

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2009-2010

N° 80

THESE
pour le
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

DES de Gastroentérologie et Hépatologie
par

Philippe Jamet

Né le 17 mars 1981 à Nantes (44)

Présentée et soutenue publiquement le 30 septembre 2010

**LA RECHERCHE DE LA MUTATION *KRAS* APPORTE-T-ELLE
UNE INFORMATION FIABLE POUR DECIDER DES OPTIONS
THERAPEUTIQUES CHEZ LES PATIENTS AYANT UN CANCER
COLORECTAL METASTATIQUE ?**

Président : Monsieur le Professeur Jean-Paul Galmiche

Directeur de thèse : Madame le Docteur Tamara Matysiak-Budnik

Sommaire

Introduction	1
1. Epidémiologie – Pathogénie du cancer colorectal	1
1.1 Définition	1
1.2 Données épidémiologiques	1
1.3 Carcinogénèse colique	2
1.3.a Instabilité génomique	4
1.3.b Inactivation des anti-oncogènes	4
1.3.c Voies des facteurs de croissance	5
2. Traitement du CCR métastatique : les thérapies ciblées	8
2.1 Efficacité thérapeutique des anti-EGFR	9
2.2 Quelles sont les raisons de l'échec du traitement par anti-EGFR ?	11
2.2.a Statut mutationnel <i>KRAS</i> et réponse au traitement	11
2.2.b Mutation <i>BRAF</i>	12
Positionnement du problème – But de l'étude	13
Matériels et méthodes	14
1. Patients et tissus	14
2. Analyses moléculaires	15
3. Interprétation des résultats	16
4. Evaluation clinique et critères de réponse	16
Résultats	17
1. Caractéristiques des patients	17
2. Statut mutationnel de <i>KRAS</i>	18
2.1 Concordance du statut <i>KRAS</i> entre tumeurs primitives et métastases	20
2.2 Analyse de l'hétérogénéité intratumorale	21
3. Réponse au traitement par anti-EGFR en fonction du statut <i>KRAS</i>	21

Discussion_____24

Références bibliographiques_____28

LEXIQUE

APC : Adenomatous Polyposis Coli

ATP : Adénosine TriPhosphate

BAX : Bcl-2-Associated X protein

BRAF : B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase

CCR : Cancer ColoRectal

CIN : instabilité chromosomique

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor

GDP : Guanosine DiPhosphate

GTP : Guanosine TriPhosphate

HES : Hematoxyline Eosine Safran

HNPCC : Hereditary NonPolyposis Colon Cancer ou syndrome de Lynch

KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MEK : MAPK/ERK Kinase

MLH1 : MutL Homolog 1

MMP : Matrix MetalloProteinase

MSH2 : MutL Homolog 2

MSH6 : MutS Homolog 6

MSI : MicroSatellite Instability

MYH : MutY Homologue

P : Progression

PAF : Polypose Adénomateuse Familiale

PCR : Polymerase Chain Reaction

PIK3CA : Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase Catalytic α

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

RC : Réponse Complète

RP : Réponse Partielle

S : Stabilité

SMAD4 : Mothers Against Decapentaplegic homolog 4

TGF- β R2 : Transforming Growth Factor β Receptor type 2

TP53 : Tumor Protein 53

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

WT : Wild Type (sauvage)

Introduction générale

1. Epidémiologie – Pathogénie du cancer colorectal

1.1 Définition

Le cancer colorectal (CCR) est une tumeur développée à partir de la muqueuse colique. Il dérive de l'épithélium glandulaire, en débutant par la formation d'adénomes, qui ensuite peuvent évoluer vers une dysplasie de degré croissant, de modérée à sévère, associant des anomalies architecturales de l'épithélium des glandes (stratification, plissement, bourgeonnement), des anomalies cellulaires nucléaires (anisonucléose, hyperchromasie, anomalies des mitoses) et cytoplasmiques (perte de la mucosécrétion), aboutissant à la formation d'un cancer. Le terme d'adénocarcinome invasif est réservé aux lésions dépassant la membrane basale. Le foyer d'adénocarcinome, d'abord superficiel et intramuqueux, s'étend et atteint la musculaire muqueuse qu'il dissocie, puis envahit l'axe des adénomes pédiculés et la sous-muqueuse des adénomes sessiles.

1.2 Données épidémiologiques

Le CCR est le quatrième cancer le plus fréquent chez l'homme et le troisième chez la femme. Son incidence est croissante partout dans le monde, mais particulièrement dans les pays occidentaux [1]. En 2002, plus d'un million de nouveaux cas étaient diagnostiqués dans le monde, et plus de 500 000 décès étaient attribués au CCR [1]. En France, 36 000 nouveaux cas de CCR sont diagnostiqués chaque année, responsables de 16 000 décès [2]. Du fait de l'incidence et de la mortalité importantes, le CCR représente un véritable problème de santé publique. En effet, si le pronostic est bon lorsqu'il est diagnostiqué à un stade précoce, il est beaucoup plus sombre pour les cancers avancés avec un envahissement ganglionnaire (stade III) ou des métastases viscérales (stade IV) (tableau 1). Il représente également un défi économique en raison du coût élevé de la prise en charge de ces patients.

Stade (classification UICC)	Survie moyenne à 5 ans (%)
Stade I	84 %
Stade II	68 %
Stade III	41 %
Stade IV	3 %

Tableau 1 : Survie à cinq ans des patients atteints d'un CCR en fonction du stade [3]

1.3 Carcinogénèse colique

Le CCR est sporadique dans 95 % des cas et d'origine familiale dans environ 5 % des cas. Dans les formes familiales, comme la polypose adénomateuse familiale (PAF) ou le syndrome de Lynch [ou HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer)], la prédisposition génétique est transmise héréditairement. La carcinogénèse colique est un phénomène complexe, multifactoriel et progressif, suivant généralement la séquence adénome → cancer, aussi bien dans les cancers sporadiques que dans les formes familiales.

Sous l'action de divers carcinogènes, des mutations successives se produisent au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse colique. La dysplasie observée histologiquement est le reflet de ces mutations. Ces étapes et mutations successives sont similaires dans les cancers sporadiques et dans les formes familiales (figure 1).

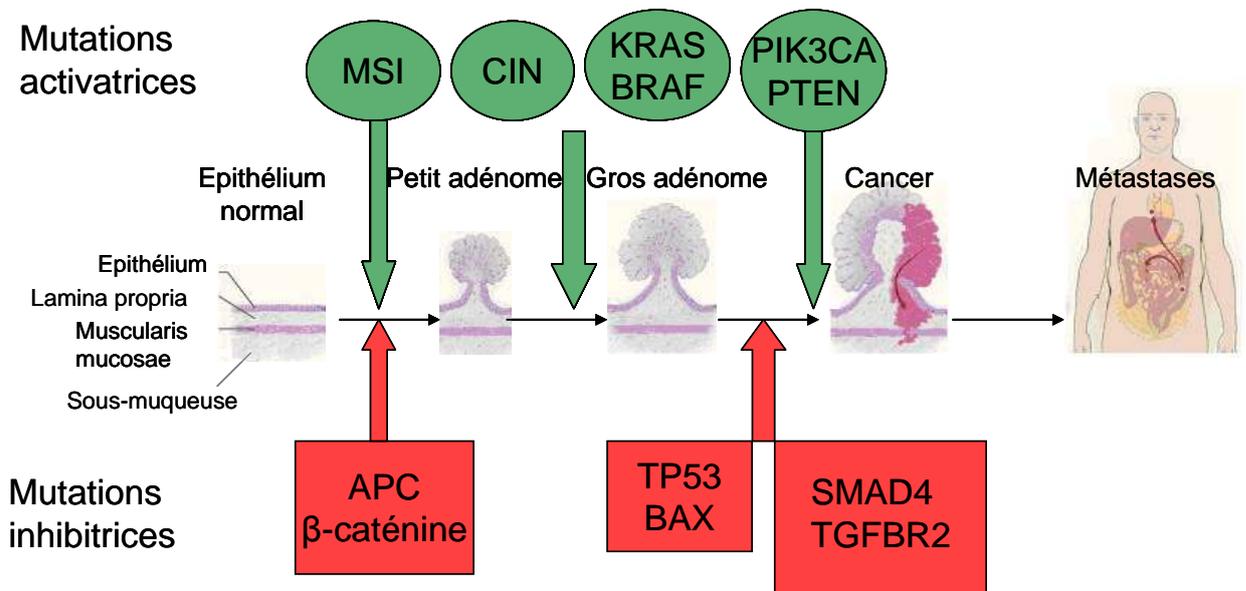


Figure 1 : Mutations conduisant à l'apparition d'un adénocarcinome colorectal[4]

APC : Adenomatous Polyposis Coli, *TP53* : Tumor Protein 53, *BAX* : Bcl-2-Associated X protein, *SMAD4* : Mothers Against Decapentaplegic homolog 4, *TGFBR2* : Transforming Growth Factor β Receptor type 2, *MSI* : MicroSatellite Instability, *CIN* : instabilité chromosomique, *KRAS* : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, *BRAF* : B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase, *PIK3CA* : Phosphatidy-Inositol 3-Kinase Catalytic α , *PTEN* : Phosphatase and TENsin homolog

Les mutations activatrices entraînent une modification de la protéine codée, conduisant à une activation constitutionnelle de cette protéine. A l'inverse, les mutations inhibitrices conduisent à une perte de fonction de la protéine codée.

Les proto-oncogènes sont des gènes impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire. A la suite d'une mutation activatrice, ils deviennent des oncogènes, qui agissent de façon dominante, affranchissant la cellule des contraintes régulant sa prolifération. Les anti-oncogènes sont des gènes dont la perte d'expression normale, par exemple après une mutation inhibitrice, est impliquée dans le développement d'une tumeur maligne. Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes dont

l'absence favorise l'oncogenèse et dont le remplacement dans les cellules défectives permet la réversion du phénomène malin.

Les différentes anomalies aboutissant à l'apparition d'un adénocarcinome colique sont encore imparfaitement connues. Toutefois, plusieurs phénomènes participant à la carcinogénèse ont été décrits, permettant d'expliquer ses grandes étapes.

1.3.a Instabilité génomique

La perte de la stabilité génomique peut permettre le développement du CCR par le biais de multiples mutations. Il en existe plusieurs formes. La plus fréquente dans le CCR est l'instabilité chromosomique qui, en entraînant la perte de gènes suppresseurs de tumeurs, favorise le développement de cancers [4-6]. Le dysfonctionnement des systèmes de réparation de l'ADN peut également favoriser la survenue de cancers. En effet, chez les patients ayant un syndrome de Lynch, les mutations des gènes *MutL Homolog 1 (MLH1)*, *MutL Homolog 2 (MSH2)* ou *MutS Homolog 6 (MSH6)* confèrent un risque de développer un CCR de 80 % au cours de la vie par le biais de l'instabilité des microsatellites (MSI, MicroSatellite Instability) qu'elle entraîne [7-8]. La mutation germinale des deux allèles du gène *MutY Homolog (MYH)* du système de réparation par excision de base entraîne un phénotype de polypose colique avec un risque de développer un CCR au cours de la vie de près de 100 % [9]. Enfin, la méthylation aberrante de l'ADN est également une source d'instabilité génétique en empêchant l'expression de certains gènes [10].

Tous ces mécanismes aboutissent soit à l'inactivation d'anti-oncogènes, soit à l'activation d'oncogènes.

1.3.b Inactivation des anti-oncogènes

De nombreux anti-oncogènes peuvent être mutés. Cependant, il existe des mutations qui sont considérées comme des étapes-clés de la carcinogénèse.

C'est le cas du gène *Adenomatous Polyposis Coli (APC)* qui, lorsqu'il est muté, produit une protéine non fonctionnelle qui ne peut plus inhiber l'action de la β -caténine. Cette dernière, libre dans le cytoplasme, peut activer la prolifération cellulaire (activation constitutionnelle de la voie Wnt). Les mutations d'*APC* sont

rencontrées chez les patients porteurs d'une PAF, mais également dans un grand nombre de cancers colorectaux sporadiques (de 60 à 80 %).

D'autres mutations semblent être un tournant évolutif dans la carcinogénèse comme la mutation de *TP53* qui inhibe son contrôle sur le cycle cellulaire et son action pro-apoptotique, coïncidant fréquemment avec la transformation d'un adénome dysplasique en carcinome invasif [11], ou encore la mutation du récepteur au facteur de croissance transformant de type 2 (TGF- β R2, transforming growth factor receptor type 2) présente chez environ un tiers des CCR. Cette mutation rend inopérante l'inhibition du cycle cellulaire par le TGF- β .

1.3.c Voies des facteurs de croissance

L'activation des voies de différents facteurs de croissance est un phénomène courant dans de nombreux cancers, notamment dans le CCR.

Des études ont montré qu'au stade de cancer, la stimulation des voies du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, vascular endothelial growth factor,) et du facteur de croissance épidermique (EGF, epidermal growth factor) jouait un rôle important dans la progression tumorale

- Voie du VEGF

Le VEGF est le principal facteur d'activation de l'angiogénèse, phénomène indispensable à la croissance tumorale [12]. En se liant à l'un de ses récepteurs, il active la prolifération des cellules endothéliales et stimule une néo-angiogénèse tumorale permettant d'alimenter la tumeur tout au long de son développement.

- Voie de l'EGF

L'EGF est un facteur de croissance ayant une action principalement trophique sur de nombreux tissus, notamment en activant la prolifération cellulaire.

Lorsque l'EGF se lie à son récepteur, l'EGFR, son domaine intracellulaire est phosphorylé. Cette phosphorylation permet l'activation de RAS qui est une protéine appartenant à la classe des molécules ayant pour fonction la transduction du signal

du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Ces molécules servent de lien entre les récepteurs membranaires et les protéines kinases intracytoplasmiques, en jouant le rôle de commutateurs moléculaires. RAS est active lorsqu'elle est liée au GTP (Guanosine TriPhosphate) et s'inactive en hydrolysant le GTP en GDP (Guanosine DiPhosphate) via son activité GTPase intrinsèque. RAS et ses isoformes sont encodées par trois gènes : *KRAS*, *HRAS* et *NRAS*.

L'activation de RAS entraîne une activation en cascade des kinases d'aval, avec tout d'abord l'activation de RAF-1, qui active à son tour MEK. Celle-ci va alors phosphoryler la Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), permettant sa translocation au noyau.

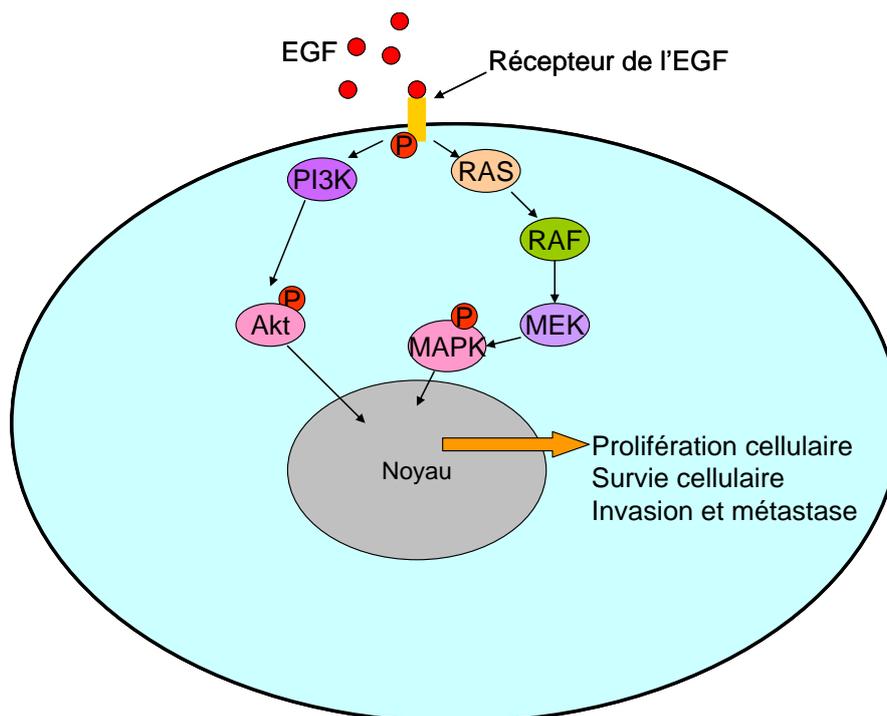


Figure 3 : Voie de l'EGFR [13]

L'activation de RAS entraîne une activation en cascade des kinases d'aval conduisant à la phosphorylation de la MAPK, permettant sa translocation au noyau et l'activation de la prolifération cellulaire

Après sa translocation nucléaire, la MAP-kinase permet l'expression rapide de certains gènes aboutissant à l'activation de la prolifération cellulaire.

La MAP-kinase permet également la survie cellulaire en entraînant l'expression de signaux anti-apoptotiques et l'invasion tumorale en régulant l'expression des enzymes dégradant la matrice extracellulaire comme les MMP (Matrix MetalloProteinase).

Ainsi, l'activation de la voie de l'EGFR est un phénomène très important dans la carcinogénèse, stimulant notamment la prolifération cellulaire.

Le gène *KRAS* est l'un des proto-oncogènes les plus fréquemment activés dans de nombreux cancers. En effet, environ 20 % des tumeurs humaines, y compris le CCR, présentent une mutation activatrice de *KRAS*. La grande majorité des mutations de *KRAS* affectent les codons 12 (approximativement 82 %) et 13 (approximativement 17 %), beaucoup plus rarement les codons 61 ou 146 [14]. Ces mutations correspondent à la substitution d'une base par une autre, conduisant à la substitution d'un acide aminé de la protéine codée par un autre. Les mutations les plus fréquentes entraînent la substitution de la glycine par l'aspartate au niveau du codon 12 (p.G12D), de la glycine par la valine au niveau du codon 12 (p.G12V) ou de la glycine par l'aspartate au niveau du codon 13 (p.G13D). D'autres mutations moins fréquentes sont décrites comme la substitution de la glycine par la sérine (p.G12S) ou l'alanine (p.G12A) au niveau du codon 12, ou encore la substitution de la glycine par l'alanine au niveau du codon 13 (p.G13A) [15-16].

Toutes ces mutations sont activatrices car elles ont pour conséquence une activation constitutionnelle de RAS, conduisant à une activation permanente de la voie de signalisation d'aval et donc de la prolifération cellulaire. La mutation *KRAS* survient précocement dans la carcinogénèse colique, puisqu'elle est retrouvée à la même fréquence dans les adénomes coliques dysplasiques et les adénocarcinomes coliques.

Un autre proto-oncogène, *BRAF*, codant pour la protéine RAF-1, peut également subir une mutation activatrice, notamment au niveau du codon 600 (mutation V600E). C'est l'une des seules mutations décrites de *BRAF*. Elle est également activatrice, conduisant à la stimulation permanente des kinases d'aval et reproduisant les mêmes effets que la mutation *KRAS*.

Les mutations *KRAS* et *BRAF* sont mutuellement exclusives.

2 Traitement du CCR métastatique : les thérapies ciblées

Durant les vingt dernières années, l'espérance de vie des patients porteurs d'un CCR métastatique a augmenté, passant de 6 à presque 25 mois. Cette amélioration est en grande partie due à l'introduction de nouveaux traitements tels que l'oxaliplatine ou l'irinotécan, mais également à l'apparition des thérapies ciblées.

En effet, une meilleure compréhension des phénomènes responsables de la carcinogénèse a permis d'identifier des molécules jouant un rôle important dans la progression de la maladie. Ces molécules constituent des cibles pour de nouvelles thérapies agissant spécifiquement sur elles, et visant à inhiber leur action.

Dans le CCR, deux approches ont été particulièrement développées : le blocage de la voie du VEGF et le blocage de la voie de l'EGFR.

La première possibilité est donc d'agir sur l'angiogénèse tumorale via la voie du VEGF. Ainsi, le bevacizumab, anticorps monoclonal anti-VEGF possédant une activité anti-angiogénique, est largement utilisé dans le traitement du CCR [17].

La seconde possibilité est d'agir sur la voie de l'EGFR (Fig.4). Plus de 65 % des cancers colorectaux surexpriment l'EGFR [18], et sa surexpression semble constituer un facteur de mauvais pronostic sur la survie globale des patients [19-20]. La voie de l'EGFR constitue donc une cible de choix dans la lutte contre le CCR [21].

Il existe deux approches pour bloquer la voie de l'EGFR : à l'aide des anticorps monoclonaux anti-EGFR tels que le cetuximab ou le panitumumab, ou à l'aide des inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR, petites molécules agissant au niveau intracellulaire en bloquant de façon compétitive la liaison de l'ATP à l'EGFR, empêchant ainsi l'activité kinase du récepteur, comme le gefitinib ou l'erlotinib [22].

En ce qui concerne les anticorps monoclonaux anti-EGFR, le premier ayant été utilisé est le cetuximab. C'est un anticorps monoclonal chimérique (Fc humain, Fab murin) de type IgG1 dirigé contre le récepteur à l'EGF, qui possède une affinité pour l'EGFR cinq à dix fois plus importante que ses ligands endogènes. Après sa liaison à l'EGFR, il empêche la fixation de ses ligands, aboutissant à une inhibition de la voie de l'EGFR. Par ailleurs, il entraîne une internalisation de l'EGFR qui pourrait aboutir à une diminution d'expression de ce récepteur et recrute des cellules immunes effectrices cytotoxiques contre les cellules tumorales surexprimant l'EGFR.

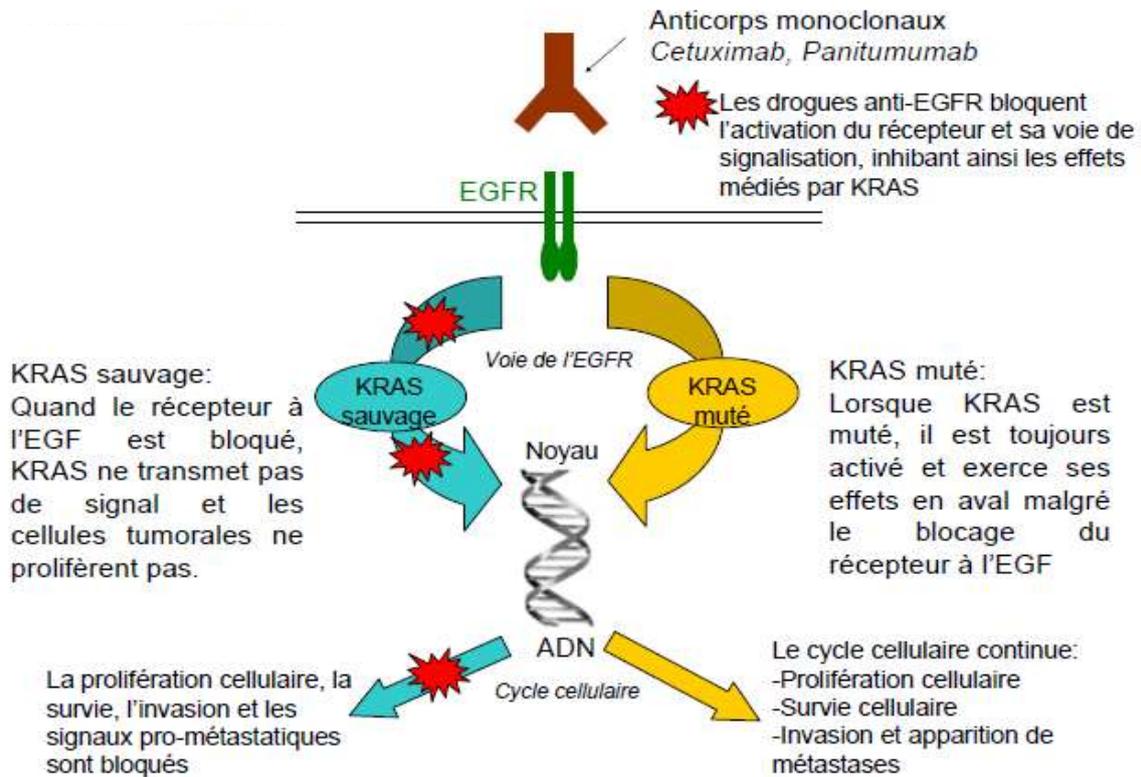


Figure 4 : Activation de la voie de l'EGFR et stratégies de blocage thérapeutique

Le panitumumab est un autre anticorps monoclonal recombinant anti-EGFR de type IgG2 entièrement humanisé, plus récemment introduit. Il possède une grande affinité pour l'EGFR et son mode d'action est le même que celui du cetuximab.

Les molécules inhibitrices de tyrosine kinase (erlotinib, gefitinib) n'ont actuellement pas de place dans le traitement du CCR.

2.1 Efficacité thérapeutique des anti-EGFR

Le cetuximab a d'abord été évalué chez les patients en échec d'une ou plusieurs lignes de chimiothérapies. Dans une étude ouverte de phase II, Saltz *et al.* ont évalué l'efficacité du cetuximab en monothérapie chez des patients en échec d'un traitement par irinotécan. Ils ont montré une réponse tumorale partielle chez 9 % des patients (95 % CI : 0,03-0,19) [23].

Dans l'étude randomisée BOND, l'efficacité d'un traitement par cetuximab associé ou non à l'irinotécan a été évaluée en deuxième ligne de traitement ou au-delà, chez 329 patients ayant déjà été traités par irinotécan et surexprimant l'EGFR. Les

résultats ont montré un taux de réponse tumorale supérieur lorsque le cetuximab était associé à l'irinotécan (22,9 vs 10,8 %, $p=0,007$) ainsi qu'un allongement de la survie sans progression (4,1 vs 1,5 mois, $p<0,001$). La survie globale médiane n'était pas significativement différente [24].

Enfin, l'étude EPIC, réalisée chez 1298 patients en échec d'un traitement par 5-FU associé à l'oxaliplatine, a montré qu'une chimiothérapie de deuxième ligne associant le cetuximab à l'irinotécan donnait de meilleurs résultats que l'irinotécan seul, avec une augmentation du taux de réponse (16,4 vs 4,2 %, $p<0,0001$), un allongement de la survie sans progression (4 vs 2,6 mois, $p<0,0001$) mais sans amélioration significative de la survie globale.

De plus récentes études ont suggéré que le cetuximab pouvait être utilisé en première ligne de traitement en apportant un bénéfice en termes de progression tumorale [25-26].

Le panitumumab a d'abord été évalué chez des patients ayant un CCR métastatique en échec des traitements habituels. Van Cutsem *et al.* ont comparé l'administration de panitumumab aux soins de confort seuls chez des patients ayant résisté à un traitement par 5-FU, oxaliplatine et irinotécan. L'étude a montré une augmentation significative de la survie sans progression (8 vs 7,3 semaines, $p<0,0001$) sans impact sur la survie globale, mais il existait des cross-over effectués dans le bras soins de confort seuls.

Tous ces résultats ont conduit à l'utilisation des anticorps anti-EGFR dans le traitement des patients ayant un CCR métastatique, avec un gène *KRAS* de type sauvage, en association à une chimiothérapie ou en monothérapie, après échec d'un traitement à base d'oxaliplatine et d'irinotécan, ou en cas d'intolérance à l'irinotécan.

2.2 Quelles sont les raisons de l'échec du traitement par anti-EGFR ?

Les différentes études ont montré que l'utilisation des anticorps anti-EGFR apportait un bénéfice thérapeutique à certains patients, cependant une large proportion de patients ne tirait aucun bénéfice de ce traitement comparé aux traitements conventionnels par irinotécan associé au 5-FU.

2.2.a Statut mutationnel *KRAS* et réponse au traitement

Il a été montré dans plusieurs travaux que la présence d'une mutation *KRAS* était prédictive d'une absence de réponse au traitement par cetuximab ou panitumumab [27-28]. Ainsi, Karapetis *et al.* ont montré que chez les patients ayant un CCR métastatique et ayant résisté aux traitements habituels (5-FU, oxaliplatine, irinotécan), l'administration de cetuximab en monothérapie comparée aux soins de support seuls était associée à une meilleure survie globale chez les patients ayant un statut tumoral *KRAS* sauvage (9,5 vs 4,8 mois, $p < 0,001$) mais également à une amélioration de la survie sans progression (3,7 vs 1,9 mois, $p < 0,001$). En revanche, chez les patients ayant un statut tumoral *KRAS* muté, il n'y avait pas de différence significative de survie globale ou sans progression en comparaison avec les soins de support seuls [29].

Le statut *KRAS* est également prédictif de la résistance au traitement par panitumumab. Ainsi, alors que le traitement par panitumumab augmentait significativement la survie sans progression des patients ayant un statut *KRAS* sauvage en comparaison avec des soins de confort (12,3 vs 7,3, $p < 0,0001$), il n'existait pas d'amélioration significative chez les patients ayant un statut *KRAS* muté [30]. Ces données ont été confirmées par une étude de phase III évaluant l'efficacité du panitumumab en deuxième ligne de traitement après échec d'une chimiothérapie à base de fluoropyrimidines, où le statut *KRAS* des patients a été évalué de façon prospective [31].

La présence de mutation de *KRAS* étant prédictive de l'échec du traitement par anticorps anti-EGFR, il est devenu obligatoire de s'assurer de l'absence de mutation avant d'instaurer un traitement par cetuximab ou panitumumab [32].

2.2.b Mutation *BRAF*

Une étude récente a montré que chez les patients ayant un statut tumoral *KRAS* sauvage et ayant résisté au traitement par cetuximab ou panitumumab, l'absence de réponse pouvait être due à la présence d'une mutation *BRAF* (V600E) [33].

Positionnement du problème – But de l'étude

Positionnement du problème

Les mutations *KRAS* ne sont présentes que chez 30 à 40 % des patients, et la mutation *BRAF V600E* n'est présente que dans moins de 10 % des cas.

Les différentes études ont montré que chez les patients n'ayant pas de mutation *KRAS*, on obtenait une réponse tumorale (partielle ou complète) seulement dans 10 à 65 % des cas [34]. D'un autre côté, les mêmes études ont montré que parmi les patients ayant une mutation *KRAS*, une réponse au traitement par anti-EGFR pouvait être observée jusque dans 20 % des cas [35]. Très clairement, le seul statut *KRAS*, évalué principalement au niveau de la tumeur primitive, ne permet donc pas de prédire avec certitude la réponse au traitement par anti-EGFR.

Il a été montré qu'au sein des adénocarcinomes colorectaux, il existait une hétérogénéité des mutations *KRAS* et *TP53* [36-37]. En effet, l'étude du statut mutationnel *KRAS* sur plusieurs prélèvements de la même tumeur a révélé l'existence de foyers tumoraux mutés pour *KRAS* et de zones *KRAS* sauvages.

L'hypothèse de cette étude était que la résistance au traitement par anti-EGFR pourrait être expliquée en partie par une hétérogénéité de statut mutationnel entre les tumeurs primitives et les métastases.

But de l'étude

Le but de cette étude était de comparer le statut mutationnel *KRAS* entre tumeurs primitives et métastases, ainsi que de rechercher une hétérogénéité du statut *KRAS* au sein d'une même métastase, chez des patients atteints de CCR métastatique, traités ou non par anti-EGFR. L'objectif secondaire de l'étude était d'étudier la relation entre l'hétérogénéité de ce statut et la réponse au traitement par anti-EGFR.

Matériels et méthodes

1. Patients et tissus

Vingt et un patients atteints de cancer colorectal métastatique, pris en charge au Centre Hospitalier Universitaire de Nantes (n=13), au Centre Régional de Lutte contre le Cancer René Gauducheau (n=7) ou au Centre Catherine de Sienne (n=1) entre 2000 et 2009, ont été inclus dans cette étude rétrospective. Les critères d'inclusion et d'exclusion sont résumés dans le tableau 2.

Critères d'inclusion	Critères d'exclusion
CCR métastatique	Tumeur primitive non réséquée
Patients majeurs (âge≥18 ans)	Autre cancer concomitant
	Tissus non disponibles

Tableau 2 : Critères d'inclusion et d'exclusion

Chez tous ces patients, du tissu issu de la tumeur primitive et des métastases devait être disponible pour l'analyse de la mutation *KRAS*.

Des échantillons, issus de résections chirurgicales (n=51) ou de biopsies (n=9), fixés au formol et paraffinés, ont été collectés dans la tumorothèque du Service d'Anatomie Pathologique du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes. Ils ont été traités conformément aux recommandations du Comité Français d'Ethique pour la Recherche sur les tissus humains. Vingt-cinq tumeurs primitives, trente-quatre métastases et une récurrence pelvienne ont été collectées. Les métastases étaient considérées comme synchrones si elles étaient découvertes avant ou pendant la résection chirurgicale de la tumeur primitive, ou dans les 12 mois suivant la résection. Elles étaient considérées comme métachrones si elles étaient détectées plus de 12 mois après la chirurgie de la tumeur primitive [38-40].

2. Analyses moléculaires

L'ensemble des échantillons a été revu au Laboratoire d'Anatomie Pathologique pour s'assurer de la qualité du prélèvement et du contenu tumoral. Dans chaque échantillon, la tumeur était identifiée par coloration HES. La partie colorée était ensuite séparée du reste de l'échantillon par macro-dissection, afin de s'assurer d'une proportion de cellules tumorales supérieure à 50 % et de réduire ainsi la contamination par les cellules normales.

L'ADN génomique était ensuite extrait en utilisant le kit QIAGEN tissue DNA kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant.

La recherche d'une mutation de *KRAS* était réalisée sur les codons 12 et 13, qui représentent 95 % des mutations décrites [41]. Les mutations de *BRAF* ont été recherchées sur l'exon 15, au codon 600 (V600E), qui représente plus de 95 % des mutations connues. L'analyse des mutations a été réalisée par séquençage direct des produits de PCR et par PCR allèle-spécifique. Chaque analyse était répétée au moins deux fois, avec des PCR indépendantes. Les amorces utilisées pour la PCR sont présentées sur la figure 5. Lorsqu'une mutation était retrouvée, ces résultats étaient confirmés par la réalisation d'une PCR allèle-spécifique.

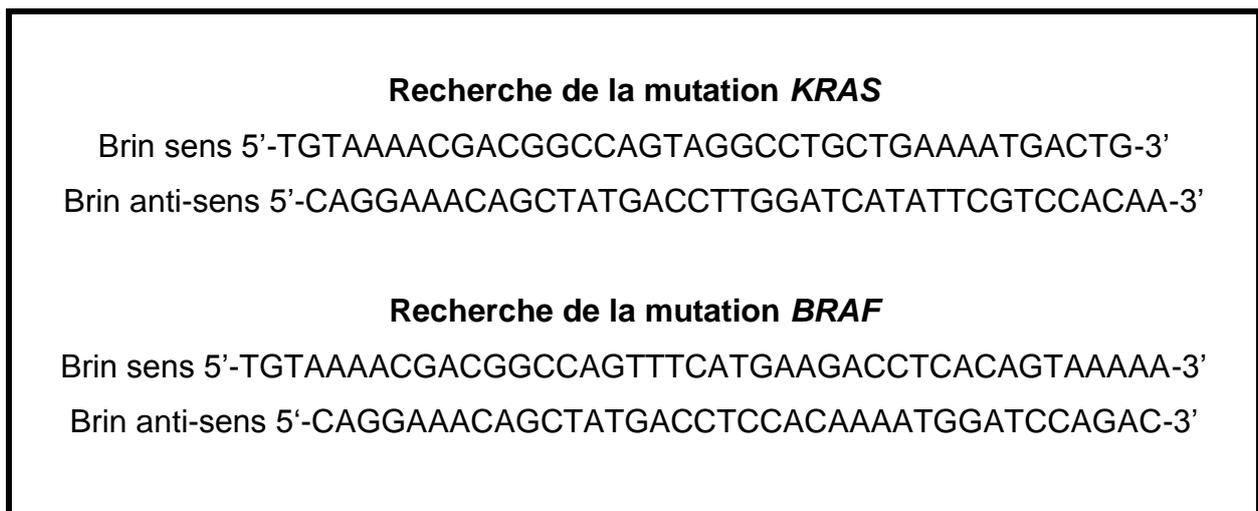


Figure 5 : Amorces utilisées pour l'analyse des mutations par PCR

A chaque fois que cela était possible, le statut mutationnel était analysé sur plusieurs échantillonnages de la même tumeur afin d'étudier l'hétérogénéité intra-tumorale.

Le statut MSI des différentes tumeurs a été évalué par PCR. Cinq loci (BAT25, BAT26, NR21, NR22 et NR24), validés comme marqueurs d'instabilité [42], ont été amplifiés. Leur profil d'amplification était comparé à celui du tissu sain. Les tumeurs étaient classées MSI-High s'il existait une instabilité sur au moins 2 loci, MSI-Low s'il existait une instabilité sur un locus et MSI 0 s'il n'y avait pas d'instabilité.

3. Interprétation des résultats

La PCR a une sensibilité de 2 %. Les prélèvements ont été considérés comme mutés si la PCR était positive pour l'une des mutations recherchées.

Les prélèvements étaient considérés comme non mutés si la PCR était négative.

4. Evaluation clinique et critères de réponse

La réponse tumorale était évaluée tous les trois mois, après chaque séquence de six cures de chimiothérapie, par un scanner thoraco-abdomino-pelvien selon les critères RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumor) [43]. Cette méthode permet d'évaluer la réponse au traitement par la mesure du diamètre de 5 cibles tumorales au total (2 cibles par organe au maximum). La réponse complète est définie par la disparition des cibles, la réponse partielle est définie par une diminution d'au moins 30 % de la somme des diamètres des cibles tumorales. La progression tumorale est définie par une augmentation d'au moins 20 % de la somme des diamètres des cibles. La stabilité correspond à l'absence des critères définissant la réponse partielle ou totale et la progression tumorale.

Les patients étaient classés en quatre groupes : réponse complète (RC), réponse partielle (RP), stabilité (S) ou progression (P). Les patients RC, RP ou S étaient considérés comme répondeurs, les patients P étaient considérés comme non répondeurs. Afin d'évaluer plus précisément la réponse au traitement, et en particulier de détecter une réponse dissociée des différentes localisations métastatiques, chacune des cibles était également évaluée séparément.

Résultats

1. Caractéristiques des patients

Au total, vingt et un patients ont été inclus. Trois patients ont été exclus secondairement en raison d'une mauvaise qualité de prélèvement (ADN inexploitable). Les données démographiques ainsi que les principales caractéristiques cliniques des 18 patients inclus dans l'analyse sont présentées dans le tableau 3.

Principales caractéristiques	n=18 patients
Caractéristiques démographiques	
Age médian (extrêmes)	61 ans (41-74)
Hommes	9
Femmes	9
Site des tumeurs primitives	21
Côlon sigmoïde - côlon gauche	11 (52,4%)
Rectum	6 (28,6%)
Côlon droit	3 (14,2%)
Côlon transverse	1 (4,8%)
Classification TNM au diagnostic	
Tis	1
T1	1
T2	0
T3	9
T4	10
Tumeurs multiples synchrones	2
Métastases	28
Métachrones	20 (71,4%)
Synchrones	8 (28,6%)
Récidive loco-régionale	1
Sites métastatiques analysés	
Foie	21
Estomac	2
Ovaires	2
Péritoine	1
Poumon	1
Cervelet	1
Récidive loco-régionale	1
Traitement sans anti-EGFR	4
Traitement par anti-EGFR	13
Données non disponibles	1
Nombre de ligne de traitement à l'introduction des anti-EGFR	
2ème ligne	1 (7,7%)
3ème ligne	4 (30,7%)
4ème ligne	5 (38,5%)
5ème ligne	2 (15,4%)
6ème ligne	1 (7,7%)

Tableau 3 : Caractéristiques des patients

Deux patients avaient des tumeurs coliques primitives multiples et synchrones. Le premier patient présentait 3 cancers colorectaux synchrones (2 siégeant dans le rectum et un dans le côlon sigmoïde), le second patient avait 2 cancers colorectaux synchrones, l'un dans le côlon droit et l'autre dans le côlon gauche.

Toutes les tumeurs primitives (n=21) correspondaient à des adénocarcinomes, dont 19 (90,5 %) classés comme bien ou modérément différenciés, et 2 (9,5 %) classés comme peu différenciés.

Tous les échantillons issus des sites métastatiques analysés (n=28) correspondaient à des métastases à distance localisées au foie (n=21, 75 %), à l'estomac (n=2, 7,1 %), à l'ovaire (n=2, 7,1 %), au poumon (n=1, 3,6 %) au péritoine (n=1, 3,6 %) et au cervelet (n=1, 3,6 %). Un échantillon correspondait à une récurrence pelvienne d'un adénocarcinome rectal. Chez 15 patients, les métastases étaient localisées sur un site unique, alors que chez 3 patients, les localisations métastatiques intéressaient au moins deux organes différents (de 2 à 4 organes atteints).

Aucune des tumeurs n'avait d'instabilité des microsatellites

Treize patients (72,2 %) ont été traités par anticorps anti-EGFR (cetuximab ou panitumumab).

2. Statut mutationnel de *KRAS*

Une mutation *KRAS* était retrouvée dans 11 (52,4 %) des 21 tumeurs primitives, et dans 17 des 29 (58,6 %) métastases ou récurrence locorégionale.

Les résultats des analyses des profils mutationnels sont présentés dans le tableau 4.

WT : sauvage : Statuts *KRAS* concordants : Statuts *KRAS* discordants : Classement impossible. p.G12A : substitution glycine>alanine (codon 12), p.G12V : substitution glycine>valine (codon 12), p.G12S : substitution glycine>sérine (codon 12), p.G13A : substitution glycine>alanine (codon 13), N/A : données non disponibles

Patient	Tumeur primitive		Métastase ou récurrence		Traitement
	Site de la tumeur (date de résection)	statut <i>KRAS</i>	Site (date de résection R, ou biopsie B)	statut <i>KRAS</i>	anti-EGFR
1	Sigmoïde (2004)	p.G12V	Foie (2004, R)	WT	oui
2	Côlon transverse (2004)	p.G13A	Estomac (2005, B)	p.G13A	oui
3	Rectum (2003)	WT	Foie (2003, B) Foie (2004, R) Foie (2004, R)	WT p.G12V p.G12V	oui
4	Côlon gauche (2001)	WT	Foie (2003, R)	WT	oui
5	Côlon gauche (2004)	p.G12V	Foie (2004, B) Foie (2005, R)	p.G12V p.G12V (1 à 2%)	oui
6	Bas rectum (2004) Haut rectum (2004) Sigmoïde (2004)	WT p.G12V WT	Foie (2004, B) Foie (2005, R) Estomac (2007, R)	WT WT p.G12V	oui
7	Rectum (2004)	WT	Récurrence pelvienne (2006, B)	p.G12V	oui
8	Côlon droit (2006) Côlon gauche (2006)	p.G12A WT	Foie (2006, B) Foie (2007, R) Foie (2007, R) Ovaires (2008, R)	WT p.G12V WT p.G12A	oui
9	Côlon gauche (2006)	WT	Foie (2007, R)	WT	oui
10	Côlon droit (2006)	WT	Foie (2008, R)	WT	oui
11	Sigmoïde (2006)	p.G13A	Foie (2006, R)	p.G13A	non
12	Côlon gauche (2007)	p.G13A	Foie (2009, R)	WT	oui
13	Sigmoïde (2004)	WT	Foie (2006, R)	WT	oui
14	Côlon droit (2008)	WT	Foie (2008, R)	WT	N/A
15	Rectum (2006)	p.G12A	Cervelet (2009, R)	p.G12A	non
16	Rectum (2006)	p.G12A	Foie (2006, R) Foie (2006, R) Foie (2008, R)	p.G12A p.G12A p.G12A	oui
17	Côlon gauche (2008)	p.G12S	Ovaires (2008, R) Péritoine (2009, B)	p.G12S p.G12S	non
18	Charnière recto-sigmoïdienne (2008)	p.G12V	Poumon (2010, R)	p.G12V	non

Tableau 4 : Analyse des mutations *KRAS* des tumeurs primitives et des métastases

L'analyse des mutations *KRAS* a montré que, dans les tumeurs primitives, 8 mutations étaient localisées sur le codon 12 (72,7 %) et 3 mutations étaient localisées sur le codon 13 (27,3 %). Dans les métastases, les profils mutationnels étaient similaires, avec 15 mutations localisées sur le codon 12 (88,2 %) et 2 mutations localisées sur le codon 13 (11,8 %).

Aucune mutation *BRAF* V600E n'a été retrouvée ni dans les tumeurs primitives ni dans les métastases.

2.1 Concordance du statut *KRAS* entre tumeurs primitives et métastases

Chez 12 des 18 patients étudiés (66,7 %), le statut *KRAS* était concordant entre la tumeur primitive et les métastases. Parmi eux, sept patients étaient porteurs d'un gène *KRAS* muté, et cinq étaient porteurs d'un gène *KRAS* sauvage.

Chez 5 autres patients (27,8 %), le statut *KRAS* était discordant entre la tumeur primitive et les métastases ou entre les différentes métastases (tableau 4) :

- Chez 2 patients (n°1 et 12), une mutation était détectée dans la tumeur primitive mais pas dans la métastase hépatique synchrone.
- Chez un patient (n°7), une mutation était détectée dans la récurrence pelvienne mais pas dans la tumeur primitive.
- Chez un patient (n°3), la mutation *KRAS* était absente dans la tumeur primitive et dans une métastase hépatique synchrone, mais elle était présente dans une autre métastase synchrone et dans une métastase métachrone.
- Chez un patient (n°8) ayant deux tumeurs coliques synchrones, une tumeur primitive était *KRAS* sauvage alors que l'autre était mutée p.G12A pour *KRAS*. Parmi ses 4 métastases, une métastase hépatique synchrone et une métastase hépatique métachrone étaient *KRAS* sauvage, une autre métastase hépatique métachrone était mutée p.G12V et une métastase ovarienne métachrone était mutée p.G12A. Ainsi, ce patient présentait deux mutations différentes du codon 12 dans deux métastases métachrones, la mutation G12V n'étant pas retrouvée dans les tumeurs primitives.

Chez 1 (n°6) des 18 patients étudiés, le classement était impossible. En effet, parmi ses 3 tumeurs primitives synchrones, 2 étaient *KRAS* sauvage et 1 était mutée p.G12V. Parmi ses 3 métastases, 2 métastases hépatiques (1 synchrone et 1 métachrone) étaient *KRAS* sauvage, et 1 métastase gastrique métachrone était mutée p.G12V pour *KRAS*.

2.2 Analyse de l'hétérogénéité intratumorale

Afin d'évaluer l'existence d'une éventuelle hétérogénéité intratumorale, une analyse du statut mutationnel a été réalisée dans plusieurs zones différentes de 6 métastases (entre 2 et 3 zones différentes) chez 5 patients (n°6, 8, 9, 10 et 16). Dans 5 métastases, dont 2 considérées comme mutées pour *KRAS* (patient n°8 : métastase hépatique, patient n°16 : métastase hépatique métachrone) et 3 considérées comme sauvages pour *KRAS* (patients n°6, 9 et 10), une concordance parfaite a été observée entre les différentes zones testées. Dans une seule métastase ovarienne métachrone (patient n°8), une hétérogénéité intratumorale a été retrouvée : une partie de la métastase était *KRAS* sauvage, alors qu'une zone adjacente était mutée G12A, tout comme la tumeur primitive de ce patient.

3. Réponse au traitement par anti-EGFR en fonction du statut *KRAS*

Parmi les 18 patients inclus, 13 ont reçu un traitement par anti-EGFR. Trois de ces treize patients ont répondu partiellement au traitement (23 %), alors que les dix autres n'ont pas répondu. La répartition des statuts mutationnels *KRAS* en fonction de la réponse au traitement est schématisée sur la figure 6.

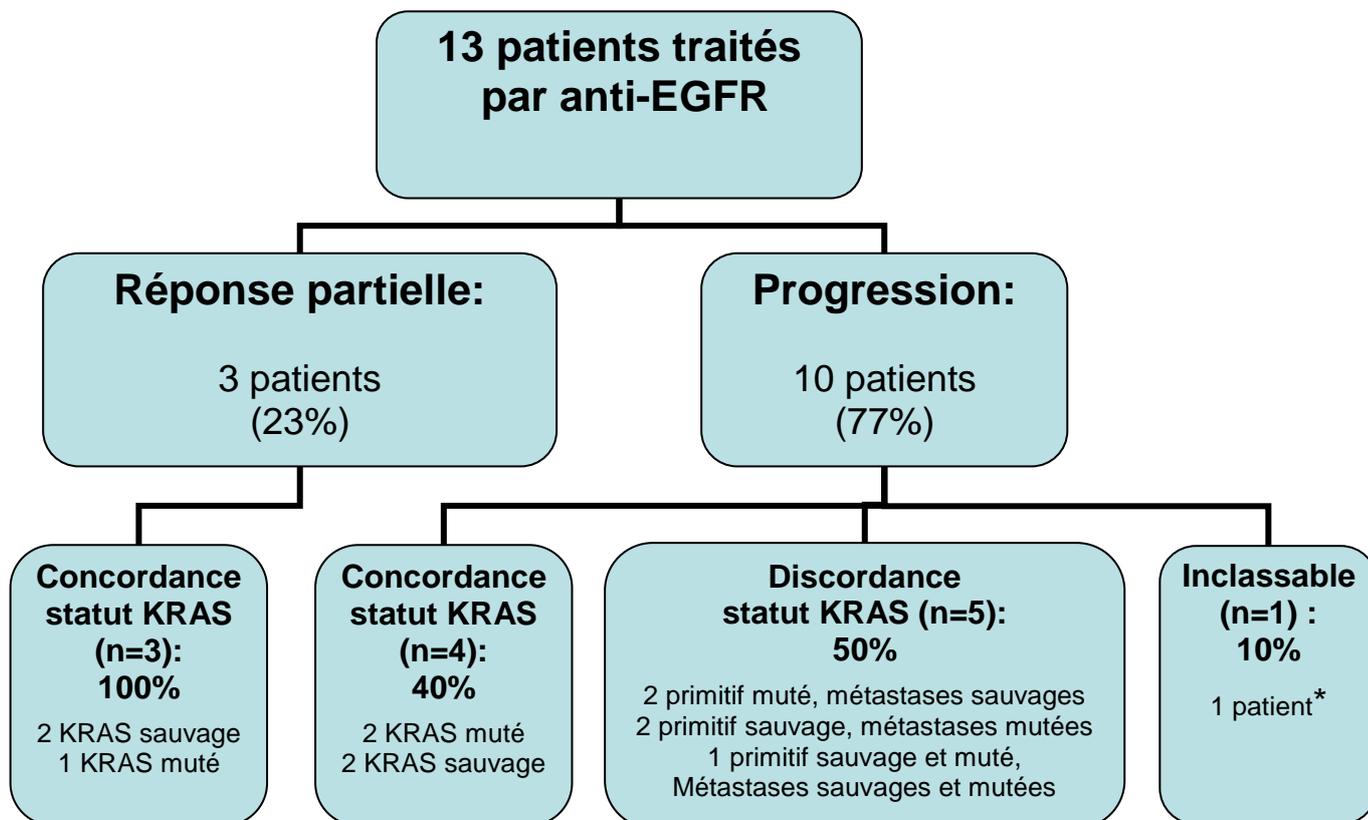


Figure 6 : Distribution des statuts *KRAS* en fonction de la réponse aux anti-EGFR

* patient n°6, ayant à la fois deux tumeurs primitives *KRAS* sauvages, une tumeur primitive *KRAS* mutée, une métastase *KRAS* mutée, deux métastases *KRAS* sauvages

Trois des treize patients (23 %) ont répondu (RP) au cetuximab ou au panitumumab (patients n°4, 9 et 16). La survie médiane sans progression était de 180 jours (de 139 à 193). Ces trois patients avaient un statut *KRAS* concordant entre la tumeur primitive et les métastases : deux (n°4 et 9) avaient une tumeur primitive *KRAS* et des métastases hépatiques métachrones *KRAS* sauvages et un patient (n°16) avait une tumeur primitive et deux métastases hépatiques synchrones et une métachrone *KRAS* mutées. Il convient de souligner qu'un patient (n°16), ayant une tumeur primitive et trois métastases porteuses d'un gène *KRAS* muté, a répondu au traitement par anti-EGFR.

Dix des treize patients (77 %) traités n'ont pas répondu au traitement par anti-EGFR.

Parmi ces patients, quatre avaient un statut *KRAS* concordant entre tumeurs primitives et métastases : 2 patients étaient porteurs de tumeurs *KRAS* sauvages, 2 patients étaient porteurs de tumeurs *KRAS* mutées.

Les cinq autres patients avaient un statut *KRAS* discordant entre tumeurs primitives et métastases. Deux patients avaient des tumeurs primitives *KRAS* sauvages avec des métastases *KRAS* mutées, deux patients avaient des tumeurs primitives *KRAS* mutées et des métastases *KRAS* sauvages. Un patient (n°8) avait une tumeur primitive *KRAS* sauvage et une mutée p.G12A associées à deux métastases *KRAS* sauvages (une synchrone et une métachrone), une métastase métachrone *KRAS* mutée p.G12A et une métastase métachrone *KRAS* mutée p.G12V. Cette dernière mutation n'était pas détectée dans les tumeurs primitives.

Le dernier patient était inclassable.

Aucun des patients ayant un statut *KRAS* discordant n'avait répondu au traitement

La relecture des tomodensitométries n'a pas permis d'observer une réponse dissociée au traitement des différentes cibles tumorales en fonction de leur statut *KRAS*.

Discussion

Cette étude montre une hétérogénéité du statut mutationnel *KRAS* dans le CCR métastatique entre les tumeurs primitives et les métastases d'une part, entre les différentes métastases d'autre part, et enfin au sein d'une même métastase. Une hétérogénéité du statut mutationnel *KRAS* au sein de tumeurs primitives coliques a été démontrée précédemment [36-37, 44-45], avec un taux d'hétérogénéité allant de 20 à 47 % selon les sites tumoraux analysés. Ainsi, une étude de Baldus *et al.* [45] a montré une hétérogénéité du statut mutationnel *KRAS* entre le front d'invasion et le centre de tumeurs *KRAS* mutées, présente dans 20 % des tumeurs primitives. Plusieurs études, hétérogènes en terme d'effectif et de techniques d'analyse, ont comparé le statut mutationnel *KRAS* des tumeurs colorectales à celui de métastases à distance, mais leurs résultats sont discordants, avec une hétérogénéité du statut *KRAS* entre tumeurs primitives et métastases allant de 4 à 30 % [37, 45-51]. Cependant, ces études n'ont analysé qu'un site métastatique par patient, et la plupart des métastases analysées étaient des métastases synchrones.

Les taux importants de discordance de statut *KRAS* constatés dans notre étude entre tumeurs primitives et métastases, ainsi qu'entre les métastases, sont probablement attribuables au nombre élevé de sites tumoraux analysés, provenant à la fois de lésions métastatiques synchrones et métachrones. Baldus *et al.* ont fait la même constatation en comparant les mutations *KRAS* dans les tumeurs primitives et les métastases ganglionnaires de patients ayant un CCR métastatique. Ils ont en effet trouvé un profil mutationnel discordant chez 31 % des patients entre les tumeurs primitives et les métastases ganglionnaires, ainsi qu'entre les métastases ganglionnaires elles-mêmes (1 à 3 métastases ganglionnaires analysées).

Nos résultats sont cohérents avec ceux d'une précédente étude d'Albanese *et al.* qui ont observé une hétérogénéité de statut mutationnel *KRAS* de 30 %, en étudiant le statut *KRAS* par séquençage direct chez 30 patients ayant un CCR métastatique [52]. Ils ont ainsi observé chez 4 patients une mutation *KRAS* uniquement dans les métastases et chez 5 patients une mutation *KRAS* dans les tumeurs primitives avec des métastases *KRAS* sauvages. Dans notre étude, 5 de

nos 18 patients (27,8 %) avaient une discordance de statut mutationnel entre leurs tumeurs primitives et leurs métastases synchrones ou métachrones. Chez un patient (n°8), nous avons pu mettre en évidence l'apparition d'une nouvelle mutation n'existant ni dans la tumeur primitive, ni dans les autres métastases.

Chez un patient ayant une tumeur primitive *KRAS* mutée, la présence de la même mutation a été mise en évidence dans seulement 2 % des cellules composant une de ses métastases hépatiques (patient n°5). Cette hétérogénéité intratumorale a également été retrouvée dans une métastase ovarienne dans laquelle la mutation *KRAS* a été recherchée dans plusieurs zones tumorales (n°8) : la mutation n'a été retrouvée que dans une zone tumorale parmi les 3 testées. Ces données suggèrent l'existence d'un mosaïcisme génétique au sein des tumeurs, permettant de s'interroger sur une éventuelle origine polyclonale du CCR. Plusieurs études ont montré qu'il existait une hétérogénéité entre les différentes métastases d'un même CCR [53], ou au sein des métastases elles-mêmes [54], supportant l'hypothèse d'une origine polyclonale des tumeurs colorectales. Par ailleurs, des études ont montré qu'il existait une importante hétérogénéité aux premiers stades de la maladie, qui disparaissait au cours de l'évolution de la tumeur, avec l'émergence d'un clone cellulaire prépondérant, probablement en raison de l'apparition de mutations conférant un grand potentiel de prolifération [44, 55].

Notre étude a recherché l'impact de l'existence ou non d'une discordance de statut *KRAS* sur la réponse tumorale au traitement par anti-EGFR. A notre connaissance, il s'agit de la première étude s'intéressant à l'impact de l'hétérogénéité de *KRAS* sur la réponse au traitement par anti-EGFR. L'impact de cette hétérogénéité entre tumeur primitive et métastases sur la réponse thérapeutique aux anti-EGFR a été difficile à évaluer dans notre étude en raison du faible nombre de patients inclus. Trois des treize patients (23 %) ont répondu à un traitement par anticorps monoclonaux anti-EGFR. Il est intéressant de noter que parmi eux, un patient présentait un statut *KRAS* muté aussi bien au niveau de la tumeur primitive que des métastases. Parmi les non-répondeurs, 50 % des patients étaient discordants et 50 % étaient concordants ou inclassables. Cependant, compte tenu du faible effectif, il n'était pas possible de conclure sur l'existence d'un impact de l'hétérogénéité de statut *KRAS*

sur la réponse au traitement par anti-EGFR, et des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer celui-ci.

Les traitements par anti-EGFR sont réservés aux patients n'ayant pas de mutation *KRAS*, puisqu'il a été montré qu'en présence d'une mutation *KRAS*, la plupart des patients ne répondaient pas à ce traitement [27, 29]. La recherche de cette mutation est généralement réalisée sur un seul prélèvement tumoral, le plus souvent sur la tumeur primitive, après son exérèse chirurgicale. Cependant, parmi les patients n'ayant pas de mutation *KRAS* retrouvée, moins de 50 % répondent au traitement par anti-EGFR, alors que certains patients ayant une tumeur porteuse d'une mutation *KRAS* peuvent y répondre.

La présence d'une discordance de statut mutationnel entre les différentes localisations tumorales pourrait constituer une explication à la résistance au traitement par anti-EGFR. De même, l'existence d'une hétérogénéité de statut mutationnel *KRAS* intra-tumorale, potentiellement due à l'apparition tardive d'une mutation *KRAS*, est de nature à rendre inefficace le traitement par anti-EGFR. Cependant, la proportion de patients présentant une discordance est trop faible pour expliquer l'ensemble des résistances, et il est probable que d'autres mutations de la voie de l'EGFR pourraient se produire et être responsables de la résistance à ce traitement. Dans ce contexte, la mutation ou le défaut d'expression de PTEN, la surexpression de pAkt, l'augmentation du nombre de copies du gène de l'EGFR, l'augmentation de la phosphorylation de l'EGFR ou la surexpression de ligands alternatifs de l'EGFR tels que l'amphiréguline ou l'épiréguline sont des pistes qui commencent à être discutées [56].

Nous avons exclu 3 patients en raison d'une mauvaise qualité de l'ADN tumoral rendant impossible la recherche de mutations. Parmi ces patients, l'un d'eux avait été traité pour un cancer du rectum par radiothérapie et chimiothérapie pré-opératoire. Ce traitement néo-adjuvant pourrait empêcher la recherche de la mutation *KRAS* dans la pièce opératoire en raison du faible volume tumoral résiduel et d'une fibrose importante. La recherche de la mutation devrait donc être réalisée sur des biopsies prélevées avant la radiothérapie ou, le cas échéant, sur des prélèvements réalisés sur les localisations secondaires de la tumeur.

En conclusion, si la recherche de la mutation *KRAS* est un prérequis indispensable à un traitement par anti-EGFR, on peut se demander s'il ne serait pas préférable de réaliser cette recherche sur l'ensemble des sites tumoraux accessibles à un prélèvement, et préférentiellement sur les métastases à distance, car elles constituent souvent la cible tumorale à traiter.

En effet, la recherche de la mutation *KRAS* sur un seul prélèvement tumoral, comme c'est actuellement le cas en pratique courante, ne permet pas de s'affranchir d'une éventuelle hétérogénéité entre les localisations tumorales. La méconnaissance de celle-ci risque de contre-indiquer un traitement par anti-EGFR chez un patient considéré comme *KRAS* muté et qui aurait des métastases *KRAS* sauvages, alors qu'il pourrait en tirer bénéfice. A l'inverse, cela pourrait entraîner la prescription d'un traitement inefficace chez un patient considéré *KRAS* sauvage avec des métastases *KRAS* mutées.

Des études sur un plus grand nombre de patients sont nécessaires afin d'évaluer précisément la fréquence de l'hétérogénéité de statut *KRAS* et son impact sur l'efficacité thérapeutique des traitements par anti-EGFR.

Références bibliographiques

1. Center, M.M., et al., *Worldwide variations in colorectal cancer*. CA Cancer J Clin, 2009. **59**(6): p. 366-78.
2. Remontet, L., et al., *Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000*. Rev Epidemiol Sante Publique, 2003. **51**(1 Pt 1): p. 3-30.
3. Monnet, E., et al., *Influence of socioeconomic status on prognosis of colorectal cancer. A population-based study in Cote D'Or, France*. Cancer, 1993. **72**(4): p. 1165-70.
4. Markowitz, S.D. and M.M. Bertagnolli, *Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(25): p. 2449-60.
5. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instability in colorectal cancers*. Nature, 1997. **386**(6625): p. 623-7.
6. Kitamura, T., et al., *SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion*. Nat Genet, 2007. **39**(4): p. 467-75.
7. Bronner, C.E., et al., *Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer*. Nature, 1994. **368**(6468): p. 258-61.
8. Fishel, R., et al., *The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer*. Cell, 1993. **75**(5): p. 1027-38.
9. Kastrinos, F. and S. Syngal, *Recently identified colon cancer predispositions: MYH and MSH6 mutations*. Semin Oncol, 2007. **34**(5): p. 418-24.
10. Issa, J.P., *CpG island methylator phenotype in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(12): p. 988-93.
11. Vazquez, A., et al., *The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(12): p. 979-87.
12. Folkman, J., *Angiogenesis*. Annu Rev Med, 2006. **57**: p. 1-18.
13. Ciardiello, F. and G. Tortora, *EGFR antagonists in cancer treatment*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1160-74.
14. Brink, M., et al., *K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study*. Carcinogenesis, 2003. **24**(4): p. 703-10.
15. Neumann, J., et al., *Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer*. Pathol Res Pract, 2009. **205**(12): p. 858-62.
16. Andreyev, H.J., et al., *Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study*. Br J Cancer, 2001. **85**(5): p. 692-6.
17. Hurwitz, H. and F. Kabbinavar, *Bevacizumab combined with standard fluoropyrimidine-based chemotherapy regimens to treat colorectal cancer*. Oncology, 2005. **69 Suppl 3**: p. 17-24.
18. Radinsky, R., et al., *Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(1): p. 19-31.
19. Mayer, A., et al., *The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer*. Cancer, 1993. **71**(8): p. 2454-60.

20. Ljuslinder, I., et al., *Increased EGFR expression at the invasive margin is a negative prognostic factor in colorectal cancer*. *Int J Cancer*, 2010.
21. Mendelsohn, J. and J. Baselga, *The EGF receptor family as targets for cancer therapy*. *Oncogene*, 2000. **19**(56): p. 6550-65.
22. Amador, M.L. and M. Hidalgo, *Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target for the treatment of colorectal cancer*. *Clin Colorectal Cancer*, 2004. **4**(1): p. 51-62.
23. Saltz, L.B., et al., *Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(7): p. 1201-8.
24. Cunningham, D., et al., *Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(4): p. 337-45.
25. Van Cutsem, E., et al., *Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(14): p. 1408-17.
26. Bokemeyer, C., et al., *Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(5): p. 663-71.
27. Lieve, A., et al., *KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer*. *Cancer Res*, 2006. **66**(8): p. 3992-5.
28. Di Fiore, F., et al., *Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy*. *Br J Cancer*, 2007. **96**(8): p. 1166-9.
29. Karapetis, C.S., et al., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(17): p. 1757-65.
30. Amado, R.G., et al., *Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(10): p. 1626-34.
31. Peeters M, P.T., Hotko Y, Cervantes A, Ducreux M, André T, et al., *Randomized phase III study of panitumumab with FOLFIRI vs FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer*. *Eur J Cancer*, 2009. **Suppl**(7): p. 3.
32. Allegra, C.J., et al., *American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(12): p. 2091-6.
33. Di Nicolantonio, F., et al., *Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(35): p. 5705-12.
34. Moroni, M., et al., *Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study*. *Lancet Oncol*, 2005. **6**(5): p. 279-86.
35. Normanno, N., et al., *Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009. **6**(9): p. 519-27.
36. Giaretti, W., et al., *Intratumor heterogeneity of K-ras2 mutations in colorectal adenocarcinomas: association with degree of DNA aneuploidy*. *Am J Pathol*, 1996. **149**(1): p. 237-45.
37. Al-Mulla, F., et al., *Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality*. *J Pathol*, 1998. **185**(2): p. 130-8.

38. Fong, Y., et al., *Liver resection for colorectal metastases*. J Clin Oncol, 1997. **15**(3): p. 938-46.
39. Tsai, M.S., et al., *Clinicopathological features and prognosis in resectable synchronous and metachronous colorectal liver metastasis*. Ann Surg Oncol, 2007. **14**(2): p. 786-94.
40. Ueno, H., et al., *Indicators for treatment strategies of colorectal liver metastases*. Ann Surg, 2000. **231**(1): p. 59-66.
41. Frattini, M., et al., *Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(12 Pt 1): p. 4015-21.
42. Suraweera, N., et al., *Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR*. Gastroenterology, 2002. **123**(6): p. 1804-11.
43. Eisenhauer, E.A., et al., *New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)*. Eur J Cancer, 2009. **45**(2): p. 228-47.
44. Losi, L., et al., *Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression*. Carcinogenesis, 2005. **26**(5): p. 916-22.
45. Baldus, S.E., et al., *Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(3): p. 790-9.
46. Tortola, S., et al., *Discordance between K-ras mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2001. **19**(11): p. 2837-43.
47. Artale, S., et al., *Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(25): p. 4217-9.
48. Etienne-Grimaldi, M.C., et al., *K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(15): p. 4830-5.
49. Santini, D., et al., *High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice*. Oncologist, 2008. **13**(12): p. 1270-5.
50. Loupakis, F., et al., *PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(16): p. 2622-9.
51. Italiano, A., et al., *KRAS and BRAF mutational status in primary colorectal tumors and related metastatic sites: biological and clinical implications*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(5): p. 1429-34.
52. Albanese, I., et al., *Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **325**(3): p. 784-91.
53. Sung, J., Boulware, D, Eschrich, S, Gonzalez, F, Yeatman, TJ, Lee, H, *Genetic Heterogeneity of Colorectal Cancer Liver Metastases*. J Surg Res, 2003. **114**.
54. Goasguen, N., et al., *Evidence of heterogeneity within colorectal liver metastases for allelic losses, mRNA level expression and in vitro response to chemotherapeutic agents*. Int J Cancer, 2010. **127**(5): p. 1028-37.
55. Shibata, D., et al., *Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(13): p. 1058-63.

56. Siena, S., et al., *Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(19): p. 1308-24.

NOM : JAMET

PRENOM : Philippe

Titre de thèse : La recherche de la mutation *KRAS* apporte-t-elle une information fiable pour décider des options thérapeutiques chez les patients ayant un cancer colorectal métastatique ?

RESUME

Contexte : La mutation de *KRAS* dans les cancers colorectaux (CCR) est un facteur prédictif de mauvaise réponse au traitement par les anti-EGFR. Cependant, tous les patients exempts de cette mutation ne répondent pas au traitement, et certains patients ayant une mutation *KRAS* peuvent y répondre.

Hypothèse : Une hétérogénéité de statut *KRAS* entre tumeur primitive et métastases pourrait en partie expliquer l'absence de réponse au traitement. **Objectif de l'étude** : Comparer le statut *KRAS* entre les tumeurs primitives et les métastases et étudier la relation entre une hétérogénéité de statut *KRAS* et la réponse au traitement.

Méthodes : Chez les 18 patients ayant un CCR métastatique inclus dans cette étude rétrospective, 21 tumeurs primitives, 28 métastases et 1 récurrence locale ont été recueillies. Le statut mutationnel *KRAS* au niveau des tumeurs primitives et des métastases a été analysé par séquençage direct. Chez les patients traités par anti-EGFR, la réponse au traitement a été comparée à l'hétérogénéité du statut *KRAS*.

Résultats : Chez 12 patients (66,7%), le statut *KRAS* était concordant entre la tumeur primitive et les métastases, alors qu'il était discordant chez 5 autres patients (27,8%). Une hétérogénéité intratumorale au sein d'une métastase a été trouvée sur les 6 analysées. Parmi les 13 patients traités par anti-EGFR, 10 (77%) n'ont pas répondu au traitement : 4 d'entre eux avaient un statut concordant entre tumeur primitive et métastases, 5 avaient un statut discordant, et le dernier était inclassable. Les 3 patients (23%) qui ont répondu au traitement (réponse partielle) avaient un statut concordant de *KRAS* entre les métastases et la tumeur primitive.

Conclusion : L'hétérogénéité de statut *KRAS* entre tumeurs primitives et métastases pourrait expliquer en partie la résistance au traitement par anti-EGFR. La recherche de la mutation *KRAS* devrait être réalisée sur toutes les cibles tumorales accessibles.

MOTS-CLES

Cancer colorectal, *KRAS*, hétérogénéité tumorale, anti-EGFR