

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2016

N°

133

THESE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Spécialité Anatomie et Cytologie Pathologiques

par

Charles-Edward LIDDELL
né(e) le 10/02/1985 à Montmorency (Val d'Oise)

Présentée et soutenue publiquement le 05/10/2016

**CARTOGRAPHIE DES DIFFÉRENTES ENTITÉS CLINICO-
PATHOLOGIQUES D'ADÉNOCARCINOME MUCINEUX DU COLON : UNE
ANALYSE DE REGROUPEMENT HIERARCHISÉ**

Président et directeur de thèse: Monsieur le Professeur J.-F. Mosnier

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur **Jean-Francois MOSNIER**, pour avoir accepté de diriger et de présider le jury de cette thèse. J'ai beaucoup d'admiration pour votre compréhension de la pathologie et vos qualités de chercheur. Merci pour votre patience, votre disponibilité et votre bienveillance.

Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

À Madame la Professeur **Céline BOSSARD**, merci pour ton enseignement pendant mes années d'internat et d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

À Monsieur le Professeur **Stéphane BEZIEAU**, pour m'avoir accueilli un semestre dans votre service, vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Au Docteur **Sylvie METAIRIE**, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Merci à tous ceux qui ont été présent et bienveillant durant ces (longues) années d'internat:

Merci au Pr Laboisse de m'avoir accepté dans cette belle spécialité, et à tous les médecins qui ont pris le temps de me former et qui m'ont transmis une certaine passion pour cette discipline: François, Laure, Christine K, Christine S, Marie, Didier, Madeleine, Frédérique, Elizabeth, Céline, Anne, Karine, Delphine, Claire, Marie-Françoise, Aude, Laurent, Pascale, Julie et Odile.

Je remercie également mes amis co-internes: Juliette (pour ta gentillesse, ton courage et ta confiance), Clo, Eva (encore désolé de ne pas t'avoir dit au revoir un soir à Jean Monnet), Delphine, Faustine, Othie (l'homme polype), Marie (merci pour la relecture de mon œuvre et tes cartes bancaires qui savent toujours me surprendre), Salim, Oli (Kiki);

A mes co-internes d'un semestre: Claire, Elsa L., Cécile, Caroline, Elsa LL., Sophie, Maxime, Rbéllou (tu crois aux miracles?), Robin, Olivier (pour les myélojazz), Alexandre.

A Camille et Audrey.

A tous les techniciens d'anapath de Nantes, La Roche et Saint-Nazaire, particulièrement à Antoine et Cyril (marathon men), à Raphaël et Erwan.

Aux secrétaires de Nantes, La Roche et Saint Saint-Nazaire, avec un pensée particulière pour Karine.

A toute l'équipe de génétique avec qui j'ai passé un semestre très agréable, notamment à Ingrid qui m'a formé, à Fabrice et Sébastien K, à Amélie, à Sébastien S et à Céline.

A toute l'équipe 4 de Marc Grégoire, qui m'a permis de passer une année de Master 2 très riche: Christophe (maître Yoda), Jaja qui a partagé mon bureau, Sophie, Carole, Iza, Camille, Jeff, Daniel, Virginie, Clarisse, Delphine, Anne-Lise, Nicolas.

Merci à tous mes amis de l'internat: Les Sablais, Élise pour ton ouverture d'esprit et ton amitié précieuse, Clairette, Marion Couscous Merguez pour tes courriers internes et Arthur pour toutes les protéines que tu m'apportes; et la ptite Lou qu'a pas idée d'être si mignonne.. Marie-couche-toi-là sait si bien transformer chaque instant en spectacle, Anaboule, Mathilde, Pierre & Clo & Little Barsi! , Anna, Marinette, Marie U, Solenne, Alex & Arnaud, Aurélie & Tanguy & Julia, Anne-Laure, Pacalou, Clément & Delphine, Thomas, Paul.

Merci aux Trompettes de Fallope de m'apporter un peu de musique, de bières et de vacances depuis plus de quatre ans, plus particulièrement au pupitre de l'ombre des clariflutes: Raphaël, Delphine et Anne Cécile. A Clément & Gaga, Sam, UD & Anne Cat, Pacalou & Léa, Manue, Guigui, Jacques, Greg & Charlotte, Cécile & Hakim, Olivier & Elise, Anais & Clément (et toutes les mini-falopes en route), et à tous les autres!

A nos nouveaux voisins les Bastet et les Mesnage.

A mes amis d'externat: Anna coloc de choc, Claire Lizou & family, Sabrina, Nico Valé et Paul, Benj, Laura, Virginia, Ahlem, Marion, Seb.

Au groupe du Lycée: Didi, Cec (tu m'as doublé!) et Seb, Lucie, Lila, BenJ et Laureline.

Aux membres de mon gouvernement: Kooda (on reste concentré!) & Christelle, Péloche tu es une personne clé dans ma vie, à ton fils Théo pour son courage et à Kristina, Slim (kikou) et Sarah, Lasta et Céline & Eva, Jo le haricot, Dam, Alison et Noémie, Roum, Omega, Lalou, Aurélie, Roseline. Merci d'avoir été ma bouffée d'oxygène pendant ces longues années et d'avoir secoué les soirées médecines. Merci à Mendiani Sound et Ayenalem. Merci pour les soirées au barachin.

A ma belle famille, merci pour votre soutien et votre intérêt pour mon travail.

A ma famille: Pap, Mounette, Doug & Marine, Alex, Liza & JC. Mamie Odette. Patrick et Françoise.

A Noémie et Arthur, à notre petite famille en devenir, merci pour tout ce que vous m'apportez au quotidien, le meilleur reste à venir!

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	1
INTRODUCTION.....	2
But de l'étude.....	2
Historique de l'adénocarcinome mucineux et des voies de cancérogenèse colorectale.....	3
1. Descriptions de l'adénocarcinome mucineux et de ses particularités.....	3
2. Découverte des principales voies de cancérogenèse colorectale.....	5
3. Découverte du rôle des anomalies épigénétiques dans les cancers colorectaux.....	8
4. Étude génétique des adénocarcinomes mucineux.....	9
5. Origine de la sécrétion de mucus dans les adénocarcinomes mucineux colorectaux.....	11
Voies de cancérogenèse colorectale.....	13
1. Généralités.....	13
2. Voie de cancérogenèse colorectale de l'adénome en dysplasie conventionnelle: l'instabilité chromosomique.....	14
2.1. Initiation du développement de l'adénome.....	14
2.2. Progression de l'adénome au cancer.....	17
3. Voie de cancérogenèse colorectale des lésions festonnées : la voie festonnée.....	20
3.1. Caractéristiques communes aux différents polypes festonnés.....	20
3.2. Initiation de la voie festonnée.....	21
3.3. Evolution des caractéristiques histologiques et moléculaires des polypes festonnés au cancer.....	22
4. La voie de l'instabilité microsatellitaire.....	26
5. Les voies alternes de cancérogenèse colorectale.....	27
MGMT et cancer colorectal.....	28
1. Mécanisme d'action de MGMT.....	28
2. Rôle de MGMT dans la cancérogenèse colorectale.....	28
3. MGMT et perspectives thérapeutiques.....	29
Epidémiologie moléculaire pathologique et analyse de regroupement hiérarchisé.....	30
PATIENTS ET MÉTHODES.....	32
Patients.....	32
Étude histologique.....	32
Immunohistochimie.....	33
Expression des protéines de réparation des mésappariements de l'ADN et de <i>MGMT</i>	33
Méthylation du promoteur des gènes <i>MGMT</i> et <i>MLH1</i>	34
Profil d'instabilité microsatellitaire.....	34

Évaluation de l'expression nucléaire de la beta caténine.....	34
Analyse mutationnelle du gène <i>CNNTB1</i>	35
Analyse mutationnelle de <i>BRAF</i> et <i>KRAS</i>	35
Analyse de regroupement hiérarchisé des profils moléculaires des adénocarcinomes mucineux.	35
Statistiques.....	36
RÉSULTATS.....	37
Analyse histologique des adénocarcinomes mucineux.....	37
Expression nucléaire de la beta caténine.....	39
Statut mutationnel de <i>KRAS</i>	39
Statut mutationnel de <i>BRAF</i>	39
Statut MSS/MSI-H.....	39
Méthylation du promoteur du gène <i>MGMT</i> et perte d'expression de <i>MGMT</i>	41
Pronostic.....	42
Analyse de regroupement hiérarchisé des adénocarcinomes mucineux.....	43
DISCUSSION.....	47
BIBLIOGRAPHIE.....	52

Index des tableaux

Tableau 1: anticorps et dilutions utilisées.....	33
Tableau 2: caractéristiques clinico-pathologiques et moléculaires des adénocarcinomes mucineux et du groupe contrôle d'adénocarcinomes sans autre indication (SAI).....	40
Tableau 3: impact des caractéristiques clinico-pathologiques, des marqueurs génotypiques de la cancérogenèse colorectale et du stade de la tumeur sur la survie globale des patients atteints d'adénocarcinome mucineux, avec le modèle de régression multivariée de Cox.....	43
Tableau 4: association des principales caractéristiques clinico-pathologiques des quatre groupes d'adénocarcinome mucineux définis par le regroupement hiérarchisé.....	46

Index des figures

Figure 1.....	5
Figure 2.....	6
Figure 3.....	7
Figure 4.....	8
Figure 5.....	12
Figure 6.....	15
Figure 7.....	16
Figure 8.....	17
Figure 9.....	18
Figure 10.....	23
Figure 11.....	25
Figure 12.....	27
Figure 13.....	28
Figure 14.....	31
Figure 15.....	38
Figure 16.....	38
Figure 17.....	42
Figure 18.....	45

LISTE DES ABRÉVIATIONS

APC	: <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ADN	: Acide Desoxyribo Nucléique
CIN	: <i>Chromosomal Instability</i>
EGFR	: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
HNPCC	: <i>Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer Syndrome</i>
KRAS	: <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LOH	: <i>Loss of Heterozygosity</i>
MGMT	: O6-Methyl Guanine-DNA Methyl Transferase
MLH1	: MutL homolog 1
MSH2	: MutS homolog 2
MSH6	: MutS homolog 6
MSI	: <i>Microsatellite Instable</i>
MSS	: <i>Microsatellite Stable</i>
NOS	: <i>Not Otherwise Specified</i>
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PAS	: <i>Periodic Acid Schiff</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RER	: <i>Replication Errors</i>
SAI	: Sans Autre Indication

INTRODUCTION

But de l'étude

Le cancer colorectal est le 3^e cancer le plus fréquent chez l'homme et le 2^e cancer le plus fréquent chez la femme. Il représente la 4^e cause de décès par cancer dans le monde, totalisant 1,4 millions de cas par an et 694 000 décès ¹. En France, ce cancer touche 42 150 personnes chaque année et on dénombre environ 18 000 décès ².

Le diagnostic des cancers colorectaux repose sur l'analyse anatomopathologique. Ces tumeurs semblent, de premier abord, relativement homogènes sur le plan histologique, constituées à plus de 90% d'adénocarcinomes. Ces adénocarcinomes sont représentés à 85 % par des adénocarcinomes sans autre indication (SAI) ³.

L'adénocarcinome mucineux est un sous-type histologique relativement fréquent, représentant 10 à 15 % des adénocarcinomes colorectaux et défini selon la classification de l'OMS 2010 par la présence de plus de 50 % de mucus extracellulaire ³. Ce sous-type histologique particulier a été depuis longtemps considéré comme une entité intéressante en raison de ses caractéristiques clinico-pathologiques distinctes des autres cancers colorectaux. En effet il a été montré dès les années 1920 qu'il est plus fréquemment situé au niveau du colon proximal et est de plus mauvais pronostic ⁴. De plus il présente un profil métastatique particulier et une moins bonne réponse aux chimiothérapies palliatives ⁵⁻⁷. Des études plus récentes ont montré que les adénocarcinomes mucineux présentaient également des caractéristiques moléculaires distinctes, avec plus fréquemment un phénotype instable pour les microsatellites (MSI), un profil de méthylation des îlots CpG (CIMP) et une mutation du gène *BRAF*, amenant certains auteurs à suggérer une voie de cancérogenèse distincte pour ce type de tumeurs ⁸. Ces études soulignant les particularités des adénocarcinomes mucineux ont néanmoins conduit à une vision stéréotypée de ces tumeurs.

Ainsi, nous avons voulu étudier l'hétérogénéité des adénocarcinomes mucineux du colon en analysant leur profil clinique, histologique, moléculaire et évolutif.

Historique de l'adénocarcinome mucineux et des voies de cancérogenèse colorectale

1. Descriptions de l'adénocarcinome mucineux et de ses particularités

La première description d'une hétérogénéité histologique au sein des adénocarcinomes coliques a été celle de l'adénocarcinome mucineux par Parham en 1923 ⁴. Parham définit un sous-type d'adénocarcinome riche en mucus, représentant environ 16 % des adénocarcinomes colorectaux, qui semble être corrélé à un profil clinique particulier. En effet, les adénocarcinomes mucineux sont localisés plus fréquemment au niveau du colon droit (caecum, colon ascendant et colon transverse) et la mortalité est plus élevée. Néanmoins, cette tumeur semble d'évolution plus lente et les métastases surviennent plus tardivement. Parham affirme que le mucus est produit par les cellules tumorales et non par les cellules du stroma. En effet, on peut observer des vacuoles de mucus intra-cytoplasmique s'ouvrant au pôle apical des cellules tumorales à proximité des plaques de mucus extracellulaire. De plus, il n'est jamais observé de mucus extracellulaire dans une métastase si l'adénocarcinome primitif n'est pas mucineux. Les cellules adénocarcinomateuses sécrètent du mucus de manière incontrôlée, et ce mucus est un signe de différenciation fonctionnelle de ces cellules. Dans certains cas, les cellules carcinomateuses peuvent prendre un aspect particulier de « bague à chaton », caractérisées par une volumineuse vacuole intracellulaire et un noyau refoulé en périphérie. Parham rappelle que l'adénocarcinome mucineux peut se voir dans tout organe possédant des cellules épithéliales capables de produire du mucus.

En 1976, Symonds étudie une série de 893 adénocarcinomes colorectaux parmi lesquels il observe 132 (15 %) adénocarcinomes mucineux ⁹. D'un point de vue histologique, il constate que les cellules s'organisent souvent en lambeaux, bordant des cavités irrégulières emplies de mucus (figure 1). Généralement il n'existe pas d'infiltrat inflammatoire autour des plaques de mucus alors qu'un infiltrat lympho-plasmocytaire est souvent observé autour des structures acineuses non mucosécrétantes. Les plaques de mucus sont marquées par les colorations spéciales du bleu de toluidine, du PAS (*Periodic Acid Schiff*) et du bleu alcian. Symonds observe que les adénocarcinomes mucineux sont associés à des lésions précoces : des adénomes villosités sont retrouvés dans 31 % des cas, et dans 26 % des cas on observe en bordure du carcinome une

muqueuse hyperplasique avec des cryptes allongés prenant un aspect indenté, ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules caliciformes. Cette dernière description correspond à la dénomination actuelle de polype festonné. Il décrit également des cas d'adénocarcinomes mucineux associés à une maladie inflammatoire chronique de l'intestin et secondaires à la radiothérapie. Il confirme le mauvais pronostic associé aux adénocarcinomes mucineux par rapport aux adénocarcinomes non mucineux, avec une survie à 5 ans respectivement de 34 % versus 53 %. Ses hypothèses sur les causes de l'agressivité des adénocarcinomes mucineux sont (i) la diffusion plus aisée des cellules tumorales par le biais du mucus et (ii) l'interférence du mucus sur la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire, suggérée par l'absence de réaction inflammatoire autour de ces tumeurs.

Umpleby propose une définition plus précise de l'adénocarcinome mucineux dans un article publié en 1985. Les tumeurs sont considérées comme mucineuses si elles comportent plus de 60 % de mucus, rapporté au volume tumoral. Il confirme une fois de plus le profil clinique particulier de ces tumeurs, de localisation proximale et de moins bon pronostic ¹⁰. Sadahiro montre que les adénocarcinomes présentant plus de 10 % de mucus extracellulaire sont de moins bon pronostic et propose ce seuil pour définir les adénocarcinomes mucineux ¹¹. En 1988, Okuno étudie une série de 540 adénocarcinomes colorectaux et note que les adénocarcinomes mucineux présentent plus fréquemment une infiltration des tissus avoisinants, des métastases ganglionnaires, des implants péritonéaux et une moins bonne survie à 5 ans et à 10 ans. Ainsi, il suggère de prendre en charge ce type d'adénocarcinome de manière plus agressive, notamment sur le curage ganglionnaire et la résection des tissus environnants ¹².

D'autres études confirmeront la nécessité de distinguer ce type histologique d'adénocarcinome de plus mauvais pronostic ^{13,14} et en 1995, Lanza émet l'hypothèse que les adénocarcinomes mucineux pourraient présenter un profil génétique différent ¹⁵.

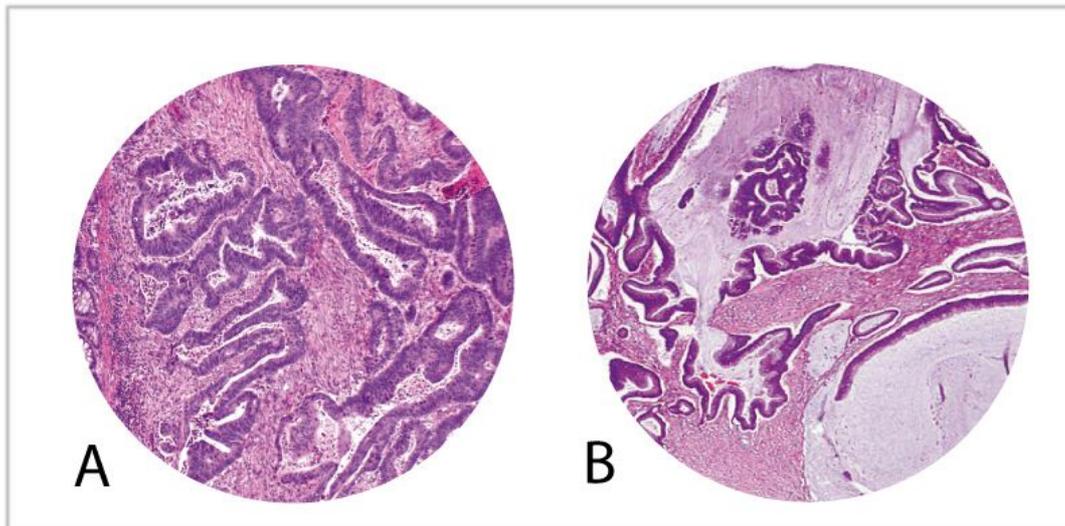


Figure 1: Aspect histologique d'un adénocarcinome colique infiltrant sans autre indication (A) et d'un adénocarcinome colique mucineux (B). Source: librepathology.org ¹⁵².

2. Découverte des principales voies de cancérogenèse colorectale

De grands progrès ont été faits dans les années 1980 sur la compréhension de la cancérogenèse et son lien avec la génétique. En 1986, Nowel formule l'idée que le cancer résulte d'une série d'altérations génétiques, entraînant des anomalies progressives des mécanismes contrôlant la croissance cellulaire ¹⁶. Vogelstein voit dans la cancérogenèse colorectale un modèle parfaitement adapté pour confirmer cette hypothèse. En effet, il est déjà établi que la plupart des adénocarcinomes colorectaux naissent d'adénomes, comme l'a suggéré Dukes en s'appuyant sur le modèle clinique de la polypose adénomateuse familiale ¹⁷. Ainsi, il est possible d'analyser les altérations génétiques de ces tumeurs à différents stades de développement. En 1988, Vogelstein montre que les mutations des gènes *KRAS* et *NRAS* sont fréquentes dans les adénomes, de même que les délétions alléliques des chromosomes 5, 17 ou 18 ¹⁸. La fréquence de ces anomalies génétiques suit le degré d'évolution des adénomes. Vogelstein établit dans cette étude la première théorie de la cancérogenèse colorectale : une accumulation d'altérations génétiques, impliquant l'activation d'oncogènes (*KRAS*, *NRAS*) et la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeur (*APC*, *TP53*), conduit à la progression histologique de l'épithélium colique normal à l'adénome puis au cancer (figure 2). Cette voie de cancérogenèse est actuellement dénommée voie de l'instabilité chromosomique (CIN pour *Chromosomal Instability*), également appelée LOH (*loss of heterozygosity*), en rapport avec des anomalies récurrentes visibles au caryotype.

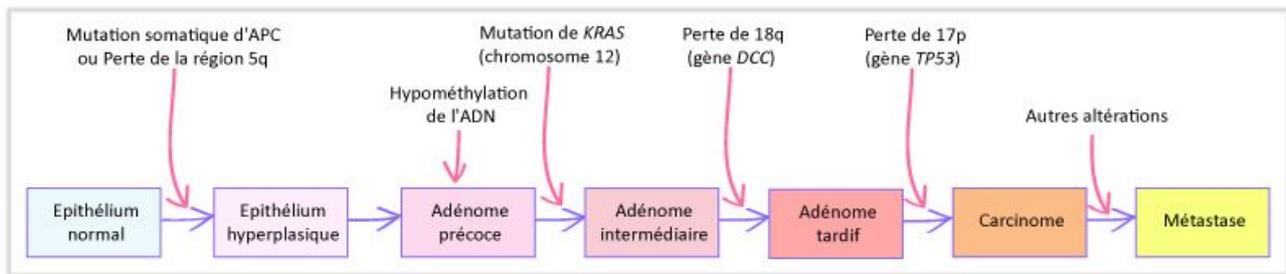


Figure 2: Schéma de la séquence adénome-carcinome selon le modèle de Fearon et Vogelstein en 1990 ⁶⁰.

Une deuxième voie de cancérogenèse colorectale est découverte en 1993 par Thibodeau et par Aaltonen. En effet, bien que la majorité des cancers colorectaux présentent un profil d'instabilité chromosomique, ce n'est pas une caractéristique commune à toutes les tumeurs. Certaines études indiquent même que la perte d'hétérozygotie est corrélée avec la localisation de la tumeur, au niveau du colon gauche, suggérant l'existence d'un autre mécanisme génétique encore inconnu ^{19,20}. Le travail de Thibodeau porte sur la fréquence des altérations des microsatellites dans les cancers colorectaux. Les microsatellites sont des séquences d'ADN répétées d'un ou plusieurs nucléotides. Thibodeau observe une différence significative entre les microsatellites de l'ADN des tumeurs et de l'ADN normal des patients dans 14% des cas ²¹ (figure 3). Dans 80 % des cas instables pour les microsatellites (MSI), on ne retrouve pas d'instabilité chromosomique. De plus, ces tumeurs MSI présentent des caractéristiques cliniques distinctes : elles sont localisées dans 87 % des cas au niveau du colon droit. Thibodeau constate que dans ces tumeurs, des anomalies sont retrouvées dans de nombreux microsatellites sans rapport entre eux, ce qui suggère un mécanisme sous-jacent commun conduisant à des altérations sur de multiples microsatellites. La cancérogenèse colorectale semble donc pouvoir emprunter deux voies différentes : (i) des mutations dans différents gènes suppresseurs de tumeurs entraînant l'instabilité chromosomique, (ii) des mutations dans un groupe de gènes inconnus entraînant l'instabilité microsatellitaire. Aaltonen publie dans le même numéro du journal *Science*, un article sur l'analyse génétique de familles atteintes d'un syndrome décrit par Lynch quelques années plus tôt, le syndrome HNPCC (*Hereditary non polyposis colorectal cancer syndrome*) ou syndrome de Lynch ²². Aaltonen décrit dans ces cancers des erreurs de réplication de l'ADN (RER – *replication errors*), correspondant à l'instabilité microsatellitaire décrite par Thibodeau. Le mois suivant ces deux publications, un article de Ionov paraît dans la revue *Nature*, sur cette même voie d'instabilité microsatellitaire qu'il attribue à une mutation dans un gène inconnu codant pour le maintien de la fidélité de la

réplication de l'ADN ²³. Quelques mois plus tard, cette même année 1993, Fishel et Leach identifient en même temps le gène *hMSH2* situé sur le chromosome 2 ^{24,25}, puis Bronner trouve un autre gène impliqué dans l'instabilité microsatellitaire, le gène *hMLH1* sur le chromosome 3 ²⁶. Nicolaidis identifie le gène *hPMS2* dont la mutation peut être observée dans le syndrome de Lynch ²⁷. Enfin, Marsischky identifie le gène *HMSH6* ²⁸. Ces quatre gènes (*hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* et *hPMS2*) codent pour les principales protéines du système de réparation des mésappariements de l'ADN, le système MMR (*Mismatch Repair*). Cependant, la présence d'une mutation dans ces quatre gènes ne permet pas d'expliquer tous les cas d'instabilité microsatellitaire, suggérant un mécanisme pathogénique différent entre les tumeurs MSI héréditaires (syndrome de Lynch) et les cancers sporadiques.

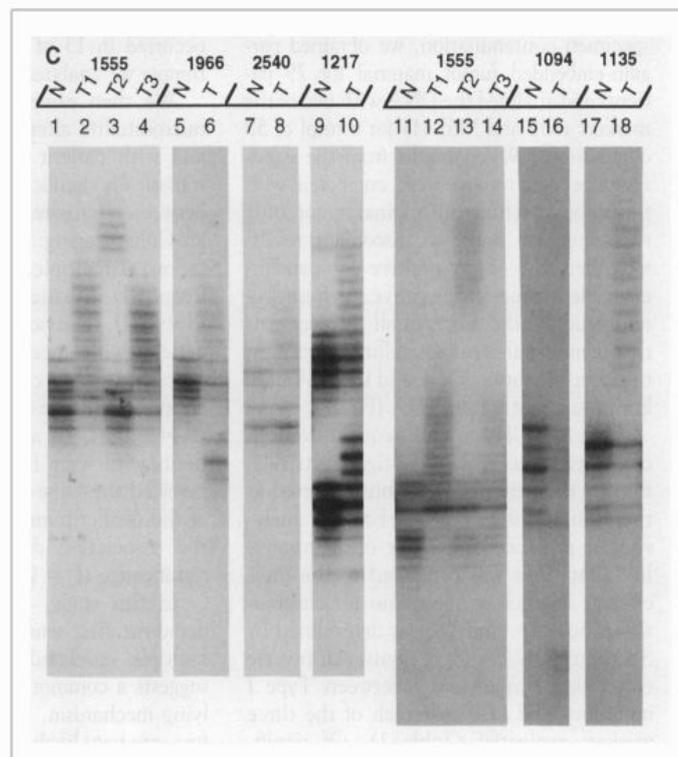


Figure 3: Première description de l'instabilité microsatellite dans le cancer colorectal par Thibodeau en 1993 ²¹. L'électrophorèse de séquences microsatellites amplifiées par PCR des échantillons N (normaux) ne montre pas d'instabilité tandis que les échantillons T (tumoraux) sont instables (nombreuses bandes).

3. Découverte du rôle des anomalies épigénétiques dans les cancers colorectaux

L'épigénétique est définie par des changements héréditaires dans la fonction des gènes, ayant lieu sans altération de la séquence ADN. Les mécanismes épigénétiques comprennent la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et les ARN non codants. La première description d'anomalies épigénétiques dans les cellules cancéreuses remonte à l'article de Feinberg et Vogelstein publié dans *Nature* en 1983²⁹. Dans cet article, les auteurs mettent en évidence une hypométhylation globale de l'ADN dans les tumeurs. Cette hypométhylation globale de l'ADN des cellules cancéreuses a été associée à une perte de stabilité génomique. En 1989, Greger montre que l'hyperméthylation du promoteur du gène suppresseur de tumeur *RB*, au niveau d'îlots riches en nucléotides CG (îlots CpG), induit la répression de ce gène dans les cellules de rétinoblastome³⁰ (figure 4). Cette observation démontre pour la première fois qu'un gène suppresseur de tumeur peut être inactivé par un mécanisme épigénétique. En 1997, Kane apporte la réponse au mécanisme pathogénique des tumeurs MSI sporadiques, en démontrant que l'hyperméthylation de *hMLH1* peut être responsable de la perte d'expression de la protéine MLH1³¹.

Une nouvelle voie de cancérogenèse colorectale s'appuyant sur l'hyperméthylation de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs est proposée en 1999 par Toyota et coll.³². Cette voie, appelée CIMP (CpG island Methylator Phenotype), serait empruntée par environ 35 % des carcinomes colorectaux³³.

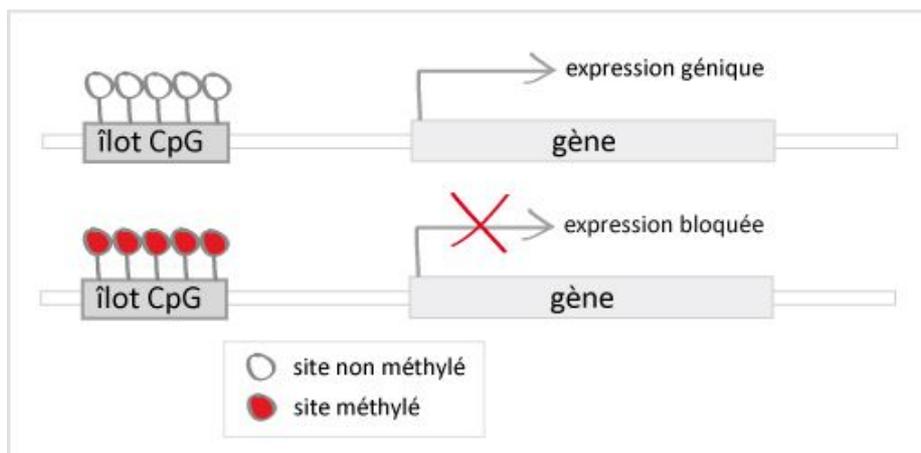


Figure 4: Représentation schématique de la répression génique induite par la méthylation des cytosines au niveau des îlots CpG de promoteurs de gènes. L'hyperméthylation de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs définit le phénotype CIMP (CpG island methylator phenotype).

4. Étude génétique des adénocarcinomes mucineux

En 1994, Kim étudie les caractéristiques clinico-pathologiques des adénocarcinomes présentant une instabilité microsatellitaire. Il observe que 35 % des adénocarcinomes MSI sont de type mucineux alors que ce sous type histologique n'est observé que dans 7 % des tumeurs non MSI ³⁴. Cette forte prévalence des adénocarcinomes mucineux au sein des tumeurs MSI est confirmée par la série de Bocker en 1996 ³⁵. Ces constatations sont en accord avec l'hypothèse de Lanza sur le profil génétique distinct des adénocarcinomes mucineux ¹⁵. Messerini et coll. veulent vérifier ces observations en étudiant le statut d'instabilité microsatellitaire d'une série de 44 adénocarcinomes mucineux sporadiques ³⁶. L'instabilité microsatellitaire est nommée MSI ou MSI-High (MSI-H) lorsque plus de 40 % des marqueurs nucléotidiques sont instables pour les microsatellites, tandis qu'elle est nommée MSI-low (MSI-L) lorsqu'il existe une instabilité microsatellitaire observable sur moins de 40 % de ces marqueurs ³⁷. Dans son étude, Messerini observe un phénotype MSI-H dans 27% des adénocarcinomes mucineux contre 5 % dans le groupe contrôle d'adénocarcinomes non mucineux. Les adénocarcinomes mucineux MSI sont retrouvés chez des patients plus jeunes et ces tumeurs sont plus souvent de croissance exophytique. Messerini constate que les adénocarcinomes mucineux MSI-H présentent en histologie un aspect d'infiltration de type expansif tandis que les MSI-L et MSS ont un aspect infiltratif. Il ne retrouve pas de différence significative concernant l'infiltrat lymphoïde de type Crohn qui avait été fréquemment décrit au contact des adénocarcinomes colorectaux sporadiques MSI et dans les syndromes de Lynch ^{34,38}. Il conclut que le phénotype MSI-H pourrait influencer directement la production de mucus dans les cancers colorectaux sporadiques et héréditaires, en altérant les gènes impliqués dans la synthèse de mucine ou sa dégradation.

En 1999, Zhang confirme l'aspect histologique plus fréquent d'infiltration expansive des adénocarcinomes mucineux. Il observe que les adénocarcinomes mucineux présentent plus fréquemment des mutations de *KRAS* que les adénocarcinomes non mucineux (50 % vs 25%, $p=0,02$) et moins d'expression de p53 (72 % vs 49%, $p=0,02$) ³⁹, soulignant une fois de plus les caractéristiques génétiques différentes des adénocarcinomes mucineux.

En 2005 et 2006, Song et Tanaka confirment le profil moléculaire distinct des adénocarcinomes mucineux. Dans l'étude de Song, les adénocarcinomes mucineux sont plus fréquemment MSI, *BRAF* mutés et de phénotype CIMP, et présentent moins fréquemment des altérations d'*APC* et de *KRAS* par rapport aux adénocarcinomes non mucineux ⁸. Tanaka étudie également le profil

génétiq ue d'une série de 26 adénocarcinomes mucineux colorectaux qu'il compare à 57 adénocarcinomes non mucineux ⁴⁰. Il confirme que les adénocarcinomes mucineux sont plus fréquemment MSI (27 % vs 12%, p=0,09), *BRAF* mutés (46 % vs 16 % p<0,01) et de phénotype CIMP (38 % vs 18 %, p<0,05), et n'observe pas de différence significative pour la mutation de *KRAS*. De plus il observe une association forte entre le statut MSI et CIMP d'une part, et entre MSI et la mutation de *BRAF* d'autre part (p<0,001).

Une étude récente analysant 756 683 cancers colorectaux issus de bases de données américaines et suédoises retrouvait 9,3 % de sous-type mucineux. Ceux-ci étaient observés plus fréquemment chez des femmes et des patients jeunes, souvent localisés au niveau du colon droit, et souvent de stade avancé. Une analyse multivariée mettait en évidence un plus mauvais pronostic par rapport aux adénocarcinomes non mucineux. D'un point de vue anatomopathologique, les adénocarcinomes mucineux présentaient significativement moins de nécrose et d'infiltrat lymphoïde. Dans cette étude, une analyse du statut mutationnel de *KRAS* de 24 adénocarcinomes mucineux comparés à 125 adénocarcinomes non mucineux, retrouvait un statut *KRAS* muté significativement plus fréquent dans les adénocarcinomes mucineux (44 % vs 24 %, p=0,041) ⁴¹. Cette fréquence élevée des mutations de *KRAS* a été confirmée par une méta-analyse ⁴².

Malgré ces caractéristiques particulières, il persiste actuellement un débat sur la nécessité de distinguer les adénocarcinomes mucineux. Certains auteurs soutiennent que ce sous-type d'adénocarcinome ne devrait pas être classé comme un type histologique différent des adénocarcinomes colorectaux classiques ⁴³. D'autres, comme Hugen, pensent au contraire que le caractère mucineux d'un adénocarcinome colorectal est une caractéristique importante à prendre en compte pour la prise en charge personnalisée des patients. Il souligne par exemple la mauvaise réponse de ces tumeurs aux chimiothérapies dans les stades avancés, possiblement due à la vascularisation peu développée et à la barrière de mucus empêchant l'accès des molécules et de la réponse immunitaire antitumorale aux cellules cancéreuses ⁴⁴.

5. Origine de la sécrétion de mucus dans les adénocarcinomes mucineux colorectaux

La définition des adénocarcinomes mucineux se base sur une caractéristique évidente en histologie : l'abondance du mucus produit par les cellules tumorales. Cette caractéristique résulte probablement d'anomalies génétiques ou épigénétiques conduisant à une dérégulation de la production de mucus par les cellules caliciformes. Étonnamment, si les caractéristiques moléculaires particulières des adénocarcinomes mucineux sont fréquemment soulignées, leur lien avec la production de mucus est assez peu discuté dans la littérature, reflétant le manque de compréhension actuel de ce phénomène.

Les mucines sont des protéines de haut poids moléculaire caractérisées par la présence d'un nombre variable de répétitions d'acides aminés en tandem, riches en sérine et en thréonine, et hautement glycosylées, créant la spécificité de chaque type de mucine. Les deux principaux gènes impliqués dans la synthèse du mucus du tube digestif sont les gènes *MUC2* et *MUC5AC*, tous deux localisés dans la région chromosomique 11p15.5. Le gène *MUC2* code pour la mucine de type intestinal, qui est présente à l'état normal dans les cellules caliciformes de l'intestin grêle et du colon ⁴⁵. Le gène *MUC5AC* code pour une mucine de type gastrique, présente dans l'épithélium foveolaire de l'estomac ⁴⁶. La sécrétion de mucus intra-luminal constitue la principale ligne de défense de la muqueuse digestive ⁴⁷.

La présence de cellules caliciformes sécrétant le *MUC2* au sein des cryptes coliques est déterminée par le facteur de transcription *ATOH1*. Ce facteur de transcription *ATOH1* est directement inhibé par la voie de signalisation Notch et indirectement par la voie Wnt ⁴⁸. La plupart des adénocarcinomes colorectaux présentent une importante diminution d'expression de *MUC2* et du nombre de cellules caliciformes, secondaire à l'activation de ces voies de signalisation ⁴⁹.

Contrairement à la majorité des adénocarcinomes colorectaux, il a été montré que l'ARNm de *MUC2* est maintenu à un niveau élevé dans les adénocarcinomes mucineux ^{49,50}. La protéine *MUC2* est également significativement surexprimée dans ce sous-type histologique ⁵¹ (figure 5). Cette surexpression de *MUC2* résulte d'une hypométhylation du gène *MUC2* ⁵². Le mécanisme responsable du maintien de l'expression de *MUC2* dans les adénocarcinomes mucineux n'est pas bien compris, mais la répression de la voie Notch pourrait jouer un rôle dans la genèse du phénotype mucineux ⁴⁸. De plus, une étude portant sur des lignées cellulaires de carcinome muco-

épidermoïde a montré que MUC2 est régulé au niveau transcriptionnel et protéique par la voie RAS/RAF/MAP Kinase ⁵³. En outre, la production de MUC2 peut être inhibée *in vitro* par un inhibiteur de MEK ⁵⁴. Ainsi, les mutations activatrices de *KRAS* et de *BRAF*, responsables d'une activation constitutive de la voie RAS/RAF/MAP Kinase, jouent également probablement un rôle dans le maintien de la sécrétion de mucus par les cellules tumorales.

Contrairement à l'hypothèse soulevée par Messerini et coll. ³⁶, il n'a pas été rapporté de lien moléculaire entre l'instabilité microsatellitaire ou le phénotype CIMP et l'expression de MUC2 ⁴².

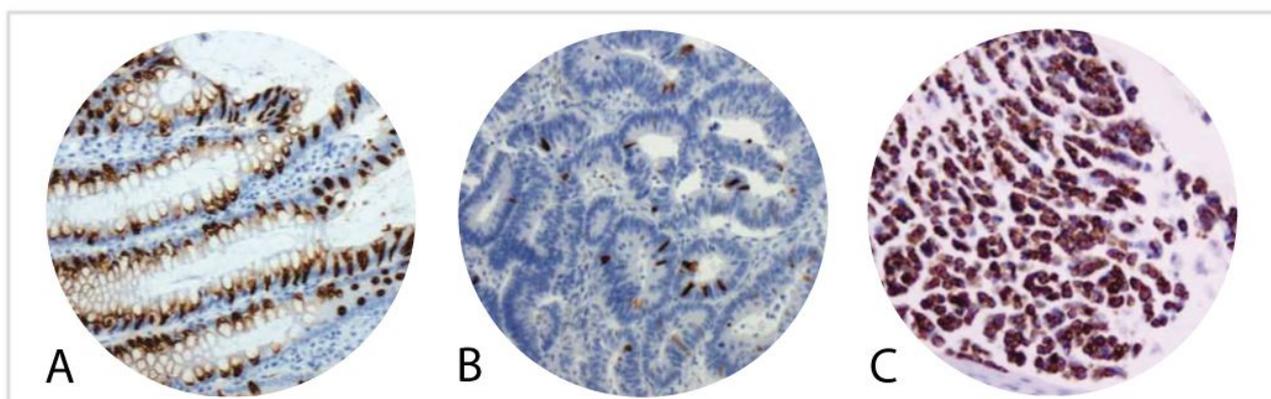


Figure 5: Expression immunohistochimique de MUC2 dans le cytoplasme des cellules caliciformes de l'épithélium colique normal (A); perte d'expression immunohistochimique de MUC2 dans un adénocarcinome colique de type non spécifique (B); expression intense de MUC2 dans un adénocarcinome mucineux. D'après Walsh et coll. ⁵⁵

Le phénotype mucineux peut également être expliqué par l'expression aberrante de MUC5AC, qui a été observée dans 35% des carcinomes colorectaux sans composante mucineuse et dans 94 % des adénocarcinomes mucineux, dans une série de 722 adénocarcinomes colorectaux ⁵⁵. Le mécanisme de cette néo-expression n'est pas bien connu. Certains auteurs pensent qu'il s'agit d'un mécanisme épigénétique (hypométhylation du gène *MUC5AC*) ⁵⁶ et d'autres ont avancé l'hypothèse d'une mutation dans gène *SOX2* ⁵⁷, bien que la corrélation entre l'expression de *SOX2* et de *MUC5AC* soit controversée ⁵⁸.

Voies de cancérogenèse colorectale

1. Généralités

Le développement des cancers colorectaux est la conséquence d'une accumulation progressive et complexe d'altérations génétiques et épigénétiques. L'acquisition d'une instabilité génomique est un événement crucial dans le développement d'une tumeur. Le taux de mutation de base dans les cellules est insuffisant pour être responsable des mutations multiples qui sont nécessaires au développement d'un cancer. Les cellules cancéreuses doivent donc acquérir une forme d'instabilité génomique intrinsèque : un phénotype mutateur, qui augmente le taux de nouvelles mutations ⁵⁹.

Il existe au moins trois voies distinctes d'instabilité génomique intervenant dans la cancérogenèse colorectale. La voie de l'instabilité chromosomique (CIN ou LOH) a été décrite en premier, initiée par la mutation du gène *APC* entraînant des pertes alléliques, des amplifications et des translocations géniques ⁶⁰. Cette voie classique de la carcinogenèse colorectale est empruntée par environ 60 % des carcinomes colorectaux ⁶¹. Une deuxième voie appelée voie de l'instabilité microsatellite (MSI), a été décrite dans les années 1990 ²¹. Cette voie est liée à l'inactivation de gènes appartenant au système de réparation des mésappariements de l'ADN, entraînant l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Plus récemment, les progrès de biologie moléculaire ont permis d'identifier une troisième voie de cancérogenèse. Celle-ci n'implique pas de changement de séquences d'ADN, mais une hyperméthylation au niveau du promoteur de certains gènes, dans des régions répétitives appelées îlots CpG. C'est la voie de méthylation des îlots CpG (CIMP) ³². La définition de ces trois voies n'est pas mutuellement exclusive ⁶².

D'un point de vue anatomopathologique, la séquence de l'adénome avec dysplasie conventionnelle menant à l'adénocarcinome est classiquement rattachée à la voie de l'instabilité chromosomique. Les lésions festonnées colorectales sont, quant à elles, rattachées aux voies de l'instabilité microsatellite et de la méthylation des îlots CpG (CIMP).

La connaissance de ces différentes voies de cancérogenèse a eu un impact majeur sur la pratique clinique puisqu'elle a incité à considérer ces différents types de polypes colorectaux comme des lésions précancéreuses, et à effectuer une exérèse préventive afin d'empêcher leur transformation carcinomateuse.

2. Voie de cancérogenèse colorectale de l'adénome en dysplasie conventionnelle: l'instabilité chromosomique

L'adénome conventionnel a longtemps été considéré comme le seul précurseur du cancer colorectal, empruntant la séquence adénome-carcinome. Cette voie de cancérogenèse en plusieurs étapes moléculaires a été proposée pour la première fois par Fearon et Vogelstein en 1990⁶⁰ et correspond à la voie de l'instabilité chromosomique, empruntée par environ 60 % des cancers colorectaux^{33,63}. Le nom d'instabilité chromosomique se réfère à la présence dans les cellules tumorales de variations du nombre de chromosomes et à des changements structuraux observables au caryotype, avec pour conséquence une perte d'hétérozygotie des gènes. Cette instabilité chromosomique résulte de différents mécanismes: mutations ponctuelles, altération du nombre de chromosomes, réarrangements chromosomiques, amplification génique, défaut de ségrégation des chromosomes, anomalies du nombre de centrosomes, dysfonctions des télomères, dommages de l'ADN et perte d'hétérozygotie⁶⁴. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de consensus sur la définition précise de l'instabilité chromosomique. En effet, différentes approches peuvent être utilisées comme la cytométrie de flux, le caryotypage, l'analyse de perte d'hétérozygotie, l'hybridation in situ (FISH), et le CGH array. En raison de l'utilisation de différentes méthodes et critères, il n'est pas toujours évident de désigner une tumeur comme CIN+ ou CIN-.

La durée du développement tumoral de l'adénome au carcinome par la voie d'instabilité chromosomique a été évaluée à environ 10 à 15 ans⁶⁵.

2.1. Initiation du développement de l'adénome

2.1.1 Caractéristiques histologiques

Foyer de crypte aberrante dysplasique

Le premier précurseur de néoplasie épithéliale observable morphologiquement est le foyer de crypte aberrante dysplasique⁶⁶. Le terme de dysplasie correspond à la traduction morphologique du premier stade du processus néoplasique, se traduisant par des anomalies de la différenciation des cellules épithéliales. Le foyer de crypte aberrante dysplasique, repérable en endoscopie après coloration au bleu de méthylène, est caractérisé par des cryptes élargies avec un épithélium épaissi bordé de cellules dont la mucosécrétion est réduite³ (figure 6).

L'adénome en dysplasie conventionnelle

L'adénome se présente sous forme d'une lésion qui peut être en relief (polype pédiculé ou sessile), plat ou déprimé. Histologiquement, il peut présenter une architecture tubuleuse, villose ou tubulo-villose. L'adénome conventionnel est défini par la présence d'une dysplasie dite « conventionnelle », par opposition à la dysplasie festonnée de description plus récente.

La dysplasie conventionnelle est définie par de nombreux critères morphologiques, comprenant des anomalies architecturales et cellulaires ⁶⁷. Les signes de désorganisation architecturale peuvent être une augmentation du nombre de glandes dont la taille devient variable et les contours irréguliers, une disposition anarchique des glandes les unes par rapport aux autres, une forme souvent complexe, avec un aspect de branchement ou de fusion glandulaire. Les cellules dysplasiques ressemblent aux cellules du fond des cryptes : elles sont cylindriques hautes avec un noyau volumineux, allongé, hyperchromatique, un cytoplasme plus basophile et une perte de la mucosécrétion. Les noyaux sont de taille inégale et perdent leur situation normale, à la partie basale de la cellule, entraînant un aspect de pseudo-stratification. On observe des mitoses traduisant l'augmentation de la prolifération cellulaire. Celles-ci peuvent être retrouvées dans tout l'épithélium anormal, y compris à la partie superficielle des glandes.

L'adénome en dysplasie conventionnelle de bas grade est caractérisé par une hypercellularité avec des noyaux allongés, peu hyperchromatiques, pseudo-stratifiés, mais restant au pôle basal des cellules épithéliales, sans dépasser les $\frac{3}{4}$ de la hauteur de l'épithélium (figure 6).

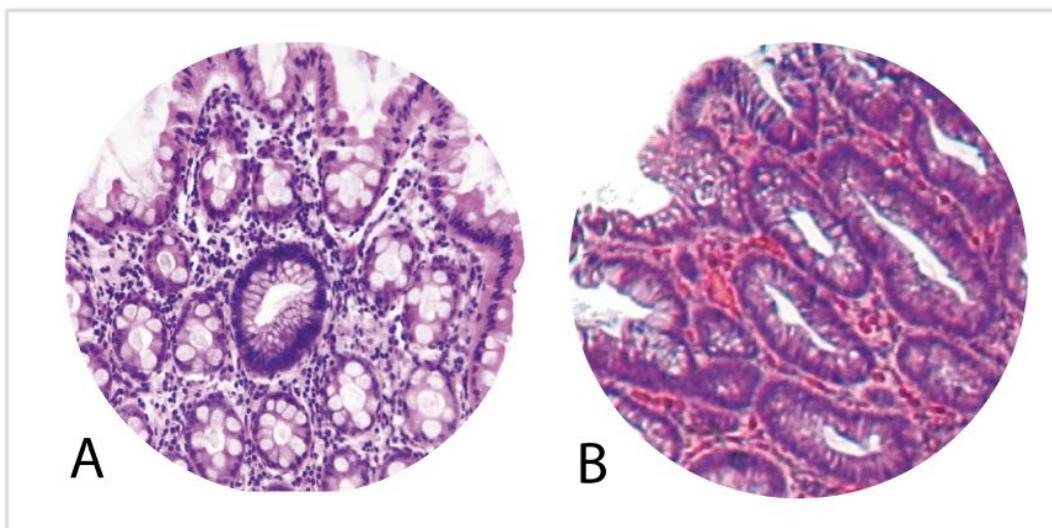


Figure 6: Aspect histologique d'une crypte aberrante dysplasique (A) et d'un adénome tubuleux en dysplasie de bas grade (B). D'après WHO – www.pubcan.org et librepathology.org ¹⁵².

2.1.2 Caractéristiques moléculaires

Voie de signalisation Wnt : APC, beta caténine

Un événement important dans l'initiation du développement de l'adénome est l'activation du signal Wnt par l'intermédiaire d'une mutation du gène suppresseur de tumeur *APC* (*adenomatous polyposis coli*)⁶⁸. Le gène *APC* code pour une protéine comportant de nombreux domaines fonctionnels qui régulent la différenciation, l'adhésion, la polarité, la migration, le développement, l'apoptose et la ségrégation chromosomique. La mutation de ce gène entraîne une inactivation de la protéine APC avec pour conséquence une accumulation de beta caténine dans la cellule, activant la transcription de multiples gènes impliqués dans la croissance cellulaire et l'invasion. Ceci induit une augmentation de la prolifération cellulaire^{69,70} (figure 7).

Les mutations germinales d'*APC* sont responsables de la polypose adénomateuse familiale⁷¹. Les mutations somatiques d'*APC* sont observées dans 5 % des cryptes aberrantes dysplasiques, 30-70 % des adénomes sporadiques, jusqu'à 72 % des tumeurs sporadiques⁷²⁻⁷⁴. Ceci suggère que la perte fonctionnelle d'*APC* est un événement précoce dans le développement tumoral. L'hyperméthylation du promoteur d'*APC* a été rapportée dans 18 % des CCR et adénomes, représentant un mécanisme alternatif pour l'inactivation du gène *APC*⁷⁵.

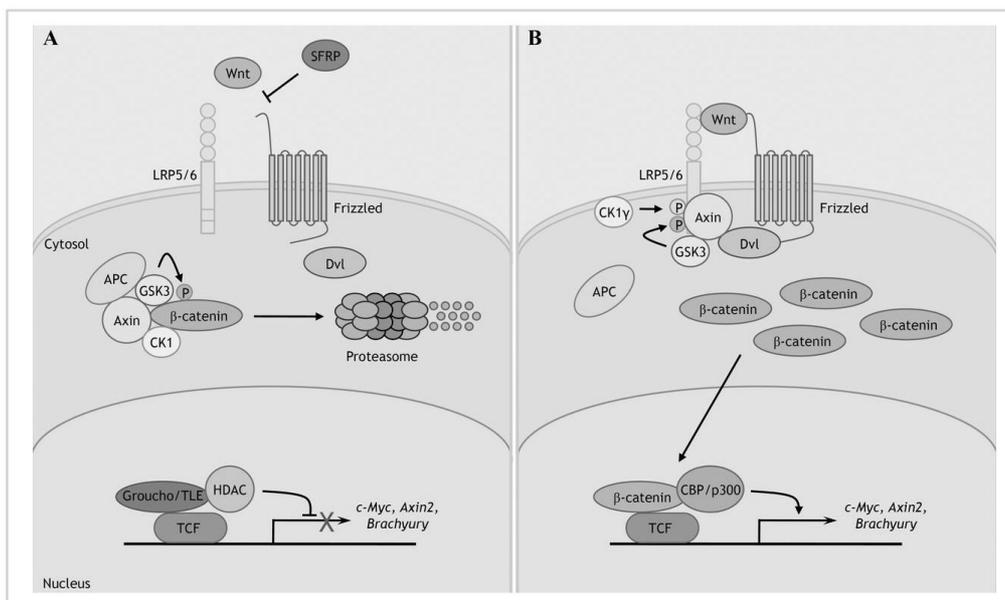


Figure 7: Représentation schématique de la voie Wnt selon Kim et coll.¹⁵³

Voie de signalisation MAP Kinase : KRAS

Une autre mutation souvent retrouvée de manière précoce dans les adénomes conventionnels est une mutation ponctuelle d'un gène de la famille Ras, au niveau des codons 12-13 de l'exon 2 de *KRAS*, entraînant l'activation constitutive de la voie de signalisation MAP Kinase (figure 8). Des mutations ponctuelles de *KRAS* sont retrouvées dans environ 17% des adénomes et 40 % des adénocarcinomes colorectaux ⁷⁶.

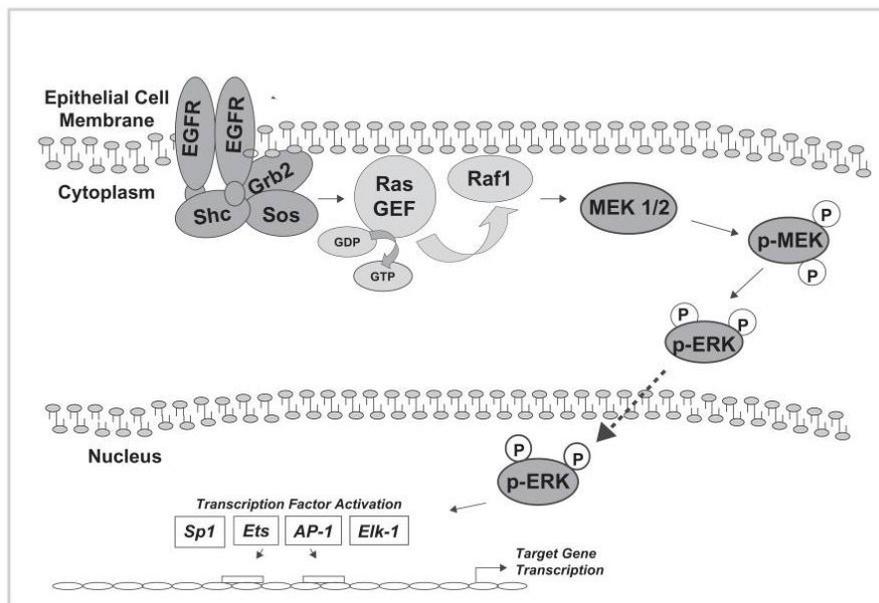


Figure 8: Représentation schématique de la cascade de signalisation MAP Kinase. D'après Mercer et coll.¹⁵¹

2.2. Progression de l'adénome au cancer

2.2.1 Caractéristiques histologiques

Une faible proportion d'adénomes en dysplasie de bas grade évolue vers la dysplasie conventionnelle de haut grade. Cette progression est en général lente, se déroulant sur plusieurs années. La dysplasie de haut grade se caractérise par la présence de noyaux nettement ascensionnés, atteignant la surface de l'épithélium, arrondis, irréguliers et hyperchromatiques. Le rapport nucléo-cytoplasmique est augmenté et la polarité cellulaire disparaît.

La transformation carcinomateuse survient lorsque les cellules tumorales traversent la musculaire muqueuse et atteignent la sous-muqueuse ³. La ressemblance de la tumeur avec les glandes

coliques normales permet de classer celle-ci selon son grade de différenciation, de bien différenciée à peu différenciée ⁷⁷.

La progression naturelle de l'adénocarcinome colorectal est ensuite l'invasion de la paroi colique (muscleuse, sous-séreuse, séreuse), l'invasion vasculaire et lymphatique et le développement de métastases ganglionnaires et viscérales.

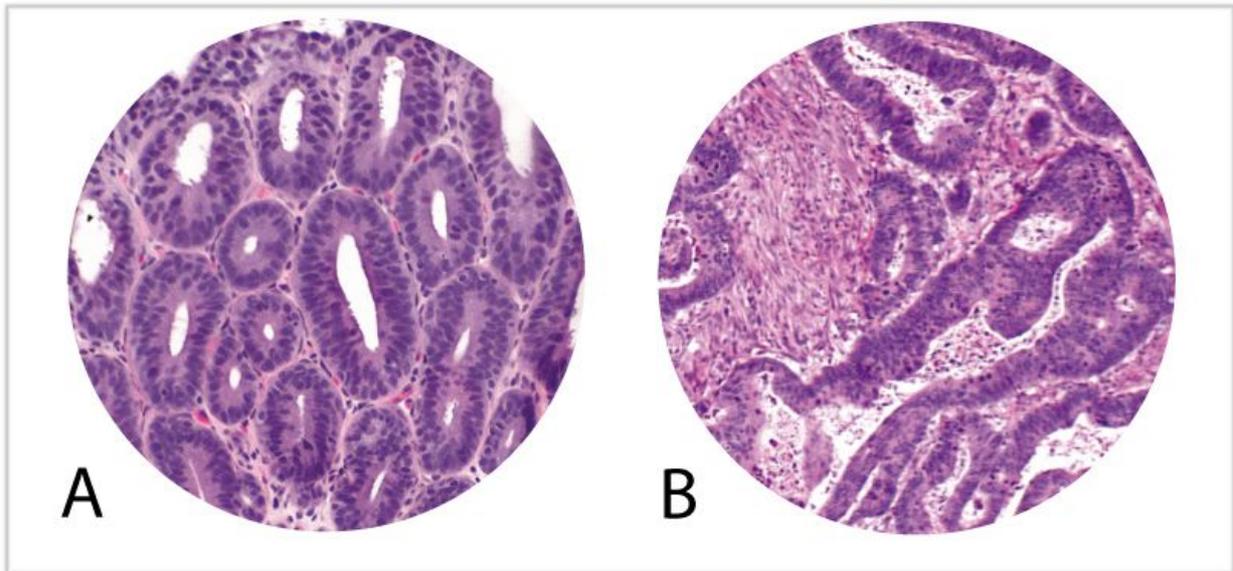


Figure 9: Adénome tubuleux en dysplasie de haut grade (A); adénocarcinome infiltrant sans autre indication (B). Source : librepathology.org ¹⁵².

2.2.2 Caractéristiques moléculaires

Perte de 17p ou mutation de TP53

Un événement d'apparition tardive dans le schéma de cancérogenèse colorectale est la perte ou la mutation du gène suppresseur de tumeur *TP53*, localisé sur le chromosome 17 ⁷⁸. La protéine p53 joue un rôle essentiel dans le maintien de la stabilité du génome ⁷⁹. En effet, cette protéine est un régulateur qui contrôle la transcription de centaines de gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADN, l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, la sénescence, l'angiogenèse, la réponse immunitaire, la différenciation cellulaire, la mobilité et la migration. Une étude a retrouvé une mutation de *TP53* ou une perte allélique de 17p dans 4 à 26 % des adénomes, environ 50 % des adénomes en dysplasie de haut grade et dans 50 à 75 % des adénocarcinomes colorectaux ⁸⁰.

Perte de 18q

La perte allélique de 18q survient dans environ 70 % des adénocarcinomes ¹⁸. De nombreux gènes suppresseurs de tumeurs sont localisés dans cette région, comme *DCC*, *SMAD4*, *SMAD2*, qui jouent un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose ⁸¹.

3. Voie de cancérogenèse colorectale des lésions festonnées : la voie festonnée

Jusqu'à récemment, les polypes colorectaux étaient soit des adénomes, soit des polypes hyperplasiques⁶⁵. On considérait les adénomes comme des lésions précancéreuses mais les polypes hyperplasiques étaient considérés comme dénués de potentiel de transformation. En 1984, Urbanski émet pour la première fois l'hypothèse que les polypes hyperplasiques peuvent être des précurseurs d'adénomes en s'appuyant sur la description de polypes associant des aspects de polype hyperplasique à d'authentiques lésions de dysplasie avec transformation carcinomateuse⁸². Cette hypothèse d'une voie de cancérogenèse à partir du polype hyperplasique a été confirmée par des études clinico-pathologiques et moléculaires, montrant que certains variants de polypes hyperplasiques portent la « signature » moléculaire de certains types de carcinomes colorectaux^{61,83-86}. De plus, les cancers de la voie festonnée ont des caractéristiques cliniques et démographiques différentes : ils prédominent chez les femmes, sont localisés plus souvent dans le colon droit, et surviennent chez des patients plus âgés. On estime qu'environ 20 % des cancers colorectaux dérivent de polypes festonnés⁶¹.

Les polypes festonnés forment cependant un groupe hétérogène de lésions incluant (i) le polype hyperplasique, (ii) l'adénome festonné sessile, (iii) l'adénome festonné traditionnel et (iv) le polype mixte, combinant au moins deux caractéristiques, que de nombreux auteurs souhaitent assimiler au groupe de l'adénome festonné traditionnel³.

3.1. Caractéristiques communes aux différents polypes festonnés

3.1.1 Caractéristiques histologiques

Histologiquement, les polypes festonnés sont des lésions caractérisées par une hyper-maturation de l'épithélium glandulaire colique entraînant des replis au sein des cryptes, réalisant un aspect festonné en histologie, c'est-à-dire un aspect dentelé de la surface épithéliale.

3.1.2 Caractéristiques moléculaires

La voie festonnée est complexe et encore mal comprise. Cette voie a deux principales caractéristiques moléculaires: l'hyperméthylation aberrante de certaines régions promotrices de gènes et des altérations dans la voie MAP Kinase.

La voie MAP Kinase

La voie MAP Kinase est une voie de signalisation qui met en jeu les protéines de la famille Raf et Ras. La mutation de *BRAF* est considérée par certains auteurs comme spécifique des carcinomes colorectaux développés à partir de la voie festonnée. La mutation la plus fréquente de *BRAF* est la mutation V600E, qui entraîne une activation constitutive du gène, induisant la prolifération cellulaire et inhibant l'apoptose.

Les mutations des gènes *KRAS* et *NRAS* produisent également un dysfonctionnement dans la voie MAP Kinase, induisant la prolifération cellulaire et inhibant l'apoptose. Ces mutations sont classiquement rattachées à la voie d'instabilité chromosomique, mais elles sont également présentes dans certains carcinomes festonnés. La combinaison d'une mutation de *KRAS* et d'un phénotype CIMP-L (CIMP-Low) pourrait constituer une entité distincte au sein de la voie festonnée (voie alterne). Une hyperméthylation de *MGMT* et non de *MLH1* est associée avec le phénotype CIMP-L et la mutation de *KRAS* ⁸⁷.

Hyperméthylation aberrante : phénotype CIMP

Environ la moitié des régions promotrices de gènes comportent des répétitions dinucléotidiques Cytosine-Guanine, les îlots CpG. Dans le génome des cellules saines, les îlots CpG des régions promotrices ne sont en général pas méthylés. La méthylation anormale d'îlots CpG dans les régions promotrices de gènes suppresseurs de tumeurs induit leur inactivation qui conduit à l'initiation de la carcinogenèse.

La présence d'une méthylation anormale de ces îlots CpG dans de multiples gènes définit le phénotype CIMP (CpG island methylator phenotype)³², qui est retrouvé dans environ 35 % des carcinomes colorectaux ³³. Le panel de loci le plus utilisé actuellement pour définir le statut CIMP est celui proposé par Weisenberg, comprenant les gènes *CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* et *SOX1* ⁸⁶. Dans environ 40 % des tumeurs présentant ce phénotype CIMP, l'hyperméthylation du promoteur du gène *hMLH1* inactive la protéine de réparation des mésappariement de l'ADN MLH1. Ceci explique en grande partie le phénotype d'instabilité microsatellite dans les cancers colorectaux sporadiques.

3.2. Initiation de la voie festonnée

Les mutations de *BRAF* ou de *KRAS* induisent initialement une prolifération au sein de l'épithélium colique, donnant l'aspect histologique de crypte aberrante festonnée ⁸⁸. Il a été montré récemment

que *KRAS* et *BRAF* sont tous deux capables d'induire un phénotype de méthylation des îlots CpGs^{89,90}. La mutation de *BRAF* est corrélée avec le phénotype CIMP-H, tandis que la mutation de *KRAS* semble être responsable d'une hyperméthylation moins étendue (CIMP-L).

La répression des gènes *CDKN2A* (codant pour la protéine p16) et *IGFBP7* (insulin like growth factor binding protein 7), via la méthylation de leur promoteur, permet aux cellules d'échapper à la sénescence et de progresser en polype hyperplasique micro-vésiculaire ou en polype hyperplasique à cellules caliciformes.

3.3. Evolution des caractéristiques histologiques et moléculaires des polypes festonnés au cancer

3.3.1 Les polypes hyperplasiques

Les polypes hyperplasiques représentent 80 à 90 % des polypes festonnés et 10 à 15 % de tous les polypes coliques. Ils sont en général de petite taille, (<5mm), sessiles, et souvent localisés au niveau du colon gauche⁹¹. Ces polypes présentent des cryptes allongées, bordées par un épithélium d'aspect festonné dans leur partie superficielle et n'ont pas de signe de dysplasie⁹². L'OMS définit trois sous-types histologiques de polypes hyperplasiques selon leur morphologie et l'aspect du mucus intracellulaire : le sous-type (i) microvésiculaire, (ii) riche en cellules caliciformes, (iii) pauvre en mucus³.

Polype hyperplasique microvésiculaire

Les polypes hyperplasiques microvésiculaires représentent le sous-type le plus fréquent de polype hyperplasique. Ils sont caractérisés par une lumière festonnée bordée de cellules épithéliales contenant des gouttelettes de mucus avec ou sans cellules caliciformes intercalées⁹³ (figure 10). Ils présentent fréquemment une mutation de *BRAF* et un phénotype CIMP-H, et rarement une mutation de *KRAS*^{85,94}.

Polype hyperplasique à cellules caliciformes

Les polypes hyperplasiques à cellules caliciformes comportent un aspect festonné moins marqué et un aspect plus tubuleux que la forme microvésiculaire, et sont bordés par un épithélium riche en cellules caliciformes (figure 10). Ils présentent fréquemment une mutation de *KRAS* et plus rarement une mutation de *BRAF* et un phénotype CIMP-H (8 % à 18,2 % des cas)⁹⁴.

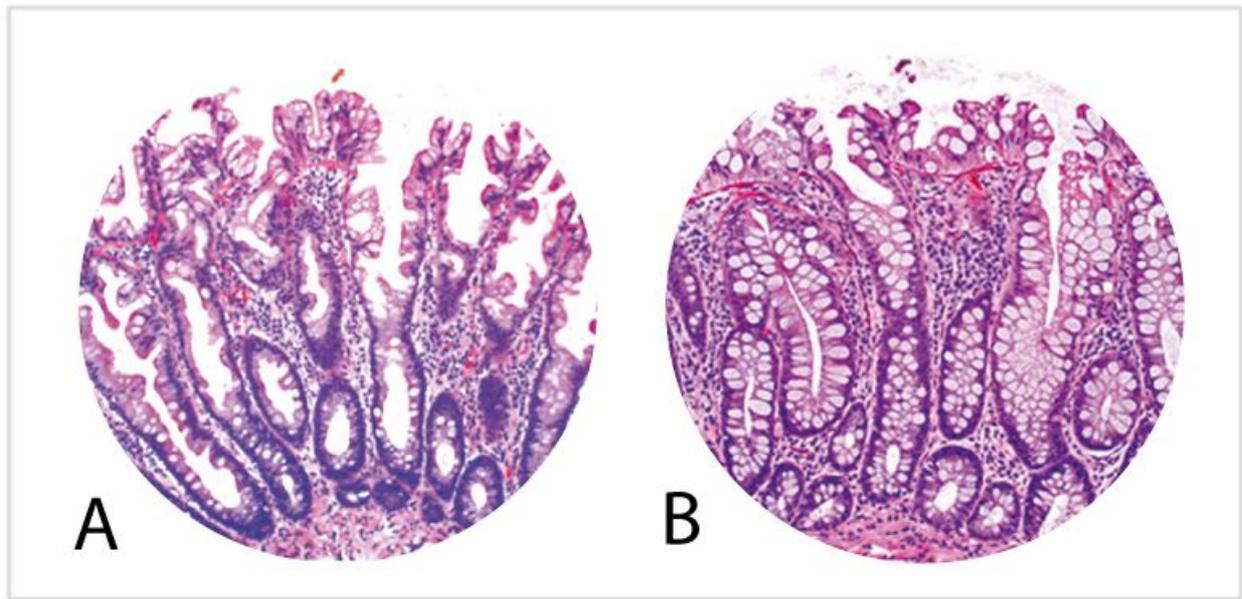


Figure 10: Aspect histologique d'un polype hyperplasique microvésiculaire (A) et d'un polype hyperplasique à cellules caliciformes (B). D'après O'brien et coll. ¹⁵⁴.

3.3.2 Polype/Adénome festonné sessile

Ce type de polype résulterait de la progression d'un polype hyperplasique de type microvésiculaire. Les polypes/adénomes festonnés sessiles représentent environ 25 % des polypes festonnés, mesurent en général plus de 5 mm, sont plats ou sessiles et sont localisés plus fréquemment au niveau du colon droit ⁶². Leur surface est lisse ou granuleuse et ils sont souvent mal délimités, les rendant difficile à détecter et à réséquer entièrement en endoscopie ⁹⁵.

Histologiquement, les polypes/adénomes festonnés sessiles diffèrent des polypes hyperplasiques microvésiculaires par la présence d'une altération de l'architecture cryptique sous forme d'une dilatation avec un aspect en « L » ou en « T » du fond des cryptes. Certains auteurs considèrent que la présence d'une seule crypte d'aspect caractéristique est suffisante pour le diagnostic, mais cette définition n'est pas acceptée par tous ⁹⁶. Dans ces polypes, l'aspect festonné est observé sur toute la hauteur des cryptes et il n'y a pas de dysplasie épithéliale.

Ces lésions présentent souvent une mutation de *BRAF* et un phénotype CIMP est retrouvé dans environ 80 % des cas ⁹⁷.

3.3.3 Adénome festonné sessile avec dysplasie

Les adénomes festonnés sessiles peuvent évoluer vers des adénomes festonnés avec dysplasie. Dans ce cas, la dysplasie est plus fréquemment de type conventionnel, c'est à dire qu'elle présente le même aspect histologique que la dysplasie observée dans les adénomes conventionnels. En effet, plusieurs études ont décrit la présence d'une zone transitionnelle de dysplasie conventionnelle, d'architecture tubuleuse ou tubulovilleuse, située entre un polype festonné sessile et un cancer invasif ^{85,98,99}.

Cependant, la dysplasie conventionnelle observée dans les adénomes festonnés sessiles présente des caractéristiques moléculaires distinctes de celles retrouvées dans les adénomes conventionnels. La transition du polype festonné sessile au polype festonné avec dysplasie pourrait être due à des anomalies de la voie Wnt, par d'autres mécanismes que ceux présents dans les adénomes conventionnels ⁹⁵. En effet, une étude a montré qu'une expression nucléaire anormale de la beta- caténine était présente dans 29 % des adénomes festonnés sessiles sans dysplasie et dans 100 % des adénomes festonnés sessiles avec dysplasie ¹⁰⁰.

Un autre type de dysplasie appelée dysplasie festonnée peut également se développer dans les adénomes festonnés sessiles. Celle-ci est caractérisée par des cellules plus cubiques, au cytoplasme éosinophile, au noyau volumineux, vésiculeux, avec un nucléole proéminent ⁹³.

3.3.4 Adénome festonné traditionnel

Les adénomes festonnés traditionnels représentent environ 1 à 2 % des polypes colorectaux. Ils sont localisés plus fréquemment au niveau du colon gauche et sont souvent pédiculés. Histologiquement, l'adénome festonné traditionnel est d'architecture tubulovilleuse avec un cytoplasme éosinophile, un noyau central allongé, palissadique. Cet aspect nucléaire ne correspond pas à de la dysplasie. L'adénome festonné traditionnel comporte des cryptes ectopiques néoformées dont l'orientation n'est plus perpendiculaire à la musculaire muqueuse ¹⁰¹. Il présente fréquemment une mutation de *KRAS* et un phénotype CIMP-L ^{33,97}. Le système de réparation des mésappariements de l'ADN est conservé dans les adénomes festonnés traditionnels

¹⁰².

3.3.5 Adénome festonné traditionnel avec dysplasie

Les adénomes festonnés traditionnels peuvent développer des territoires de dysplasie festonnée. Ces territoires sont caractérisés par une architecture festonnée, des cellules au cytoplasme éosinophile abondant, au noyau vésiculeux en position basale, avec des mitoses souvent atypiques. Moins fréquemment il peut exister des secteurs de dysplasie conventionnelle ¹⁰³.

Le développement de la dysplasie s'accompagne souvent d'une mutation de *TP53*. L'activation de la voie Wnt, mise en évidence par un marquage nucléaire avec la beta-caténine, est également fréquemment retrouvée. La mutation d'APC étant rare dans les polypes festonnés, cette activation de la voie Wnt est probablement due à l'hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs ¹⁰³.

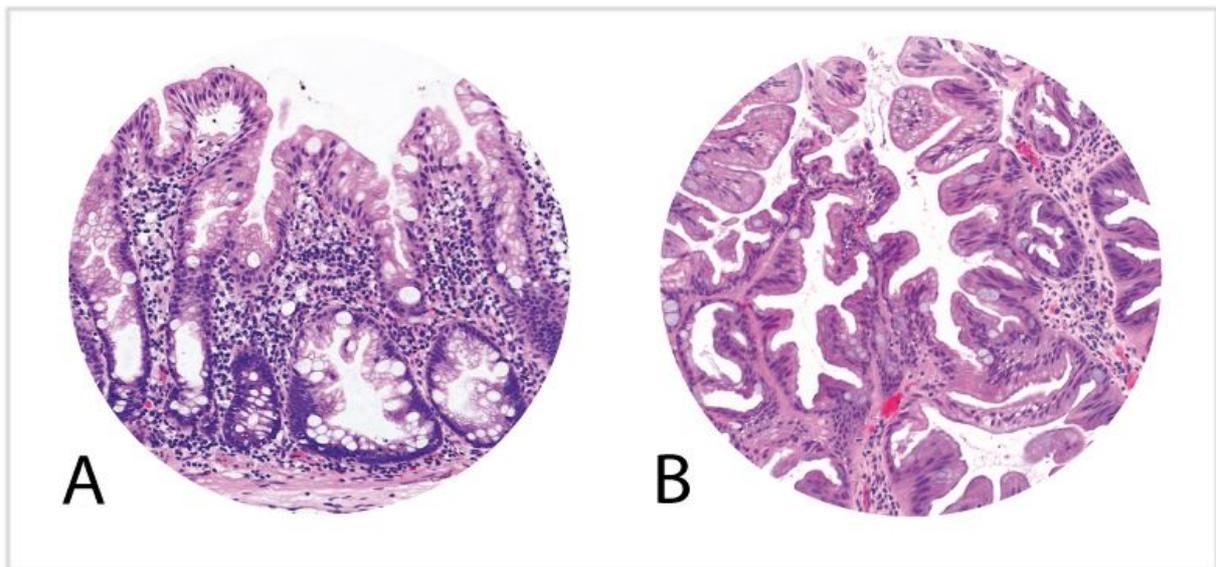


Figure 11: Aspect histologique d'un polype/adénome festonné sessile (A) et d'un adénome festonné traditionnel (B). Source: librepathology.org ¹⁵².

4. La voie de l'instabilité microsatellitaire

Les adénocarcinomes colorectaux empruntant la voie de l'instabilité microsatellitaire sont soit sporadiques, soit héréditaires.

La forme sporadique d'adénocarcinome MSI est presque exclusivement due à l'hyperméthylation du gène *MLH1*¹⁰⁴. Cette hyperméthylation s'intègre dans le profil de méthylation des îlots CpG (CIMP) et donc dans la voie festonnée décrite précédemment.

La forme héréditaire d'adénocarcinome MSI correspond au syndrome de Lynch ou HNPCC, représentant environ 3 à 5 % des cancers colorectaux. Ce syndrome est associé à des tumeurs extra-coliques, en particulier endométriales. Il est dû à une mutation germinale sur un allèle de l'un des quatre gènes clés du système MMR : *MLH1* (42%), *MSH2* (33%), *MSH6* (18%) ou *PMS2* (7%)¹⁰⁵. Pour acquérir le phénotype MMR déficient, une mutation ou une hyperméthylation de l'autre allèle est nécessaire. La chronologie d'apparition de ce phénotype MMR déficient dans la cancérogenèse des tumeurs de patients atteints de syndrome de Lynch est controversée¹⁰⁶. En effet, certaines études suggèrent que les mutations somatiques des gènes MMR surviennent après la formation de l'adénome, mais d'autres études observent la présence d'un phénotype MMR déficient dès le stade d'adénome¹⁰⁶. Contrairement aux adénocarcinomes MSI sporadiques, les adénocarcinomes développés sur syndrome de Lynch ont pour précurseurs des adénomes en dysplasie conventionnelle. La mutation de *BRAF* n'est théoriquement jamais observée dans le syndrome de Lynch et sa présence est très en faveur d'une forme sporadique de cancer colorectal¹⁰⁷. De plus, la présence d'une mutation de l'exon 3 du gène de la beta caténine est parfois retrouvée dans le syndrome de Lynch, mais pas dans les formes sporadiques¹⁰⁸.

5. Les voies alternes de cancérogenèse colorectale

Des voies supplémentaires de cancérogenèse colorectale ont été récemment proposées, décrivant des variantes de voies moléculaires, intéressant principalement la voie festonnée. Cependant, ces voies alternes ne sont actuellement pas consensuelles.

Plusieurs auteurs ont par exemple évoqué une voie ayant pour précurseur certains adénomes tubulo-villeux et adénomes festonnés traditionnels, présentant un profil génétique particulier : MSS, CIMP-L et KRAS mutés^{56,95,103,109} (figure 12).

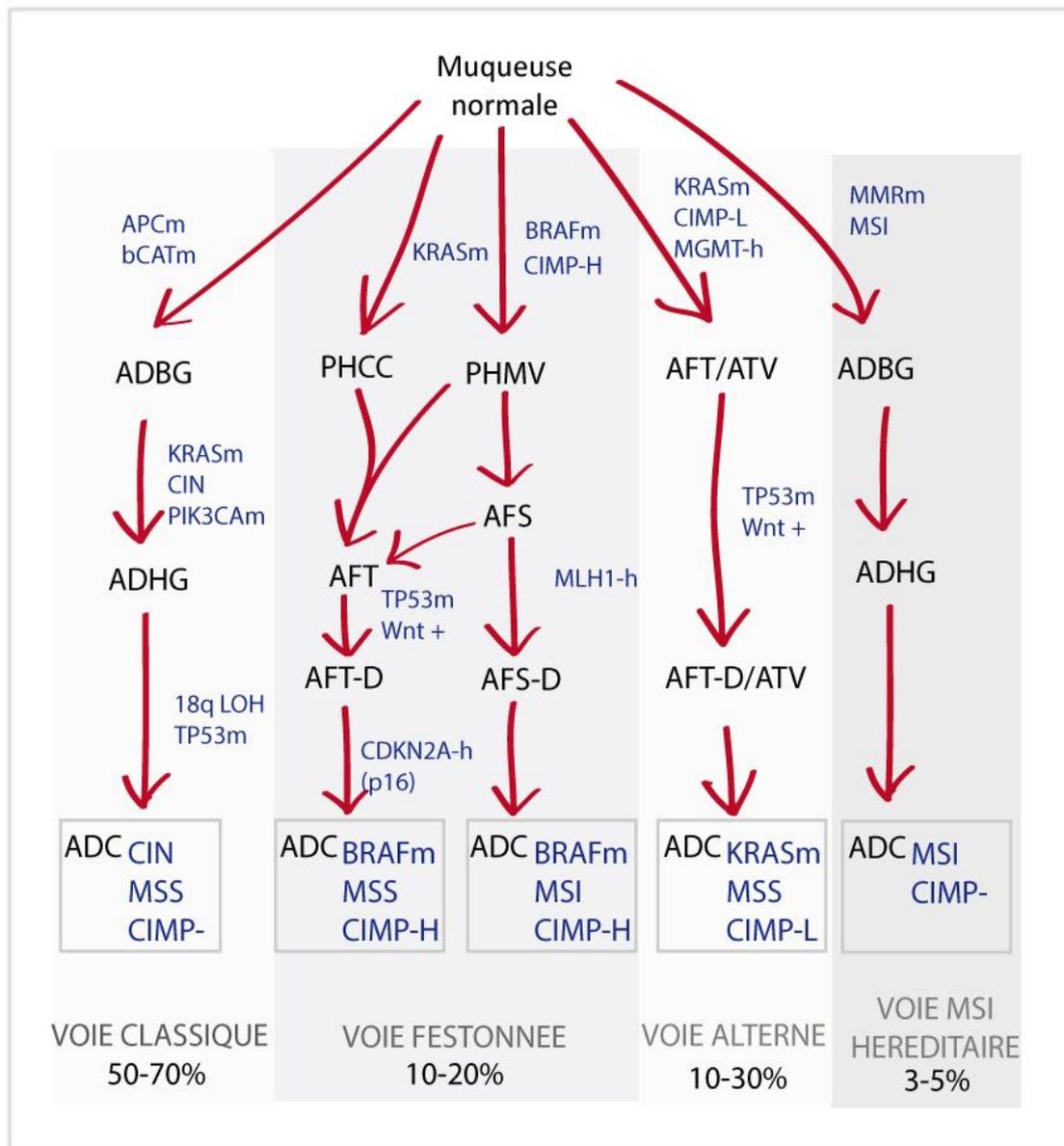


Figure 12: Synthèse des différentes voies de cancérogenèse colorectale d'après Pancione¹⁰⁹, Yang⁹³ et Bettington¹⁰³; abréviations: ADBG : adénome conventionnel en dysplasie de bas grade ; ADHG : adénome conventionnel en dysplasie de haut grade ; ADC : adénocarcinome ; PHCC : polype hyperplasique à cellules caliciformes ; PHMV : polype hyperplasique microvésiculaire ; AFS(-D) : adénome festonné sessile (avec dysplasie) ; AFT(D) : adénome festonné traditionnel (avec dysplasie) ; ATV : adénome tubulo-villeux ; m : mutation ; h:hyperméthylation.

MGMT et cancer colorectal

1. Mécanisme d'action de MGMT

Les cassures de l'ADN jouent un rôle central dans le développement et la progression du cancer, surtout lorsque la machinerie de réparation de l'ADN ne fonctionne pas. La protéine MGMT est une enzyme de réparation de l'ADN codée par le gène *MGMT* situé sur le chromosome 10q26 ¹¹⁰, qui retire le groupement alkyl de la position O6 d'une guanine. Cette réaction entraîne une inactivation irréversible de l'enzyme ¹¹¹.

La transcription de *MGMT* est régulée par des mécanismes épigénétiques. La méthylation de dinucléotides CpG dans la région promotrice de *MGMT* a pour conséquence une inactivation du gène et l'absence d'expression de la protéine MGMT. Les groupements alkyls ne sont alors pas retirés des guanines méthylées, avec pour conséquence des altérations de la structure normale de l'ADN ¹¹².

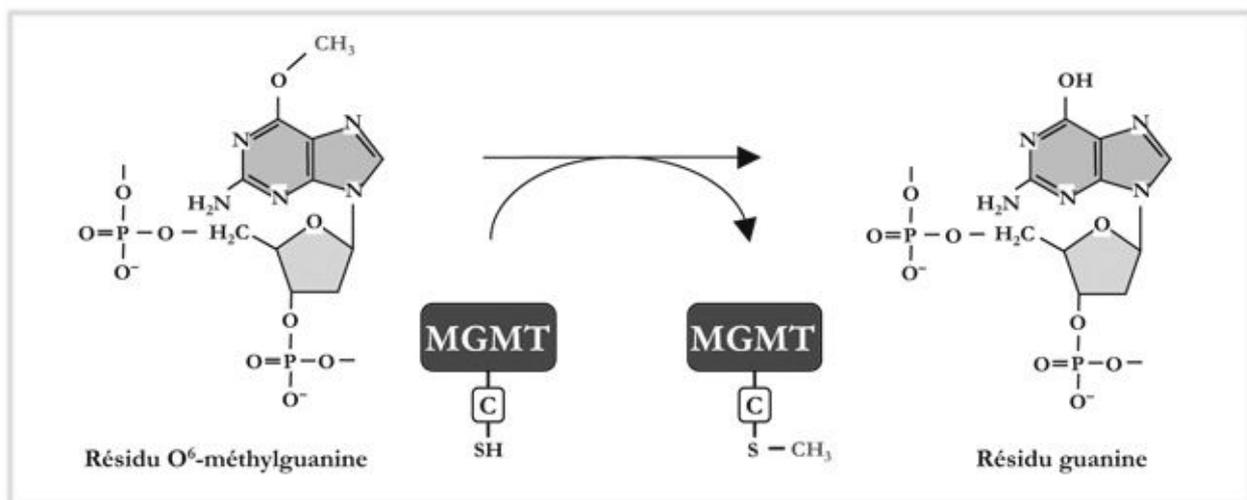


Figure 13: Schéma de la fonction de MGMT sur le groupement alkyl du résidu O⁶-méthylguanine

2. Rôle de MGMT dans la cancérogenèse colorectale

Dans la cancérogenèse colorectale, la méthylation du promoteur de *MGMT* est un événement fréquent avec pour conséquence une faible expression de la protéine MGMT, observée dans environ 40 % des cancers colorectaux ^{113,114}.

La perte d'expression de MGMT a été observée également dans le tissu colorectal normal, suggérant que la répression de MGMT n'est que l'une des multiples étapes nécessaires à la

transformation carcinomateuse ¹¹⁵. La perte de MGMT est considérée comme un champ de cancérisation puisque qu'il n'est ni nécessaire, ni suffisant pour la progression du cancer, c'est à dire qu'il ne représente que l'un des événements pouvant conduire à la carcinogénèse.

La perte d'expression de MGMT est plus fréquente dans les tumeurs MSI ¹¹⁶ mais elle joue également un rôle dans les tumeurs MSS par le biais de l'instabilité chromosomique ¹¹⁷. Les mutations de *KRAS* sont fréquemment associées à l'hyperméthylation de MGMT, particulièrement les mutations *KRAS* G>A. En effet, pendant la transcription de l'ADN, les guanines méthylées peuvent être considérées par erreur comme des adénines, causant des mutations G>A, qui ne sont pas corrigées par MGMT lorsque le gène est hyperméthylé. Dans une étude, la méthylation de *MGMT* était retrouvée dans 71 % des cancers colorectaux métastatiques avec des mutations *KRAS* G>A, alors qu'elle était présente dans seulement 32 % des tumeurs non G>A mutés *KRAS* et dans 35 % des tumeurs *KRAS* WT ^{118,119}.

3. MGMT et perspectives thérapeutiques

Le mécanisme d'action des agents alkylants, comme la dacarbazine et le temozolomide, est la méthylation d'une guanine en position O⁶, induisant un mésappariement d'une paire de base. L'activité de MGMT protège les cellules tumorales des effets létaux de ces chimiothérapies en retirant le groupement alkyl anormal. La perte d'expression de MGMT via l'hyperméthylation du promoteur du gène pourrait donc être prédictif d'une meilleure réponse aux agents alkylants.

Dans une étude pilote incluant des patients sélectionnés sur le profil moléculaire de leur tumeur, un traitement par temozolomide a été efficace chez deux patients atteints de cancers colorectaux avec une perte d'expression de MGMT ¹²⁰. Shacham-Schmueli a également rapporté 2 cas de réponse objective au temozolomide chez des patients MGMT déficients atteints de cancers colorectaux métastatiques ¹²¹. Ces observations ont été confirmées par trois études de phase II chez des patients atteints de cancer colorectaux métastatiques traités par dacarbazine ou temozolomide, montrant que l'hyperméthylation du promoteur de MGMT était prédictif de la réponse au traitement ^{113,122,123}.

Epidémiologie moléculaire pathologique et analyse de regroupement hiérarchisé

Pendant des siècles, les patients ont été regroupés selon la ressemblance de leurs pathologies à travers des classifications de maladies. L'objectif principal consistant à attribuer un nom spécifique à une pathologie touchant un groupe de patient est de mieux prédire l'histoire naturelle et la réponse à un traitement ou à une intervention particulière. Les systèmes de classification des maladies sont principalement basés sur la symptomatologie, l'organe affecté, et l'altération d'une fonction physiologique (par exemple : maladies néoplasiques, auto-immunes, métaboliques, etc...). De nombreuses maladies chroniques sont multifactorielles et leur cause est souvent mal comprise. Les systèmes de classification actuels des maladies incorporent de plus en plus de connaissances sur la pathogenèse moléculaire, apportant l'espoir d'un traitement personnalisé pour chaque patient.

L'épidémiologie classique suppose que les individus présentant la même pathologie ont une cause similaire de maladie, qui suit une histoire naturelle similaire et une réponse similaire au traitement ou à une intervention. Ainsi l'épidémiologie classique permet d'identifier des facteurs étiologiques majeurs mais suppose une homogénéité des patients. L'épidémiologie moléculaire pathologique est une approche épidémiologique reposant sur une analyse moléculaire et pathologique, permettant de classifier les maladies en fonction de leur pathogenèse. Cette approche permet de mettre en évidence des liens entre des facteurs étiologiques et des marqueurs moléculaires, et permet de dévoiler l'hétérogénéité des différents processus pathologiques, même au sein d'une maladie précise ¹²⁴. Les travaux de recherche portant sur l'analyse moléculaire des cancers font de plus en plus appel à cette approche d'épidémiologie moléculaire pathologique. En effet, les analyses génomiques et épigénomiques ont mis en évidence une très grande diversité des caractéristiques moléculaires, non seulement entre les tumeurs de différents individus, mais également entre différentes tumeurs d'un même individu, et même entre les cellules tumorales d'une même tumeur ¹²⁵. L'analyse de regroupement hiérarchisé pourrait constituer un outil de l'épidémiologie moléculaire pathologique.

L'analyse de regroupement hiérarchisé permet de regrouper les marqueurs moléculaires en fonction de leur corrélation entre eux, et de regrouper les patients en fonction de la parenté du

profil moléculaire de leur tumeur. Cette analyse est combinée à une représentation graphique. Chaque marqueur moléculaire est représenté par un point d'une couleur reflétant qualitativement ou quantitativement les observations expérimentales originales. Cette représentation graphique permet d'étudier et d'intégrer les données de manière intuitive. La représentation graphique inclut également un arbre phylogénique (dendrogramme), dont la longueur des branches reflète le degré de similarité entre les objets. Ceci permet d'appréhender la proximité entre les différents groupes ¹²⁶ (figure 14).

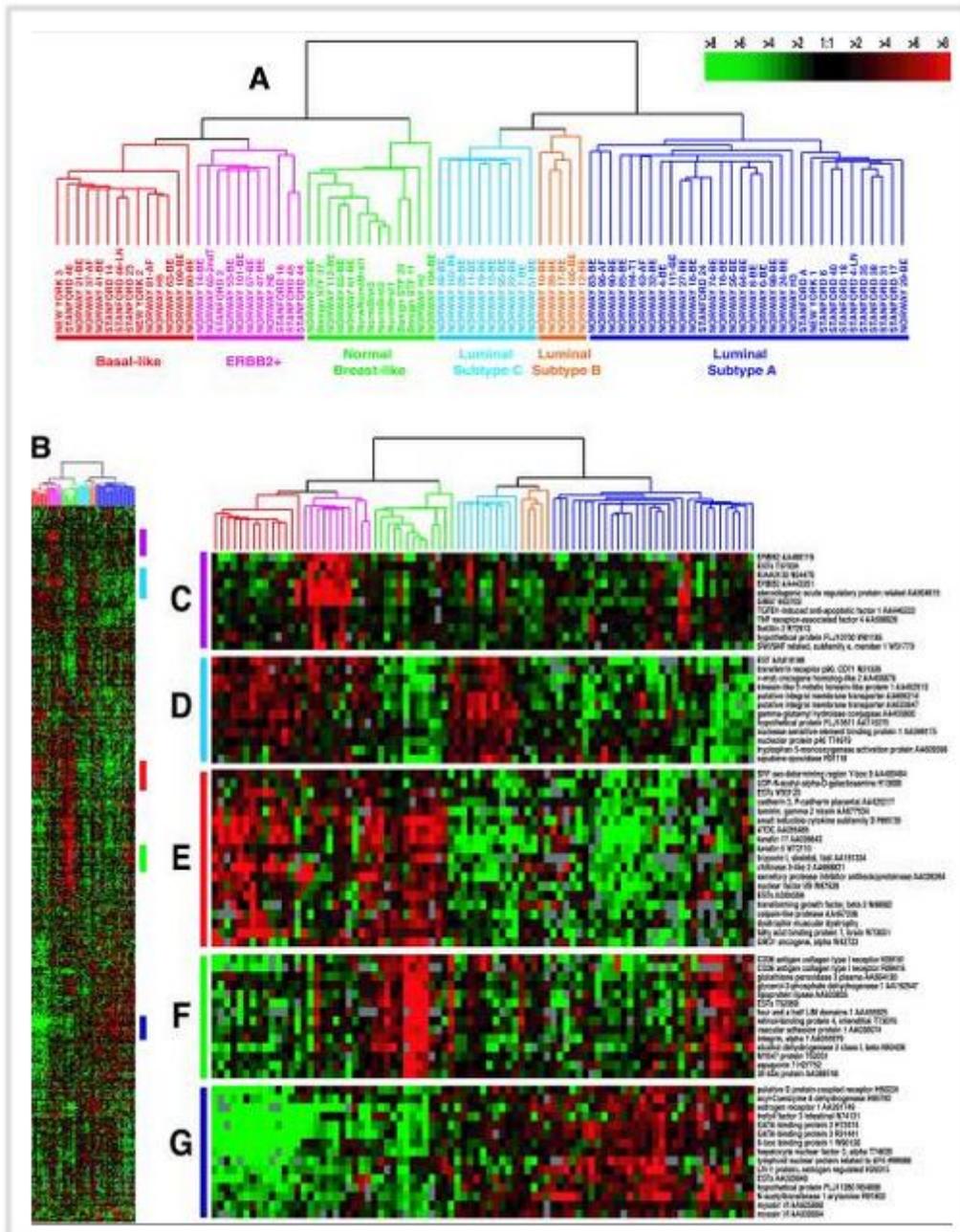


Figure 14: Exemple d'analyse de regroupement hiérarchisé par Sorlie et coll. ¹⁵⁵ permettant d'identifier différents sous-types moléculaires de tumeurs du sein basés sur les différences d'expression génique.

PATIENTS ET MÉTHODES

Patients

Les patients présentant le diagnostic d'adénocarcinome invasif primitif du colon ou du rectum avec composante mucineuse, enregistrés dans le service d'Anatomie Pathologique du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nantes entre 2004 et 2012, ont été identifiés à l'aide de la base de donnée institutionnelle. Les adénocarcinomes du rectum traités par thérapie néo-adjuvante ont été exclus de l'étude, ainsi que les adénocarcinomes de l'appendice. Une cohorte de 136 patients consécutifs atteints d'adénocarcinome colorectal sans autre indication (SAI), sans composante mucineuse, servait de groupe contrôle. Les adénocarcinomes mucineux étaient définis selon la classification OMS 2010 ³ par la présence de plus de 50 % de la lésion constituée de flaques de mucus extracellulaire contenant des cellules épithéliales malignes sous forme de structures acineuses, de lambeaux de cellules tumorales ou de cellules tumorales isolées incluant les cellules en bague à chaton. Les comptes-rendus anatomopathologiques et les dossiers cliniques ont été consultés, et les informations suivantes ont été relevées : âge, sexe, présence de facteurs de risques comme la polypose adénomateuse familiale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, type d'intervention chirurgicale initiale, localisation anatomique initiale de la tumeur. L'étude a été menée dans le respect des lois de bioéthique française ¹²⁷. La collection des cas a été approuvée par le comité d'éthique local et répertorié avec le numéro RC15_0307.

Étude histologique

Tous les cas d'adénocarcinome colorectal comportant une composante mucineuse ont été revus histologiquement. Les critères histologiques suivants ont été notés pour chaque tumeur : pourcentage du volume tumoral constitué de mucus extracellulaire, pourcentage de structures acineuses et de lambeaux de cellules tumorales polarisées définissant un adénocarcinome

mucineux de haut grade et de bas grade respectivement, et enfin présence ou absence de cellules en bague à chaton flottant dans le mucus ou de cellules peu cohésives dans un stroma desmoplastique. De plus, le niveau d'infiltration, les métastases ganglionnaires, l'invasion lymphatique et péri-nerveuse, l'invasion veineuse extra-murale, la présence et le type de lésions précoces et enfin la présence de polypes ou de carcinome colorectal synchrone ont été notés. L'hétérogénéité tumorale était prise en compte lorsqu'au moins deux sous types histologiques distincts, définis selon la classification OMS 2010³, étaient observés au sein de la même tumeur, et le pourcentage de chaque composante était apprécié.

Immunohistochimie

Des coupes de 3 µm d'épaisseur ont été réalisées à partir de blocs de tissus inclus en paraffine après fixation formolée. Ces coupes étaient marquées avec les anticorps primaires détaillés dans le tableau 1 et par un système de révélation permettant une amplification du signal par des molécules de peroxydase (Envision Flex Plus kit, Dako, Glostrup, Denmark), après élimination des peroxydases endogènes, sur un automate Dako.

Tableau 1: anticorps et dilutions utilisés

Anticorps	Dilution	Source
MGMT (clone MT3.1)	1:100	Labvision, Fremont, CA, USA
Beta caténine (clone CAT 5H10)	1:100	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
MLH1 (clone G168-15)	1:100	BD Biosciences, Erembodegem, Belgique
MSH2 (clone D06578-8)	1:100	Oncogene, Cambridge, MA, USA
MSH6 (clone 44)	1:40	BD transduction Laboratories, Lexington, KY, USA
PMS2 (clone EP51)	Prédilué	Dako, Glostrup, Danemark

Expression des protéines de réparation des mésappariements de l'ADN et de *MGMT*

Dans les cellules tumorales, l'expression de MGMT, MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 était considérée comme maintenue (normale) ou perdue. L'expression nucléaire de MGMT, MLH1, MSH2, MSH6 et

PMS2 dans les lymphocytes intra-tumoraux ou dans le tissu normal péri-tumoral était utilisée comme contrôle interne positif.

Méthylation du promoteur des gènes *MGMT* et *MLH1*

La méthylation du promoteur de *MGMT* et *MLH1* était déterminée par la technique MethyLight. L'ADN était extrait à partir de coupes paraffinées de 10 µm d'épaisseur à l'aide du kit iPrep™ ChargeSwitch® Forensic sur l'automate iPrep™ Purification instrument (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). L'ADN génomique était ensuite traité au bisulfite avec le kit Epiect Bisulfite (Qiagen, Hilden, Germany). Le témoin de réaction Col2A1 était utilisé pour normaliser la quantité d'ADN après conversion au bisulfite. Les loci étaient considérés comme méthylés si le pourcentage de méthylation était supérieur à 10 % par rapport à la référence.

Profil d'instabilité microsatellitaire

Pour déterminer le statut MSI/MSS, l'ADN était extrait à partir de coupes de 10 µm d'épaisseur. Le statut était déterminé par PCR pentaplex en amplifiant cinq marqueurs mononucléotidiques BAT25, BAT26, NR21, NR22, NR24 mis au point et validés précédemment¹²⁸. Les produits de PCR étaient génotypés sur l'automate ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems) et analysés par Genscan Analysis puis sur Genotyper (Genotyper 3.7 Applied Biosystem). La tumeur était considérée comme instable (MSI) si elle montrait une instabilité d'au moins 2 des 5 marqueurs, et stable (MSS) si aucun des marqueurs n'était instable.

Évaluation de l'expression nucléaire de la beta caténine

L'expression immunohistochimique de la beta caténine était utilisée comme un marqueur de l'activation de la voie wnt/beta caténine dans les adénocarcinomes mucineux et les cas contrôles. Le nombre de noyaux marqués par la beta caténine était quantifié au sein des adénocarcinomes

mucineux dans trois différents champs au grossissement x400, dans les zones les plus riches en noyaux marqués par la beta caténine repérées à faible grossissement. Les noyaux marqués par la beta caténine étaient ensuite comptés avec le logiciel NE Elements Imaging (Nikon, Edo, Japan).

Analyse mutationnelle du gène *CNNTB1*

L'analyse du gène *CNNTB1* (NM_001904.3) codant pour la protéine beta caténine a été réalisée par séquençage automatisé. L'exon 3 du gène *CNNTB1* était amplifié par PCR. Les produits de PCR étaient purifiés et séquencés sur le séquenceur automatique ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems) et analysés avec le logiciel Seqscape (Applied Biosystems).

Analyse mutationnelle de *BRAF* et *KRAS*

L'analyse de *BRAF* et *KRAS* a été réalisée par séquençage automatisé. Les fragments encadrant l'exon 15 du gène *BRAF* et les exons 2, 3 et 4 du gènes *KRAS* étaient amplifiés par PCR. Les produits de PCR étaient purifiés et séquencés sur le séquenceur automatique ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems) et analysés avec le logiciel Seqscape (Applied Biosystems).

Analyse de regroupement hiérarchisé des profils moléculaires des adénocarcinomes mucineux

Les données moléculaires étaient d'abord reformatées spécifiquement pour l'analyse de regroupement hiérarchisé. Pour les mutations de *BRAF*, *KRAS* et l'instabilité microsatellite, une échelle à trois points était utilisée, avec 0 = pas de mutation ou pas d'instabilité microsatellite, 1 = ininterprétable et 3 = mutation ou instabilité microsatellite. L'analyse de regroupement hiérarchisé était réalisée avec les logiciels Cluster et Tree View, disponibles gratuitement sur <http://rana.stanford.edu/software> ^{126,129}.

Statistiques

Les associations entre les variables catégorielles (groupes de différenciation, sexe, statut MGMT, statut MSS/MSI, localisation tumorale) ont été calculées par test du chi-2, de Fisher ou de Kruskal Wallis. Le test de Mann-Whitney était utilisé pour comparer les variables continues entre les groupes.

Les données opératoires et de suivi clinique ont été obtenues à partir des dossiers hospitaliers. La survie globale (OS) était mesurée de la date de l'intervention chirurgicale à la date de décès lié à l'adénocarcinome colique (si le décès n'était pas lié au cancer colique, les données étaient censurées à la date du décès). Une analyse de survie univariée a été réalisée à l'aide du test du log-rank et illustrée par les courbes de Kaplan-Meier. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel SAS version 9.3 pour Windows (SAS Institute, Cary, NC, USA).

RÉSULTATS

Analyse histologique des adénocarcinomes mucineux

Un total de 845 adénocarcinomes colorectaux primitifs ont été résectionnés chirurgicalement entre 2004 et 2012. Parmi ces cas, 60 (7,1%) ont été classés en adénocarcinome mucineux selon les critères de la classification OMS 2010 ³. Comme il est défini dans cette classification, les adénocarcinomes mucineux ont été divisés en deux groupes selon leur phénotype architectural : (i) adénocarcinome mucineux constitué de lambeaux de cellules épithéliales polarisées autour de flaques de mucus (adénocarcinome mucineux de bas grade : n=37, 62%) (Figure 15A); et (ii) adénocarcinome mucineux avec des structures acineuses flottant dans les flaques de mucus (adénocarcinome mucineux de haut grade : n = 23, 38%) (Figure 15B). Quarante neuf adénocarcinomes mucineux étaient entièrement composés de flaques de mucus, tandis que 11 cas présentaient des proportions variables de mucus extracellulaire (entre 50% et 90%). Enfin, une composante de cellules en bague à chaton était observée dans 13 adénocarcinomes mucineux (Figure 16). Les cellules en bague à chaton étaient présentes plus fréquemment dans les adénocarcinomes mucineux comportant des structures acineuses flottant dans les flaques de mucus extracellulaires que dans les adénocarcinomes avec des bandes de cellules polarisées bordant des flaques de mucus (10/23 (43%) versus 3/37 (8%) (test du Chi-2 : p=0,001).

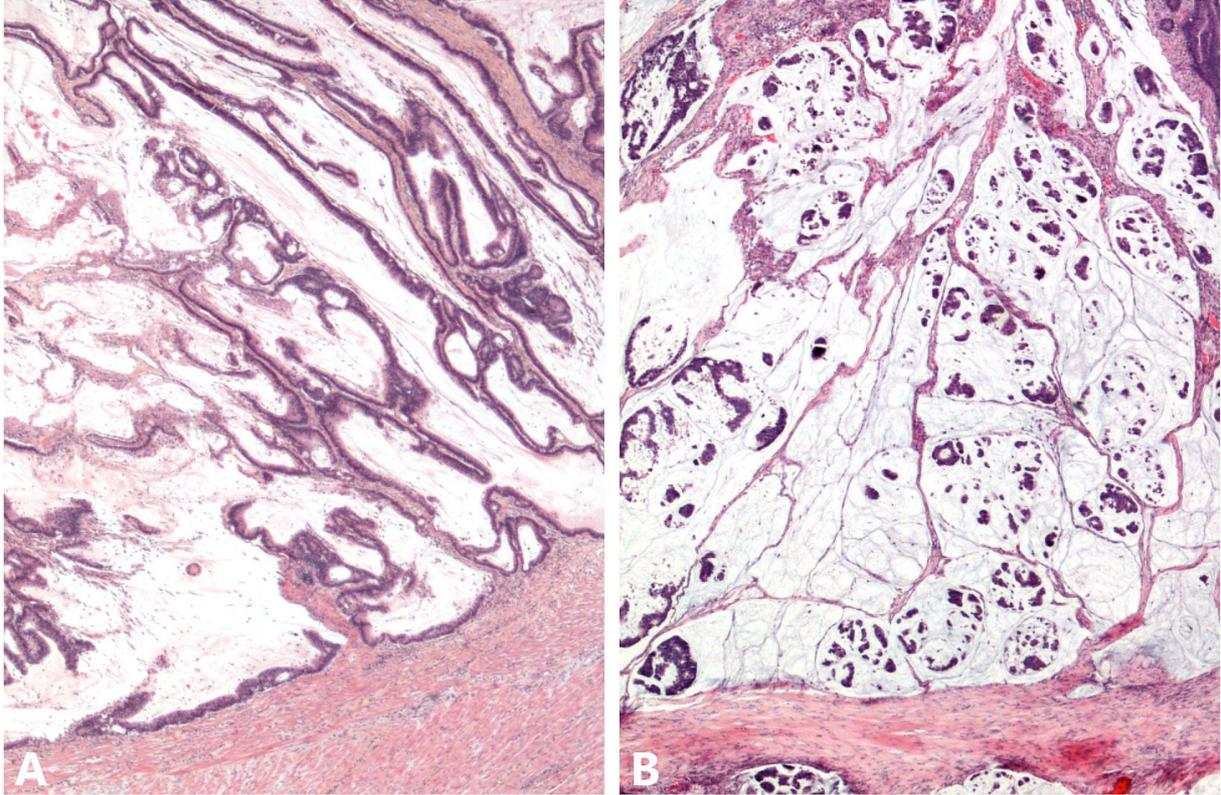


Figure 15: (A) adénocarcinome mucineux de bas grade caractérisé par des lambeaux de cellules épithéliales autour de flaques de mucus. (B) adénocarcinome mucineux de haut grade caractérisé par des structures acineuses flottant dans des flaques de mucus (hématéine-éosine, grossissement original x 40).

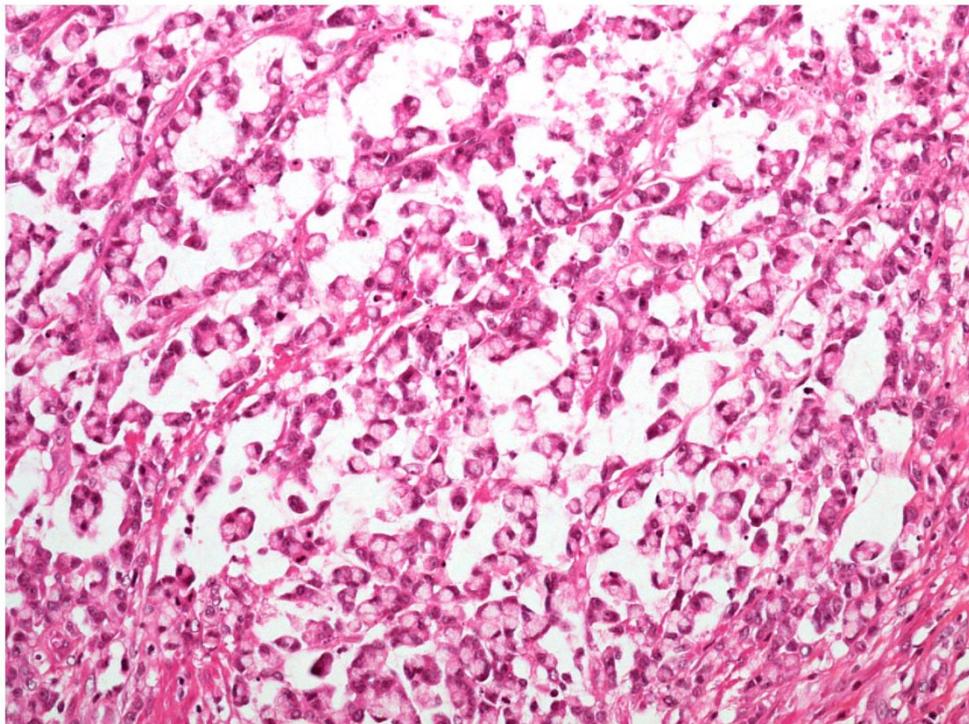


Figure 16: Présence de cellules en bague à chaton au sein de flaques de mucus (hématéine-éosine, grossissement original x200)

Expression nucléaire de la beta caténine

L'activation de la voie Wnt était identifiée au centre de la tumeur grâce à l'expression nucléaire de la beta caténine en immunohistochimie ¹³⁰. Le nombre moyen de cellules tumorales présentant une expression nucléaire de la beta caténine était plus faible dans les adénocarcinomes mucineux que dans le groupe contrôle d'adénocarcinomes sans autre indication (SAI) (21 % versus 30 %; test de Mann Whitney, $p = 0,002$) (tableau 2).

Statut mutationnel de *KRAS*

Une mutation dans l'exon 2 de *KRAS* était observée dans 24 des 40 adénocarcinome mucineux MSS (60%). Bien que le taux de mutation de *KRAS* était plus élevé dans les adénocarcinomes mucineux que dans le groupe contrôle d'adénocarcinomes SAI (45/136 ; 33%), la différence n'était pas statistiquement significative.

Statut mutationnel de *BRAF*

Dix-sept (28%) adénocarcinomes mucineux présentaient une mutation de *BRAF*. Toutes ces mutations correspondaient à la mutation activatrice V600E, sauf une (G596R). Le taux de mutation de *BRAF* dans les adénocarcinomes mucineux était significativement plus élevé que dans le groupe contrôle d'adénocarcinomes SAI (4/136 ; 3%)(test du Chi-2 : $p < 0,0001$)

Statut MSS/MSI-H

Vingt des 60 (33%) adénocarcinomes mucineux étaient MSI-H : 17 avec une perte concomitante d'expression immunohistochimique de MLH1 et PMS2, 2 avec une perte concomitante de MSH2 et MSH6 en immunohistochimie, et 1 avec une perte d'expression immunohistochimique isolée de PMS2. Neuf des 20 adénocarcinomes MSI-H (45%) présentaient une mutation V600E de *BRAF*.

L'instabilité microsatellite était associée à un syndrome de Lynch avéré chez deux patients présentant un adénocarcinome mucineux. Une hyperméthylation de *MLH1* était observée dans 18 cas, incluant 10 adénocarcinomes mucineux mutés *BRAF* et un adénocarcinome mucineux associé à un syndrome de Lynch.

Dans le groupe contrôle d'adénocarcinomes SAI, 5 des 136 (4%) tumeurs étaient MSI-H (test du chi-2 : $p < 0,0001$).

Tableau 2: caractéristiques clinico-pathologiques et moléculaires des adénocarcinomes mucineux et du groupe contrôle d'adénocarcinomes sans autre indication (SAI).

	Adénocarcinomes mucineux	Groupe contrôle (adénocarcinomes SAI)	
N (%)	60	136	
Sexe			P = NS
Masculin	32 (62.5%)	81 (63%)	
Féminin	28 (37.5%)	55 (37%)	
Age moyen (années)	70	68	P* = 0.456
< 55 ans	10 (17%)	19 (14%)	P† = 0.06
56 – 75 ans	24 (40%)	70 (51%)	
> 75 ans	26 (43%)	47 (35%)	
Localisation			P < 0.0001
Colon droit	37 (62%)	39 (29%)	
Colon gauche	23 (36%)	97 (71%)	
Adénome précessif	20 (33%)	26 (19%)	P = 0.03
Conventionnel	16 (27%)	26 (19%)	
Festonné	4 (6%)	0 (0%)	
Carcinome associé	10 (17%)	16 (12%)	P = 0.351
Colorectal	6 (10%)	9 (7%)	
Autres organes	4 (6%)	7 (5%)	
Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin	3	0	ND
Mutation de <i>BRAF</i>	17 (28%)	4 (3%)	P < 0.0001
Mutation de <i>KRAS</i>	24 (40%)	45 (33%)	P = 0.350
MSI-H	20 (30%)	5 (4%)	P < 0.0001
Expression nucléaire moyenne de la b catenine	21%	30%	P = 0.002 P = 0.002‡

Méthylation du promoteur du gène *MGMT* et perte d'expression de *MGMT*

Une hyperméthylation de *MGMT* était présente dans 17 cas (28%), tandis qu'une perte d'expression immunohistochimique de *MGMT* était observée dans 14 cas (23%) (Figure 17). La méthylation du promoteur de *MGMT* était étroitement corrélée à la perte d'expression immunohistochimique ($p < 0,001$) mais n'était pas parfaitement superposable. Une perte d'expression de *MGMT* était observée dans 3 cas sans hyperméthylation du promoteur de *MGMT* et l'expression de *MGMT* était conservée dans 6 tumeurs présentant une hyperméthylation du promoteur de *MGMT*. Au total, des altérations de *MGMT* (hyperméthylation du promoteur ou perte d'expression de *MGMT*) étaient présentes dans 20 des 60 adénocarcinomes mucineux (33%). La fréquence d'une mutation G>A de *KRAS* était significativement plus élevée dans les adénocarcinomes mucineux avec perte d'expression immunohistochimique de *MGMT* (7/14, 50 %) que dans les adénocarcinomes exprimant *MGMT* (8/46, 17 %, $p = 0,013$).

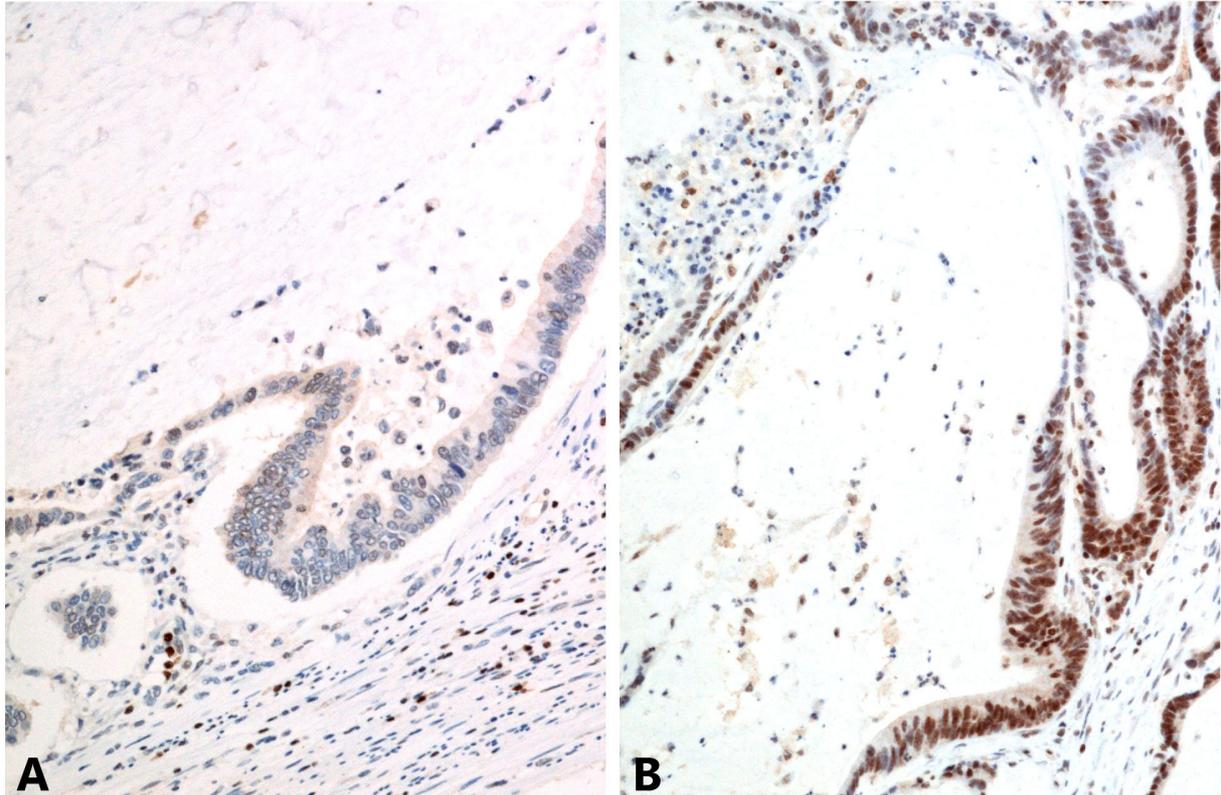


Figure 17: Images représentatives du marquage immunohistochimique de MGMT : (A) Perte complète d'expression de MGMT par les cellules tumorales d'un adénocarcinome mucineux. L'expression nucléaire de MGMT par les cellules stromales et inflammatoires sert de contrôle positif. (B) Expression nucléaire et cytoplasmique de MGMT dans presque toutes les cellules tumorales d'un adénocarcinome mucineux (marquage immunohistochimique MGMT, x200)

Pronostic

Les données de suivi étaient disponibles pour 58 des 60 patients présentant un adénocarcinome mucineux. La durée moyenne de suivi était de 34 mois (1-105 mois). L'importance pronostique (i) de chaque paramètre moléculaire et (ii) des paramètres démographiques et clinico-pathologiques, incluant le statut MSI/MSS était déterminée par une analyse statistique univariée et multivariée.

En analyse univariée, seul l'âge des patients au diagnostic avait une valeur pronostique (HR 1,05, IC95 % 1,02-1,09, $p = 0,0033$). La mutation de *BRAF* montrait une tendance à la significativité (HR 1,97, IC95 % 0,92-4,23, $p = 0,0754$). En analyse de survie multivariée avec le modèle de régression

de Cox, l'âge au diagnostic, la mutation de *BRAF* et le stade 4 de la classification TNM étaient indépendamment associés à un mauvais pronostic (tableau 3).

Tableau 3: impact des caractéristiques clinico-pathologiques, des marqueurs génotypiques de la cancérogenèse colorectale et du stade de la tumeur sur la survie globale des patients atteints d'adénocarcinome mucineux, avec le modèle de régression multivariée de Cox.

Variable	No	HR	IC	p-value
Age	58	1.07	1.03 - 1.11	< 0.001
Mutation de <i>BRAF</i>		3.49	1.20 – 10.2	0.021
Cellules en bague à châton		0.60	0.18 – 1.94	0.389
Structures acineuses		2.65	0.99 – 7.12	0.053
Mutation de <i>KRAS</i>		0.53	0.15 – 1.84	0.317
Hyperméthylation de MLH1		0.26	0.06 – 1.21	0.085
Statut MSI/MSS		3.09	0.63 – 15.3	0.165
Stade 1/2 vs 3 vs 4		0.20	0.04 – 0.98	0.044
Stade 1/2 vs 3 vs 4		1.67	0.55 – 5.07	

Analyse de regroupement hiérarchisé des adénocarcinomes mucineux

L'analyse de regroupement hiérarchisé reposait sur les données moléculaires décrites précédemment : l'expression nucléaire de la beta caténine, le statut mutationnel de *KRAS* et de *BRAF*, le statut MSS/MSI-H, la perte d'expression de MSH2 et les anomalies de MGMT. Le regroupement hiérarchisé permettait de répartir les adénocarcinomes mucineux en quatre groupes (Figure 18).

Le premier groupe (G1) était constitué de 24 adénocarcinomes mucineux comportant une mutation de *KRAS* et un statut MSS. Dans ce groupe, les altérations de MGMT étaient fréquentes (13/24, 54 %, $p = 0,01$ versus autres groupes). Ces adénocarcinomes mucineux étaient souvent localisés dans le colon gauche (14/24, 59 %; $p = 0,009$) et étaient souvent associés à des lésions précancéreuses comme des adénomes villosités, tubulo-villosités ou des adénomes festonnés. Comme pour toutes les autres caractéristiques clinico-pathologiques, le taux d'expression nucléaire de la beta caténine n'était pas différent de celui du groupe contrôle d'adénocarcinomes SAI (tableau 2).

Le deuxième groupe (G2) était constitué de 17 adénocarcinomes mucineux comportant une mutation de *BRAF*. Dans ce groupe, le nombre de patients plus âgés, principalement des femmes, était plus élevé (tableau 4). Ce groupe comportait autant d'adénocarcinomes mucineux MSI-H (9/17) que de MSS (8/17). Cependant, le taux d'expression nucléaire de beta caténine était significativement plus faible que dans tous les autres groupes (test de Mann Whitney, $p < 0,0001$) et que dans le groupe contrôle d'adénocarcinomes SAI ($p = 0,002$). Certains des adénocarcinomes mucineux de ce groupe présentaient des anomalies de MGMT. Enfin, comme il a été montré dans les résultats de l'étude du pronostic, ce groupe était associé au pronostic le plus péjoratif.

Le troisième groupe (G3) était constitué de 11 adénocarcinomes mucineux MSI-H, dénommé MSI-H « nul » car ne présentant pas de mutation de *KRAS* ni de *BRAF*. Certaines caractéristiques clinico-pathologiques étaient significativement différentes. Tous les cas étaient localisés au niveau du colon droit (G3 versus autres groupes, test de Fisher, $p = 0,01$) et la plupart des cas comportaient un aspect histologique de haut grade (C3 versus autres groupes, test de Fisher, $p = 0,001$). Les patients atteints de syndrome de Lynch appartenaient tous à ce groupe. Dans ce groupe, le taux d'expression nucléaire de la beta caténine était moins élevé que dans les groupes G1 et G4, mais était significativement plus élevé que dans le groupe G2 (Test de Mann-Whitney, $p = 0,001$). Une mutation de l'exon 3 de la beta caténine (pSer45del et pSer45Phe) était détectée chez les deux patients atteints de syndrome de Lynch. Aucune anomalie de MGMT n'était observée dans ce groupe.

Le quatrième groupe (G4) était constitué de 8 adénocarcinomes mucineux de statut MSS, dénommé MSS « nul » car ne présentant pas de mutation de *KRAS* ni de *BRAF*. Bien que ce groupe partageait de nombreuses caractéristiques avec le groupe G1, les anomalies de MGMT étaient moins fréquentes. Le taux d'expression nucléaire de la beta caténine n'était pas différent de celui du groupe G1 et du groupe contrôle d'adénocarcinomes SAI (31 % versus 32 % et 31 % versus 30 % respectivement, test de Mann-Whitney ; $p = \text{NS}$). Une lésion précancéreuse était détectable dans 4 cas (50%) (adénome tubulo-villeux et adénome festonné traditionnel) (tableau 4). Ce groupe présentait des caractéristiques clinico-pathologiques proches du second groupe. Finalement, ce groupe ne présentait pas de différence significative avec le groupe contrôle, à l'exception du caractère mucineux en histologie.

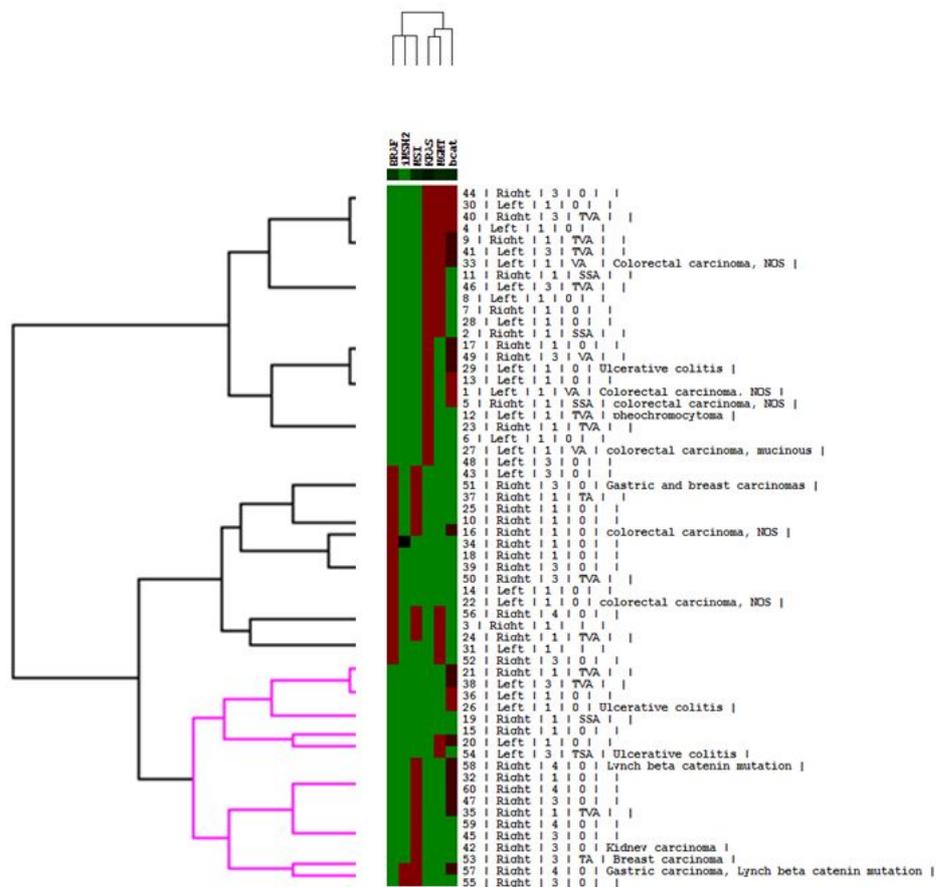


Figure 18: analyse de regroupement hiérarchisé de 60 adénocarcinomes mucineux du colon. Les tumeurs sont d'abord regroupées selon leur proximité entre les biomarqueurs : statut MSS/MSI, statut mutationnel de KRAS et BRAF, expression immunohistochimique de MSH2 et beta caténine et anomalie de MGMT. Les patients sont ensuite répartis selon leur proximité dans chaque groupe. Les dendrogrammes montrent deux dimensions de regroupement : l'association entre les biomarqueurs (en haut) et l'association entre les patients (coté gauche). La mutation de KRAS et de BRAF, le statut MSI, la perte d'expression immunohistochimique de MSH2, l'expression immunohistochimique de la beta caténine et les anomalies de MGMT sont représentés par des carrés rouges. L'absence de mutation de KRAS et BRAF, le statut MSS, l'expression de MSH2, l'absence d'expression de la beta caténine et l'absence d'anomalie de MGMT sont représentés par des carrés verts. Sur le coté droit de la figure sont détaillés des caractéristiques clinico-pathologiques : première colonne, identification du cas ; deuxième colonne, localisation de la tumeur ; troisième colonne : grade de la tumeur ; quatrième colonne, lésions associées ; cinquième colonne, autre pathologie associée. Quatre groupes de tumeurs ont ainsi été isolés sur le coté gauche de la figure. Abréviations : NOS : adénocarcinome not otherwise specified, SSA : sessile serrated adenoma, TVA : tubulo villous adenoma ; VA : villous adenoma.

Tableau 4: association des principales caractéristiques clinico-pathologiques des quatre groupes d'adénocarcinome mucineux définis par le regroupement hiérarchisé.

Paramètre clinico-pathologique	Groupes				P value†
	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	
N (%)	24 (40%)	17 (28%)	11 (18%)	8 (13%)	
Sexe					P = NS
Homme	15 (62.5)	6 (35%)	6 (55%)	5 (63%)	
Femme	9 (37.5)	11 (65%)	5 (45%)	3 (37%)	
Age moyen (années)	66	76	69	71	P* = 0.05
< 55 ans	6 (25%)	2 (12%)	2 (18%)	0 (0%)	P† = 0.06
56 – 75 ans	10 (42%)	4 (24%)	4 (36%)	6 (75%)	
> 75 ans	8 (33%)	11 (64%)	5 (46%)	2 (25%)	
Localisation					C3 vs autres P = 0.01
Colon droit	10 (42%)	13 (76%)	11 (100%)	3 (37%)	
Colon gauche	14 (58%)	4 (24%)	0 (0%)	5 (63%)	
					C1+C4 vs C2+C3: p = 0.0004
Grade de la tumeur					C3 vs other P = 0.001
Bas grade	18 (75%)	11 (65%)	2 (18%)	6 (75%)	
Haut grade	6 (25%)	6 (35%)	9 (82%)	2 (25%)	
Adénome précessif	11 (46%)	3 (18%)	2 (18%)	4 (50%)	NS
Conventionnel	9	3	2	2	
Festonné	2	0	0	2	C1+C4 vs C2+C3: p = 0.02
Carcinome associé	4 (17%)	3 (18%)	3 (27%)	0 (0%)	NS
Colorectal	4	2	0	0	
Autres organes	0	1	3	0	
Maladie inflammatoire chronique de l'intestin	2	0	0	1	ND
Métastases lymphatiques	13 (54%)	8 (47%)	3 (27%)	4 (50%)	NS
Anomalies de MGMT	13 (54%)	5 (29%)	0 (0%)	2 (25%)	C1 vs autres p = 0.01
Expression nucléaire moyenne de la beta caténine	32%	4%	15%	31%	C2 vs autres P = 0.0002‡

† toutes les statistiques : test du chi 2 sauf (*) test de Kruskal Wallis et (‡) test de Mann-Whitney.

DISCUSSION

Notre compréhension des adénocarcinomes mucineux colorectaux repose, d'un point de vue historique, sur deux approches. La première est une approche pathologique descriptive basée sur des caractéristiques clinico-pathologiques^{9,10}. La seconde approche, plus récente, décrit les adénocarcinomes mucineux selon leurs caractéristiques moléculaires^{8,36,40,131,132}. Dans ce travail, nous présentons une approche convergente basée sur une analyse de regroupement hiérarchisé intégrant les données clinico-pathologiques et les caractéristiques moléculaires, qui souligne l'hétérogénéité des adénocarcinomes mucineux et permet d'isoler des groupes pouvant potentiellement présenter un intérêt thérapeutique.

Notre approche d'analyse de regroupement hiérarchisé d'adénocarcinomes mucineux s'est appuyée sur le statut d'instabilité microsatellitaire MSS/MSI, sur le statut mutationnel de *BRAF* et de *KRAS*, et sur l'activation de la voie wnt/beta caténine. *MGMT* a été intégré dans notre analyse de regroupement hiérarchisé en raison de son rôle connu dans la cancérogenèse colorectale par sa fonction de gène suppresseur de tumeur^{117,133}.

En comparaison avec le groupe contrôle d'adénocarcinomes SAI, les adénocarcinomes mucineux possédaient quatre caractéristiques importantes : (i) la présence d'une mutation de *BRAF* significativement plus élevée, (ii) une fréquence significativement plus importante d'instabilité microsatellite, (iii) une fréquence légèrement plus importante de mutation de *KRAS* et (iv) une activation de la voie wnt/beta caténine significativement plus faible au sein de la tumeur. Près de 70 % des adénocarcinomes mucineux colorectaux présentaient une activation constitutionnelle de la voie RAS/RAF/MAP Kinase, suggérant que cette voie de signalisation joue un rôle dans le développement des adénocarcinomes mucineux. De plus, dans notre série d'adénocarcinomes mucineux, la mutation de *KRAS* était l'anomalie moléculaire la plus fréquemment retrouvée. Comme le montre le tableau 2, les données clinico-pathologiques et moléculaires de notre série d'adénocarcinomes mucineux étaient très proches de la série récemment décrite par Andrici et coll.¹³⁴, évaluant la valeur pronostique du statut MSI-H chez 264 patients atteints d'adénocarcinomes mucineux. Cependant, dans notre étude, il y avait légèrement plus d'hommes que de femmes, et le taux d'adénocarcinomes colorectaux mutés *BRAF* et MSI-H était légèrement

plus faible (28 % versus 35 % et 33 % versus 36 % respectivement). Néanmoins, Andrici et coll.¹³⁴ ont déterminé le statut mutationnel de *BRAF* et le statut d'instabilité microsatellite seulement par technique immunohistochimique sur *tissue microarrays*. Malheureusement, ces auteurs n'ont pas déterminé le statut mutationnel de *KRAS* dans leur large série d'adénocarcinomes mucineux. D'autres séries comprenant tous les types histologiques d'adénocarcinomes colorectaux ont cependant rapporté une plus grande fréquence de la mutation de *KRAS* dans les adénocarcinomes avec composante mucineuse^{135,136}.

Notre approche basée sur le regroupement hiérarchisé a permis d'identifier quatre principaux groupes d'adénocarcinomes mucineux colorectaux : (i) les adénocarcinomes mucineux mutés *BRAF*, (ii) les adénocarcinomes mucineux MSI-H « nuls », (iii) les adénocarcinomes mucineux MSS « nuls » et (iv) les adénocarcinomes mucineux mutés *KRAS*. Il est intéressant de constater que le regroupement hiérarchisé a permis de distinguer un groupe d'adénocarcinomes mutés *BRAF* et un groupe MSI-H « nul » ne comportant pas de mutation de *BRAF* ni de *KRAS*. Le groupe de carcinomes colorectaux mutés *BRAF* était composé de presque autant d'adénocarcinomes mucineux MSS que de MSI-H. Ce groupe possédait des caractéristiques clinico-pathologiques et moléculaires particulières, survenant notamment chez des patients plus âgés, principalement chez les femmes, et de localisation colique droite. Un polype précessif était rarement identifié en bordure de ces adénocarcinomes mucineux, mais lorsqu'il était observé, il correspondait à un adénome en dysplasie conventionnelle. Ces adénocarcinomes mucineux présentaient souvent une hyperméthylation du promoteur de *MLH1* dans les cas MSI-H, ou des anomalies de *MGMT* suggérant un faible niveau d'instabilité microsatellite (MSI-L) et un phénotype de méthylation des îlots GpG (CIMP)^{61,87}. Enfin la caractéristique moléculaire la plus singulière de ce groupe d'adénocarcinomes mucineux était le faible niveau d'activation de la voie de signalisation wnt/beta caténine dans les cellules tumorales, suggérant que la mutation de *BRAF* est mutuellement exclusive avec la voie d'activation de la beta caténine dans les adénocarcinomes mucineux colorectaux. De plus, le mauvais pronostic associé à l'âge plus élevé au diagnostic et à la mutation de *BRAF* quelque soit le statut MSI/MSS mis en évidence par l'analyse multivariée justifie de distinguer ce groupe. Ceci conforte le rôle initiateur de *BRAF* dans la cancérogenèse colorectale. Ces observations permettent de considérer que les adénocarcinomes mucineux mutés *BRAF* portent la signature de la voie festonnée de la cancérogenèse colorectale. Dans cette voie, les adénomes festonnés sessiles destinés à progresser en adénocarcinome MSI, l'élément

déterminant est la méthylation des îlots CpG entraînant l'inactivation bi-allélique de *MLH1*⁸⁵. Pour les adénomes festonnés sessiles ou traditionnels avec mutation de *BRAF* destinés à progresser en adénocarcinome MSS, les éléments déterminants sont moins clairs, mais la méthylation des îlots CpG et TP53 est souvent évoquée. Des anomalies de *MGMT* ont également été observées dans la progression des adénomes festonnés, notamment dans les polypes mixtes hyperplasiques et adénomateux, et dans les adénomes festonnés sessiles avec composante dysplasique ou carcinomateuse^{137,138}. Dans la voie festonnée de la cancérogenèse colorectale, une autre voie jouant un rôle par le biais de la méthylation des îlots CpG est l'activation de la voie de signalisation wnt/beta caténine. En effet, cette voie peut être activée par la méthylation de gènes contrôlant *APC*, comme *SFRP*, *MCC* et *AXIN2*¹³⁹. Cependant, le faible niveau d'expression nucléaire de la beta caténine au sein des adénocarcinomes mucineux mutés *BRAF* dans notre série suggère que ces anomalies épigénétiques de la voie de signalisation wnt/beta caténine ne constituent qu'un avantage sélectif transitoire dans la progression des polypes festonnés vers l'adénocarcinome.

Les adénocarcinomes mucineux MSI-H « nuls » possédaient une expression significativement plus élevée de la beta caténine dans les cellules tumorales que dans les adénocarcinomes mucineux *BRAF* mutés. Dans ce groupe, les patients étaient plus jeunes et certains présentaient un syndrome de Lynch avéré. Une mutation de l'exon 3 du gène de la beta caténine a été recherchée chez les patients présentant une expression plus élevée de beta caténine. Cette mutation a été retrouvée chez deux patients atteints de syndrome de Lynch. Des études ont décrit une fréquence relativement élevée de mutation de la beta caténine dans les cancers de patients atteints de syndrome de Lynch^{140,141}. Comme dans notre étude, toutes les mutations pathogéniques rapportées étaient des mutations faux-sens entraînant des altérations de la thréonine du codon 41 ou de la sérine du codon 45. Johnson et coll¹⁴¹ ont suggéré que la mutation de l'exon 3 de la beta caténine survient durant ou après la progression de l'adénome au carcinome dans le syndrome de Lynch. D'un point de vue clinique, ce groupe d'adénocarcinomes mucineux MSI « nul » est probablement le plus hétérogène, incluant des syndromes de cancer colorectal héréditaire non prouvé et des adénocarcinomes mucineux associés à la voie festonnée.

Le regroupement hiérarchisé a permis d'identifier deux groupes constitués exclusivement d'adénocarcinomes mucineux MSS, différant seulement par la présence d'une mutation de *KRAS* dans l'un des groupes. Ces deux groupes partageaient de nombreuses caractéristiques clinico-pathologiques entre eux et avec le groupe contrôle d'adénocarcinomes SAI. On retrouvait

également dans ces deux groupes MSS de nombreuses caractéristiques classiquement décrites dans les séries historiques d'adénocarcinome mucineux^{9,10}, comme l'association avec des adénomes villosus ou tubulovillosus et l'association avec les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. En effet, ces groupes d'adénocarcinomes mucineux étaient associés à un polype précancéreux, à un autre polype ou à un carcinome dans 80 % des cas. Ces adénocarcinomes mucineux étaient localisés plus fréquemment au niveau du colon gauche et prédominaient chez les hommes. Même en rassemblant ces deux groupes de carcinomes colorectaux MSS, le taux de mutation de *KRAS* demeurait significativement plus élevé que dans le groupe contrôle d'adénocarcinome SAI (75 % versus 33%). Une plus grande fréquence de polypes précancéreux en bordure des carcinomes a été rapportée dans les carcinomes colorectaux mutés *KRAS*¹³⁶. Dans notre étude, bien que la majorité des polypes précancéreux étaient des adénomes conventionnels dérivant de la voie de la mutation APC, un adénome festonné traditionnel était observé en bordure de deux adénocarcinomes mucineux du colon droit mutés *KRAS*, démontrant la présence de la voie festonnée dans certains adénocarcinomes mucineux mutés *KRAS*. Ces observations sont en accord avec une étude récente rapportant que 46 % des adénomes festonnés traditionnels avec carcinome invasif possédaient une composante mucineuse, incluant de nombreux cas mutés *KRAS*¹⁴². Une explication de la fréquence des polypes adénomateux en bordure d'adénocarcinomes mutés *KRAS* pourrait être que ces carcinomes ont besoin de la continuité avec leur polype précurseur pour progresser et/ou que la composante maligne se développe lentement et ne surpasse pas rapidement la lésion précancéreuse¹³⁶.

Les anomalies de MGMT (c'est à dire la perte d'expression protéique et/ou l'hyperméthylation du promoteur de *MGMT*) étaient fréquemment retrouvées dans adénocarcinomes mucineux mutés *KRAS* de notre série. Comme d'autres auteurs l'ont observé, nous retrouvons une concordance imparfaite entre la perte d'expression immunohistochimique de la protéine MGMT et l'hyperméthylation du promoteur de *MGMT*^{87,136,143}. Pour cette raison, nous avons choisi d'intégrer dans l'analyse de regroupement hiérarchisé toutes les anomalies de MGMT. Cette légère discordance entre l'hyperméthylation et l'expression protéique de MGMT peut être due à diverses causes comme la méthodologie (type du test de méthylation) et un mécanisme moléculaire alternatif régulant l'expression de *MGMT*. Par exemple, Halford et coll. ont décrit une mutation somatique faux-sens du gène *MGMT* dans les carcinomes colorectaux, s'accompagnant dans certains cas d'une réduction ou d'une perte d'expression protéique de MGMT¹⁴⁴. Certaines études

ont montré que les adénocarcinomes colorectaux mutés *KRAS* étaient associés à un profil moléculaire particulier incluant l'inactivation du gène *MGMT*. Ainsi, il a été suggéré que l'inactivation de *MGMT* participe à la progression de l'adénome au carcinome en association avec les mutations de *KRAS* et de *TP53*^{118,119}. Enfin, certains auteurs ont décrit une association entre l'hyperméthylation de *MGMT*, un faible niveau d'instabilité chromosomique (MSI-L) et un phénotype de méthylation des îlots CpG (CIMP)^{87,145-147}. Il a été rapporté que l'inactivation de *MGMT* par méthylation joue un rôle dans des voies de cancérogenèse alternes, incluant la voie de l'adénome festonné traditionnel muté *KRAS*¹⁴⁸, décrit par Jass comme une voie de fusion⁷⁶.

L'inactivation fréquente de *MGMT* dans les adénocarcinomes mucineux pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques pour ces tumeurs comportant une résistance naturelle à de nombreuses chimiothérapies conventionnelles^{5,6}, et aux thérapies anti-EGFR^{149,150}. En effet, comme *MGMT* exerce un rôle central dans la réparation des dommages de l'ADN induits par l'alkylation¹¹¹ l'inactivation de *MGMT* dans les adénocarcinomes mucineux *KRAS* et *BRAF* mutés pourrait indiquer une importante sensibilité aux agents alkylants. Il a déjà été montré que la dacarbazine pouvait être efficace après échec des thérapies standard chez les patients atteints de carcinome colorectal métastatique avec inactivation de *MGMT*^{113,121}. Cependant, la réponse des patients atteints d'adénocarcinomes mucineux semble ne pas dépendre uniquement des caractéristiques moléculaires de la tumeur, mais également des propriétés physiques du micro-environnement tumoral. En effet, la barrière de mucus et une micro-vascularisation moins développée dans ce type de carcinome pourraient restreindre l'accès des médicaments aux cellules tumorales⁴⁴.

En conclusion, les adénocarcinomes mucineux comportent des groupes clinico-pathologiques hétérogènes présentant un intérêt pronostic et thérapeutique. Cette étude suggère que les mutations de *KRAS* ou de *BRAF* jouent un rôle initiateur dans les multiples voies alternes de cancérogenèse des adénocarcinomes mucineux colorectaux, tandis que les altérations génétiques déterminant le phénotype mucineux interviennent tardivement. Enfin, cette analyse de regroupement hiérarchisé basée sur des données clinico-pathologiques simples et des données moléculaires constitue un outil puissant de dépistage des syndromes héréditaires de cancer colorectal dans les études de cohorte.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–E386 (2015).
2. Binder, F. *Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012.* (Réseau Francim, 2013).
3. *WHO classification of tumours of the digestive system.* (IARC Press, 2010).
4. Parham, D. Colloid carcinoma. *Ann. Surg.* **77**, 90 (1923).
5. Negri, F. V. *et al.* Mucinous histology predicts for reduced fluorouracil responsiveness and survival in advanced colorectal cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **16**, 1305–1310 (2005).
6. Catalano, V. *et al.* Mucinous histology predicts for poor response rate and overall survival of patients with colorectal cancer and treated with first-line oxaliplatin- and/or irinotecan-based chemotherapy. *Br. J. Cancer* **100**, 881–887 (2009).
7. Hugen, N., van de Velde, C. J. H., de Wilt, J. H. W. & Nagtegaal, I. D. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **25**, 651–657 (2014).
8. Song, G. A. *et al.* Mucinous carcinomas of the colorectum have distinct molecular genetic characteristics. *Int. J. Oncol.* **26**, 745–750 (2005).
9. Symonds, D. A. & Vickery, A. L. Mucinous carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* **37**, 1891–1900 (1976).
10. Umpleby, H. C., Ranson, D. L. & Williamson, R. C. Peculiarities of mucinous colorectal carcinoma. *Br. J. Surg.* **72**, 715–718 (1985).
11. Sadahiro, S., Ohmura, T., Saito, T. & Akatsuka, S. An assessment of the mucous component in carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* **64**, 1113–1116 (1989).
12. Okuno, M. *et al.* Mucinous colorectal carcinoma: clinical pathology and prognosis. *Am. Surg.* **54**, 681–685 (1988).

13. Green, J. B. *et al.* Mucinous carcinoma--just another colon cancer? *Dis. Colon Rectum* **36**, 49–54 (1993).
14. Secco, G. B. *et al.* Primary mucinous adenocarcinomas and signet-ring cell carcinomas of colon and rectum. *Oncology* **51**, 30–34 (1994).
15. Lanza, G., Gafà, R., Dubini, A., Maestri, I. & Cavazzini, L. [Clinico-pathological features and biological characterization of mucoid colorectal carcinoma]. *Pathologica* **87**, 631–639 (1995).
16. Nowell, P. C. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* **46**, 2203–2207 (1986).
17. Dukes, C. E. Familial Intestinal Polyposis. *J. Clin. Pathol.* **1**, 34–38 (1947).
18. Vogelstein, B. *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* **319**, 525–532 (1988).
19. Delattre, O. *et al.* Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet Lond. Engl.* **2**, 353–356 (1989).
20. Offerhaus, G. J. *et al.* The relationship of DNA aneuploidy to molecular genetic alterations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* **102**, 1612–1619 (1992).
21. Thibodeau, S. N., Bren, G. & Schaid, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *science* **260**, 816–819 (1993).
22. Lynch, H. T. *et al.* Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II). Genetics, pathology, natural history, and cancer control, Part I. *Cancer Genet. Cytogenet.* **53**, 143–160 (1991).
23. Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**, 558–561 (1993).
24. Fishel, R. *et al.* The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* **75**, 1027–1038 (1993).
25. Leach, F. S. *et al.* Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* **75**, 1215–1225 (1993).
26. Bronner, C. E. *et al.* Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* **368**, 258–261 (1994).

27. Nicolaides, N. C. *et al.* Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* **371**, 75–80 (1994).
28. Marsischky, G. T., Filosi, N., Kane, M. F. & Kolodner, R. Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev.* **10**, 407–420 (1996).
29. Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89–92 (1983).
30. Greger, V., Passarge, E., Höpping, W., Messmer, E. & Horsthemke, B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum. Genet.* **83**, 155–158 (1989).
31. Kane, M. F. *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.* **57**, 808–811 (1997).
32. Toyota, M. *et al.* CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8681–8686 (1999).
33. Snover, D. C. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum. Pathol.* **42**, 1–10 (2011).
34. Kim, H., Jen, J., Vogelstein, B. & Hamilton, S. R. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am. J. Pathol.* **145**, 148 (1994).
35. Bocker, T. *et al.* Genomic instability in colorectal carcinomas: comparison of different evaluation methods and their biological significance. *J. Pathol.* **179**, 15–19 (1996).
36. Messerini, L. *et al.* Microsatellite instability in sporadic mucinous colorectal carcinomas: relationship to clinico-pathological variables. *J. Pathol.* **182**, 380–384 (1997).
37. Umar, A. *et al.* Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 261–268 (2004).
38. Konishi, M. *et al.* Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* **111**, 307–317 (1996).

39. Zhang, H., Evertsson, S. & Sun, X. Clinicopathological and genetic characteristics of mucinous carcinomas in the colorectum. *Int. J. Oncol.* **14**, 1057–1061 (1999).
40. Tanaka, H. *et al.* BRAF mutation, CpG island methylator phenotype and microsatellite instability occur more frequently and concordantly in mucinous than non-mucinous colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **118**, 2765–2771 (2006).
41. Wang, M.-J. *et al.* Prognostic Significance and Molecular Features of Colorectal Mucinous Adenocarcinomas: A Strobe-Compliant Study. *Medicine (Baltimore)* **94**, e2350 (2015).
42. Hugén, N. *et al.* The molecular background of mucinous carcinoma beyond MUC2: Molecular background of mucinous carcinoma. *J. Pathol. Clin. Res.* **1**, 3–17 (2015).
43. Maeda, Y., Sadahiro, S., Suzuki, T., Haruki, Y. & Nakamura, N. Significance of the mucinous component in the histopathological classification of colon cancer. *Surg. Today* **46**, 303–308 (2016).
44. Hugén, N., Brown, G., Glynne-Jones, R., de Wilt, J. H. W. & Nagtegaal, I. D. Advances in the care of patients with mucinous colorectal cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 361–369 (2015).
45. Winterford, C. M., Walsh, M. D., Leggett, B. A. & Jass, J. R. Ultrastructural localization of epithelial mucin core proteins in colorectal tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **47**, 1063–1074 (1999).
46. Machado, J. C., Nogueira, A. M., Carneiro, F., Reis, C. A. & Sobrinho-Simões, M. Gastric carcinoma exhibits distinct types of cell differentiation: an immunohistochemical study of trefoil peptides (TFF1 and TFF2) and mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6). *J. Pathol.* **190**, 437–443 (2000).
47. Birchenough, G. M. H., Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K., Bergström, J. H. & Hansson, G. C. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* **8**, 712–719 (2015).
48. Kazanjian, A. & Shroyer, N. F. NOTCH Signaling and ATOH1 in Colorectal Cancers. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **7**, 121–127 (2011).
49. Weiss, A. A., Babyatsky, M. W., Ogata, S., Chen, A. & Itzkowitz, S. H. Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in human normal, malignant, and inflammatory intestinal tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **44**, 1161–1166 (1996).

50. Melis, M. *et al.* Gene expression profiling of colorectal mucinous adenocarcinomas. *Dis. Colon Rectum* **53**, 936–943 (2010).
51. Li, L., Huang, P., Yu, X. & Bu, X. Clinicopathological significance of mucin 2 immunohistochemical expression in colorectal cancer: A meta-analysis. *Chin. J. Cancer Res.* **24**, 190–195 (2012).
52. Okudaira, K. *et al.* MUC2 gene promoter methylation in mucinous and non-mucinous colorectal cancer tissues. *Int. J. Oncol.* **36**, 765–775 (2010).
53. Perrais, M., Pigny, P., Copin, M.-C., Aubert, J.-P. & Van Seuningem, I. Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the epidermal growth factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and Sp1. *J. Biol. Chem.* **277**, 32258–32267 (2002).
54. Hatayama, H., Iwashita, J., Kuwajima, A. & Abe, T. The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356**, 599–603 (2007).
55. Walsh, M. D. *et al.* Expression of MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 mucins in colorectal cancers and their association with the CpG island methylator phenotype. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **26**, 1642–1656 (2013).
56. Renaud, F. *et al.* The serrated neoplasia pathway of colorectal tumors: Identification of MUC5AC hypomethylation as an early marker of polyps with malignant potential. *Int. J. Cancer* **138**, 1472–1481 (2016).
57. Park, E. T. *et al.* Aberrant expression of SOX2 upregulates MUC5AC gastric foveolar mucin in mucinous cancers of the colorectum and related lesions. *Int. J. Cancer* **122**, 1253–1260 (2008).
58. Raghoebir, L. *et al.* Aberrant SOX2 expression in colorectal cancers does not correlate with mucinous differentiation and gastric mucin MUC5AC expression. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **465**, 395–400 (2014).
59. Loeb, L. A., Loeb, K. R. & Anderson, J. P. Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 776–781 (2003).

60. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767 (1990).
61. Jass, J. R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* **50**, 113–130 (2007).
62. Murcia, O. *et al.* Serrated colorectal cancer: Molecular classification, prognosis, and response to chemotherapy. *World J. Gastroenterol.* **22**, 3516–3530 (2016).
63. Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643–649 (1998).
64. Pino, M. S. & Chung, D. C. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* **138**, 2059–2072 (2010).
65. Muto, T., Bussey, H. J. & Morson, B. C. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* **36**, 2251–2270 (1975).
66. Takayama, T. *et al.* Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1277–1284 (1998).
67. Scoazec, J.-Y. [Dysplasia in glandular digestive tissues: new concepts, new classifications]. *Ann. Pathol.* **27**, 398–416 (2007).
68. Powell, S. M. *et al.* APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* **359**, 235–237 (1992).
69. IJspeert, J. E. G., Medema, J. P. & Dekker, E. Colorectal Neoplasia Pathways. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* **25**, 169–182 (2015).
70. Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C. A. & Jones, K. A. The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev.* **20**, 586–600 (2006).
71. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159–170 (1996).
72. Cottrell, S., Bicknell, D., Kaklamanis, L. & Bodmer, W. F. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet Lond. Engl.* **340**, 626–630 (1992).

73. Miyaki, M. *et al.* Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res.* **54**, 3011–3020 (1994).
74. Otori, K. *et al.* Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. *Cancer* **83**, 896–900 (1998).
75. Esteller, M. *et al.* Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res.* **60**, 4366–4371 (2000).
76. Jass, J. R. *et al.* Advanced colorectal polyps with the molecular and morphological features of serrated polyps and adenomas: concept of a ‘fusion’ pathway to colorectal cancer. *Histopathology* **49**, 121–131 (2006).
77. Edge, S. *et al.* *AJCC cancer staging manual.* (Springer, 2010).
78. Baker, S. J. *et al.* p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* **50**, 7717–7722 (1990).
79. Hartwell, L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* **71**, 543–546 (1992).
80. Leslie, A., Carey, F. A., Pratt, N. R. & Steele, R. J. C. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br. J. Surg.* **89**, 845–860 (2002).
81. Jen, J. *et al.* Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **331**, 213–221 (1994).
82. Urbanski, S. J., Kossakowska, A. E., Marcon, N. & Bruce, W. R. Mixed hyperplastic adenomatous polyps--an underdiagnosed entity. Report of a case of adenocarcinoma arising within a mixed hyperplastic adenomatous polyp. *Am. J. Surg. Pathol.* **8**, 551–556 (1984).
83. Otori, K. *et al.* High frequency of K-ras mutations in human colorectal hyperplastic polyps. *Gut* **40**, 660–663 (1997).
84. O’Brien, M. J. *et al.* Hyperplastic (serrated) polyps of the colorectum: relationship of CpG island methylator phenotype and K-ras mutation to location and histologic subtype. *Am. J. Surg. Pathol.* **28**, 423–434 (2004).
85. O’Brien, M. J. *et al.* Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates

- separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am. J. Surg. Pathol.* **30**, 1491–1501 (2006).
86. Weisenberger, D. J. *et al.* CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* **38**, 787–793 (2006).
87. Whitehall, V. L. J., Walsh, M. D., Young, J., Leggett, B. A. & Jass, J. R. Methylation of O⁶-Methylguanine DNA Methyltransferase Characterizes a Subset of Colorectal Cancer with Low-level DNA Microsatellite Instability. *Cancer Res.* **61**, 827–830 (2001).
88. Rosenberg, D. W. *et al.* Mutations in BRAF and KRAS Differentially Distinguish Serrated versus Non-Serrated Hyperplastic Aberrant Crypt Foci in Humans. *Cancer Res.* **67**, 3551–3554 (2007).
89. Fang, M., Ou, J., Hutchinson, L. & Green, M. R. The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFK to mediate the CpG Island Methylator phenotype. *Mol. Cell* **55**, 904–915 (2014).
90. Serra, R. W., Fang, M., Park, S. M., Hutchinson, L. & Green, M. R. A KRAS-directed transcriptional silencing pathway that mediates the CpG island methylator phenotype. *eLife* **3**, e02313 (2014).
91. Weston, A. P. & Campbell, D. R. Diminutive colonic polyps: histopathology, spatial distribution, concomitant significant lesions, and treatment complications. *Am. J. Gastroenterol.* **90**, 24–28 (1995).
92. Han, Y. & Zhou, Z. Y. Clinical features and molecular alterations of traditional serrated adenoma in sporadic colorectal carcinogenesis. *J. Dig. Dis.* **12**, 193–198 (2011).
93. Yang, H.-M., Mitchell, J. M., Sepulveda, J. L. & Sepulveda, A. R. Molecular and histologic considerations in the assessment of serrated polyps. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **139**, 730–741 (2015).
94. Yang, S., Farraye, F. A., Mack, C., Posnik, O. & O'Brien, M. J. BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status. *Am. J. Surg. Pathol.* **28**, 1452–1459 (2004).
95. Huang, C. S., Farraye, F. A., Yang, S. & O'Brien, M. J. The clinical significance of serrated polyps. *Am. J. Gastroenterol.* **106**, 229–240; quiz 241 (2011).

96. Rex, D. K. *et al.* Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am. J. Gastroenterol.* **107**, 1315-1329, 1330 (2012).
97. Kim, K.-M. *et al.* Molecular features of colorectal hyperplastic polyps and sessile serrated adenoma/polyps from Korea. *Am. J. Surg. Pathol.* **35**, 1274–1286 (2011).
98. Snover, D. C., Jass, J. R., Fenoglio-Preiser, C. & Batts, K. P. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am. J. Clin. Pathol.* **124**, 380–391 (2005).
99. Goldstein, N. S. Small colonic microsatellite unstable adenocarcinomas and high-grade epithelial dysplasias in sessile serrated adenoma polypectomy specimens: a study of eight cases. *Am. J. Clin. Pathol.* **125**, 132–145 (2006).
100. Yachida, S., Mudali, S., Martin, S. A., Montgomery, E. A. & Iacobuzio-Donahue, C. A. Beta-catenin nuclear labeling is a common feature of sessile serrated adenomas and correlates with early neoplastic progression after BRAF activation. *Am. J. Surg. Pathol.* **33**, 1823–1832 (2009).
101. Torlakovic, E. E. *et al.* Sessile serrated adenoma (SSA) vs. traditional serrated adenoma (TSA). *Am. J. Surg. Pathol.* **32**, 21–29 (2008).
102. Bettington, M. L. *et al.* A clinicopathological and molecular analysis of 200 traditional serrated adenomas. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **28**, 414–427 (2015).
103. Bettington, M. L. & Chetty, R. Traditional serrated adenoma: an update. *Hum. Pathol.* **46**, 933–938 (2015).
104. Cunningham, J. M. *et al.* Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* **58**, 3455–3460 (1998).
105. Plazzer, J. P. *et al.* The InSiGHT database: utilizing 100 years of insights into Lynch syndrome. *Fam. Cancer* **12**, 175–180 (2013).
106. Tanaka, M. *et al.* Mismatch repair deficiency in Lynch syndrome-associated colorectal adenomas is more prevalent in older patients. *Histopathology* **69**, 322–328 (2016).
107. Loughrey, M. B. *et al.* Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Fam. Cancer* **6**, 301–310 (2007).

108. Akiyama, Y., Nagasaki, H., Yagi, K. O., Nomizu, T. & Yuasa, Y. Beta-catenin and adenomatous polyposis coli (APC) mutations in adenomas from hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Cancer Lett.* **157**, 185–191 (2000).
109. Pancione, M., Remo, A. & Colantuoni, V. Genetic and Epigenetic Events Generate Multiple Pathways in Colorectal Cancer Progression. *Pathol. Res. Int.* **2012**, (2012).
110. Natarajan, A. T. *et al.* Chromosomal localization of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by in situ hybridization. *Mutagenesis* **7**, 83–85 (1992).
111. Pegg, A. E. Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.* **50**, 6119–6129 (1990).
112. Gerson, S. L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 296–307 (2004).
113. Amatu, A. *et al.* Promoter CpG Island Hypermethylation of the DNA Repair Enzyme MGMT Predicts Clinical Response to Dacarbazine in a Phase II Study for Metastatic Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 2265–2272 (2013).
114. Esteller, M. & Herman, J. G. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* **23**, 1–8 (2004).
115. Inno, A. Role of MGMT as biomarker in colorectal cancer. *World J. Clin. Cases* **2**, 835 (2014).
116. Svrcek, M. *et al.* Methylation tolerance due to an O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Gut* **59**, 1516–1526 (2010).
117. Shen, L. *et al.* MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1330–1338 (2005).
118. Esteller, M. *et al.* Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* **60**, 2368–2371 (2000).
119. Esteller, M. *et al.* Promoter Hypermethylation of the DNA Repair Gene O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Is Associated with the Presence of G:C to A:T Transition Mutations in p53 in Human Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Res.* **61**, 4689–4692 (2001).

120. Von Hoff, D. D. *et al.* Pilot study using molecular profiling of patients' tumors to find potential targets and select treatments for their refractory cancers. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 4877–4883 (2010).
121. Shacham-Shmueli, E. *et al.* Response to temozolomide in patients with metastatic colorectal cancer with loss of MGMT expression: a new approach in the era of personalized medicine? *J. Clin. Oncol.* **29**, e262–e265 (2011).
122. Hochhauser, D. *et al.* A phase II study of temozolomide in patients with advanced aerodigestive tract and colorectal cancers and methylation of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 809–818 (2013).
123. Pietrantonio, F. *et al.* Activity of temozolomide in patients with advanced chemorefractory colorectal cancer and MGMT promoter methylation. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **25**, 404–408 (2014).
124. Ogino, S. *et al.* Review Article: The Role of Molecular Pathological Epidemiology in the Study of Neoplastic and Non-neoplastic Diseases in the Era of Precision Medicine. *Epidemiol. Camb. Mass* **27**, 602–611 (2016).
125. Ogino, S., Fuchs, C. S. & Giovannucci, E. How many molecular subtypes? Implications of the unique tumor principle in personalized medicine. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **12**, 621–628 (2012).
126. Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. & Botstein, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14863–14868 (1998).
127. *LOI n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique.* 2011-814 (2011).
128. Suraweera, N. *et al.* Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* **123**, 1804–1811 (2002).
129. Liu, C. L. *et al.* Software Tools for High-Throughput Analysis and Archiving of Immunohistochemistry Staining Data Obtained with Tissue Microarrays. *Am. J. Pathol.* **161**, 1557–1565 (2002).
130. Hirsch, D. *et al.* LGR5 positivity defines stem-like cells in colorectal cancer. *Carcinogenesis* **35**, 849–858 (2014).

131. Alexander, J. *et al.* Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am. J. Pathol.* **158**, 527–535 (2001).
132. Greenson, J. K. *et al.* Pathologic Predictors of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: *Am. J. Surg. Pathol.* **33**, 126–133 (2009).
133. Giovannucci, E. & Ogino, S. DNA Methylation, Field Effects, and Colorectal Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1317–1319 (2005).
134. Andrici, J. *et al.* Mismatch repair deficiency as a prognostic factor in mucinous colorectal cancer. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **29**, 266–274 (2016).
135. Laurent-Puig, P., Agostini, J. & Maley, K. Oncogènèse colorectale. *Bull. Cancer (Paris)* **97**, 1311–1321 (2010).
136. Rosty, C. *et al.* Colorectal carcinomas with KRAS mutation are associated with distinctive morphological and molecular features. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **26**, 825–834 (2013).
137. Oh, K., Redston, M. & Odze, R. D. Support for hMLH1 and MGMT silencing as a mechanism of tumorigenesis in the hyperplastic-adenoma-carcinoma (serrated) carcinogenic pathway in the colon. *Hum. Pathol.* **36**, 101–111 (2005).
138. Bettington, M. *et al.* Clinicopathological and molecular features of sessile serrated adenomas with dysplasia or carcinoma. *Gut* (2015). doi:10.1136/gutjnl-2015-310456
139. Murakami, T. *et al.* Distinct WNT/ β -catenin signaling activation in the serrated neoplasia pathway and the adenoma-carcinoma sequence of the colorectum. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **28**, 146–158 (2015).
140. Miyaki, M. *et al.* Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res.* **59**, 4506–4509 (1999).
141. Johnson, V. *et al.* Exon 3 beta-catenin mutations are specifically associated with colorectal carcinomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Gut* **54**, 264–267 (2005).
142. Tsai, J.-H. *et al.* Traditional serrated adenoma has two pathways of neoplastic progression that are distinct from the sessile serrated pathway of colorectal carcinogenesis. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **27**, 1375–1385 (2014).

143. Shima, K. *et al.* MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers. *Cancer Causes Control CCC* **22**, 301–309 (2011).
144. Halford, S., Rowan, A., Sawyer, E., Talbot, I. & Tomlinson, I. O6-methylguanine methyltransferase in colorectal cancers: detection of mutations, loss of expression, and weak association with G:C>A:T transitions. *Gut* **54**, 797–802 (2005).
145. Ogino, S. *et al.* Precision and Performance Characteristics of Bisulfite Conversion and Real-Time PCR (MethylLight) for Quantitative DNA Methylation Analysis. *J. Mol. Diagn. JMD* **8**, 209–217 (2006).
146. Nagasaka, T. *et al.* Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **22**, 4584–4594 (2004).
147. Ogino, S. *et al.* MGMT germline polymorphism is associated with somatic MGMT promoter methylation and gene silencing in colorectal cancer. *Carcinogenesis* **28**, 1985–1990 (2007).
148. Minoo, P. Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of MGMT. *Front. Oncol.* **3**, (2013).
149. Cutsem, E. V. *et al.* Cetuximab Plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: Updated Analysis of Overall Survival According to Tumor KRAS and BRAF Mutation Status. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2011–2019 (2011).
150. Douillard, J.-Y. *et al.* Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1023–1034 (2013).
151. Mercer, B. A. & D’Armiento, J. M. Emerging role of MAP kinase pathways as therapeutic targets in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **1**, 137–150 (2006).
152. Libre Pathology. Available at: <https://librepathology.org/>. (Accessed: 15th August 2016)
153. Kim, W., Kim, M. & Jho, E. Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem. J.* **450**, 9–21 (2013).
154. O’Brien, M. J., Zhao, Q. & Yang, S. Colorectal serrated pathway cancers and precursors. *Histopathology* **66**, 49–65 (2015).
155. Sørlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–10874 (2001).

Vu, le Président du Jury,
(tampon et signature)

Vu, le Directeur de Thèse,
(tampon et signature)

Vu, le Doyen de la Faculté,

(tampon et signature)

NOM : LIDDELL

PRENOM : Charles-Edward

Titre de Thèse : CARTOGRAPHIE DES DIFFÉRENTES ENTITÉS CLINICO-PATHOLOGIQUES D'ADÉNOCARCINOME MUCINEUX DU COLON : UNE ANALYSE DE REGROUPEMENT HIERARCHISÉ

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude était d'étudier l'hétérogénéité des voies moléculaires empruntées par les adénocarcinomes mucineux colorectaux. Cette étude est basée sur une analyse de regroupement hiérarchisé combinant des données clinico-pathologiques et moléculaires, incluant le statut MSS/MSI et MGMT, les mutations de *KRAS* et *BRAF* et l'activation de la voie de signalisation Wnt. L'analyse de regroupement hiérarchisé permet d'identifier plusieurs groupes clinico-pathologiques d'adénocarcinomes mucineux colorectaux présentant un intérêt épidémiologique, pronostique et thérapeutique. Cette étude suggère également que les mutations *BRAF* et *KRAS* sont toutes deux initiatrices de voies de cancérogenèse alternes dirigeant la progression de la plupart des adénocarcinomes mucineux.

MOTS-CLES

Adénocarcinome mucineux colorectal, analyse de regroupement hiérarchisé, hétérogénéité