour être classé en carcinome adénosquameux. Il s'agit d'une entité très rare dans le colon et le rectum (26).

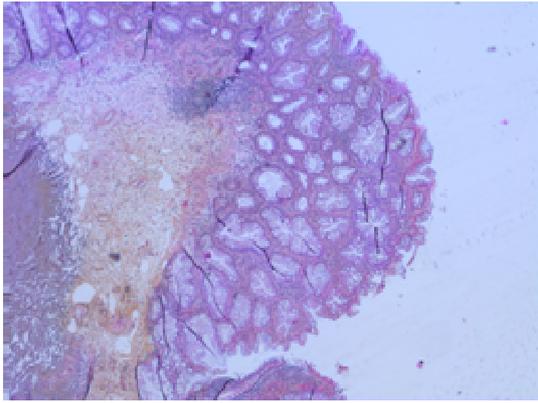
- Le carcinome médullaire est une variante rare, caractérisée par des cellules malignes au noyau vésiculaire avec un nucléole proéminent et un cytoplasme éosinophile.

Il est retrouvé dans ces tumeurs la présence d'une importante infiltration par des lymphocytes intra-épithéliaux (27).

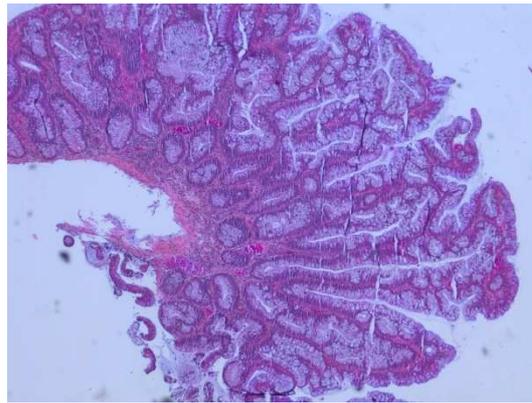
- Le carcinome indifférencié est une tumeur épithéliale rare sans différenciation morphologique. En dépit de son apparence indifférenciée, c'est une entité génétiquement distincte et généralement associée à MSI-H (28).

Les CCR sont en grande majorité négatifs pour la cytokératine 7 et positifs pour la cytokératine 20 en immunohistochimie. Ils expriment également le facteur de transcription CDX2 (caudal type homeobox 2).

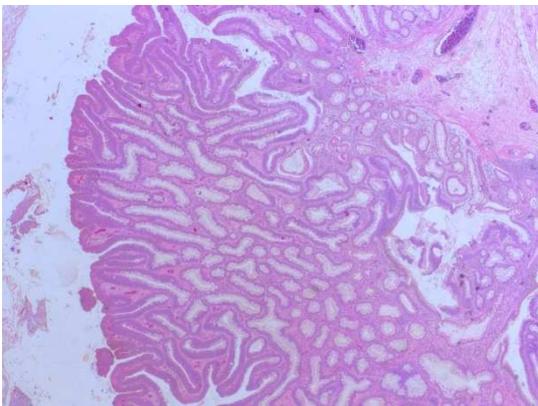
La **Figure 1** illustre certaines caractéristiques histologiques des adénomes et des CCR.



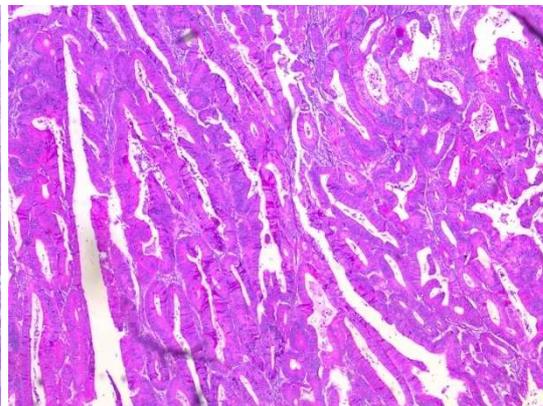
Adénome/polype festonné sessile sans dysplasie



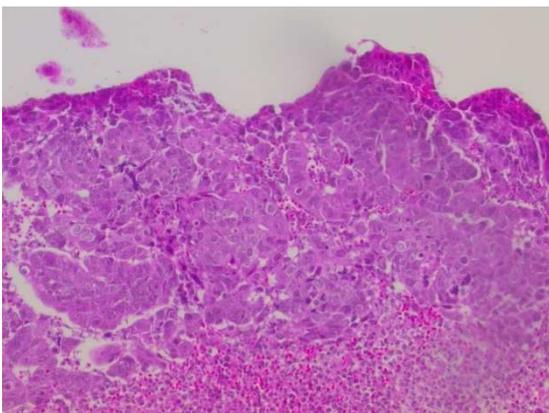
Adénome festonné traditionnel NIEBG



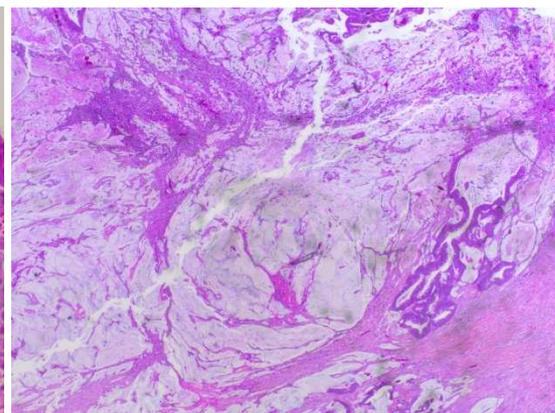
Adénome tubuleux NIEHG



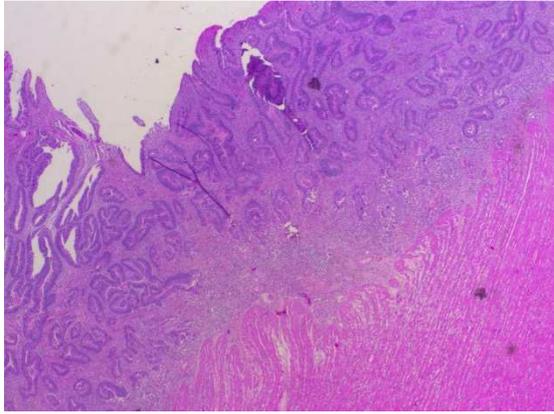
Adénocarcinome bien différencié



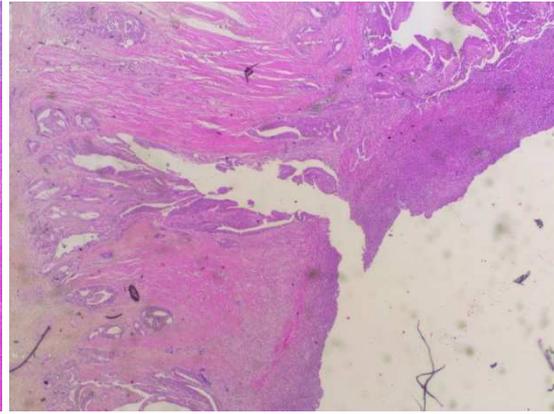
Adénocarcinome peu différencié



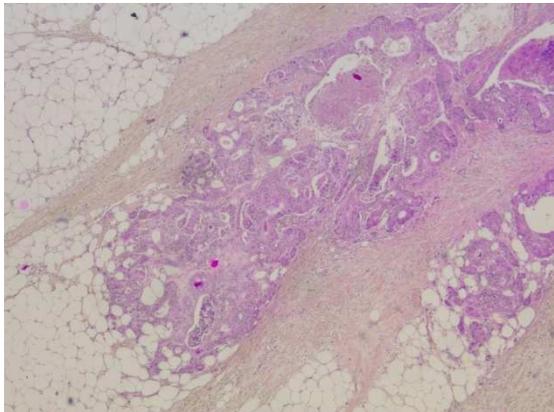
Adénocarcinome mucineux



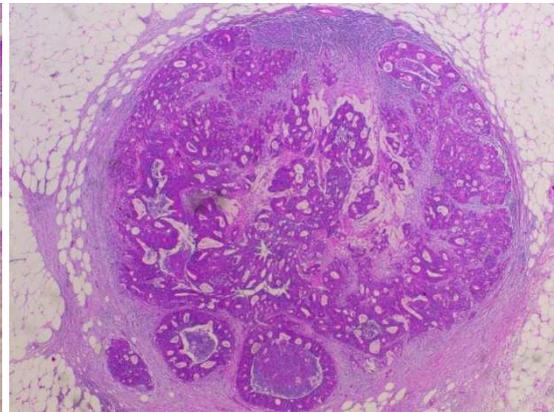
Infiltration de la sous muqueuse pT1



Infiltration de la musculature pT2



Infiltration de la sous séreuse pT3



Métastase ganglionnaire N+ avec rupture capsulaire

Figure 1 : Caractéristiques histologiques d'adénomes coliques, différenciation et infiltration trans pariétale et ganglionnaire de CCR

D. Classification pTNM des carcinomes colorectaux (AJCC, 7ème édition 2009)

La classification histopronostique TNM, pour « Tumor, Nodes, Metastasis » en anglais soit « tumeur, ganglions lymphatiques, métastases » distingue de façon indépendante 5 niveaux d'envahissement pariétal (T), trois degrés d'extension ganglionnaire (N) et la présence ou non de métastases (M). Ces trois critères c'est-à-dire la profondeur d'infiltration de la tumeur, atteinte ou non des ganglions lymphatiques et le nombre de ganglions atteints ainsi que la présence ou non de métastases permettent de définir le stade du cancer selon la classification pTNM (**Tableau 10**). La définition des catégories T, N et M repose sur l'examen clinique, l'imagerie, l'endoscopie et/ou l'exploration chirurgicale.

Tumeur Primitive

pTx : Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive

pT0 : Pas de signe de tumeur primitive

pTis : Carcinome *in situ* : intra-épithélial ou intra-muqueux

pT1 : Tumeur infiltrant la sous-muqueuse

pT2 : Tumeur infiltrant la musculuse

pT3 : Tumeur infiltrant la sous-séreuse

pT4a : Tumeur infiltrant le péritoine viscéral

pT4b : Tumeur envahissant directement ou adhérent les autres organes ou structures de voisinage

Ganglions régionaux (N)

pNx : Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales

pN0 : Absence de métastase ganglionnaire régionale

pN1a : Métastase dans 1 ganglion lymphatique régional

pN1b : Métastase dans 2 à 3 ganglions lymphatiques régionaux

pN1c : Dépôts tumoraux dans la sous séreuse, le mésentère ou les tissus péricolique ou périrectal non péritonéalisés sans ganglion lymphatique régional métastatique

pN2a : Métastase dans 4 à 6 ganglions lymphatiques régionaux

pN2b : Métastase dans 7 ou plus ganglions lymphatiques régionaux

Métastases

pM0 : Absence de métastase à distance

pM1a : Métastase localisée à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s), autre que régional

pM1b : Métastase dans plus d'un organe/site ou atteinte péritonéale

Tableau 10 : Classification pTNM des CCR selon la 7ème version (29)

Le stade des CCR au moment du diagnostic est généralement exprimé par un chiffre romain allant de 0 à IV. Ces 5 stades sont décrits ci-dessous et sont illustrés dans la **Figure 2**. La signification de ces cinq stades est expliquée ci-dessous :

-Stade 0 : la tumeur est *in situ*, ce qui signifie qu'elle est très superficielle et qu'elle n'envahit pas la sous-muqueuse, que les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints et qu'il n'y a pas de métastase à distance (Tis, N0, M0).

- Stade I : la tumeur envahit la deuxième couche (sous-muqueuse) ou la couche musculaire (musculeuse) de la paroi du côlon ou du rectum, les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints et il n'y a pas de métastase à distance (T1, T2, N0, M0).

- Stade II : la tumeur atteint la sous séreuse ou le péritoine viscéral ou une structure/organe de voisinage, mais aucun ganglion n'est atteint et il n'y a pas de métastase (T3, T4, N0, M0).

- Stade III : les cellules cancéreuses ont envahi les ganglions lymphatiques proches de la tumeur (T variable, N1, N2, M0).

- Stade IV : le cancer s'est propagé au-delà du côlon ou du rectum, il atteint le péritoine ou des organes éloignés, généralement le foie ou les poumons (T variable, N variable, M1)

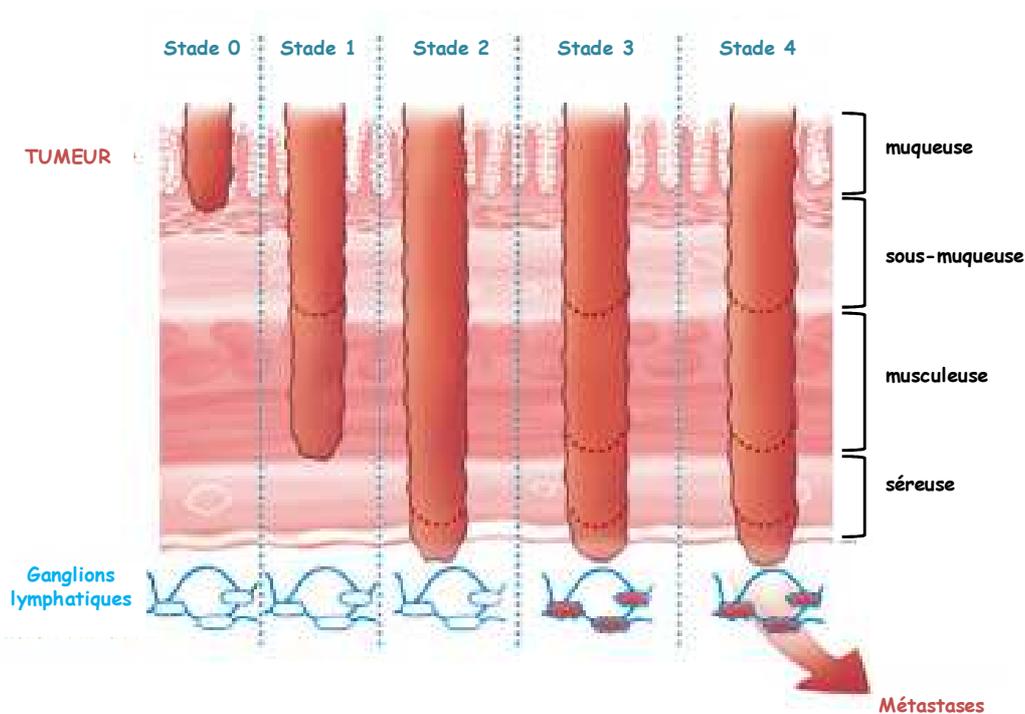


Figure 2 : Stade du Cancer Colorectal
<http://www.e-cancer.fr/>

III. Carcinogénèse et mécanismes

Ces deux dernières décennies, les progrès de la biologie moléculaire ont mis en évidence un certain nombre de mécanismes de la cancérogénèse. L'objectif principal est la prise en charge optimale du patient notamment grâce à l'identification des altérations moléculaires dont certaines permettent de prévoir une réponse au traitement. Une quinzaine de gènes identifiés dans les formes sporadique et familiale sont impliqués dans la carcinogénèse du CCR.

La carcinogénèse colorectale a été la première à être décrite, par Fearon et Vogelstein, comme étant un modèle d'oncogénèse par étape. Le Pr. Vogelstein est un pionnier dans le domaine de la génomique du cancer, ses études sur le CCR ont révélé qu'il résulte de l'accumulation séquentielle de mutations oncogènes et de mutations des gènes suppresseurs de tumeurs.

Vogelstein et al. (30), ont proposé en 1990 un modèle de développement des cancers colorectaux sporadiques en plusieurs étapes. Ils ont établi la notion « Séquence adénome cancer » sous l'action d'anomalies génétiques chronologiquement déterminées (**Figure 3**).

Les voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'oncogénèse colique sont les voies Wnt (Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site)/ β -caténine, TGF β (Transforming growth factor beta), p53 et RAS. Dans bon nombre de CCR, c'est la voie Wnt/ β -caténine (étape initiatrice) qui est à l'origine de cette longue marche vers le cancer (l'ensemble de ces événements peut mettre entre dix et vingt ans avant d'aboutir à un cancer véritable). Certains sont des gènes suppresseurs de tumeur, comme le gène *p53*, ils ont une fonction inhibitrice dans la prolifération cellulaire et donc inhibent le développement des tumeurs. D'autres gènes sont impliqués dans la réparation comme *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* (Postmeiotic Segregation Increased 2). Des mutations au sein des gènes suppresseurs de tumeurs entraînent une perte de fonction de ces gènes. D'autres sont oncogènes, ces gènes codent pour des protéines qui ont une fonction de stimulation de la prolifération cellulaire, par exemple les gènes *β -caténine* et *KRAS*. Leur mutation confère un gain de fonction et entraîne une activation de la prolifération.

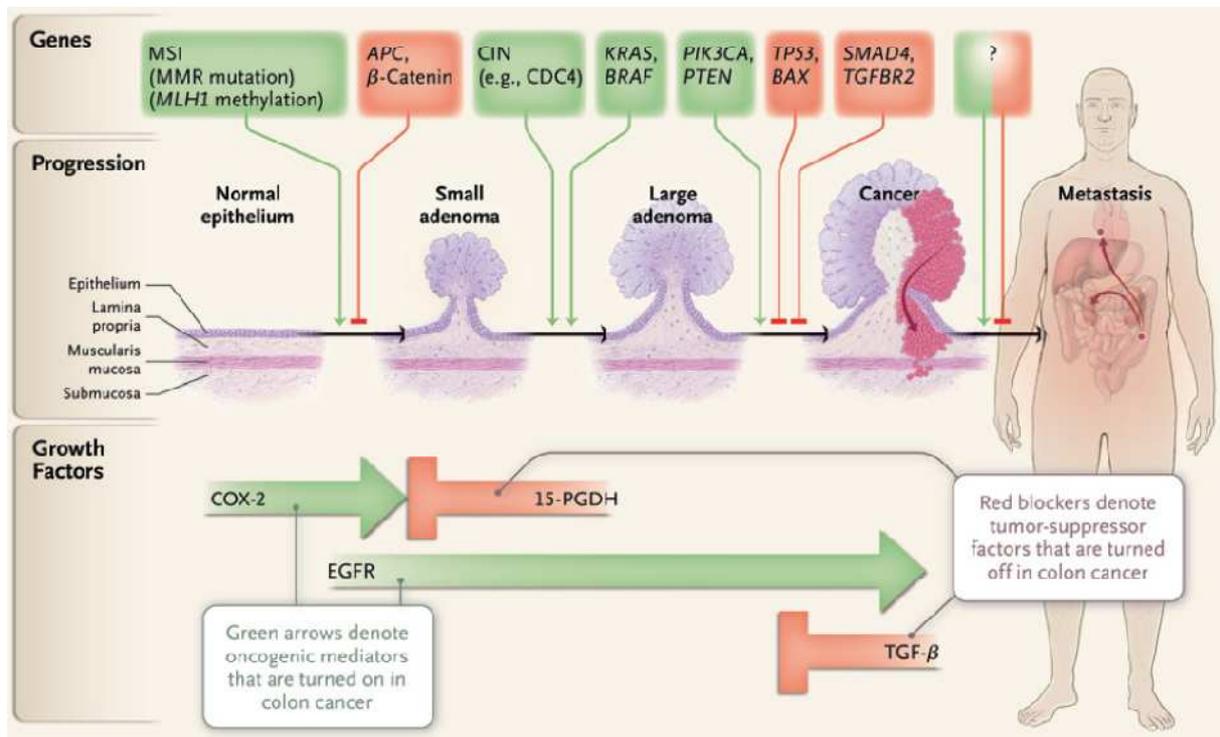


Figure 3 :Principales altérations génétiques conduisant au CCR (31)

Deux mécanismes moléculaires essentiels sont impliqués dans le modèle de cancérogénèse colique :

- L'instabilité chromosomique
- L'instabilité des microsatellites

Ces mécanismes sont étayés par l'existence des formes héréditaires de CCR : la PAF caractérisée par une instabilité chromosomique (phénotype CIN : chromosomal instability) et le syndrome de Lynch caractérisé par l'instabilité des microsatellites (phénotype MIN ; microsatellite instability).

Au cours des dernières années, la caractérisation moléculaire du CCR s'est développée. En plus de la compréhension des caractéristiques biologiques de la maladie, le but ultime de ces études était de fournir des outils qui pourraient permettre de différencier les sous-groupes de CRC avec des implications pronostiques et prédictives.

Un autre système de classification basé sur l'état de méthylation des différents marqueurs dans les tumeurs, comme le phénotype de méthylation des îlots CpG (CIMP, CpG island methylator phenotype) élevé (CIMP-H, CpG Island Methylator Phenotype High), faible ou négative, ajoute un autre niveau de complexité à la classification des CCR (32).

A. Instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique (phénotype CIN ou LOH+ (loss of hétérozygoty) est l'anomalie moléculaire retrouvée chez tous les sujets atteints de PAF et dans 85% des CCR sporadiques. Elle est définie par la perte ou le gain de chromosomes entiers ou de fragments de chromosomes. La perte d'un locus chromosomique est appelée perte d'hétérozygotie (loss of hétérozygoty, LOH). Les régions les plus fréquemment perdues dans les CCR se situent sur le bras court des chromosomes 1, 8, 17 et 22 et sur le bras long des chromosomes 5 et 18 (33). Un certain nombre de gènes suppresseurs de tumeur a été identifié dans ces régions délétées, tels que les gènes *APC* (adenomatous polyposis coli) sur le bras long du chromosome 5, *P53* sur le bras court du chromosome 17 et deux gènes médiateurs de la voie de signalisation du TGF β (*SMAD2* et *SMAD4*) situés sur le bras long du chromosome 18 (27,34).

Les mécanismes à l'origine de l'instabilité chromosomique ne sont pas clairement établis mais interviennent précocement dans la carcinogénèse. En effet, dans la majorité des adénomes, une perte chromosomique est observée (35).

B. Instabilité des microsatellites

L'instabilité des microsatellites (phénotype MIN) est l'anomalie retrouvée dans le syndrome de Lynch et dans 15% des CCR sporadiques. Ces patients ont un phénotype appelé « MSI (microsatellite instability) » ou « RER+ (Replicative Error) ». Les patients sans instabilité microsatellitaire sont de phénotype « MSS » (microsatellite stable). Dans le génome humain, il existe des séquences mono à tétra-nucléotidiques répétées, de localisation variable et situées le plus fréquemment dans les régions non codantes, appelées microsatellites. Le nombre de répétitions est variable d'un individu à l'autre définissant le polymorphisme de répétition.

L'instabilité des microsatellites se caractérise par la variation anormale du nombre de séquences répétées dans l'ADN tumoral comparé à l'ADN du même patient provenant du tissu sain. Ces microsatellites sont particulièrement sujets à des erreurs d'appariement (mésappariement) lors de la réplication. Ces erreurs sont à l'état physiologique normalement réparées grâce à un système de réparation des mésappariements de l'ADN (DNA Mismatch repair, MMR). L'instabilité des microsatellites résulte de l'inactivation d'un des gènes MMR tels que *hMLH1* (MutL Homolog Human 1), *hMSH2* (MutS Homolog Human 2), *hMSH6*

(MutS Homolog Human 6), *hPMS2* (Human Postmeiotic Segregation Increased 2) et *hPMS1* (Human Postmeiotic Segregation Increased 1).

La perte d'expression des protéines hMLH1 et hMSH2 est exclusive. Dans les CCR, il est retrouvé une perte d'expression des protéines hMLH1 ou hMSH2, ces 2 pertes d'expression ne peuvent pas coexister. Lors d'une perte d'expression de la protéine hMLH1, il peut coexister une perte d'expression de PMS2. De manière similaire, lors d'une perte d'expression de la protéine hMSH2, il est observé fréquemment une perte d'expression de hMSH6.

Concernant le syndrome de Lynch, parmi les gènes MMR en cause, les mutations des gènes codant pour *hMLH1* et *hMSH2* représentent respectivement 34 et 42% des mutations (36). Les mutations du gène *hMSH6* représentent 5 à 10% des syndromes de Lynch et semble plus fréquemment associées au cancer de l'endomètre (34,37). Les mutations du gène *hPMS2* sont rares et celles du gène *hPMS1* controversées par certains auteurs (38).

Les CCR sporadiques avec MSI sont le plus souvent présents dans le côlon proximal, peu différenciés et produisent plus de mucine et d'ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) (39,40). Sur le plan moléculaire, l'instabilité des microsatellites résulte principalement de l'inactivation somatique biallélique du gène *hMLH1* par hyperméthylation du promoteur.

L'inactivation biallélique par hyperméthylation ou une mutation au niveau d'un des gènes du système MMR entraînent une accumulation des mutations au niveau des microsatellites. Cette accumulation des mutations peut être délétère si elle se localise dans des régions codantes de l'ADN. C'est ainsi qu'un grand nombre de gènes impliqués dans la voie de contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose peuvent être inactivés par la présence de mutations dans des régions codantes répétées. Notamment, le facteur de transcription *TGF-4*, les gènes du récepteur type II du TGF β et de l'IGF (Insulin-like growth factor) impliqués dans la voie de signalisation du TGF β , le gène *PTEN*, le gène *BAX* (Bcl-2-associated X protein) et le gène *P53* impliqués dans la voie apoptotique.

C. Hyperméthylation des îlots CpG (Cytosine-Phosphate-Guanine)

En plus de l'instabilité chromosomique et de l'instabilité des microsatellites, il existe plusieurs phénomènes épigénétiques qui seraient impliqués dans la carcinogénèse du CCR.

L'épigénétique est définie comme « l'étude des modifications de l'expression des gènes qui sont transmissibles lors de la mitose et/ou la méiose, mais ne découlent pas de modifications dans la séquence de l'ADN ». La mise en place des mécanismes d'épigénétiques est cruciale au cours du développement et sa stabilité est essentielle pour le maintien des fonctions de chaque type cellulaire au cours de la vie d'un organisme (41).

Le phénomène épigénétique le plus fréquent se localise au niveau des îlots CpG qui sont une concentration de dinucléotides cytosine-phosphate-guanine. Ces îlots sont localisés au niveau des régions promotrices des gènes et sont le siège d'aberrations de la méthylation de la cytosine. La méthylation ne s'effectue que sur les cytosines situées en 5' d'une guanine. Près de 70% des gènes possèdent un îlot CpG au niveau de leur promoteur ou de leur exon situé en 5' (42). La méthylation d'un îlot CpG dans la région promotrice d'un gène s'associe à une extinction transcriptionnelle du gène concerné.

Les îlots CpG ne sont habituellement pas méthylés contrairement aux cytosines des dinucléotides CpG dispersés dans le génome. La méthylation des cytosines est un mécanisme essentiel au cours du développement embryonnaire normal, elle permet le maintien de l'inactivation d'un des 2 chromosomes X et l'inhibition mono-allélique des gènes de l'empreinte parentale (32,43). L'hyperméthylation des îlots CpG des promoteurs est observé dans les cancers mais également dans le vieillissement physiologique, mais les gènes cibles sont différents (44). Dans les CCR, on distingue le phénotype de méthylation des îlots CpG élevé (CIMP-H, CpG Island Methylator Phenotype High), faible ou négatif. La majorité des tumeurs sporadiques MSI est CIMP-H et possède une inactivation épigénétique de MLH1 considérée comme l'événement pilote (45–49). Le CIMP est un événement très précoce dans la carcinogénèse du CCR, présent dès le stade de foyers de cryptes aberrantes et dans les adénomes festonnés et les polypes hyperplasiques de grande taille avec instabilité des microsatellites (46,50).

D. Les différentes voies de signalisation impliquées dans la cancérogénèse colique

1. La voie de signalisation WNT

WNT est une des familles de glycoprotéines riches en cystéines d'environ 350 acides aminés sécrétés dans le milieu extracellulaire, jouant un rôle important chez tous les animaux dans l'embryogénèse et l'homéostasie des tissus adultes. A l'état normal, dans la cellule, quand il n'y a pas d'activation de la voie de signalisation WNT (Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site), la protéine APC exerce une régulation négative sur la β -caténine grâce à 2 partenaires que sont l'axine et la kinase GSK3 β (Glucogen Synthétase Kinase3 β). En effet, la phosphorylation de la β -caténine par GSK3 β permet sa dégradation par le protéasome et empêche son accumulation dans le cytoplasme des cellules. L'activation des récepteurs Frizzled par la fixation du ligand WNT entraîne la phosphorylation de la protéine Dishevelled qui par son association à l'axine empêche GSK3 β de phosphoryler la β -caténine et donc sa dégradation par le protéasome. La β -caténine n'est plus dégradée et s'accumule dans le cytoplasme (**Figure 4**) (51).

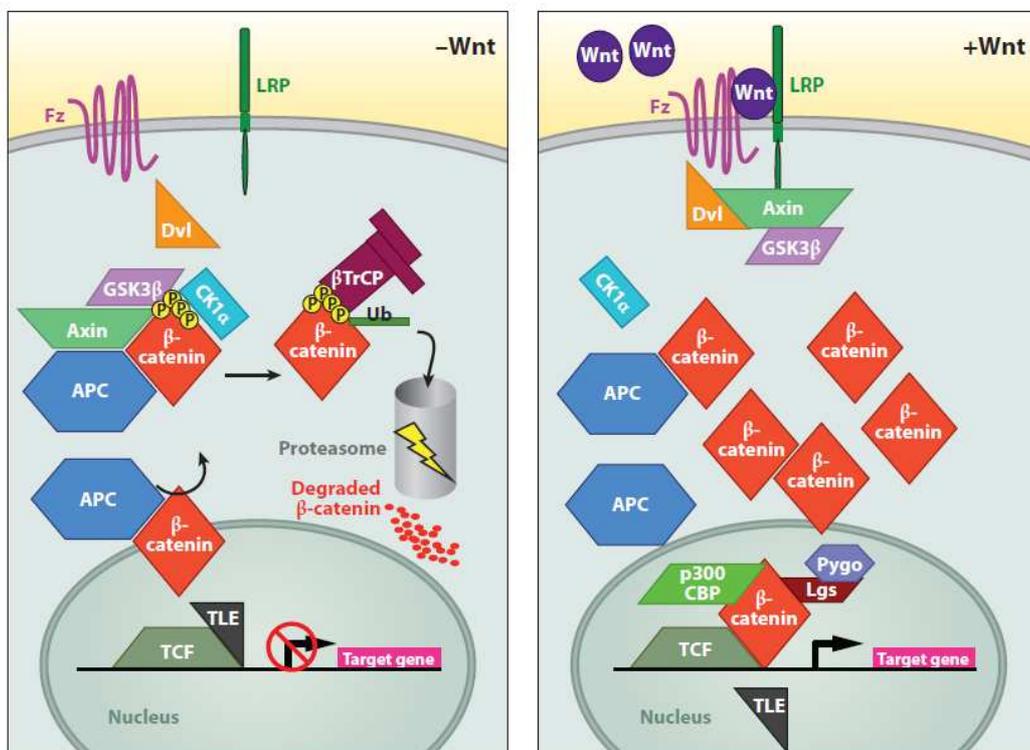


Figure 4: Voie de signalisation WNT (51)

Dans la cellule tumorale, l'activation ou l'inactivation d'un ou plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans l'étape de phosphorylation de la β -caténine bloque sa dégradation. Dans 60 à 80% des CCR de phénotype CIN, le gène concerné est le gène *APC* qui subit une mutation inactivatrice (apparition d'un codon stop et synthèse d'une protéine non fonctionnelle) ou une inactivation biallélique. Dans les CCR de phénotype MSI, il s'agit de mutations activatrices du gène codant la β -caténine ou des mutations inactivatrices du gène codant l'axine (52). La conséquence est l'inhibition de la dégradation de la β -caténine qui s'accumule dans le cytoplasme des cellules activées, puis transférée dans le noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) entraînant la transcription de gènes cibles. Un des gènes cibles est l'oncogène *c-MYC* surexprimé dans les CCR induisant une dérégulation de la croissance cellulaire, de l'apoptose, de la différenciation cellulaire, et l'auto-recrudescence de cellules souches.

2. La voie de signalisation du TGF- β

Le TGF β (Transforming Growth Factor β) intervient dans la régulation de la prolifération cellulaire. Il inhibe la croissance cellulaire grâce à l'activation de son récepteur membranaire hétérodimérique. Ce récepteur a une activité sérine/thréonine kinase. Les ligands TGF β activés se lient au récepteur membranaire de type II. Cette fixation entraîne l'activité kinase du récepteur qui à son tour s'auto phosphoryle. Le récepteur de type II TGF- β activé se lie au récepteur de type I TGF β qui sera phosphorylé et donc activé grâce à l'activité kinase du récepteur de type II TGF β . Par la suite, les protéines SMAD 2 et SMAD 3 sont phosphorylées en raison de l'activation du récepteur de type I puis vont former un complexe avec SMAD 4. Ce complexe hétérodimérique de SMAD4 et des SMADs est transloqué dans le noyau, cette translocation aura pour conséquence la production de TGF β . Cette protéine joue un rôle important dans l'inhibition de la croissance cellulaire incontrôlée et permet le déclenchement de la mort cellulaire. En résumé, la protéine SMAD4 est primordiale dans la régulation du TGF β .

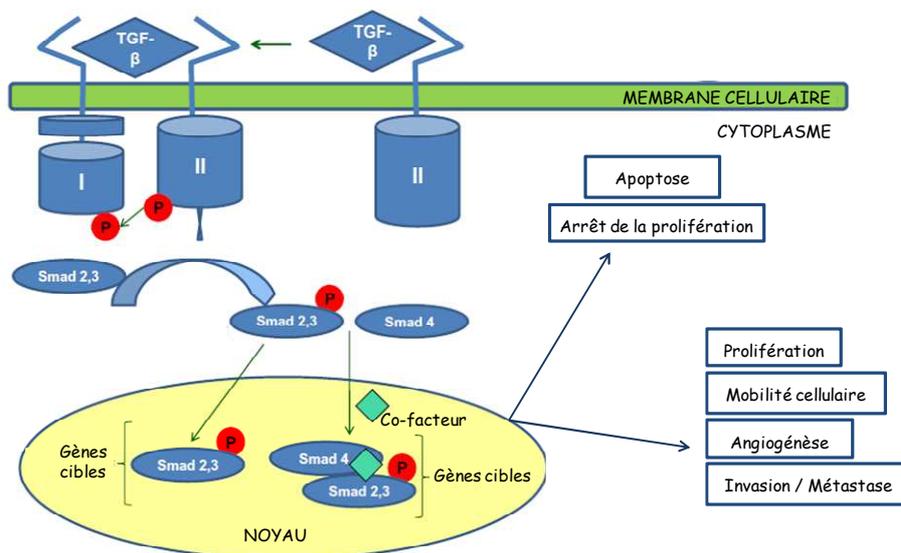


Figure 5: Voie de signalisation TGF β, adaptée d'après(53)

Cette voie de signalisation est inactivée dans les CCR MSI+. Il existe une inactivation biallélique du gène du récepteur de type II TGF- β dans 60 à 80% (52). Ce gène possède une séquence répétée codante de 10 adénines qui est le siège d'erreurs de réparations de mésappariements de l'ADN. Ce qui conduit à un récepteur non fonctionnel.

Il existe un autre gène de cette voie de signalisation, le gène *IGF* (Insuline Growth Factor) qui se situe en amont du récepteur II TGF- β et permet son activation. Dans les CCR MSI+, une séquence répétée codante du gène *IGF* de 8 guanines est le siège d'erreurs de réparations de mésappariements de l'ADN entraînant son inactivation.

Dans les CCR LOH+, cette voie de signalisation est inactivée dans 20 à 30% des cas par des mutations inactivatrices de SMAD2 et SMAD4.

3. La voie de signalisation de la protéine P53

Le gène suppresseur de tumeurs p53 code pour la protéine p53 qui est impliquée dans la régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire en cas d'anomalie de la réplication de l'ADN. Dans une cellule normale, en l'absence de tout stress, il n'y a que très peu de p53 car la protéine MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog) séquestre p53 et induit sa destruction par le biais du protéasome. Dans une cellule saine, lors d'un stress (lésion de l'ADN par exemple), MDM2 est inhibée conduisant à une accumulation de la protéine p53 dans la cellule. Après avoir été la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles, p53 active la transcription de gènes cibles qui ont pour fonction l'arrêt du cycle cellulaire dans un premier temps puis la mort de la cellule par apoptose dans un second temps. L'arrêt du cycle cellulaire permet à la cellule de stimuler ses mécanismes de réparation, dont certains sont

directement activés par p53. Si les dommages subis par la cellule ne peuvent pas être réparés, la cellule entre en apoptose. Dans la cellule tumorale où l'expression de p53 est altérée, la cellule continue le cycle cellulaire et ne rentre plus en apoptose. De plus, l'altération du gène *p53* entraîne une forte instabilité chromosomique. Les CCR de phénotype LOH+ ont une mutation du gène *p53* dans 60 à 80% des cas (52). Dans les CCR MSI+, les mutations du gène *p53* sont bien plus faibles mais dans 30 à 50% des CCR MSI+, on observe une mutation du gène codant pour la protéine pro-apoptotique *BAX* (54). Ce gène possède une séquence répétée codante de 8 guanines qui subit un décalage de lecture par insertion ou délétion d'une guanine entraînant une protéine non fonctionnelle.

Ces altérations apparaissent dans les dernières étapes avant la métastase des cellules cancéreuses coliques et elles provoquent la non-réparation des erreurs de réplication et l'échappement définitif à l'apoptose.

4. La voie de signalisation RAS

La voie RAS (Rat Sarcoma)/MAPK (Mitogen activated Protein Kinase) est une voie de signalisation intracellulaire. Elle intervient dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation cellulaire et de l'angiogénèse. Dans les CCR, elle est activée de façon anormale. Les mécanismes d'activation sont essentiellement : l'activation des récepteurs membranaires notamment EGFR (Epidermal Growth Factor) et des mutations somatiques concernant des proto-oncogènes codant pour les protéines RAS et RAF (Rat Fibrosarcoma).

L'EGFR ou HER1 est le principal récepteur membranaire capable d'activer la voie RAS/MAPK. C'est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille HER ou ErbB (**Figure 6**). L'EGFR est composé d'un domaine extracellulaire assurant la fixation avec le ligand d'un domaine transmembranaire et d'un domaine effecteur tyrosine-kinase intracellulaire. L'EGFR possède plusieurs ligands notamment l'EGF (Epidermal Growth Factor) et le TGF- α (Transforming Growth Factor alpha) (**Figure 6**). La fixation du ligand sur le récepteur entraîne, après homo- et/ou hétérodimérisation de ce récepteur avec d'autres récepteurs de la famille ErbB tels que HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) l'activation de HER2 par phosphorylation de son domaine tyrosine kinase intracellulaire (**Figure 7**). Le domaine tyrosine-kinase activé du récepteur devient un site d'ancrage pour des protéines intracellulaires dites « adaptatrices ». Pour reconnaître le domaine, ces protéines possèdent un domaine intracellulaire SH2 (Src homology-2). Ces protéines ont un rôle primordial dans la transmission intracellulaire des signaux. Le complexe Grb2

(Growth factor receptor-bound protein 2) /hSos active la protéine RAS dans la voie de signalisation RAS/MAPK et la protéine PI3K (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase) qui phosphoryle certains lipides membranaires, dans la voie PI3K /AKT.

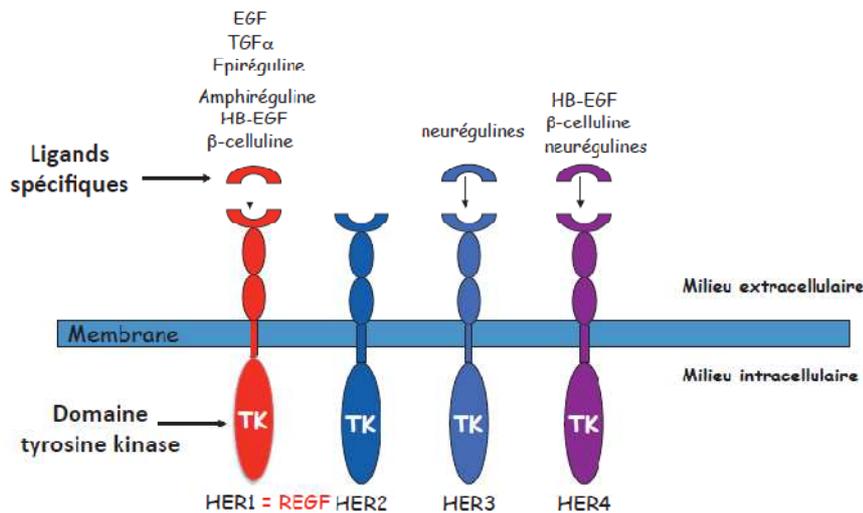


Figure 6 : Famille des récepteurs de l'EGF (ErbB ou HER) (55)

La fixation des ligands sur le récepteur de l'EGFR conduit à son activation qui, elle-même entraîne l'activation des voies de signalisation intracellulaire qui sont principalement la voie RAS/MAPK (voie proliférative) et la voie PI3K (Protein Kinase B) /AKT (voie anti-apoptotique) (55) (**Figure 7**).

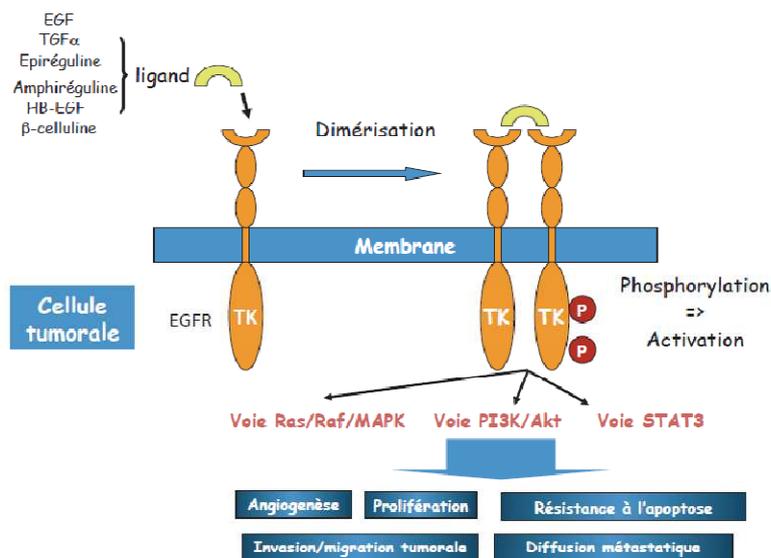


Figure 7 : Activation du récepteur à l'EGFR et des voies de signalisation intracellulaire en aval (55).

Dans la carcinogénèse plusieurs mécanismes peuvent entraîner l'activation de l'EGFR :

- Une amplification du gène de l'EGFR.
- Une augmentation du nombre de ligands de l'EGFR notamment le TGF- α .
- Des mutations du gène de l'*EGFR* au niveau du domaine extracellulaire.
- Des mutations du gène de l'*EGFR* au niveau du domaine intracellulaire (rares dans les CCR).
- Une augmentation du nombre de récepteurs à la surface de la cellule.

Dans le CCR, l'anomalie principalement mise en évidence est une surexpression de l'EGFR : dans 30 à 85% des cas (56). Cependant, d'autres anomalies surviennent dans la voie de signalisation en aval de l'EGFR.

La famille des gènes *RAS* comprend trois gènes bien caractérisés *HRAS* (*Harvey RAS*), *NRAS* (*Neuroblastoma RAS*) et *KRAS* (*Kirsten RAS*). Les protéines *RAS* ont un poids moléculaire de 21 000 daltons, d'où leurs noms p21. Elles sont localisées à la face interne de la membrane cytoplasmique, ancrées dans la couche phospholipidique membranaire par leur extrémité C terminale. Les protéines *RAS* ont une fonction dans la transduction du signal du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire et ainsi régulent la prolifération, la survie, la différenciation, la migration cellulaire et l'angiogénèse. Leur activation est déclenchée par l'intermédiaire de récepteurs membranaires dont l'EGFR.

Les protéines *RAS* oscillent entre un état actif où elles sont liées au GTP (Guanosine-Tri-Phosphate) et un état inactif où elles sont liées au GDP (Guanosine-Di-Phosphate) (**Figure 8**). L'activation des protéines *RAS* normales ou mutées survient lors du remplacement du GDP par le GTP catalysé par une protéine appartenant à la famille des protéines GEF (Guanine nucléotide exchange factors). Ce qui entraîne de manière transitoire l'interaction de *RAS* avec d'autres molécules intracellulaires et l'activation de voies de signalisation (*RAS*/MAPK et PI3K/AKT). Les protéines *RAS* activent les protéines de la famille RAF1, constituée des sérine-thréonine-kinases ARAF, BRAF et CRAF. L'inactivation des protéines *RAS* est provoquée par l'hydrolyse du GTP en GDP catalysée par l'activité GTPase intrinsèque de la protéine *RAS* elle-même et par les protéines GAP (GTPase Activating Factor).

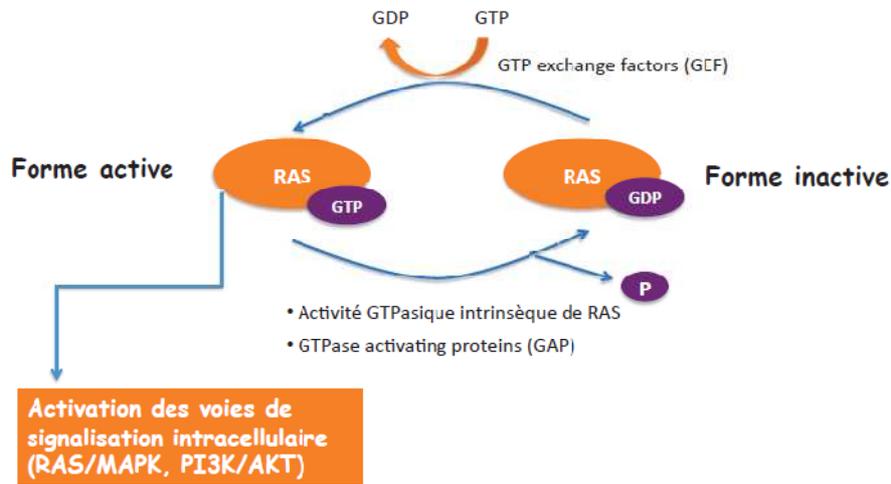


Figure 8 : Forme active et inactive de la protéine RAS (55).

L'activation de la voie des MAPK est aussi communément appelée « ERK » (Extracellular signal-Regulated Kinase). Cette cascade des MAP Kinases est initiée par la liaison de la protéine RAF-1 à la protéine RAS-GTP (**Figure 8**). RAF1 est responsable de l'activation par phosphorylation de la MAPK-kinase ou MEK (MAPK-ERK-Kinase). À son tour, MEK active par double phosphorylation ERK, ce qui conduit à sa translocation au niveau du noyau induisant l'expression de gènes précoces codant pour des facteurs de transcription (*c-FOS*) et autres gènes impliqués dans la régulation de gènes contrôlant la prolifération cellulaire (*c-MYC*, *c-JUN* ou *JUNB*). L'expression des facteurs de transcription entraîne une augmentation de l'expression des gènes dont ceux codant pour la Cycline D1 et cdk6 (Cell Division Protein Kinase 6) qui ont un rôle primordial dans l'initiation du cycle cellulaire en G1. Les cellules passent de la phase G1 à la phase S induisant une prolifération cellulaire (**Figure 9**).

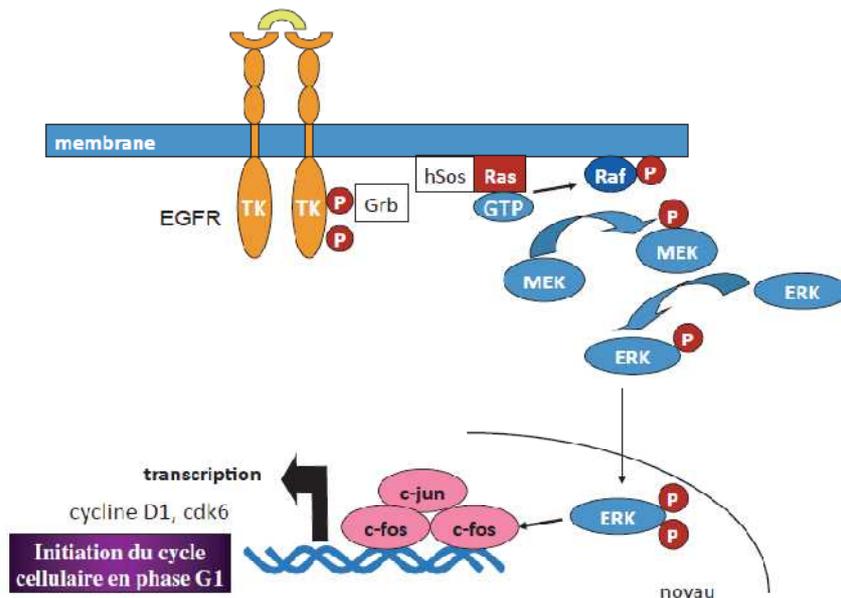


Figure 9: Schéma simplifié de la voie RAS/MAPK (55).

KRAS est un des oncogènes les plus fréquemment mutés (20% des cancers). On observe une forte prévalence de mutations de *KRAS* dans les cancers du pancréas (60%), colorectaux (40-50%), des voies biliaires (33%), broncho-pulmonaires (18%, essentiellement adénocarcinomes et patients fumeurs) et les adénocarcinomes de l'endomètre et des ovaires (14 %). L'activation de la protéine RAS résulte de la présence d'une mutation faux sens de *RAS*. Cette mutation entraîne une altération de l'activité GTPase et par conséquent une accumulation de la forme active de la protéine RAS liée au GTP conduisant à une prolifération tumorale (57).

Dans le CCR, les mutations les plus fréquentes sont détectées dans les codons 12 et 13 de l'exon 2 du gène *KRAS* (environ 40%). Dans moins de 10% des cas, elles concernent l'exon 3 (codons 61 et 59) et l'exon 4 (codons 117 et 146). Le gène *NRAS* est beaucoup plus rarement porteur de mutations (environ 5 à 8% des cas au niveau des codons 12, 13, 61) (58).

Concernant les protéines de la famille RAF-1, seul *BRAF* a été décrit comme muté. Une mutation quasiment unique est observée au niveau de ce gène, conduisant à une substitution d'une valine en un acide glutamique au niveau du codon 600 (V600E). Cette mutation activatrice est responsable d'une augmentation de l'activité kinase de la protéine *BRAF*, et par conséquent d'un effet oncogène (59). Les tumeurs les plus fréquemment mutées sont les cancers de la thyroïde et les mélanomes (40 %) et les cancers colorectaux (5-10 %). Ces mutations sont exclusives des mutations du gène *KRAS*.

La voie de signalisation intracellulaire PI3K/AKT peut aussi être directement activée de façon non régulée par activation de son domaine intracellulaire à activité tyrosine-kinase suite à une mutation (environ 13% des CCR) (60). La voie de signalisation PI3K intervient dans la régulation de la glycogénèse, la régulation de la taille de la cellule, la migration, l'apoptose et la prolifération (**Figure 10**).

La voie de transduction de signal passant par les protéines EGFR/RAS/RAF/PI3K apparaît donc activée de manière constitutive dans environ 60 % des cancers colorectaux, plus fréquemment dans les cancers de phénotype MSI+ que dans les cancers de phénotype LOH+. Cependant, à l'heure actuelle, seules les mutations des gènes RAS sont considérés comme facteurs prédictifs de non-réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR.

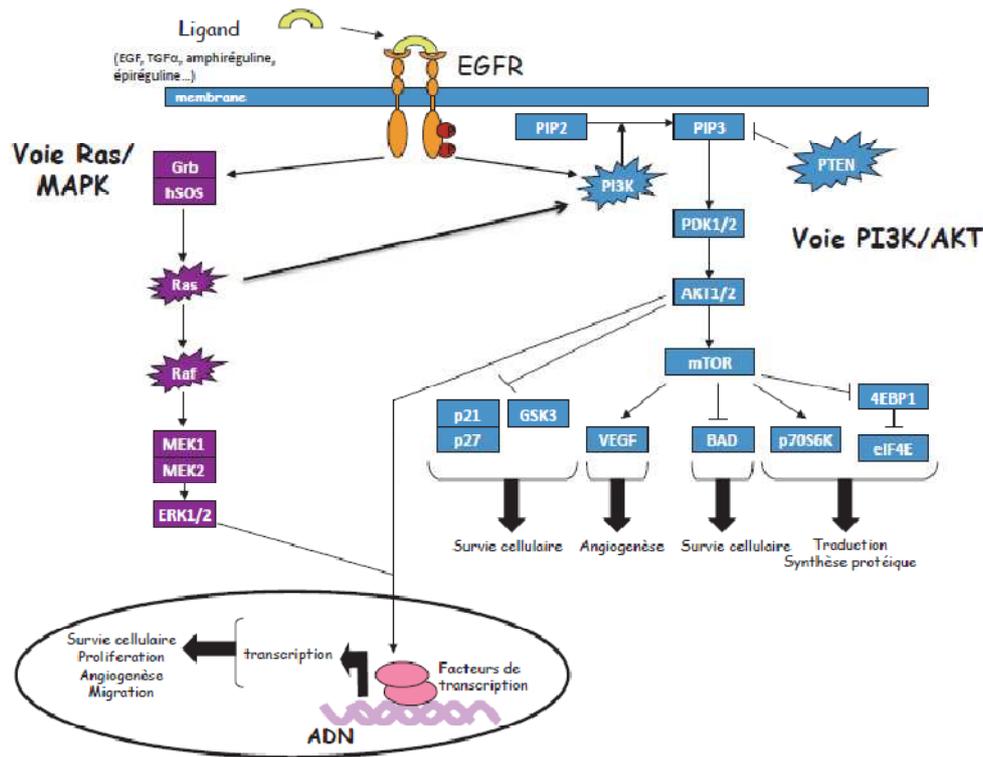


Figure 10: Schéma général simplifié des voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT(55)

E. Vers des classifications moléculaires

De nombreuses anomalies génétiques s'accumulent lors de la cancérogénèse colorectale et des classifications basées sur le profil génotypique existent mais à l'heure actuelle, il n'y a pas de consensus sur leur utilisation pratique (61).

Par exemple, en 2013, l'équipe de Hanahan a établi une classification divisée en 5 sous-groupes (62) :

- « Gobelet » défini par une expression élevée de l'ARNm des gènes *MUC2* et *TFF3*
- « Entérocyte » défini par une expression élevée des gènes spécifiques de l'entérocyte
- « Stem-like » défini par une haute expression de la voie de signalisation Wnt.
- « Inflammatoire » défini par une haute expression des chemokines et des gènes liés à l'interféron
- « Transit-Amplification » défini par une expression variable des gènes des cellules souches et de la voie de signalisation Wnt.

IV. Facteurs Pronostiques

Les facteurs pronostiques permettent au clinicien d'optimiser la stratégie thérapeutique et d'adapter la surveillance. La classification pTNM précédemment décrite permet de classer les tumeurs selon leur extension locale, régionale et à distance et ainsi de standardiser le traitement selon le stade et le pronostic.

A. Le degré d'infiltration pariétale

Le degré d'infiltration pariétale conditionne notamment l'extension ganglionnaire et veineux. L'infiltration de la musculuse est une étape importante dans l'extension tumorale. Quand la tumeur infiltre la sous-muqueuse sans envahir la musculuse alors l'envahissement ganglionnaire est de 15% alors qu'il est de 45% quand la tumeur envahit la musculuse (63). Les tumeurs T4 sans envahissement ganglionnaire ont un risque plus élevé d'extension locorégionale que les tumeurs T1, T2 et T3 avec un envahissement ganglionnaire. Le stade T4 est un facteur indépendant de mauvais pronostic. Les stades T4 ont une survie à 3 ans de 36% contre 70% dans les stades T3 (64).

B. L'envahissement ganglionnaire

L'envahissement ganglionnaire est intégré dans la classification pTNM. Il a une valeur pronostique. Plus le nombre de ganglions envahis est élevé plus le pronostic est défavorable. Pour des tumeurs classées N0, N1 et N2, la survie à 3 ans est de 75%, 57% et 36% respectivement (63,65).

C. Le nombre de ganglions examinés

Le nombre de ganglions examinés défini par le Thésaurus National de Cancérologie Digestive (TNCD) est de 12. Selon l'étude de Le Voyer et al., la survie globale à 5 ans pour un stade II passe de 73% avec un nombre de ganglions analysés inférieur à 11 à 87% avec un nombre supérieur à 20. Concernant le stade IIIA-IIIB, la survie globale à 5 ans passe de 67% pour moins de 11 ganglions examinés à 90% si l'on examine plus de 40 ganglions (66).

D. La marge de résection

La marge de résection est un facteur pronostique important et indépendant. Le classement est le suivant :

Rx : Les marges de résection sont non analysables.

R0 : Absence de tumeur résiduelle.

R1 : Tumeur résiduelle microscopique.

R2 : Tumeur résiduelle macroscopique.

Les marges de résection Rx et R1 constituent un facteur prédictif péjoratif avec un risque relatif de 7,62 observé dans l'étude de Poeschl et al. (67).

E. Le degré de différenciation

Le degré de différenciation influe sur la fréquence des métastases ganglionnaires régionales et à distance, les embolies vasculaires et les engainements périnerveux. Il s'agit d'un facteur de risque indépendant. La survie à 5 ans est de 29% pour les CCR peu différenciés contre 59% pour les CCR moyennement et bien différenciés ($p=0,0002$) (63,65).

F. Le sous type histologique

Le sous type histologique le plus fréquent est l'adénocarcinome lieberkühnien puis viennent l'adénocarcinome mucineux et le carcinome à cellules indépendantes. Le carcinome à cellules indépendantes a un pronostic moins favorable comme le montre l'étude d'O'Connell et al. avec un taux de survie à 5 ans de 36% contre 65,9% pour les adénocarcinomes ($p<0.001$) (68).

G. Les embolies vasculaires et lymphatiques et engainements périvénereux

La présence d'embolies des veinules péri-tumorales par les cellules tumorales est considérée comme un facteur de mauvais pronostic prédictif de survenue de métastases hépatiques. L'étude de Chapuis et al., montre que la survie à 5 ans est de 15% en présence d'embolies vasculaires veineux péri-tumoraux contre 40% quand il n'y en a pas (69). La présence d'embolies vasculaires péri-tumoraux est liée au stade pTNM et à la différenciation tumorale (70) et elle est associée à une augmentation des récurrences (71) et à une diminution de la survie globale (72). Les embolies vasculaires et lymphatiques ne sont pas considérés comme un facteur pronostique indépendant comme précisé dans l'étude de Burton et al. (64).

Les engainements périnerveux (EPN) sont considérés par de nombreux auteurs comme un facteur de mauvais pronostic indépendant corrélé à un risque augmenté de récurrence et de survenue de métastases hématogènes. La survie globale à 5 ans est de 25% pour les CCR avec EPN contre 72% pour les CCR sans EPN (73).

La présence d'embolies vasculaires, lymphatiques et d'EPN est dénommée « Venous Emboli and Lymphatic and Perineural Invasion (VELIPI) ». Le taux de survie à 5 ans sans maladie est de 32,4% chez des patients atteints de tumeurs VELIPI négatives et de 12,1% chez des patients atteints de tumeurs VELIPI positives. L'étude de Pagès et al. montre également des différences significatives dans la durée médiane de la survie sans maladie entre les patients atteints de tumeurs VELIPI positives et des patients atteints de tumeurs VELIPI négatives (3,3 mois vs 26,9 mois, $p < 0,001$) (74).

H. Les dépôts tumoraux « satellites »

Les dépôts tumoraux dits « satellites » correspondent à des nodules macro ou microscopiques dans le tissu adipeux péri-colique ou péri-rectal, à distance du front d'invasion tumoral, sans argument histologique de structure ganglionnaire résiduelle, mais dans le territoire de drainage lymphatique de la tumeur primitive. Ces dépôts peuvent correspondre à une extension discontinue de la tumeur, à une extension extravasculaire d'une invasion veineuse ou à un ganglion lymphatique totalement remanié et non identifiable. Si ces lésions sont observées avec des tumeurs qui seraient classées T1 ou T2, la classification T reste inchangée. Les dépôts, ou nodules, sont classés N1c (il s'agit au total d'une population T1, T2, sans ganglion lymphatique positif, mais avec des dépôts tumoraux classés N1c).

Les taux de survie chez les patients atteints de dépôts tumoraux sont significativement plus faibles que ceux sans (survie globale à 5 ans : 58,4% vs 81,0%, $p < 0,0001$; survie sans récurrence à 5 ans : 47,1% vs 73,4%, $p < 0,0001$). Les dépôts tumoraux sont un facteur indépendant de pronostic pour les patients atteints de cancer colorectal (75).

I. CCR opérés en urgence

Selon le TNCD, un CCR initialement en occlusion ou avec une perforation est un CCR à risque très élevé de récurrence. La survie à 3 ans pour les CCR opérés en urgence est de 48% contre 78% pour ceux opérés lors d'une chirurgie programmée selon l'étude de Burton et al. (63,65).

J. L'antigène Carcino-Embryonnaire (ACE)

L'ACE est une protéine qui participe au mécanisme d'adhésion cellulaire. Elle joue un rôle dans la différenciation cellulaire et la carcinogénèse. L'ACE est produit dans 90% des CCR et est un facteur pronostique indépendant (76–78). Un taux sérique élevé (>5 ng/ml) en préopératoire signe un pronostic défavorable avec une diminution de la survie. Le taux de survie globale à 5 ans et le taux de survie sans récurrence chez les patients ayant un taux sérique d'ACE bas sont de 81,7% et de 82,4%, respectivement, significativement plus élevés que les taux pour les personnes ayant un taux sérique d'ACE élevé (69,9%; $p = 0,011$ et 70,6%; $p = 0,002$). Une analyse multi variée a révélé que le niveau de l'ACE sérique préopératoire était un facteur pronostique indépendant important pour la survie globale ($p = 0,021$) et la survie sans maladie ($p = 0,026$) (63).

K. Lymphocytes T cytotoxiques

Le lymphocyte T cytotoxique est un lymphocyte T qui présente à sa surface des récepteurs pouvant se lier à des complexes formés par un peptide présenté par une molécule CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I. Une fois activés par un complexe CMH-antigène, les lymphocytes T cytotoxiques libèrent la perforine, une protéine qui produit des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles et provoque leur lyse. Les lymphocytes T cytotoxiques libèrent également le granzyme, une protéase à sérine, capable de pénétrer dans la cible par les pores occasionnés par la perforine et induire une apoptose. Les molécules CMH de classe I se lient aux antigènes tumoraux et peuvent ainsi être reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques qui induisent l'apoptose des cellules tumorales et par conséquent entraînent une diminution de la croissance et de la dissémination tumorale. Les CCR avec une grande densité de lymphocytes CD45RO⁺ ont une survie sans progression de 36,5 mois et une survie globale médiane de 53,2 mois, contre 11,1 mois et 20,6 mois, respectivement, pour les CCR avec une faible densité de lymphocytes CD45RO (73).

L. L'instabilité des microsatellites

Le phénotype MSI des CCR est considéré comme un facteur pronostique indépendant, notamment des stades II et III. Ainsi, le phénotype MSI est associé à une meilleure survie globale ou sans récurrence par rapport aux CCR avec phénotype MSS. La survie globale à 5 ans est de 76% pour les CCR MSI contre 54% pour les CCR MSS selon l'étude de Gryfe et al.(77). Une instabilité des microsatellites est associée à un avantage significatif de survie

indépendamment de tous les facteurs pronostiques standard, y compris le stade tumoral (hazard ratio, 0,42 ; IC : 95% de 0,27 à 0,67, $p < 0,001$). De plus, quelque soit la profondeur de l'invasion de la tumeur, les CCR MSI sont associés à une diminution de la probabilité de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux (odds ratio, 0,33; IC :95%, de 0,21 à 0,53, $P < 0,001$) ou des organes éloignés (odds ratio, 0,49; IC :95%, de 0,27 à 0,89, $p = 0,02$) (79). On explique essentiellement l'effet favorable du statut MSI par le fait que l'instabilité génétique des cellules tumorales rendrait les tumeurs MSI plus sensibles à l'apoptose par accumulation de mutations des gènes requis pour la croissance cellulaire.

M. Le gène KRAS

De nombreux essais thérapeutiques randomisés publiés ces dernières années montrent la valeur prédictive négative de la présence des mutations du gène KRAS vis à vis des thérapies ciblées anti-EGFR. Ainsi, les patients porteurs d'un gène KRAS non muté (sauvage) répondent beaucoup mieux aux anti-EGFR. La survie globale des patients sans mutation KRAS dans leur tumeur est significativement plus élevée par rapport aux patients présentant une tumeur mutée ($p = 0,016$; médiane de 16,3 contre 6,9 mois) (80). La présence des mutations de KRAS a aussi une valeur pronostique puisque, l'étude de Conlin et al. (81) avait montré que, en absence de traitement anti-EGFR, les patients présentant des mutations KRAS avaient une survie globale significativement plus faible que les patients sans mutations KRAS ($p = 0,0098$). Dans cette même étude, après correction du stade Dukes, de l'âge et du sexe [hazard ratio de 2,9 (intervalle de confiance à 95% : 1.4 à 6.2), $p = 0,0040$], il a été montré que KRAS était une variable pronostique indépendante.

N. Le gène BRAF

Le gène BRAF est maintenant connu comme un facteur pronostique. Le statut BRAF sauvage est associé à une meilleure survie globale. Une étude menée sur 214 CCR a montré une survie globale à 3 ans de 73.3% pour les patients BRAF sauvage vs 16.7% pour les patients BRAF muté ($p < 0,001$). Les tumeurs BRAF mutées avaient également un stade TNM plus élevé ($p = 0,014$). Le risque de métastases à distance était 2.5 plus élevé pour les tumeurs BRAF mutées 62.5% vs 22.9% ($p = 0,025$). Le risque d'avoir des métastases synchrones était 8 fois plus élevé 50% vs 5.9% ($p = 0,002$) (82).

V. Traitements

A. Critères d'opérabilité et de résecabilité

L'extension locale (T) et métastatique (M) conditionnent la résecabilité. Idéalement, l'objectif est une résection R0 en bloc.

Si la tumeur est M0, une résection première est envisagée sauf s'il y a un envahissement des structures adjacentes empêchant une résection « en bloc » (83). Pour les cancers du moyen et bas rectum (T3 et/ou N+) un traitement néoadjuvant à type de radiochimiothérapie est réalisé (83). Si la tumeur est M1, non résecable, il n'existe pas d'indication formelle au traitement initial du cancer primitif sauf si la tumeur est hémorragique, en syndrome occlusif ou perforée. Une chimiothérapie de première ligne est alors discutée (83). Si la tumeur est M1 résecable, la résection de la tumeur primitive et des métastases en un ou deux temps est envisagée en fonction des symptômes et des localisations des métastases. Une chimiothérapie d'intervalle de type FOLFOX4 (83) entre les deux temps selon extension est discutée (84).

A. Traitement chirurgical

L'objectif est d'avoir une chirurgie avec des marges chirurgicales saines qui sont un facteur pronostic important et indépendant.

Le principe du traitement chirurgical du CCR consiste en une exérèse avec des marges de résection distale et proximale d'au minimum 5 cm (sur pièce fraîche) (83). De plus, les marges circonférentielles doivent être saines et l'exérèse du mésocolon attenant doit se faire en bloc. (pour les tumeurs de la charnière recto-sigmoïdienne, 5 cm de mésorectum sous le pôle inférieur de la tumeur doivent être retirés). La technique « no-touch » et la ligature première des vaisseaux sont optionnelles et la résection par cœlioscopie est recommandée (83).

En cas de suspicion de tumeur T4, l'exérèse chirurgicale doit être monobloc, enlevant la tumeur et son extension locale. Un traitement néoadjuvant par chimiothérapie peut être discuté (83). En cas de découverte per-opératoire d'une tumeur de la charnière rectosigmoïdienne T4 avec atteinte vésicale ou utérine, il est possible de réaliser une stomie d'amont avant de débiter une radiochimiothérapie puis une ré-intervention dans le but d'une exérèse. Cette option thérapeutique devra être discutée en Réunion de Concertation

Pluridisciplinaire (RCP) en préopératoire en cas de suspicion de tumeur T4 au cours du bilan préopératoire (83). En cas de doute sur l'existence de métastases hépatiques, une échographie per-opératoire est recommandée (83). De plus, le curage ganglionnaire doit compter 12 ganglions au minimum (83).

Il existe différents types de résection en fonction de la localisation de la tumeur initiale :

- Côlon droit : hémicolectomie droite avec anastomose iléo-transverse.
- Sigmoïde et côlon gauche : colectomie segmentaire ou héli-colectomie gauche et anastomose colorectale.
- Jonction recto-sigmoïdienne : résection recto-sigmoïdienne avec anastomose colorectale.
- Rectum moyen et bas : proctectomie ou amputation abdomino-périnéale.

B. Traitement endoscopique

La résection endoscopique d'un cancer *in situ* ou intra muqueux peut être un traitement suffisant. Pour les lésions avec foyers de carcinomes sous muqueux, la résection endoscopique est considérée comme suffisante uniquement en cas d'envahissement sous muqueux superficiel (<1000µm si sessile et 1/3 supérieur du pied si pédiculé) et si la pièce de polypectomie présente l'ensemble des critères de sécurité suivant (83) :

- Limite de résection saine.
- Absence de foyer de carcinome indifférencié.
- Absence d'emboles vasculaire ou lymphatique.
- Marge de sécurité > 1mm.

C. Stratégie thérapeutique, stade TNM et mutation RAS

Les stratégies thérapeutiques mises en place vont être fonction du stade TNM.

1. Stade I

Pour le **stade I correspondant à T1-T2-N0**, le traitement de référence est la chirurgie seule.

2. Stade II

Pour le **stade II (T3-T4-N0)**, le traitement de référence est la chirurgie. En cas de statut MSI positif ou en l'absence de facteurs de mauvais pronostic reconnus, aucune chimiothérapie n'est envisagée. En cas de facteurs de mauvais pronostic pour les tumeurs

MSS, il n'existe pas de traitement de référence. Néanmoins plusieurs options existent. 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 certaines occlusions), une chimiothérapie peut être proposée aux patients n'ayant pas de comorbidité, en bon état général avec une tumeur MSS. En l'absence de consensus dans cette situation, la prudence est souhaitable ainsi que l'explication aux patients de la balance bénéfique/risque dans leur cas. Les schémas proposés doivent avoir peu de risque toxique tel que les fluoropyrimidines orales et le LV5FU2 simplifié. Le schéma FOLFOX4 peut se discuter principalement chez des patients de moins de 70 ans avec tumeur T4 et/ou moins de 12 ganglions analysés. En cas d'utilisation du protocole FOLFOX4, l'oxaliplatine devra être interrompu dès l'apparition d'une neurotoxicité de grade 2. En cas d'instabilité microsatellite tumorale, une chimiothérapie adjuvante n'est pas recommandée (83).

En terme de pronostic, le groupe de stade II est un groupe hétérogène. Les différentes méta-analyses observent des résultats contradictoires concernant le bénéfice thérapeutique d'une chimiothérapie adjuvante. L'étude QUASAR 2 (n = 3239) a comparé une chimiothérapie adjuvante par 5-Fluoro-Uracile + Acide folinique ± lévamisole à un bras sans chimiothérapie adjuvante chez des patients porteurs de CCR majoritairement de stade II (91%). En analyse de sous-groupe, pour les cancers coliques de stade II, le risque relatif de récurrence à 2 ans était diminué de 29% (HR : 0,71 IC 95% ; 0,54-0,92, p = 0,01) avec une tendance non significative à l'amélioration de la survie globale (HR : 0,83 IC 95% ; 0,65-1,07). De plus, dans cette étude les patients de plus de 70 ans ne tiraient aucun bénéfice d'une chimiothérapie adjuvante (RR de décès : 1,02 IC 95% ; 0,70-1,48) (85). L'étude MOSAIC a comparé une chimiothérapie adjuvante par FOLFOX4 (Oxaliplatine+ LV5-FU2) au LV5-FU2 (5-Fluoro-Uracile + Acide folinique). Dans le sous-groupe représentant l'ensemble des patients de stade II, il n'y a aucun bénéfice de survie à 6 ans à traiter par FOLFOX 4 (86,9 vs 86,8%, RR 1,00 ; IC 95% ; 0,70-1,41). Pour le sous-groupe des stades II à haut risque (T4 ou nombre de ganglions examinés < 12), le traitement par FOLFOX4 permet une amélioration mais statistiquement non significative de la survie sans maladie à 5 ans, comparé au LV5FU2 (RR : 0,72 ; IC 95% ; 0,50 - 1,02, NS) et de la de survie globale à 6 ans (RR : 0,81 ; IC 95% ; 0,52-1,26, NS) (86).

3. Stade III

Pour le **Stade III (tous T-N1 ou N2)**, le traitement de référence est la chirurgie et une chimiothérapie adjuvante par FOLFOX 4 (ou par FOLFOX 4 simplifié) ou XELOX administrée pendant 6 mois et commencée si possible avant le 42^{ème} jour postopératoire. Chez les sujets de plus de 70 ans une monochimiothérapie par fluoropyrimidine seule est recommandée (83). Le protocole FOLFOX 4 pendant 6 mois améliore significativement la survie à 6 ans après résection d'une tumeur de stade III comparé au LV5FU2 (72,9% vs 68,7% RR 0,80 IC 95% ; 0,65-0,97 ; p = 0,023) (87). L'étude C07 du NSAPBP a confirmé l'intérêt de l'oxaliplatine en association avec le LV5-FU2 en montrant une amélioration de 6,2 % de la survie sans maladie à 3 ans (88). Dans l'étude de Haller et al., la supériorité du XELOX sur une association du LV5-FU2 a été montrée pour la survie sans récurrence à 3 ans de 70,9 % versus 66,5 % respectivement (HR=0,80, IC 95% ; 0,69 à 0,93, p = 0,0045) (87). L'association irinotécan et 5FU n'a pas démontré une efficacité supérieure au LV5-FU2 (89,90). Plusieurs études de phase III évaluant les thérapies ciblées (bevacizumab et cétuximab) en association à la chimiothérapie (fluoropyrimidine + oxaliplatine) sont négatives (91).

4. Stade IV (M+), (83)

a. Métastases hépatiques résécables

Dans le cas de métastases hépatiques résécables, le traitement de référence est la chirurgie avec une marge de résection RO.

En cas de résécabilité de classe I : le protocole FOLFOX 4 simplifié est proposé : 6 cures préopératoires et 6 cures postopératoires (92). La chirurgie hépatique première est à envisager s'il existe une nécessité diagnostique ou en cas de lésions de petite taille faisant craindre une disparition sous chimiothérapie.

En cas de disparition en imagerie d'une métastase hépatique après chimiothérapie, la résection hépatique doit intéresser le site initial de la lésion disparue car une réponse complète histologique est obtenue dans moins de 20 % des cas (93). Si le site de la lésion disparue ne peut être réséqué, une chimiothérapie intra artérielle hépatique sera discutée car elle réduit le risque de récurrence dans les séries rétrospectives (94).

En cas de métastases synchrones à la tumeur primitive, une résection hépatique 2 à 3 mois après l'exérèse colique est réalisée ou simultanément si la métastase est d'accès facile et

la tumeur primitive non compliquée. Alors, une résection en un temps avec anastomose digestive avant l'hépatectomie est possible. Une chimiothérapie préopératoire par FOLFOX 4 simplifiée est discutée. La stratégie inversée (chirurgie hépatique première éventuellement précédée de chimio, et colectomie secondaire) peut être aussi envisagée.

En cas de métastases pulmonaires résécables associées, il est recommandé de débiter par une exérèse hépatique suivie d'une résection pulmonaire 2 à 3 mois plus tard.

En cas de métastases progressant sous chimiothérapie, qui est un critère de mauvais pronostic et qui limite l'indication de résection, celle-ci pourra toutefois être discutée notamment en cas de métastase unique progressive après 2 lignes de chimiothérapie car elle semble améliorer le pronostic (95).

En cas de résécabilité de classe II, la prise en charge dans un centre médico-chirurgical spécialisé dans la chirurgie hépatique est fortement recommandée.

En cas d'adénopathie pédiculaire ou cœliaque, il est préconisé une chirurgie avec curage si résécabilité de classe I et elle est déconseillée en cas de classe II.

b. Métastases extra-hépatiques résécables

Pour les métastases pulmonaires, les indications sont les mêmes que pour les métastases hépatiques, la chirurgie est réalisée seulement si l'exérèse complète est possible. Une chimiothérapie péri-opératoire est à discuter comme pour les métastases hépatiques.

Pour les carcinomes péritonéaux, une résection complète des lésions suivie d'une chimiothérapie intrapéritonéale (CIP) +/- hyperthermie (CHIP Chimiothérapie Hyperthermique Intra Péritonéale) est indiquée lorsque la carcinose est isolée et d'extension modérée chez un malade en bon état général (sans insuffisance viscérale). Cette association thérapeutique n'est justifiée que si toutes les lésions supérieures à 2 mm ont été retirées. Toute carcinose péritonéale de découverte fortuite (au cours d'une laparotomie ou d'une coelioscopie) en dehors d'un centre expert préparé pour la CHIP doit être décrite précisément dans le but de statuer sur la possibilité d'exérèse, mais aucun geste de résection ne doit être réalisé.

c. Métastases à la limite de la résécabilité

En l'absence d'essai de phase III publié sur les métastases potentiellement résécables, il n'existe pas de recommandations de référence.

Chez les patients avec des métastases pouvant devenir résécables en cas de réponse majeure, il est recommandé de privilégier, après discussion en RCP, un protocole donnant un taux de réponse élevé dans l'optique d'une résécabilité secondaire (bi ou tri-chimiothérapie ou plus biothérapie). Le choix du traitement est à discuter en fonction de la contre-indication (nombre, taille, contact vasculaire ...) et du patient (co-morbidités, foie pathologique, notamment stéatosique ...). La détermination du statut du gène RAS (KRAS et NRAS exons 2, 3 et 4) dans la tumeur primitive ou les métastases est utile dans le choix de la stratégie thérapeutique (sur tumeur primitive ou métastases). La recherche d'une mutation BRAF est optionnelle, elle n'est pas prédictive de « non efficacité » des anti-EGFR et confère uniquement un mauvais pronostic.

En cas de métastases non résécables traitées par chimiothérapie, avec une excellente réponse permettant d'envisager secondairement une résection, la morbidité de l'hépatectomie est majorée après 6 cycles. Il est donc recommandé d'opérer dès que les métastases deviennent résécables sans attendre au-delà de 4 mois de chimiothérapie (réponse maximum obtenue entre 2 et 4 mois) et de respecter un délai de 4 à 6 semaines après la fin de la chimiothérapie avant d'opérer.

Pour les patients métastatiques opérés, une chimiothérapie de 6 mois au total pré- et postopératoire est recommandée.

Chez les patients devenus résécables seulement après plus de 6 mois de traitement, une chimiothérapie postopératoire de 2 à 6 mois selon la toxicité cumulative et les suites postopératoires peut être envisagée.

d. Métastases « jamais résécables »

La caractérisation des métastases qui ne seront jamais résécables est parfois difficile. La non résécabilité doit toujours être définie après discussion en RCP avec présence d'au moins un chirurgien et d'un radiologue expérimenté.

Il est raisonnable de considérer comme non résécables :

- Les métastases chez des patients incapables, du fait de comorbidités, de supporter l'acte chirurgical (ou les actes successifs) nécessaire(s) à l'éradication de tous les sites métastatiques.

- Les métastases dans des sites non résecables (os, cerveau par exemple). Une métastase cérébrale isolée non résecable doit être traitée par irradiation stéréotaxique. Celle-ci peut être indiquée jusqu'à 3 lésions.
- Les métastases et/ou trop nombreuses pour la résection ou le traitement local de tous les sites (par exemple, dans tous les segments du foie ou miliaire pulmonaire)
- En cas d'envahissement ganglionnaire massif (adénopathies mésentériques ou médiastinales) ou de lymphangite carcinomateuse pulmonaire.

5. Statut sauvage du gène RAS

Il existe 2 traitements anti-EGFR possédant l'AMM (Autorisation de mise sur le marché) dans le cancer colorectal métastatique : le cetuximab (Erbitux[®]) et le panitumumab (Vectibix[®]) (96) (**Figure 11**).

a. Le cetuximab

Le cetuximab est un anticorps monoclonal murin de type IgG1 qui se lie au domaine extracellulaire de l'EGFR. Il bloque la dimérisation de l'EGFR et interrompt la voie de signalisation inhibant ainsi le développement cellulaire, l'angiogénèse, la diffusion métastatique et induisant l'apoptose (**Figure 11**).

Le cetuximab a une indication :

- en traitement de première ligne, en association avec un traitement à base d'oxaliplatine (FOLFOX).
- en traitement de première ligne, en association avec une chimiothérapie à base d'irinotecan (FOLFIRI).
- en monothérapie en seconde ligne, en cas d'échec des traitements à base d'irinotecan ou d'oxaliplatine et en cas d'intolérance à l'irinotécan

b. Le panitumumab

Le panitumumab est un anticorps monoclonal humain, il se fixe au domaine de liaison du ligand de l'EGFR et inhibe l'autophosphorylation du récepteur induite par tous les ligands connus de l'EGFR. La fixation du panitumumab à l'EGFR a pour effet l'internalisation du récepteur, l'inhibition du développement cellulaire, de l'angiogénèse, de la diffusion métastatique et l'induction d'une apoptose (**Figure 11**).

Le panitumumab a une indication :

- en traitement de première ligne, en association avec un traitement à base d'oxaliplatine (FOLFOX).
- en traitement de première ligne, en association avec un traitement à base d'irinotecan (FOLFIRI) chez des patients qui ont déjà reçu une chimiothérapie à base de fluoropyrimidine.
- en monothérapie en seconde ligne, en cas d'échec des traitements à base de fluopyrimidine, d'irinotecan ou d'oxaliplatine.

Chez les patients exprimant la forme non mutée de RAS, l'administration du panitumumab en association avec la chimiothérapie en première ligne de traitement augmente la survie sans progression par rapport à la chimiothérapie seule (10,1 mois vs 7,8 mois / rapport de risque de 0,72) ainsi que la survie globale (26,0 mois vs 20,2 mois / rapport de risque de 0,78) (97). De même, lorsque le traitement par chimiothérapie a échoué, le cetuximab en monothérapie a permis d'augmenter la survie sans progression comparé aux soins palliatifs seuls (3,7 mois vs 1,9 mois $p < 0.001$) et la survie globale (9,5 mois vs 4,8 mois $p < 0.001$) chez les patients dont la tumeur porte une forme non mutée de KRAS (98). Des résultats similaires ont été observés pour des patients traités avec le panitumumab.

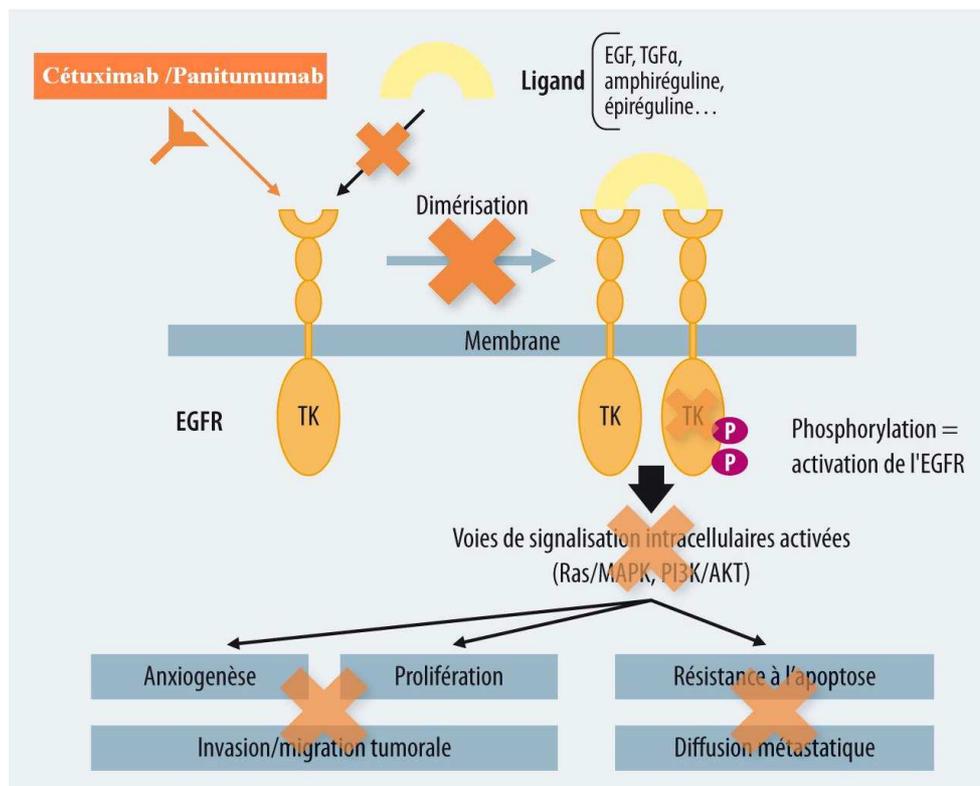


Figure 11 : Mécanismes du cetuximab et du panitumumab d'après Lièvre A. (99)

Objectifs de l'étude

A l'heure des thérapeutiques ciblées, la détection des anomalies moléculaires est indispensable et nécessite une connaissance approfondie de l'hétérogénéité tumorale. Cette hétérogénéité est identifiée en premier lieu en macroscopie puis en histologie et en biologie moléculaire. Cette dernière décennie, la connaissance moléculaire du développement du cancer s'est considérablement enrichie, en parallèle, les techniques de détections sont de plus en plus puissantes et de plus en plus sensibles. Ces outils performants permettent d'identifier les anomalies moléculaires principales du clone tumoral majoritaire qui sont potentiellement des cibles thérapeutiques mais aussi de détecter des anomalies plus rares caractérisant des clones tumoraux minoritaires qui peuvent être impliqués dans la résistance au traitement.

L'hétérogénéité tumorale est d'abord macroscopique avec des zones tumorales qui sont nécrosées, hémorragiques, remaniées et kystisées. L'étape de macroscopie est primordiale car c'est elle qui détermine le choix des zones d'intérêt pour l'examen microscopique et l'analyse moléculaire, d'où l'importance d'échantillonner la tumeur (avec un minimum d'un prélèvement par centimètre).

L'échantillonnage tumoral est indispensable pour déterminer de façon fiable le diagnostic histologique le plus précis possible : la différenciation (certaines zones tumorales peuvent être moins différenciées), le grade (par exemple le score de Gleason pour le cancer de la prostate et le score de Fuhrman pour le cancer du rein) et la présence d'un contingent minoritaire qui peut être de plus mauvais pronostic (contingent de cellules indépendantes). De plus, l'hétérogénéité tumorale morphologique peut être la conséquence d'une progression tumorale.

Il existe également une hétérogénéité phénotypique en immunohistochimie qui constitue des difficultés diagnostiques pour les marqueurs de différenciation tel que le TTF-1 (Thyroid transcription factor-1) (dans les cancers broncho-pulmonaires, c'est un marqueur de l'origine pulmonaire et de l'adénocarcinome qui peut être hétérogène en fonction de la différenciation tumorale) mais aussi pour les marqueurs de prolifération qui manquent de reproductibilité inter- et intra- observateurs.

En histologie, une tumeur est constituée de différentes sous-populations homogènes ou hétérogènes mais qui peuvent être différentes sur le plan moléculaire. Les progrès des techniques de prélèvements, de moins en moins invasives, permettent des échantillons tissulaires de plus en plus petits et/ou des échantillons cytologiques mais sont-ils représentatifs de la tumeur ?

L'étude de Longo et al. (100) a analysé des échantillons tissulaires de 4 patients atteints d'un carcinome du rein métastatique. Et 2/3 des mutations trouvées dans une biopsie donnée n'étaient pas détectables dans tous les échantillons tumoraux du même patient (101). Le fait de détecter ou pas une mutation entraîne un changement de stratégie thérapeutique (comme le CCR métastatique RAS muté qui ne bénéficiera pas de thérapie ciblée) et de pronostic.

Une question légitime peut se poser : Est-ce que l'hétérogénéité tumorale est la conséquence d'une résistance au traitement ? Pas que... Une étude menée par Jänne et al. (102) a mis en évidence dans des lignées cellulaires et dans des cancers du poumon, des sous-populations cellulaires présentant une amplification de MET avant tout traitement. Ces clones minoritaires porteurs d'anomalies moléculaires impliqués dans la résistance aux thérapies ciblées étaient donc présents avant le traitement (93).

Les mutations observées dans les métastases reflètent différents clones identifiés dans la tumeur initiale, certains clones étant enrichis. Quand plusieurs lignes de traitements ont été mises en œuvre, la métastase est soumise à une sélection induite par les différents traitements.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'hétérogénéité mutationnelle de RAS (KRAS, NRAS) et de BRAF sur plusieurs zones tumorales au sein de la tumeur initiale, du ganglion métastatique et de la métastase quand ils étaient présents.

Il s'agit d'une étude rétrospective chez des patients opérés d'un CCR au CHU de Poitiers.

Matériels et Méthodes

I. Sélection des patients

Les 18 patients sélectionnés ont été opérés au CHU de Poitiers entre 2002 et 2009. Ils ont été inclus de façon rétrospective. Les critères d'inclusion étaient un âge supérieur à 18 ans, un CCR histologiquement prouvé avec un compte rendu d'anatomie et cytologie pathologique comportant le pTNM et une recherche de mutation KRAS initiale ou postérieure au traitement chirurgical.

3 Groupes ont été définis :

- Groupe I : Six patients KRAS12-13 sauvage (limite de sensibilité 2%) sur l'analyse initiale par pyroséquençage.

- Groupe II : Six patients KRAS 12-13 faiblement muté avec une mutation détectée entre 2 et 10% sur l'analyse initiale réalisée avec la technique de pyroséquençage. Ces patients ont fait l'objet d'une analyse en biologie moléculaire antérieure par séquençage direct avec une limite de sensibilité de la technique à 25% et ils avaient été inclus dans le groupe KRAS 12-13 sauvage (2008-2009). Puis ils ont été inclus dans l'étude du Dr Tougeron et ont fait l'objet d'une analyse rétrospective en biologie moléculaire par pyroséquençage, leur phénotype s'est avéré être faiblement muté < 10%. Les taux de réponse étaient de 6,7% pour les KRAS faiblement mutés *versus* 37,0% pour KRAS sauvage ($p < 0,01$). La survie sans progression était de $2,7 \pm 0,5$ mois pour KRAS faiblement mutés *versus* $6,0 \pm 0,3$ mois pour KRAS WT (wildtype) ($p < 0,01$) (103).

- Groupe III : Six patients KRAS 12-13 muté avec une mutation détectée supérieure à 10%.

A partir de ces 18 patients, 81 échantillons tumoraux ont été analysés en biologie moléculaire pour la recherche des mutations du gène *KRAS* exon 2 (codons 12-13) (*KRAS* 12-13), exon 3 (codon 61) (*KRAS* 61), exon 4 (codon 146) (*KRAS* 146), du gène *NRAS* exon 2 (codon 12-13) (*NRAS* 12-13), exon 3 (codon 61) (*NRAS* 61) et du gène *BRAF* exon 15 (codon 600) (*BRAF*).

II. Sélection tumorale

La sélection tumorale a été faite sur lames HES (Hémalun-Erythrosine-Safran) en fonction de l'envahissement pariétal de la tumeur par deux anatomopathologistes : un médecin expérimenté et un interne.

Les sélections tumorales d'une tumeur pT3 (envahissant la musculuse) sont au nombre de 3 :

- 1 sélection tumorale pT1 : tumeur intra-muqueuse.
- 1 sélection tumorale pT2 : tumeur envahissant la sous-muqueuse.
- 1 sélection tumorale pT3 : tumeur envahissant la musculuse.

Trois tumeurs avaient un contingent minoritaire mucineux qui a fait l'objet d'une sélection tumorale propre.

Une tumeur n'avait pas de zone tumorale identifiable dans la muqueuse, la sous muqueuse et la musculuse mais seulement dans la sous séreuse. Elle a fait l'objet de 2 sélections tumorales à distance en pT3.

III. Macrodissection

Une fois la zone tumorale sélectionnée sur la lame HES, elle est reportée sur le bloc de paraffine correspondant. Cette zone sélectionnée est alors macrodisséquée, réincluse en paraffine dans un nouveau bloc numéroté. Une nouvelle lame HES est réalisée permettant de vérifier que la zone observée au microscope optique corresponde à la zone initialement sélectionnée.

IV. Détermination du pourcentage de cellules tumorales

S'en suit l'étape de détermination du pourcentage de cellules tumorales sur la zone sélectionnée. Le pourcentage de cellules tumorales a été évalué par 2 anatomopathologistes (un médecin expérimenté et un interne) allant de 5 à 90% de cellules tumorales selon les zones tumorales sélectionnées.

V. Protocole d'analyse

La recherche des mutations RAS et BRAF est effectuée par pyroséquençage.

Principe du pyroséquençage : Séquençage par synthèse où les nucléotides sont ajoutés un à un. Le nucléotide est incorporé dans le brin d'ADN en cours de synthèse et libère un pyrophosphate. Le pyrophosphate est transformé en ATP (Adénosine Triphosphate) grâce à une ATP sulfurylase. Une luciférase utilise cet ATP pour émettre un signal lumineux. Ce signal est capté par le séquenceur qui le reproduit sous la forme d'un pic sur le pyrogramme. La hauteur du pic est proportionnelle à l'intensité du signal lumineux elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides ajoutés.

La technique décrite est celle réalisée pour KRAS 12-13 et KRAS 61 à partir du kit theascreen KRAS PyroKit CE (Qiagen).

A. Déparaffinage (de la macrodissection) et extraction d'ADN

L'extraction est réalisée avec le kit QIAamp DNA-FFPE Tissue (Qiagen). La macrodissection de la zone tumorale est transférée dans un tube de 2mL. Dans chaque tube est ajouté 1mL d'histosol, les échantillons sont ensuite vortexés et centrifugés 3 minutes à 12 000g. Le surnageant est retiré et le culot est lavé avec 1mL d'éthanol 100% puis centrifugé 3 minutes à 12 000g. Le surnageant est retiré (laisser s'évaporer l'éthanol) et le culot est resuspendu avec 180µL d'ATL et 20µL de PK. Après 1h d'incubation à 56°C et 1h à 90°C, les échantillons sont vortexés et centrifugés brièvement. On ajoute alors 200µL d'AL (vortexer afin d'obtenir une solution homogène) puis 200µL d'éthanol à 100% (vortexer longuement et centrifugés rapidement). Le lysat est déposé sur une colonne d'élution puis centrifugé 1 minute à 6 000g. 500µL de solution AW1 sont ajoutés puis le tube est centrifugé 1 minute à 6 000g. Ensuite 500µL de solution AW2 sont ajoutés puis le tube est centrifugé 1 minute à 6 000g et 3 minutes à 8 000g. La colonne est placée sur un tube de 1,5mL sur lequel est noté « ADN + nom de l'analyse + numéro d'échantillon + Q (pour Qiagen) + 1 ou 2 (pour 1^{ère} ou 2^{ème} extraction). Les échantillons sont élués avec 80µL de tampon d'élution ATE, incubés 5 minutes à température ambiante et centrifugés 1 minute à 8000g. A partir de cette étape, l'ADN se trouve dans l'éluat. Il sera stocker à -80°C.

B. Préparation de mix PCR pour pyroséquençage

Les analyses KRAS 12-13 et KRAS 61 sont effectuées avec le kit Therascreen KRAS PyroKit CE (Qiagen).

Les autres analyses KRAS 146, NRAS 12-13, NRAS61 et BRAF ont été réalisées pour des raisons financières avec des amorces conçues sur site et sont en cours de publication, leurs descriptions ne peuvent être mentionnées.

Le mix PCR est préparé selon les indications du fournisseur Qiagen. Pour un échantillon, les volumes suivants sont ajoutés :

-7.0 μ L d'eau (High Purity)

-12.5 μ L HotStarTaq Plus Master Mix (2x)

-2.5 μ L CoralLoad concentrate (10x)

-1.0 μ L PCR Primers biotinylés (les séquences des amorces ne sont pas transmises par le fournisseur QIAGEN).

Au total le micro tube numéroté contient : 23 μ L de mix par échantillon + 2 μ L d'ADN

C. Amplification

La PCR (réaction de polymérisation en chaîne) est réalisée dans un thermocycleur (Applied Veriti) :

- 15 minutes à 95°C

- 20 secondes à 95°C

- 30 secondes à 53°C

- 20 secondes à 72°C

- 5 minutes à 72°C

- L'échantillon est maintenu à une température de 8°C

} 1 cycle x 42

D. Pyroséquençage des produits de PCR

La plaque de dosage des amplicons est configurée à l'aide du logiciel PyroMark Q24 et stockée sur clé USB. Les amplicons sont identifiés sur les puits. Chaque plaque PyroMark Q24 comporte un contrôle blanc (mix réactionnel sans ADN), un contrôle non muté (non ADN non méthylé fourni dans le kit) et un contrôle muté (ADN lignée mutée).

Préparation de la solution de billes par puits :

- 1 μL de Billes de sépharose
- 40 μL de PyroMark Binding buffer
- 29 μL d'eau ultra pure

Dans une plaque PCR 24 puits, la solution est ajoutée (70 μL par puits). Conformément à la configuration de la plaque, 10 μL de produit PCR biotinylés sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est recouverte d'un film adhésif puis agitée de façon constante (1 400 rpm) pendant 5 à 10 minutes.

Les 5 cuves de la station de travail sont préparées selon le schéma suivant (**Figure 12**) :

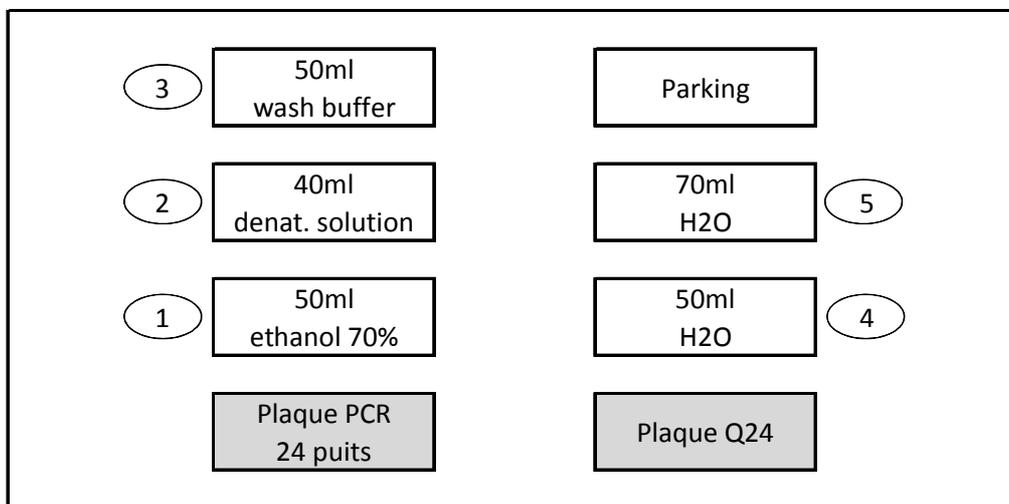


Figure 12 : Station de travail Qiagen pour la préparation des échantillons

Le tampon « Wash buffer » (10X) et « Denat solution » sont compris dans le kit Qiagen. Le tampon « Wash buffer » est préalablement dilué au 1X avant utilisation.

Avant toutes manipulations le vide est appliqué dans le « hérisson » et les filtres sont lavés avec de l'eau stérile (cuve 5).

Préparation du mix Primer Seq (25 μL par puits) :

- Amorces (Primers Seq) : 0.8 μL (Séquences des amorces 12-13, 61 (KRAS) non transmises par le fournisseur Qiagen, les séquences des amorces des codons 146 (KRAS), 12-13, 61 (NRAS) et 600 (BRAF) sont en cours de publication).

- Annealing buffer : 24.2 μL

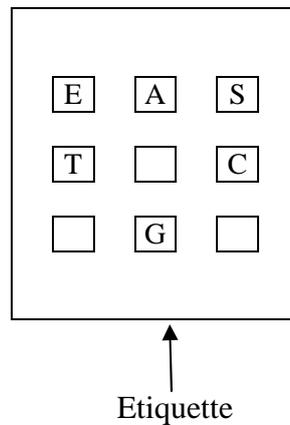


Figure 13: Illustration du système d'aspiration « hérisson » (Manuel du kit therascreen KRAS 12-13, KRAS 61 Pyro 07/2011)

Dans une plaque Pyromark Q24, la solution préparée ci-dessus est déposée. La plaque PCR 24 puits et la plaque Pyromark Q24 sont placées sur la station de travail en s'assurant de l'orientation des 2 plaques. Le vide est appliqué dans le « hérisson » afin de capturer les billes sur les filtres du « hérisson » en les plongeant soigneusement dans la plaque PCR pendant 15 secondes. Le « hérisson » est déplacé dans la cuve 1 contenant l'éthanol à 70% pendant 5 secondes (maintenir en l'air en position verticale pendant quelques secondes afin d'évacuer tout le liquide) puis dans la cuve 2 contenant la solution de dénaturation et pendant 5 secondes (maintenir en l'air en position verticale pendant quelques secondes afin d'évacuer tout le liquide). Le « hérisson » est ensuite placé dans la cuve 3 contenant le tampon de lavage pendant 10 secondes. Les billes contenues sur le « hérisson » sont libérées (arrêt du vide) dans la plaque PyroMark Q24. Ensuite les filtres du « hérisson » sont lavés successivement dans les cuves 4 et 5 contenant de l'eau.

La plaque PyroMark Q24 est incubée pendant 2 minutes dans l'étuve à 80°C puis refroidie pendant au moins 15 minutes à température ambiante.

La cartouche de réactif PyroMark Q24 Cartridge est remplie selon les volumes calculés (selon le logiciel Pyromark) en suivant le schéma ci-dessous (**Figure 14**) :



E= enzyme, S= substrat, A, T, C, G= nucléotides

Figure 14 : Schéma de la cartouche de réactif PyroMark Q24 Cartridge

Le pyroséquenceur est allumé, la cartouche chargée et la plaque PyroMark Q24 placée sur le bloc. Le « run » est transféré sur le pyroséquenceur à l'aide de la clé USB. Lorsque le « run » est terminé, les résultats se trouvant sur la clé USB sont analysés.

Pour chaque gène, une séquence d'injection est auparavant enregistrée dans le programme du pyroséquençage. Ces séquences d'injection prennent en compte les mutations recherchées pour le gène cible.

Les séquences d'injection sont les suivantes :

KRAS 12-13 : TACGACTCAGATCGTAG

KRAS 61 : GCTCAGTCAGACT

KRAS 146 : GATCAGCTGAGC

NRAS 12-13 : TACGACTCAGCATCGTAGAG

NRAS 61 : TCGTATCGAGAG

BRAF 600 : TCGTATCTGTAG

E. Analyse des résultats

L'analyse des résultats est réalisée à l'aide du logiciel PyroMark Q24. Le logiciel analyse la séquence produite en tenant compte de la séquence d'analyse du gène cible.

1. Les analyses effectuées avec le kit Therascreen KRAS PyroKit CE (Qiagen)

KRAS Exon 2 (en rouge codon 12 et codon 13)

5'- GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTA
GGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATG
ATCCAACAATAGAG -3'

Séquences d'analyse : NGTGR**RC**GTAGGC et G**NTGR**CGTAGGC

N : Toutes les bases (A, C, G ou T)

R : A ou G

KRAS Exon 3(en rouge codon 61)

5'-TCAGGATTCCTACAGGAAGCAAGTAGTAATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGG
ATATTCTCGACACAGCAGGT**CAA**GAGGAGTACAGTGCAATGAGGGACCAGTACA
TGAGGACTGGGGAGGGCTTTCTTTGTGTATTTGCCATAAATAACTAAATCATTT
GAAGATATTCACCATTATAG-3'

Séquences d'analyse : CTCD**D**TGACCTG et CTCT**H**GACCTG et CTCT**T**KACCTG

D : A, T ou G

H : A, T ou C

K : T ou G

Substitution d'acide nucléique	Substitution d'un acide aminé	LoB (unités %)	LoD (unités %)
Codon 12 (GGT)			
GAT	G12D	0,6	2,2
GTT	G12V	0	1,0(7)
TGT	G12C	0,5	2,1
AGT	G12S	0,4	1,9
GCT	G12A	0,7	2,3
CGT	G12R	0,3	1,8
Codon 13 (GGC)			
GAC	G13D	0,3	1,9
Codon 61 (CAA) analysé en orientation antisens (TTG)			
GTG	Q61H	0,8	2,8
TAG	Q61L	1,2	3,1
TCG	Q61R	1,6	3,5
ATG	Q61H	0,7	2,6
TTC	Q61E	1,2	3,1

Tableau 11 : LoB et LoD déterminées pour des mutations spécifiques (Manuel du kit therascreen KRAS 12-13, KRAS 61 Pyro 07/2011)

LOB : Limite du blanc est la plus forte concentration apparente de l'analyse apparente qui devrait être trouvée lors de répétitions d'un échantillon témoin WT ne contenant pas les mutations testées (104).

LOD : Limite de détection est la plus faible concentration d'un analyte susceptible d'être distinguée de manière fiable à partir de la LOB et au cours de laquelle la détection est possible (104)

Les LOB et LOD du kit KRAS 12-13, 61 sont déterminées par Qiagen.

2. Les analyses « techniques établies sur site »

KRAS 146 Exon 4 (en rouge codon 146)

5'-TATAACTTTTTTTCTTTCCAGAGAACAATTTAAAAGAGTTAAGGACTCTGA
AGATGTACCTATGGTCCTAGTAGGAAATAAATGTGATTTGCCTTCTAGAACAGTA
GACACAAAACAGGCTCAGGACTTAGCAAGAAGTTATGGAATTCCTTTTATTGAAA
CATCAGCAAGACAAGACAG-3'

Séquences d'analyse : ATCAVCAAAGA, ATCAGBAAAGA

V : A, C ou G

B : C, T ou G

A146T	A146P	A146G	A146V
<i>Codon 146</i>	<i>Codon 146</i>	<i>Codon 146</i>	<i>Codon 146</i>
ACA	CCA	GGA	GTA

NRAS Exon 2 (en rouge codon 12 et codon 13)

5'-CTTTAAAGTACTGTAGATGTGGCTCGCCAATTAACCCTGATTACTGGTTTCCAA
CAGGTTCTTGCTGGTGTGAAATGACTGAGTACAACTGGTGGTGGTTGGAGCAGG
TGGTGTGGGAAAAGCGCACTGACAATCCAGCTAATCCAGAACCCTTTGTAGAT
GAATATGATCCCACCATAGAG-3'

Séquences d'analyse : GNTGNTGTTGGGAAAAGC NGTNGTGTGGGAAAAGC

G12S	G12R	G12C	G12D	G12A	G12V
<i>Codon 12</i>					
AGT	CGT	TGT	GAT	GCT	GTT

NRAS Exon 3 (en rouge codon 61)

5'-CCTCCCTCCCTGCCCCCTTACCCTCCACACCCCCAGGATTCTTACAGAAAACAA
GTGGTTATAGATGGTGAACCTGTTTGGTGGACATACTGGATACAGCTGGACAAG
AAGAGTACAGTGCCATGAGAGACCAATACATGAGGACAGGCGAAGGCTTCCTCT
GTGTATTTGCCATCAATAATAGCAAGTCATTTGCGGATATTAACCTCTACAG-3'

Séquence d'analyse : CNAGAAGAGTA -VAAGAAGAGTA- CANGAAGAGTA

CNA		VAA	CAN		
CGA-Q61R	CTA-Q61L	AAA- Q61K	CAC-Q61H	CAG-Q61Q	CAT-Q61H

BRAF Exon 15 (codon 600)

5'-ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCT
ACA^{GTG}AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCA
TTTTGTGGATG-3'

Séquences d'analyse : CWCTGTAGC, CAYTGTAGC, CVCTGTAGC

W : T ou A

Y : Cou T

V600E	V600G	V600A	V600M
GAG (CTC)	GGG (CCC)	GCG (CGC)	ATG (CAT)

Les LOB et LOD des techniques établies sur site sont calculées selon les formules :

- LOB : $\mu_{wt} + 1.645 SD$
- LOD : $\mu_{wt} + 3X SD_{wt}$
- μ_{wt} : moyenne obtenue avec un échantillon wt
- SD : écart-type

3. Interprétation biologique

L'interprétation biologique prend en compte les LOB et les LOD, les témoins positifs, négatifs et les blancs d'une part et le taux de la mutation de l'échantillon d'autre part. Selon le taux de la mutation l'échantillon est considéré muté ou non muté.

Si le taux de mutation est $< \text{LOD}$, il s'agit d'un cas non muté (WT).

Si le taux de mutation est $\geq \text{LOD}$ et $\leq \text{LOD} + 3$ unités %, il s'agit d'un cas avec un taux faible de mutation (PLLM : potentiel low level mutation).

Si le taux de mutation est $> \text{LOD} + 3$ unités %, il s'agit d'un cas muté (MUT).

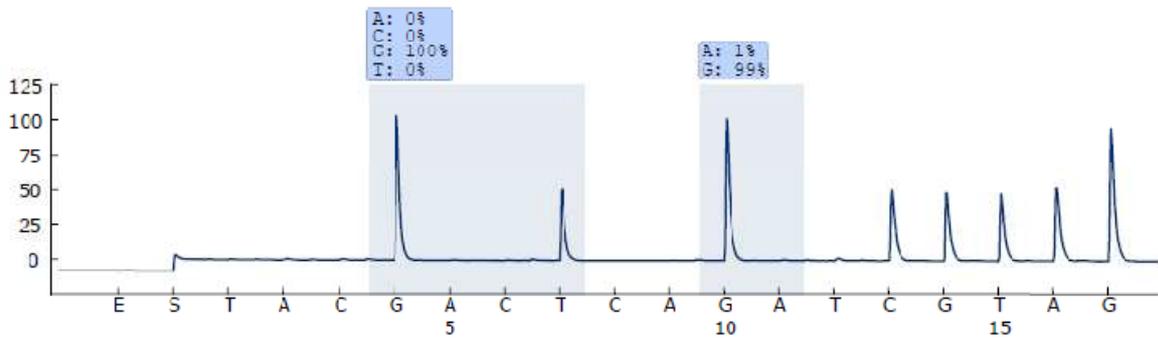


Figure 15 : Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotype sauvage des codons 12 et 13 (KRAS Exon 2)

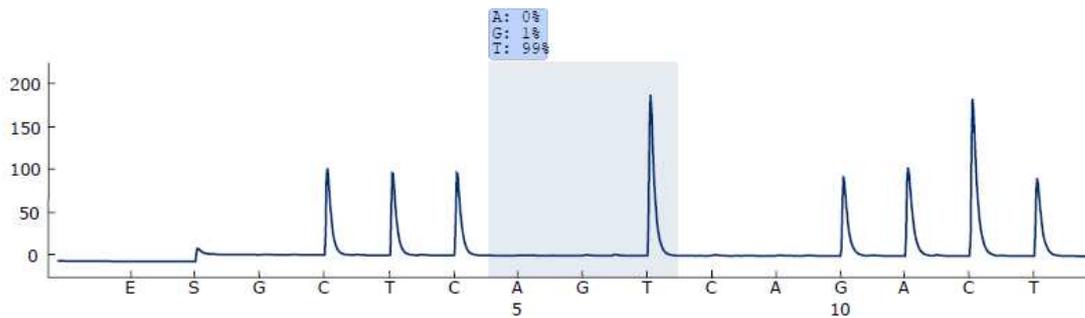


Figure 16 : Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotype sauvage des codons 61 (KRAS Exon 3)

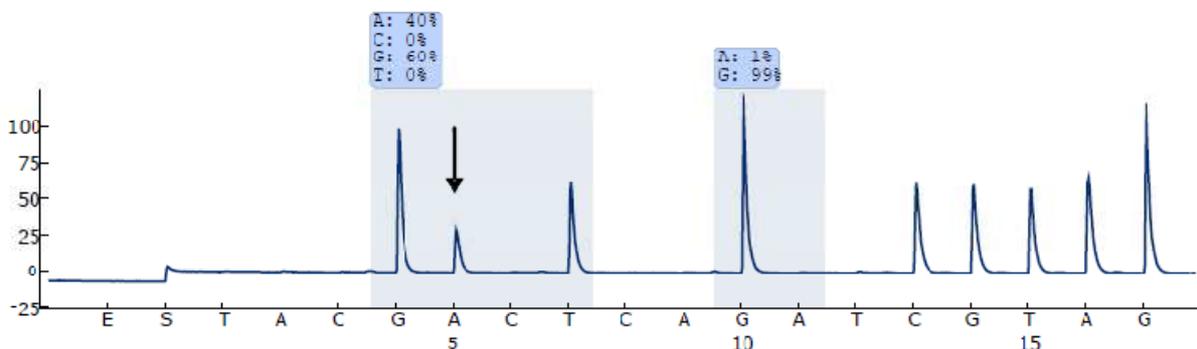


Figure 17 : Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant une mutation GGT → GAT (substitution d'une Glycine par un Acide aspartique au niveau du codon 12 (KRAS Exon 2))

Résultats

I. Caractéristiques anatomopathologiques et cliniques des 18 patients

Au total 18 patients ont été inclus et 81 échantillons tumoraux ont été réalisés. Chaque échantillon a fait l'objet de 6 analyses en biologie moléculaire : KRAS 12-13, KRAS 61, KRAS 146, NRAS 12-13, NRAS 61 et BRAF.

Il y avait exactement autant de femmes (50%) que d'hommes (50%). L'âge moyen au diagnostic était de 66.1 ans avec un écart type de 9.1 ans (51 ans à 79 ans). Et 38.9 % avaient moins de 60 ans.

Concernant la stadification pTNM des tumeurs, 5.5% étaient pT2, 77.8% pT3 et 16.7% pT4a. 55, 6% des tumeurs avaient un envahissement ganglionnaire. Une seule tumeur était métastatique au moment du diagnostic. 5.5% des tumeurs étaient de stade I, 33, 3% de stade II, 55.6% de stade III et 5.5% de stade IV.

Les caractéristiques cliniques et anatomopathologique des patients sont présentées dans le **Tableau 12** ci-dessous :

Sex Ration	
Homme	9 (50%)
Femme	9 (50%)
Age	
Moyenne	66,1 avec un écart type 9,1
< 60 ans	7 (38,9%)
> 60 ans	11 (61,1%)
pTNM	
T2	1 (5,5%)
T3	14 (77,8%)
T4a	3 (16,7%)
N0	8 (44,4%)
N1a	1 (5,5%)
N1b	3 (16,7%)
N2a	1 (5,5%)
N2b	5 (27,8%)
M+	1 (5,5%)
Thérapie Ciblée (Cetuximab ou Panitumumab)	
10 (55,6%)	

Tableau 12 : Caractéristiques clinique et anatomopathologique des patients

II. Caractéristiques moléculaires des 18 patients :

A. Description des différents groupes

1. Groupe I. Analyse KRAS 12-13 initiale : WT

- Patient 1 : Analyse initiale BRAF WT et MSS. Toutes les analyses moléculaires des différentes sélections tumorales étaient non mutées.
- Patient 2 : Analyse initiale BRAF WT et MSS. L'analyse KRAS 12-13 de sélection T3 montrait la présence d'une mutation G13D (l'acide aminé Glycine est remplacé par un acide aminé Acide aspartique au niveau du codon 13) à 22,5%. Les autres analyses de l'ADN initial, T2 et du ganglion étaient sauvages. Ce patient présente une hétérogénéité tumorale KRAS 12-13 avec deux clones distincts identifiés : un clone sauvage et un clone muté G13D.
- Patient 3 : Analyse initiale BRAF WT (statut MSI non fait). Toutes les analyses moléculaires des différentes sélections tumorales étaient non mutées.
- Patient 4 : Analyse initiale BRAF V600E muté et MSI. Toutes les analyses moléculaires KRAS et NRAS étaient sauvages. La nouvelle analyse de l'échantillon initial et l'analyse de la sélection tumorale T2 étaient BRAF V600E mutées respectivement à 5,6% et 28,3%, alors que la sélection tumorale T1 était sauvage. Ce patient présente une hétérogénéité tumorale BRAF V600E avec deux clones distincts identifiés : un clone sauvage et un clone muté BRAF V600E.
- Patient 5 : Analyse initiale BRAF WT (statut MSI non fait). Toutes les analyses moléculaires des différentes sélections tumorales étaient non mutées.
- Patient 6 : Analyse initiale BRAF WT et MSS. Toutes les analyses moléculaires des différentes sélections tumorales étaient non mutées.

2. Groupe II. Analyse KRAS 12-13 Initiale : PLLM

- Patient 7 : Analyse initiale BRAF WT, KRAS 12-13 PLLM G12S à 2%.
L'ADN initial a été vérifié par une nouvelle analyse. Ce clone a également été retrouvé au niveau des sélections tumorales T1 et T2 (PLLM G12S à 3,3% et muté G12S à 31,7%). Les sélections (T3 et ganglion) étaient non mutées. Une deuxième extraction de la sélection

tumorale T1 demandée par erreur, a montré la présence d'une autre mutation en position 12 (G12D à 6,8%). La présence de cette nouvelle mutation ainsi que celle de la première extraction en T1 ont été revérifiées et à nouveau retrouvées (PLLM G12S 2,8% et PLLM G12D 2,7% respectivement pour la 1ère et la 2ème extraction).

Concernant l'analyse KRAS 61, la sélection tumorale initiale ne montrait pas de mutation. T2 présentait une mutation Q61L à 7%. Les sélections tumorales en T1 (1ère et deuxième extractions), T2 et en T3 présentaient une mutation Q61L PLLM à 4,2%, PLLM à 4,1%, à 7% et PLMM à 3,9% respectivement. La sélection tumorale ganglionnaire était non mutée. Les analyses KRAS 146, NRAS 12-13 et BRAF V600E étaient non mutées. Elles n'ont pas été réalisées pour la deuxième extraction de T1.

Concernant l'analyse NRAS 61, les quatre sélections tumorales T1, T2, T3 et le ganglion ont été retrouvées mutées Q61K à 49%, 29%, 29% et 22% respectivement.

Au total, ce patient a une hétérogénéité tumorale avec la présence de clones non mutés et de plusieurs clones mutés KRAS G12S, G12D, Q61L et NRAS Q61K.

- Patient 8 : Analyse initiale BRAF WT et KRAS 12-13 PLLM G12V à 2%.

L'analyse KRAS 12-13 de toutes les sélections tumorales étaient mutées G12V (9.4% à 38.8%). Toutes les autres analyses moléculaires étaient non mutées.

- Patient 9 : Analyse initiale BRAF WT et KRAS 12-13 PLLM G12S à 2%.

L'ADN initial a subi une nouvelle analyse KRAS 12-13 montrant un PLLM G12S à 3,8%. Toutes les autres sélections tumorales étaient non mutées.

Concernant l'analyse KRAS 61, l'analyse de l'ADN initial montrait un PLLM Q61R à 3,8%. Les autres sélections tumorales étaient non mutées.

Concernant l'analyse NRAS 61, toutes les sélections tumorales étaient mutées Q61R (36 à 53%).

Les autres analyses KRAS 146, NRAS 12-13 et BRAF V600E étaient non mutées.

Au total, ce patient présente une hétérogénéité tumorale avec des clones sauvages et des clones mutés KRAS G12S, Q61R et NRAS Q61R.

- Patient 10 : Analyse initiale BRAF WT et KRAS 12-13 PLLM G12D à 2%.

L'analyse de l'ADN initial pour KRAS 12-13 montrait également un PLLM G12D à 2%. Toutes les autres sélections tumorales concernant KRAS 12-13 et les autres analyses étaient non mutées. Ce patient présente une hétérogénéité tumorale avec deux clones distincts identifiés : un clone sauvage et un clone G12D.

- Patient 11 : Analyse initiale BRAF WT et KRAS 12-13 PLLM G12D à 2%.

L'analyse de l'ADN initial et de la sélection tumorale T3 montraient un PLLM G12D respectivement à 4,1% et à 2,4%. Les sélections tumorales T2 et ganglion étaient mutées G12D à 5,3% et 5,5% respectivement. Toutes les autres analyses étaient WT. Ce patient présente un clone muté KRAS G12D.

- Patient 12 : Analyse initiale BRAF WT et KRAS 12-13 PLLM G12D à 2%.

L'analyse de l'ADN initial montrait également un PLLM G12D à 3,6%. Toutes les autres sélections tumorales étaient non mutées.

Concernant l'analyse KRAS 61, la sélection tumorale T3 montrait un PLLM Q61L à 4,2%. Toutes les autres sélections tumorales étaient non mutées.

Concernant l'analyse KRAS 146, les sélections tumorales initiales T3 et T3bis montraient une mutation A146T respectivement à 70%, 19% et 47%. La sélection tumorale Métastase était sauvage.

Au total, Ce patient présente une hétérogénéité tumorale avec des clones sauvages et des clones mutés KRAS G12D, Q61H et A146T.

3. Groupe III. Analyse KRAS 12-13 Initiale : Mutée

- Patient 13 : Analyse initiale BRAF WT, MSS et KRAS 12-13 mutée G12V.

Toutes les sélections tumorales montraient une mutation KRAS G12V de 20,1% à 53,4%. Toutes les autres analyses étaient WT.

- Patient 14 : Analyse initiale BRAF WT, MSS et KRAS 12-13 mutée G12V.

Les sélections tumorales initiale, T1 et T2 montraient une mutation G12V respectivement à 13%, 4,2% et 14,8%. La sélection tumorale T3 était PLLM G12V à 3,8%. La sélection tumorale ganglion était WT avec 5 % de cellules tumorales. Pour comparaison, les sélections tumorales T1 et T3 avaient également 5% de cellules tumorales et étaient respectivement mutées G12V à 4,2% et PLLM G12V à 3,8%. Toutes les autres analyses étaient non mutées. Ce patient présente une hétérogénéité tumorale avec deux clones distincts identifiés : un clone sauvage et un clone KRAS G12V.

- Patient 15 : Analyse initiale BRAF WT et KRAS 12-13 mutée G12D.

Toutes les sélections tumorales montraient une mutation KRAS G12D (34,5 à 46,3%). Toutes les autres analyses étaient non mutées. Ce patient présente un clone muté KRAS G12D.

- Patient 16 : Analyse initiale BRAF WT et KRAS 12-13 mutée G12V.

Toutes les sélections tumorales montraient une mutation G12V (13,8 à 46,3%). Toutes les autres analyses étaient non mutées. Ce patient présente un clone muté KRAS G12V.

- Patient 17 : Analyse KRAS 12-13 Initiale mutée G12V :

Toutes les sélections tumorales montraient une mutation G12V (10 à 25,4%).

Concernant l'analyse NRAS 61, la sélection tumorale initiale montrait un PLLM Q61K à 7%. Toutes les autres sélections tumorales et les autres analyses étaient non mutées.

Au total, ce patient présente une hétérogénéité tumorale avec des clones KRAS G12V et NRAS Q61K.

- Patient 18 : Analyse initiale BRAF WT, MSS et KRAS 12-13 mutée G12R.

Toutes les sélections tumorales montraient une mutation G12R (29,4 à 56,5%). Toutes les autres analyses étaient non mutées. Ce patient présente un clone muté KRAS G12R.

B. Synthèse des analyses moléculaires des 18 patients

Dans une tumeur : on peut avoir des zones mutées et non mutées pour un gène donné : hétérogénéité spatiale (T1 muté et T2 sauvage par exemple). Et la même zone tumorale peut présenter plusieurs mutations d'un même gène (KRAS 12-13 et 146 par exemple) ou des mutations de deux gènes différents (KRAS et NRAS par exemple) : hétérogénéité mutationnelle. Les deux peuvent coexister.

Les résultats sont résumés dans les **Tableaux 13** et **14**.

1. Hétérogénéité spatiale

La tumeur présente en son sein des zones mutées et non mutées pour un gène donné (KRAS, NRAS ou BRAF). Ces clones sont soit fortement ou soit faiblement mutés.

a. Patients avec un clone sauvage et un clone fortement muté dans des zones tumorales différentes

5 patients/18 présentent une hétérogénéité des différentes zones tumorales pour au moins une analyse : présence d'un clone sauvage et d'au moins un clone fortement muté pour la même analyse.

- Patient 2 : 2 clones KRAS 12-13: 1 clone WT / 1 clone G13D
- Patient 4 : 2 clones BRAF : 1 clone WT / 1 clone V600E
- Patient 7 : 3 clones KRAS 12-13: 1 clone WT / 1 clone G12S/ 1 clone G12D
2 clones KRAS 61: 1 clone WT / 1 clone Q61L
- Patient 12 : 2 clones KRAS 146 : 1 clone WT / 1 clone A146T
- Patient 14 : 2 clones KRAS 12-13: 1 clone WT / 1 clone G12V

Dans notre étude, 27,7 % des patients présentent une hétérogénéité tumorale pour au moins une analyse.

b. Patients avec un clone sauvage et un clone faiblement muté (PLLM) dans des zones tumorales différentes

Si on prend en compte les sélections tumorales faiblement mutées PLLM (dont le pourcentage de mutation est compris entre la LOD et la LOD +3%): 3 patients sont concernés :

- Patient 9 : 2 clones KRAS 12-13: 1 clone WT / 1 clone PLLM G12S
2 clones KRAS 61/ 1 clone WT / 1 clone PLLM Q61R
- Patient 10 : 2 clones KRAS 12-13: 1 clone WT / 1 clone PLLM G12D
- Patient 17 : 2 clones NRAS 61 : 1 clone WT / 1 clone PLLM Q61K
- Patient 12 : présente en plus de ces deux clones KRAS 146 :
2 clones KRAS 12-13: 1 clone WT / 1 clone PLLM G12D
2 clones KRAS 61: 1 clone WT / 1 clone PLLM Q61H

En prenant en compte les sélections tumorales faiblement mutées (PLLM) : 8 patients / 18 présentent une hétérogénéité tumorale pour au moins une analyse soit 44,4% des patients.

2. Hétérogénéité mutationnelle

Au sein d'une tumeur, une zone tumorale peut avoir plusieurs gènes mutés.

Quatre patients présentent plusieurs mutations. Hors les mutations dans le CCR sont exclusives avec les connaissances actuelles : pour exemple 1 clone tumoral KRAS 12-13 ne peut pas être muté sur les autres analyses.

- Patient 7 : 2 mutations KRAS 12-13 / 1 mutation KRAS 61 / 1 mutation NRAS 61
- Patient 9 : 1 mutation PLLM KRAS 12-13 / 1 mutation PLLM KRAS 61 / 1 mutation NRAS 61
- Patient 12 : 1 mutation PLLM KRAS 12-13 / 1 mutation PLLM KRAS 61 / 1 mutation KRAS 146
- Patient 17 : 1 mutation KRAS 12-13 / 1 mutation PLLM NRAS 61

Les dix autres patients ne présentaient pas d'hétérogénéité tumorale spatiale ou mutationnelle. Quatre patients avaient un statut sauvage dans toutes les sélections tumorales pour les analyses de tous les gènes. Six patients présentaient la même mutation dans toutes les sélections tumorales pour une analyse donnée.

	KRAS 12-13	KRAS 61	KRAS 146	NRAS 12-13	NRAS 61	BRAF V600E
Patient 2	WT/ G13D	WT	WT	WT	WT	WT
Patient 4	WT	WT	WT	WT	WT	WT/V600E
Patient 7	WT/G12S/G12D	WT/Q61L	WT	WT	Q61K	WT
Patient 9	WT/G12S	WT/Q61R	WT	WT	WT	WT
Patient 10	WT/G12D	WT	WT	WT	WT	WT
Patient 12	WT/G12D	WT/Q61H	WT/A146T	WT	WT	WT
Patient 14	WT/G12V	WT	WT	WT	WT	WT
Patient 17	G12R	WT	WT	WT	WT/Q61K	WT

Tableau 13: 8 patients présentant une hétérogénéité tumorale

Rouge: fortement muté

Vert: faiblement muté

A noter que parmi les 18 patients, dix ont reçu une thérapie ciblée (Cetuximab ou Panitumumab). Parmi les 10, trois patients se sont avérés être non mutés sur toutes les sélections tumorales. Six patients présentent au moins une sélection tumorale KRAS ou NRAS mutée (soit 60%) et un patient a au moins une sélection tumorale PLLM (10%). Au total 70% des patients ayant reçu un traitement par Cetuximab ou Panitumumab avaient au moins une sélection tumorale KRAS ou NRAS PLLM ou mutée.

Numéro Patient	p TNM	% C tumorales	KRAS 12-13	KRAS 61	KRAS 146	NRAS 12-13	NRAS 61	BRAF	MSI
1	Initial	40	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MSS
1	T1	90	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
1	T2	40	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
1	T3	30	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
1	GG	70	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
2	Initial	80	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MSS
2	T2	15	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
2	T3	20	MUT G13D 22,5	WT	WT	WT	WT	WT	NF
2	GG	5	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
3	Initial	80	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
3	T1	60	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
3	T2	40	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
3	T3	10	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
3	GG	5	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
4	Initial	70	WT	WT	WT	WT	WT	MUT V600E 5,6	MSI
4	T1	30	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
4	T2	90	WT	WT	WT	WT	WT	MUT V600E 28,3	NF
5	Initial	80	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
5	T1	90	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
5	T2	75	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
5	T3	25	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
6	Initial	100	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MSS
6	T1	60	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
6	T2	30	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
7	Initial	NC	PLLM G12S 2,2	WT	FA	WT	FA	WT	NF
7	T1 1ère extraction	70	PLLM G12S 3,3	PLLM Q61L 4,2	WT	WT	MUT Q61K 49	WT	NF
7	T1 2ème extraction	70	MUT G12D 6,8	PLLM Q61L 4,1	NF	NF	NF	NF	NF
7	T2	25	MUT G12S 31,7	MUT Q61L 7	WT	WT	MUT Q61K 29	WT	NF
7	T3	40	WT	PLLM Q61L 3,9	WT	WT	MUT Q61K 29	WT	NF
7	GG	25	WT	WT	WT	WT	MUT Q61K 22	WT	NF
8	Initial	30	MUT G12V 9,4	WT	WT	WT	WT	WT	NF
8	T1	60	MUT G12V 26,4	WT	WT	WT	WT	WT	NF
8	Mucineux	90	MUT G12V 38,8	WT	WT	WT	WT	WT	NF
8	T2	75	MUT G12V 36,4	WT	WT	WT	WT	WT	NF
8	T3	60	MUT G12V 32,6	WT	WT	WT	WT	WT	NF
8	GG	80	MUT G12V 31,4	WT	WT	WT	WT	WT	NF
9	Initial	70	PLLM G12S 3,8	PLLM Q61R 3,8	WT	WT	MUT Q61R 43	WT	NF
9	T1	95	WT	WT	WT	WT	MUT Q61R 44	WT	NF
9	T2	70	WT	WT	WT	WT	MUT Q61R 53	WT	NF
9	T3	25	WT	WT	WT	WT	MUT Q61R 36	WT	NF
10	Initial	30	PLLM G12D 2	WT	WT	WT	WT	WT	NF
10	T1	20	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
10	T2	25	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
10	T3	30	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
10	GG	30	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
11	Initial	5	PLLM G12D 4,1	WT	WT	WT	WT	WT	NF
11	T2	5	MUT G12D 5,3	WT	WT	WT	WT	WT	NF
11	T3	5	PLLM G12D 2,4	WT	WT	WT	WT	WT	NF
11	GG	5	MUT G12D 5,5	WT	WT	WT	WT	WT	NF
12	Initial	40	PLLM G12D 3,6	WT	MUT A146T 70	WT	WT	WT	NF
12	T3	20	WT	PLLM Q61H 4,2	MUT A146T 19	WT	WT	FA	NF
12	Autre zone	15	WT	WT	MUT A146T 47	WT	WT	WT	NF
12	Méta	25	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
13	Initial	70	MUT G12V 22,6	WT	WT	WT	WT	WT	MSS
13	T1	70	MUT G12V 53,4	WT	WT	WT	WT	WT	NF
13	T2	10	MUT G12V 31,4	WT	WT	WT	WT	WT	NF
13	Mucineux	30	MUT G12V 27,6	WT	WT	WT	WT	WT	NF
13	T3	15	MUT G12V 20,1	WT	WT	WT	WT	WT	NF
14	Initial	30	MUT G12V 13	WT	WT	WT	WT	WT	MSS
14	T1	5	MUT G12V 4,2	WT	WT	WT	WT	WT	NF
14	T2	40	MUT G12V 14,8	WT	WT	WT	WT	WT	NF
14	T3	5	PLLM G12V 3,8	WT	WT	WT	WT	WT	NF
14	GG	5	WT	WT	WT	WT	WT	WT	NF
15	Initial	40	MUT G12D 36,6	WT	WT	WT	WT	WT	NF
15	T1	60	MUT G12D 46,3	WT	WT	WT	WT	WT	NF
15	T2	15	MUT G12D 34,8	WT	WT	WT	WT	WT	NF
15	T3	20	MUT G12D 34,5	WT	WT	WT	WT	WT	NF
15	GG	40	MUT G12D 59,2	WT	WT	WT	WT	WT	NF
16	Initial	40	MUT G12V 22	WT	WT	WT	WT	WT	NF
16	T1	80	MUT G12V 46,3	WT	WT	WT	WT	WT	NF
16	T2	40	MUT G12V 31,2	WT	WT	WT	WT	WT	NF
16	T3	10	MUT G12V 13,8	WT	WT	WT	WT	WT	NF
17	Initial	30	MUT G12V 10	WT	WT	WT	PLLM Q61K 7	WT	MSS
17	T1	30	MUT G12V 20,5	WT	WT	WT	WT	WT	NF
17	T2	20	MUT G12V 13,9	WT	WT	WT	WT	WT	NF
17	T3	10	MUT G12V 25,4	WT	WT	WT	WT	WT	NF
17	GG	20	MUT G12V 16	WT	WT	WT	WT	WT	NF
18	Initial	80	MUT G12R 48,3	WT	WT	WT	WT	WT	NF
18	T1	30	MUT G12R 29,4	WT	WT	WT	WT	WT	NF
18	T2	35	MUT G12R 46,5	WT	WT	WT	WT	WT	NF
18	T3	20	MUT G12R 56,5	WT	WT	WT	WT	WT	NF
18	Mucineux	80	MUT G12R 54,4	WT	WT	WT	WT	WT	NF

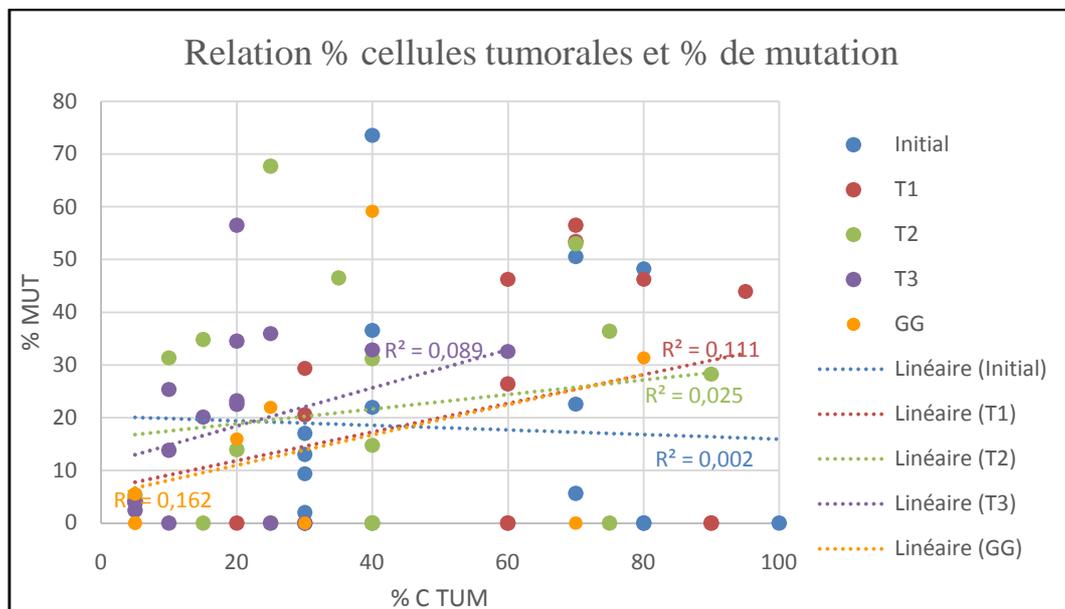
Tableau 14 : Résultats des analyses KRAS 12-13, 61,146, NRAS 12-13, 61 et BRAF

NF : non fait, FA : faillied analyse

III. Relation entre le pourcentage de cellules tumorales et le pourcentage de mutation retrouvée

Dans un deuxième temps, nous avons voulu étudier la relation potentielle entre le pourcentage de cellules tumorales des différentes zones et le pourcentage de mutation observée.

Chaque sélection tumorale était intégrée dans un des cinq groupes : Initial, T1, T2, T3 ou ganglion pour maintenir l'indépendance des échantillons ; ceci facilitant la comparaison des résultats (**Graphique 1**). Nous avons réalisé un test de corrélation de Spearman (non paramétrique) dont les résultats obtenus ne sont pas significatifs (**Tableau 15**). De plus les cinq droites de corrélation (modèles linéaires) ont des coefficients de performance/détermination (R^2) compris entre 0,002 et 0,162. Ce taux très faible confirme donc que nous ne pouvons pas mettre en évidence de corrélation entre le pourcentage de cellules tumorales et le pourcentage de mutation. Nous pouvons cependant observer une « influence » pour les groupes T1, T2 et T3 et ganglion : plus on observe un pourcentage élevé de cellules tumorales plus le risque d'avoir un pourcentage de mutation élevé est important. Ces résultats doivent être interprétés en tenant compte du faible nombre d'échantillons dans chaque groupe initial, T1, T2, T3 et ganglion.



Graphique 1 : Relation entre le pourcentage de cellules tumorales et le pourcentage de mutation

% MUT : pourcentage de mutation

% C TUM : pourcentage de cellules tumorales

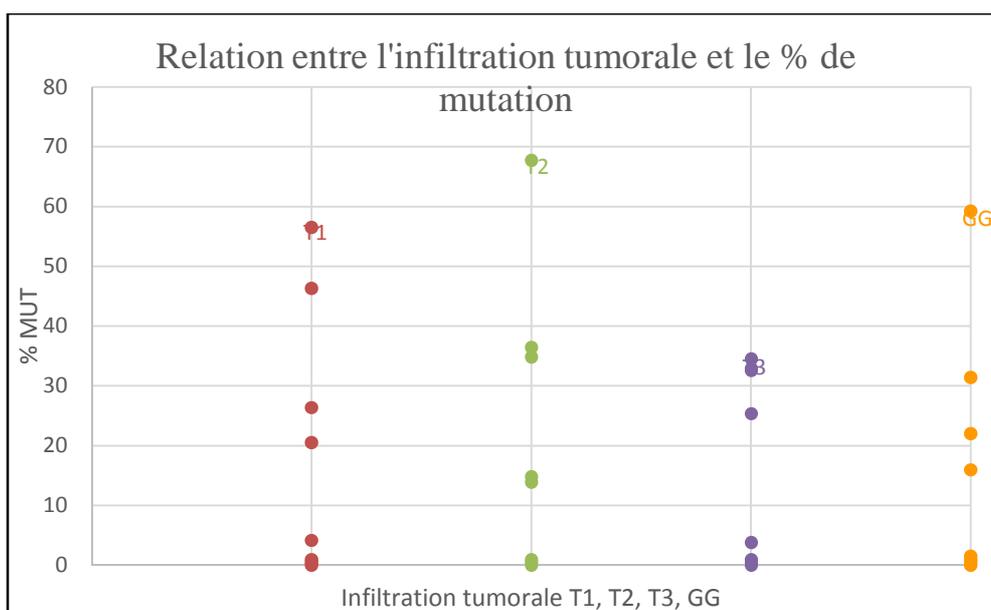
	Coefficient de corrélation de Spearman	Probabilités des tests associés
Initial	-0,236	0,362
T1	0,254	0,361
T2	0,06	0,819
T3	0,188	0,485
Ganglion	0,48	0,16

Tableau 15: Résultats du test de spearman

IV. Relation entre la profondeur de la tumeur et le pourcentage de mutation

Pour étudier l'effet du pourcentage de mutation sur l'agressivité de la tumeur, nous avons étudié la relation entre la profondeur de la tumeur et le pourcentage de mutation.

Sur l'ensemble des analyses réalisées, 8 patients présentaient à la fois une sélection tumorale T1, T2, T3 et ganglionnaire. Le prélèvement initial qui correspondait à une coupe transpéritéale de la muqueuse colique n'a pas été pris en compte. Le pourcentage de mutation observé pour le groupe T1 était compris entre 0 et 56.5, pour le groupe T2 entre 0 et 67.7, pour le groupe T3 entre 0 et 34.5 et pour le groupe ganglion entre 0 et 59.2 (**Graphique 2**). Nous avons réalisé le test de comparaison de Friedman (test non paramétrique de comparaison de 4 échantillons appariés) dont le résultat est non significatif ($p\text{-value} = 0.669$). Vu l'hétérogénéité des résultats nous ne pouvons pas mettre en évidence de relation entre la profondeur de l'infiltration tumorale et le pourcentage de mutation observé.



Graphique 2 : Relation entre l'infiltration tumorale et le pourcentage de mutation

Discussion

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'hétérogénéité mutationnelle de RAS (KRAS, NRAS) et BRAF dans le cancer colorectal. Nous avons sélectionné pour cette étude plusieurs zones tumorales chez 18 patients au sein de la tumeur initiale (T1, T2, T3) et étudié le statut RAS et BRAF dans ces zones et dans les ganglions métastatiques et dans la métastase quand ils étaient présents.

Bien que notre étude comporte un faible nombre de patients (n=18), 81 échantillons tumoraux ont pu être analysés. Chacun a subi 6 analyses (KRAS, NRAS et BRAF), ce qui représentait 486 analyses au total. Il s'agissait d'une étude rétrospective, car nous voulions étudier les CCR qui initialement étaient WT en séquençage direct puis PLLM en pyroséquençage. Ces deux techniques diffèrent par leur sensibilité (25% *versus* 2%). Nous avons pris en parallèle des patients WT et mutés qui avaient également été étudiés par séquençage direct à la même période. Notre étude a été réalisée sur un seul site le CHU de Poitiers.

Il est important de prendre en compte le pré analytique : le délai entre la réalisation du geste chirurgical et l'immersion du prélèvement dans le formol (10%), la quantité de formol qui doit être de 9 pour 1, l'immersion complète du prélèvement, la durée de fixation (de 6 à 72h selon les prélèvements) et l'épaisseur des copeaux. La quantité d'ADN extraite ainsi que sa qualité sont également importantes. La connaissance de la quantité de cellules tumorales contenue sur les copeaux ou la macro dissection du prélèvement analysé intervient également. En dessous d'un certain seuil, la sensibilité de la technique n'est plus assurée. Certaines techniques sont plus sensibles que d'autres tels que le pyroséquençage *versus* le séquençage direct (les 6 patients du groupe PLLM avaient eu au départ une analyse KRAS 12-13 par séquençage direct : les 6 analyses étaient WT alors qu'en pyroséquençage une mutation PLLM avait été détectée). L'équipe d'Ahn et al. a étudié 101 cancers bronchiques non à petites cellules (tumeur primitive, ganglion et métastase) par séquençage direct et par une analyse heteroduplex : 12/101 (11,9%) montraient une hétérogénéité en séquençage direct et 17/101 (16,8%) en analyse heteroduplex (105).

Nous avons pu mettre en évidence dans cette étude une hétérogénéité tumorale dans le sens où au sein de la tumeur toutes les zones ne sont pas forcément mutées ou encore ne présentant pas la même mutation : nous nous trouvons donc devant une hétérogénéité tumorale spatiale et mutationnelle à la fois. Parmi les 18 patients inclus, 5 présentaient une hétérogénéité tumorale spatiale pour au moins une analyse (27,8%). En incluant les mutations PLLM (comprises entre la LOD et la LOD+3%), 8 patients présentaient une hétérogénéité tumorale pour au moins une analyse (44,4%). Quatre patients (2,4, 10, 14) (22,2%) présentent une hétérogénéité tumorale spatiale avec un seul clone muté présent sur une ou plusieurs zones tumorales. Quatre patients (7, 9, 12 et 17) (22,2%) présentaient une hétérogénéité tumorale spatiale et mutationnelle :

- pour le patient 7 : 4 clones mutés dont 2 clones KRAS 12-13 (G12D et G12S), 1 clone KRAS 61 (Q61L) et 1 clone NRAS 61(Q61K) ;
- pour le patient 9 : 3 clones mutés dont 1 clone KRAS 12-13 (G12S PLLM), 1 clone KRAS 61(Q61R PLLM) et 1 clone NRAS (Q61R) ;
- pour le patient 12 : 3 clones mutés dont 1 clone KRAS12-13 (G12D PLLM), 1 clone KRAS 61 (Q61H) et 1 clone KRAS 146 (A146T) ;
- pour le patient 17: 2 clones mutés : 1 clone KRAS 12-13 (G12R) et 1 clone NRAS 61 (Q61K). Ces différents clones mutés étaient présents sur une ou plusieurs zones.

Comme dans notre étude, l'étude menée par Takata et al. a mis en évidence que 4 des 5 mélanomes primaires étudiés montraient une hétérogénéité tumorale avec la présence de cellules WT majoritaires et de cellules BRAF mutées. Deux de ces quatre mélanomes présentaient plusieurs clones BRAF mutés (106). L'équipe de Gobbert et al. a analysé les gènes *KRAS*, *BRAF* et *PIK3CA* sur 100 CCR entre le centre de la tumeur et le front d'invasion ; il a été montré que 8% des CCR étaient hétérogènes. Ils ont également étudié 55 tumeurs primitives et ganglions métastatiques : 17 présentaient une hétérogénéité soit 31%, et 20 tumeurs primitives et métastases à distance, 2 étaient hétérogènes (10%) (107).

D'une manière intéressante, nous avons pu observer que les mutations de KRAS et NRAS pouvaient coexister puisque chez 4 patients (22,2%) nous observons la présence dans la même zone ou dans des zones différentes la présence de ces mutations. De même, nous avons observé chez trois patients (16,2%) la présence dans la même zone ou dans des zones différentes des mutations des différents exons KRAS. Les mutations des différents exons de KRAS et de NRAS sont décrites comme exclusives. Faut-il chercher les autres mutations de RAS si une mutation de l'exon 2 de KRAS est mise en évidence ? Même si au niveau de la

prise en charge thérapeutique la mise en évidence d'une mutation contre indique la prescription d'anti EGFR. Dans l'avenir, des thérapies ciblant telle ou telle mutation pourraient être envisagées et la recherche de RAS devra alors être complète.

L'homogénéité/hétérogénéité des mutations au sein des cancers est débattue. Certaines équipes ont montré que les tumeurs étaient homogènes dans le temps telle que l'équipe de Merlio et al. qui a étudié 88 patients (mélanomes primaires et métastases) seulement 4 patients (4,5%) présentaient une hétérogénéité inter-tumorale. De nombreuses équipes ont mis en avant l'hétérogénéité tumorale dans le temps et dans l'espace (108). Par exemple, l'équipe de Polsky et al. a étudié 18 mélanomes primitifs et métastases : 8 cas (44,4%) étaient discordants (6 : primitifs WT / métastases *BRAF* muté ; 2 primitifs *BRAF* muté / métastases WT). Cette équipe a également étudié 19 patients ayant plusieurs métastases de mélanome : 5 présentaient 1 métastase WT et une métastase *BRAF* muté (26.3%) (109).

Cette étude soulève de nombreuses questions sur les conséquences de cette hétérogénéité tumorale sur la pratique quotidienne. Faut-il réaliser plusieurs analyses sur la tumeur primitive ? Analyser un ganglion tumoral (lequel ?), une métastase à distance (laquelle sélectionnée ?) ? Lors d'une récurrence locale, régionale ou à distance faut-il réaliser un nouveau prélèvement pour analyse en biologie moléculaire ? Faut-il changer la technique d'analyse ? Multiplier les analyses implique une augmentation accrue du travail de la tumorotheque et de la plateforme INCa (temps technicien, ingénieur, anatomo-cytopathologiste et biologiste) et du coût.

Une autre technique peut être utilisée, il s'agit du NGS (Next-Generation Sequencing). Elle peut séquencer des millions de gènes en un « run » avec un coût faible et une sensibilité de 1%.

Comment connaître au mieux, à un moment donné précis le statut mutationnel du CCR ? Au moment du diagnostic. Après une chimiothérapie et/ou une thérapie ciblée. Lors d'une récurrence locale, régionale ou à distance.

L'analyse des cellules tumorales circulantes (CTC) ou l'analyse de l'ADN circulant semblent être les plus adaptées. Ces analyses nécessitent une prise de sang, pas d'anesthésie ni de geste invasif. Elles peuvent être répétées dans le temps et donnent à un moment T, le nombre de CTC ou la quantité d'ADN circulant, leur état mutationnel pour chaque analyse réalisée. Cela permet donc d'avoir une réponse adaptée et précise face à la progression de la maladie.

Certaines équipes étudient les CTC. Elles seraient corrélées avec le stade clinique du CCR. L'équipe de Rafael et al. a étudié les CTC dans le CCR chez 94 patients : 34 possédaient des CTC (36,2%) : 20,7% au stade II, 24,1% au stade III et 60,7% au stade IV (110). Une autre équipe a étudié la relation entre le nombre de CTC et la survie sans progression et la survie globale chez des patients atteints de CCR métastasés. Le seuil était fixé à 3 CTC / 7,5ml de sang. Les patients ayant 3 ou plus de CTC avaient une survie sans progression de 4,5 mois versus 7,5 mois pour ceux qui avaient moins de 3 CTC. La survie globale était respectivement de 9,4 mois *versus* 18.5 mois (111).

D'autres équipes étudient l'ADN circulant. L'équipe d'Ychou et al. a étudié 95 CCR métastatiques. Elle a comparé l'analyse du tissu tumoral avec la technique « gold standard » et l'analyse de l'ADN circulant par PCR quantitative. Concernant la mutation BRAF V600E, l'analyse de l'ADN circulant a montré 100% de spécificité et 100% de sensibilité. Concernant la recherche de mutations KRAS la spécificité était de 98%, la sensibilité de 92% et la concordance de 96% ; un tissu tumoral était WT avec la détection d'une mutation dans l'ADN circulant et 3 tissus tumoraux étaient mutés alors que l'ADN circulant était WT (112).

L'hétérogénéité du statut mutationnel a également été étudiée dans les CTC du CCR. L'équipe de Gasch et al. a étudié le statut mutationnel des gènes *EGFR*, *KRAS* et *PIK3CA* pour respectivement 33, 5 et 5 CCR. Deux CCR sur 33 présentaient une hétérogénéité tumorale pour *EGFR* (6%), 1/5 présentait une hétérogénéité pour *KRAS* (20%) et 4/5 présentaient une hétérogénéité pour *PIK3CA* (80%). Un des patients présentant une hétérogénéité pour *PIK3CA* avait 9 CTC mutées (6 E545A et 3 E542A) et 6 CTC WT. En sus, parmi ces 9 CTC mutées *PIK3CA*, 5 étaient également mutées *KRAS* (113). Cette équipe a mis en évidence l'hétérogénéité des mutations à partir des CTC.

En conclusion, notre étude a pu mettre en évidence une hétérogénéité tumorale à la fois spatiale et mutationnelle dans les CCR. Il aurait été intéressant d'étudier cette hétérogénéité sur un plus grand nombre de patients, en prospectif et multicentrique. La détection des CTC et de l'ADN circulant représente l'avenir avec la possibilité d'analyser l'état mutationnel et son hétérogénéité à un moment donné de l'évolution de la maladie. Enfin, ceci permettra d'adapter la thérapeutique au plus juste grâce à une simple prise de sang qui pourra être renouvelée selon la réponse au traitement.

Bibliographie

1. Cancer TIA for R on. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 4 edition. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, éditeurs. World Health Organization; 2010. 418 p.
2. Boyle P, Levin B (eds) (2008). World Cancer Report. IARC/ Lyon, France.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. avr 2005;55(2):74-108.
4. Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, Moss SM, Amar SS, Balfour TW, et al. Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. Lancet. 30 nov 1996;348(9040):1472-7.
5. Kronborg O, Fenger C, Olsen J, Jørgensen OD, Søndergaard O. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. Lancet. 30 nov 1996;348(9040):1467-71.
6. Faivre J, Dancourt V, Lejeune C, Tazi MA, Lamour J, Gerard D, et al. Reduction in colorectal cancer mortality by fecal occult blood screening in a French controlled study. Gastroenterology. juin 2004;126(7):1674-80.
7. Dépistage organisé du cancer colorectal en France. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, Institut de Veille sanitaire, n°2-3; 2009.
8. World Cancer Research Fund (WCRF), American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington: World Cancer Research Fund International 2007.517 p.
9. Liang PS, Chen T-Y, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. Int J Cancer J Int Cancer. 15 mai 2009;124(10):2406-15.
10. Chung SJ, Kim YS, Yang SY, Song JH, Kim D, Park MJ, et al. Five-year risk for advanced colorectal neoplasia after initial colonoscopy according to the baseline risk stratification: a prospective study in 2452 asymptomatic Koreans. Gut. nov 2011;60(11):1537-43.
11. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. N Engl J Med. 5 mars 1992;326(10):658-62.
12. Yun HR, Lee LJ, Park JH, Cho YK, Cho YB, Lee WY, et al. Local recurrence after curative resection in patients with colon and rectal cancers. Int J Colorectal Dis. nov 2008;23(11):1081-7.
13. Haute Autorité de Santé. Référentiel de spratiques pour la prévention et le dépistage du cancer colorectal. 2013.
14. Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. JAMA. 8 juin 2011;305(22):2304-10.
15. Bulletin N°53. Académie Internationale de Pathologie (AIP). 2011.

16. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. juin 1999;116(6):1453-6.
17. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*. mai 1991;34(5):424-5.
18. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 18 févr 2004;96(4):261-8.
19. Basic and clinical perspectives of colorectal polyps and cancer. Proceedings of a meeting. Boston, Massachusetts, November 20-21, 1986. *Prog Clin Biol Res*. 1988;279:1-409.
20. Konishi F, Morson BC. Pathology of colorectal adenomas: a colonoscopic survey. *J Clin Pathol*. août 1982;35(8):830-41.
21. Konishi F, Muto T, Kamiya J, Sawada T, Sugihara K, Morioka Y, et al. Histopathologic comparison of colorectal adenomas in English and Japanese patients. *Dis Colon Rectum*. août 1984;27(8):515-8.
22. Fung CH, Goldman H. The incidence and significance of villous change in adenomatous polyps. *Am J Clin Pathol*. janv 1970;53(1):21-5.
23. Scoazec J-Y. [Dysplasia in glandular digestive tissues: new concepts, new classifications]. *Ann Pathol*. déc 2007;27(6):398-416.
24. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*. août 2000;47(2):251-5.
25. Dixon MF. Gastrointestinal epithelial neoplasia: Vienna revisited. *Gut*. juill 2002;51(1):130-1.
26. Sasaki S, Masaki T, Umetani N, Futakawa N, Ando H, Muto T. Characteristics in primary signet-ring cell carcinoma of the colorectum, from clinicopathological observations. *Jpn J Clin Oncol*. mars 1998;28(3):202-6.
27. Jessurun J, Romero-Guadarrama M, Manivel JC. Medullary adenocarcinoma of the colon: clinicopathologic study of 11 cases. *Hum Pathol*. juill 1999;30(7):843-8.
28. Tortola S, Marcuello E, González I, Reyes G, Arribas R, Aiza G, et al. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. mai 1999;17(5):1375-81.
29. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. Édition : 7th Edition. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2009. 336 p.
30. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1 juin 1990;61(5):759-67.
31. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 17 déc 2009;361(25):2449-60.
32. Issa J-P. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*. déc 2004;4(12):988-93.

33. Karoui M, Tresallet C, Brouquet A, Radvanyi H, Penna C. [Colorectal carcinogenesis. 2. Underlying epigenetic and genetic alterations and molecular classification of colorectal cancers]. *J Chir (Paris)*. avr 2007;144(2):97-104.
34. Michor F, Iwasa Y, Vogelstein B, Lengauer C, Nowak MA. Can chromosomal instability initiate tumorigenesis? *Semin Cancer Biol*. févr 2005;15(1):43-9.
35. Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*. 1 févr 2001;61(3):818-22.
36. Casey G, Lindor NM, Papadopoulos N, Thibodeau SN, Moskow J, Steelman S, et al. Conversion analysis for mutation detection in MLH1 and MSH2 in patients with colorectal cancer. *JAMA*. 16 févr 2005;293(7):799-809.
37. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 6 mars 2003;348(10):919-32.
38. Liu T, Yan H, Kuismanen S, Percesepe A, Bisgaard ML, Pedroni M, et al. The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res*. 1 nov 2001;61(21):7798-802.
39. Chang S-C, Lin J-K, Yang SH, Wang H-S, Li AF-Y, Chi C-W. Relationship between genetic alterations and prognosis in sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer J Int Cancer*. 1 avr 2006;118(7):1721-7.
40. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 7 mai 1993;260(5109):816-9.
41. Deltour S, Chopin V, Leprince D. [Epigenetics and cancer]. *Médecine Sci MS*. avr 2005;21(4):405-11.
42. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 31 janv 2006;103(5):1412-7.
43. Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet*. déc 2006;38(12):1378-85.
44. Kondo Y, Issa J-PJ. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. juin 2004;23(1-2):29-39.
45. Vilar E, Tabernero J. Molecular dissection of microsatellite instable colorectal cancer. *Cancer Discov*. mai 2013;3(5):502-11.
46. Wheeler JM, Loukola A, Aaltonen LA, Mortensen NJ, Bodmer WF. The role of hypermethylation of the hMLH1 promoter region in HNPCC versus MSI+ sporadic colorectal cancers. *J Med Genet*. août 2000;37(8):588-92.
47. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 juin 1998;95(12):6870-5.

48. Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, de la Chapelle A, Peltomäki P. Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am J Pathol.* mai 2000;156(5):1773-9.
49. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1 mars 1997;57(5):808-11.
50. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer.* févr 2006;6(2):107-16.
51. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:479-507.
52. Lièvre A, Laurent-Puig P. [Colorectal carcinogenesis: update]. *Rev Prat.* 31 janv 2004;54(2):143-50.
53. Lampropoulos P, Zizi-Sermpetzoglou A, Rizos S, Kostakis A, Nikiteas N, Papavassiliou AG. TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. *Cancer Lett.* 1 janv 2012;314(1):1-7.
54. Olivier S, Mir A-M, Michalski J-C, Lefebvre T. [Signaling and metabolic predispositions linked to the colorectal cancer]. *Médecine Sci MS.* mai 2011;27(5):514-20.
55. Lièvre A, Laurent-Puig P. RAS/MAPK signaling pathway [Internet]. 2010. Disponible sur: <http://hdl.handle.net/2042/30747>
56. Cohen SJ, Cohen RB, Meropol NJ. Targeting signal transduction pathways in colorectal cancer--more than skin deep. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 août 2005;23(23):5374-85.
57. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1 sept 1989;49(17):4682-9.
58. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 12 août 2014;
59. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 27 juin 2002;417(6892):949-54.
60. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1 mars 2009;69(5):1851-7.
61. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. The evolution of our molecular understanding of colorectal cancer: what we are doing now, what the future holds, and how tumor profiling is just the beginning. *Am Soc Clin Oncol Educ Book ASCO Am Soc Clin Oncol Meet.* 2014;91-9.
62. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med.* mai 2013;19(5):619-25.
63. Lasser P. [Local treatments of rectal cancer]. *J Chir (Paris).* janv 1996;133(1):23-36.
64. Burton S, Norman AR, Brown G, Abulafi AM, Swift RI. Predictive poor prognostic factors in colonic carcinoma. *Surg Oncol.* août 2006;15(2):71-8.

65. Lasser P, Goharin A. [Local treatment of rectal cancer]. *Ann Chir.* avr 2000;125(3):213-21.
66. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 août 2003;21(15):2912-9.
67. Poeschl EM, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, et al. Perineural invasion: correlation with aggressive phenotype and independent prognostic variable in both colon and rectum cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 juill 2010;28(21):e358-60; author reply e361-2.
68. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst.* 6 oct 2004;96(19):1420-5.
69. Chapuis PH, Dent OF, Fisher R, Newland RC, Pheils MT, Smyth E, et al. A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Br J Surg.* sept 1985;72(9):698-702.
70. Sternberg A, Amar M, Alfici R, Groisman G. Conclusions from a study of venous invasion in stage IV colorectal adenocarcinoma. *J Clin Pathol.* janv 2002;55(1):17-21.
71. Mitomi H, Mori A, Kanazawa H, Nishiyama Y, Ihara A, Otani Y, et al. Venous invasion and down-regulation of p21(WAF1/CIP1) are associated with metastasis in colorectal carcinomas. *Hepatogastroenterology.* oct 2005;52(65):1421-6.
72. Bokey EL, Chapuis PH, Dent OF, Newland RC, Koorey SG, Zelas PJ, et al. Factors affecting survival after excision of the rectum for cancer: a multivariate analysis. *Dis Colon Rectum.* janv 1997;40(1):3-10.
73. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 nov 2009;27(31):5131-7.
74. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 22 déc 2005;353(25):2654-66.
75. Nagayoshi K, Ueki T, Nishioka Y, Manabe T, Mizuuchi Y, Hirahashi M, et al. Tumor deposit is a poor prognostic indicator for patients who have stage II and III colorectal cancer with fewer than 4 lymph node metastases but not for those with 4 or more. *Dis Colon Rectum.* avr 2014;57(4):467-74.
76. Goldstein MJ, Mitchell EP. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest.* 2005;23(4):338-51.
77. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med.* 13 janv 2000;342(2):69-77.
78. Huh JW, Oh BR, Kim HR, Kim YJ. Preoperative carcinoembryonic antigen level as an independent prognostic factor in potentially curative colon cancer. *J Surg Oncol.* 1 avr 2010;101(5):396-400.

79. Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM. Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg.* juill 1997;185(1):55-9.
80. Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile J-F, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 15 avr 2006;66(8):3992-5.
81. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJC. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut.* sept 2005;54(9):1283-6.
82. Chen J, Guo F, Shi X, Zhang L, Zhang A, Jin H, et al. BRAF V600E mutation and KRAS codon 13 mutations predict poor survival in Chinese colorectal cancer patients. *BMC Cancer.* 3 nov 2014;14(1):802.
83. Thésaurus National de Cancérologie Digestive (TNCD). *Cancer du côlon.* 2011.
84. Recommandations pour la pratique clinique: prise en charge thérapeutique des métastases hépatiques des cancers colorectaux. *Gastroenterol Clin Bio,* 27. 2003;B1-104.
85. Quasar Collaborative Group, Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet.* 15 déc 2007;370(9604):2020-9.
86. Teixeira L, Hickish T, Tournigand C, Bachet J, Bonetti A, Rivera F, et al. Efficacy of FOLFOX4 as adjuvant therapy in stage II colon cancer (CC): A new analysis of the MOSAIC trial according to risk factors. *J Clin Oncol [Internet].* 2010 [cité 31 oct 2014];28:15s(suppl; abstr 3524). Disponible sur: <http://meetinglibrary.asco.org/content/49298-74>
87. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 juill 2009;27(19):3109-16.
88. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, Smith RE, Colangelo LH, Yothers G, et al. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 juin 2007;25(16):2198-204.
89. Ychou M, Raoul J-L, Douillard J-Y, Gourgou-Bourgade S, Bugat R, Mineur L, et al. A phase III randomised trial of LV5FU2 + irinotecan versus LV5FU2 alone in adjuvant high-risk colon cancer (FNCLCC Accord02/FFCD9802). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* avr 2009;20(4):674-80.
90. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, et al. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 juill 2009;27(19):3117-25.
91. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Colangelo LH, et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 janv 2011;29(1):11-6.

92. Haller D., Tabernero J., Maroun J., de Braud F., Price T., Van Cutsem E., et al. First efficacy findings from a randomized phase III trial of capecitabine + oxaliplatin vs. bolus 5-FU/LV for stage III colon cancer (NO16968/XELOXA study). *Eur J Cancer Suppl*, 7. 2009;4-4.
93. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet*. 22 mars 2008;371(9617):1007-16.
94. Benoist S, Brouquet A, Penna C, Julié C, El Hajjam M, Chagnon S, et al. Complete response of colorectal liver metastases after chemotherapy: does it mean cure? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 août 2006;24(24):3939-45.
95. Elias D, Goere D, Boige V, Kohneh-Sharhi N, Malka D, Tomasic G, et al. Outcome of posthepatectomy-missing colorectal liver metastases after complete response to chemotherapy: impact of adjuvant intra-arterial hepatic oxaliplatin. *Ann Surg Oncol*. nov 2007;14(11):3188-94.
96. INCa Mutations des gènes KRAS et NRAS dans le cancer colorectal métastatique.
97. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 12 sept 2013;369(11):1023-34.
98. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 23 oct 2008;359(17):1757-65.
99. Lièvre A. Mutations du gène KRAS et réponse aux anticorps anti EGFR dans les cancers colorectaux. *La lettre de l'hépatogastroentérologue* 2010 Déc.
100. Longo DL. Tumor heterogeneity and personalized medicine. *N Engl J Med*. 8 mars 2012;366(10):956-7.
101. Vilar E, Tabernero J. Molecular dissection of microsatellite instable colorectal cancer. *Cancer Discov*. mai 2013;3(5):502-11.
102. Turke AB, Zejnullahu K, Wu Y-L, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell*. 19 janv 2010;17(1):77-88.
103. Tougeron D, Lecomte T, Pagès JC, Villalva C, Collin C, Ferru A, et al. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. mai 2013;24(5):1267-73.
104. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev Aust Assoc Clin Biochem*. août 2008;29 Suppl 1:S49-52.
105. Park S, Holmes-Tisch AJ, Cho EY, Shim YM, Kim J, Kim HS, et al. Discordance of molecular biomarkers associated with epidermal growth factor receptor pathway between primary tumors and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. juill 2009;4(7):809-15.

106. Lin J, Goto Y, Murata H, Sakaizawa K, Uchiyama A, Saida T, et al. Polyclonality of BRAF mutations in primary melanoma and the selection of mutant alleles during progression. *Br J Cancer*. 1 févr 2011;104(3):464-8.
107. Baldus SE, Schaefer K-L, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 févr 2010;16(3):790-9.
108. Boursault L, Haddad V, Vergier B, Cappellen D, Verdon S, Bellocq J-P, et al. Tumor homogeneity between primary and metastatic sites for BRAF status in metastatic melanoma determined by immunohistochemical and molecular testing. *PloS One*. 2013;8(8):e70826.
109. Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, Ng E, Shapiro RL, Berman RS, et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. *PloS One*. 2012;7(1):e29336.
110. Sastre J, Maestro ML, Puente J, Veganzones S, Alfonso R, Rafael S, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. mai 2008;19(5):935-8.
111. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 juill 2008;26(19):3213-21.
112. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med*. avr 2014;20(4):430-5.
113. Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, Langer-Freitag S, Reeh M, Seifert AM, et al. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. *Clin Chem*. janv 2013;59(1):252-60.

Annexes

		Deuxième lettre									
		U		C		A		G			
Première lettre	U	UUU	Phénil- alanine	UCU	sérine	UAU	tyrosine	UGU	cystéine	U	Troisième lettre
		UUC	alanine	UCC		UAC	UGC	C			
		UUA	leucine	UCA		UAA	codons	UGA	codon stop	A	
		UUG	leucine	UCG		UAG	stop	UGG	tryptophane	G	
	C	CUU	leucine	CCU	proline	CAU	histidine	CGU	arginine	U	
		CUC		CCC		CAC	CGC	C			
		CUA		CCA		CAA	CGA	A			
		CUG		CCG		CAG	CGG	G			
	A	AUU	isoleucine	ACU	thréonine	AAU	asparagine	AGU	sérine	U	
		AUC		ACC		AAC	AGC	C			
		AUA	ACA	AAA		lysine	AGA	arginine	A		
		AUG	méthionine	ACG		AAG	AGG	G			
	G	GUU	valine	GCU	alanine	GAU	acide	GGU	glycine	U	
		GUC		GCC		GAC	aspartique	GGC		C	
		GUA		GCA		GAA	acide	GGA		A	
		GUG		GCG		GAG	glutamique	GGG		G	

Annexe 1: Le code génétique présente les codons et les acides aminés correspondants

Nom	3 lettres 1 lettre	
alanine	Ala	A
arginine	Arg	R
asparagine	Asn	N
aspartate ou acide aspartique	Asp	D
cystéine	Cys	C
glutamate ou acide glutamique	Glu	E
glutamine	Gln	Q
glycine	Gly	G
histidine	His	H
isoleucine	Ile	I
leucine	Leu	L
lysine	Lys	K
méthionine	Met	M
phénylalanine	Phe	F
proline	Pro	P
sérine	Ser	S
thréonine	Thr	T
tryptophane	Trp	W
tyrosine	Tyr	Y
valine	Val	V

Annexe 2: Acides aminés et abréviations

8. Côlon et rectum

DONNÉES D'IDENTIFICATION DU DOSSIER PATIENT RATTACHÉES AU COMPTE RENDU ANATOMOPATHOLOGIQUE

Établissement autorisé où a été effectué le prélèvement*

Nom de l'établissement et n° FINESS

Identifiant patient (l'établissement autorisé où a été effectué le prélèvement a la responsabilité de fournir ces données au pathologiste)*

Nom de famille (de naissance ou d'adoption)

Prénom

Nom d'usage (par exemple nom d'épouse)

Date de naissance (JJ/MM/AAAA) (en l'absence de date de naissance et par défaut : âge)

Sexe

Identifiant national de santé (INS) du patient s'il existe

Identifiant permanent du patient (IPP) attribué par l'établissement autorisé où a été effectué le prélèvement

Code postal de résidence

Identifiant médecin demandeur (l'établissement autorisé où a été effectué le prélèvement a la responsabilité de fournir ces données au pathologiste)*

Nom du préleveur

Date de prélèvement

COMPTE RENDU ANATOMOPATHOLOGIQUE DONNÉES MINIMALES À RENSEIGNER POUR UNE TUMEUR PRIMITIVE CÔLON - RECTUM (C18/C19/C20) - PIÈCES OPÉRATOIRES

Identifiant médecin pathologiste

N° de compte rendu

Nom de la structure d'anatomie et cytologie pathologiques et n° FINESS

Signataire du compte rendu

Date de signature du compte rendu

Compte rendu de la pièce opératoire

Description de la pièce opératoire (sous la responsabilité du préleveur)*

Type de prélèvement

Colectomie droite/colectomie transverse/colectomie gauche/sigmoïdectomie/exérèse locale endorectale/exérèse du rectum et mésorectum/amputation abdomino-périnéale/anoproctectomie/autre

Organe/région anatomique

Côlon/Rectum

Localisation de la/des tumeur(s) dans l'organe

Côlon ascendant/angle colique droit/côlon transverse/angle colique gauche/côlon descendant/sigmoïde/rectum/autre

Description histopathologique

Type histologique¹

Adénocarcinome lieberkühnien/carcinome indifférencié/carcinome à cellules en bague à chaton/carcinome colloïde (mucineux)/carcinome médullaire/autre

Grade histopronostique¹

Pour les adénocarcinomes lieberkühniens : bien différencié/moyennement différencié/peu différencié

Extension tumorale

Tranches de section chirurgicales :

- État de la tranche de section distale : saine/envahie
 - Pour tumeur rectale : marge circonférentielle en mm
-

Autres facteurs pronostiques et/ou prédictifs

Emboles vasculaires : oui/non

Infiltration péri-nerveuse : oui/non

Evaluation de la régression tumorale (en cas de traitement néo-adjuvant)

Critères permettant de déterminer le pT/pN

Critères relatifs à la tumeur :

Degré d'infiltration de la paroi colorectale, péri-colorectal, et des organes adjacents

Présence d'une perforation en zone tumorale

Présence de dépôts tumoraux dans le méso

Critères relatifs aux ganglions :

Nombre de ganglions envahis/nombre de ganglions examinés

pT/pN²

Notes

■ * Le pathologiste ne peut renseigner ces données que si elles lui ont été transmises.

■ Un «/» dans le texte équivaut à « ou ».

■ ¹ Selon la classification OMS en vigueur. En son absence, la classification utilisée est à préciser.

■ ² L'année de la classification UICC utilisée est mentionnée dans le texte à la suite du pTNM.

Annexe 3 : Compte rendu anatomopathologique standardisé 12/2011 (Inca)



UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie



SERMENT



En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admise dans l'intérieur des maisons mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueuse et reconnaissante envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

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



Résumé

Objectif : En clinique, les patients ayant un cancer colorectal (CCR) RAS sauvage (Rat Sarcoma viral oncogen homolog) sont traités par anticorps anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Cependant un certain nombre de patients ne répondent pas au traitement. Pour identifier une des causes possibles, nous avons cherché les mutations de la voie de signalisation RAS et analysé leur distribution au sein de la tumeur initiale, du ganglion et de la métastase.

Matériels et Méthode : 18 patients ont été inclus rétrospectivement. 81 sélections tumorales ont été effectuées selon la stadification pTNM. 70 en tumeur initiale, 10 en ganglions métastatiques et 1 en métastase à distance. Après extraction de l'ADN de chaque sélection tumorale, une analyse par pyroséquençage des produits de PCR a été réalisée pour les mutations KRAS, NRAS et BRAF.

Résultats : 53 sélections tumorales étaient mutées KRAS, 9 NRAS et 2 BRAF. Une hétérogénéité intra-tumorale est retrouvée chez 7 patients (39%). Une hétérogénéité entre la tumeur initiale et la métastase ganglionnaire ou à distance est retrouvée chez 6 patients (33%). Au total 8 patients ont une hétérogénéité tumorale (44%). De plus, 4 patients possédaient plusieurs clones tumoraux mutés au sein de la même zone tumorale (22%).

Conclusion : Nos résultats montrent qu'une importante proportion des CCR présente une hétérogénéité mutationnelle RAS. Cette observation pourrait avoir des implications importantes dans l'utilisation de la thérapie ciblée et l'adaptation du traitement face à la progression de la maladie.

Mots Clés : Cancer Colorectal, RAS, EGFR, Hétérogénéité