

**UNIVERSITE DE NANTES**

---

**FACULTE DE MEDECINE**

---

Année : 2017

N° 151

**THESE**

pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

Spécialité Anatomie et cytologie pathologiques

par

Delphine DANSETTE

née le 21 avril 1988 à Paris (75)

---

Présentée et soutenue publiquement le mardi 03 octobre 2017

---

**ETUDE DES VARIATIONS DE L'EXPRESSION DE CDX2 DANS LES  
ADENOCARCINOMES MUCINEUX COLIQUES**

---

Président et Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Jean-François MOSNIER

# REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-François Mosnier,

Qui me fait l'honneur de présider ce jury et qui a accepté de diriger ce travail de thèse.

Je vous remercie pour votre confiance en me proposant celui-ci, pour votre disponibilité et pour vos précieux conseils tout au long de ce travail. Je vous remercie également pour la qualité de votre enseignement lors de mon internat. Je vous prie de trouver ici toute ma gratitude et mon profond respect.

A Madame le Professeur Céline Bossard,

Qui me fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Je te remercie pour ta disponibilité, ton savoir et tes précieux conseils. Je te prie de trouver ici toute ma gratitude et mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Stéphane Bézieau,

Qui me fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Je vous remercie de juger ce travail et de l'intérêt que vous lui porterez. Je vous remercie également pour votre accueil dans le service de génétique et de m'avoir permis d'y réaliser une partie de cette thèse.

A Monsieur le Professeur Jaafar Bennouna,

Qui me fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Veillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

## **A mes collègues,**

Merci à l'équipe du service d'anatomopathologie et cytologie pathologiques du CHU de Nantes. C'est un plaisir de travailler avec vous tous. Aux médecins, merci pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises pendant mon internat et pour votre enthousiasme. Aux secrétaires et techniciens, merci pour votre sympathie et vos conseils donnés pendant l'internat. Aux techniciens d'immunohistochimie et de FISH, Blandine, Emmanuel, Sylvie, Alexandra, Estelle, Christine P., Marie-Françoise, et Sandra, je souhaite vous remercier tout particulièrement pour votre gentillesse, votre compréhension, votre patience et pour le temps que vous avez consacré à ce travail de thèse et à mes travaux antérieurs.

Merci à mes co-internes d'anatomopathologie pour cet internat : Juliette, Charly, Clotilde, Faustine, Eva, Othman, Marie, Salim, Oli, Adeline et Cindy.

Aux équipes des services d'anatomopathologie de la Roche-sur-Yon et de Saint-Nazaire, je vous remercie sincèrement pour votre accueil, votre gentillesse et la qualité de votre enseignement. J'ai eu un immense plaisir à travailler avec vous. Merci tout particulièrement au Dr François Leclair, au Dr Pascale Guerzider, et au Dr Aude Colson-Rapin.

Merci à l'ensemble du service de génétique pour votre accueil. Merci tout particulièrement à Delphine, Fabrice, et Damien pour votre encadrement et votre aide pour ce travail de thèse.

## **A mes amis,**

Merci à vous tous, pour tous ces souvenirs partagés.

Merci tout particulièrement à David et Viviane pour toutes ces années d'amitiés.

A toutes mes amies et co-équipières de l'équipe de rugby féminin de Paris VI, Agathe, Audrey, Laure, Maguette, merci pour tous ces moments irremplaçables.

Merci à Mathilde et Arnaud, Thomas et Aurore, Paul et Coralie pour tous ces bons moments.

## **A ma famille**

A mes parents, mes sœurs et Julien, mes grands-parents et ma tante, merci pour vos encouragements et votre soutien.

**A Clément**, merci pour tout le bonheur que tu m'apportes chaque jour.

# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	8
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	10
CARACTERISATION DES ADENOCARCINOMES MUCINEUX .....	10
Généralités et définition.....	10
Caractérisation clinique .....	11
Caractérisation moléculaire et actualisation des données cliniques.....	11
Evolution des données pronostiques et thérapeutiques des adénocarcinomes mucineux.....	12
RENOUVELLEMENT DE LA MUQUEUSE COLIQUE NORMALE.....	16
Renouvellement de la muqueuse colique normale chez l'Homme .....	16
Voies de signalisation impliquées dans le destin cellulaire intestinal .....	17
i) La voie Notch .....	17
ii) La voie Wnt/bêta-caténine.....	18
iii) CDX2.....	19
iv) Interactions de CDX2 avec les autres voies de signalisation .....	22
IMPLICATIONS DE CDX2 EN PATHOLOGIE.....	24
Structure de CDX2 .....	24
CDX2 en pathologie inflammatoire.....	25
CDX2 en pathologie tumorale .....	26
i) CDX2 comme gène suppresseur de tumeur .....	26
ii) CDX2 comme oncogène .....	27
BUT DE L'ETUDE .....	29
PATIENTS ET METHODES .....	30
Patients .....	30
Etude anatomopathologique .....	30
Etude immunohistochimique .....	31
Statut de CDX2 .....	31
Statut mutationnel de BRAF et de KRAS .....	34
Statut d'instabilité microsatellitaire .....	35
Statut de MGMT .....	35
Statut de la bêta-caténine .....	36
Analyse statistique .....	36
Analyse par regroupement hiérarchisé.....	37

RESULTATS .....	38
Caractéristiques anatomo-cliniques des adénocarcinomes mucineux .....	38
Statut de CDX2 dans la muqueuse colique normale .....	41
Statut de CDX2 dans les adénocarcinomes mucineux.....	41
Statut de CDX2 et caractéristiques anatomocliniques.....	43
Statut de CDX2 et différenciation immunohistochimique des tumeurs .....	45
Statut de CDX2 et statut mutationnel de BRAF et KRAS .....	45
Statut de CDX2 et instabilité microsatellitaire.....	46
Statut de CDX2 et statut de méthylation de MGMT.....	48
Statut de CDX2 et activation de la voie Wnt.....	48
Analyse par regroupement hiérarchisé.....	50
DISCUSSION .....	53
BIBLIOGRAPHIE.....	60

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Renouveaulement de la muqueuse colique .....	16
Figure 2. Implication de la voie Notch dans le renouvellement de la muqueuse colique .....	18
Figure 3. Implication de la voie Wnt/bêta-caténine dans le renouvellement de la muqueuse colique .....	19
Figure 4. Représentation schématique des interactions entre les différentes voies de signalisation régulant la constitution et l'entretien de la muqueuse colique .....	22
Figure 5. Représentation schématique de la structure génomique et protéique de CDX2 .....	24
Figure 6. Représentation schématique du rôle de CDX2 dans la réponse inflammatoire médiée par le TNFalpha .....	25
Figure 7. Hybridation in situ en Fluorescence du gène CDX2 .....	34
Figure 8. Types architecturaux des adénocarcinomes mucineux colorectaux .....	39
Figure 9. Réaction immunitaire anti-tumorale .....	39
Figure 10. Expression de CDX2 dans la muqueuse colique normale .....	41
Figure 11. Statut de CDX2 dans les adénocarcinomes mucineux .....	42
Figure 12. Profil immunophénotypique d'un adénocarcinome mucineux avec gain de CDX2 .....	47
Figure 13. Profil immunophénotypique d'un des trois adénocarcinomes mucineux avec perte de l'expression de CDX2 .....	47
Figure 14. Analyse par regroupement hiérarchisé des 60 adénocarcinomes mucineux du côlon .....	51

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Anticorps primaires utilisés pour l'étude immunohistochimique .....	31
Tableau II. Caractéristiques anatomocliniques des 60 adénocarcinomes mucineux	40
Tableau III. Caractéristiques anatomocliniques des adénocarcinomes mucineux en fonction du statut de CDX2 en FISH .....	44
Tableau IV. Caractéristiques moléculaires des adénocarcinomes mucineux en fonction du statut de CDX2 en FISH .....	49

# LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
CDX2	: Caudal-type homeobox 2
CIMP	: Phénotype méthylateur des îlots CpG
CTNNB1	: Catenin Beta 1
FISH	: Hybridation in situ en fluorescence
HNPCC	: (Syndrome de) Cancer colorectal héréditaire sans polypose
KRAS	: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MGMT	: Méthylguanine méthyltransférase
MLH1	: MutL Homolog 1
MSH2	: MutS Homolog 2
MSH6	: MutS Homolog 6
MSI	: Instable pour les microsatellites
MSS	: Stable pour les microsatellites
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PCR	: Réaction en chaîne par polymérase
PMS2	: PMS1 Homolog 2
SAI	: (Adénocarcinome) sans autre indication
UICC	: Union Internationale contre le Cancer

# INTRODUCTION

Les adénocarcinome mucineux constituent un sous-type histologique relativement fréquent représentant 5 à 15 % des cancers colorectaux, définis selon la classification de l'OMS 2010 par la présence de plus de 50 % de mucus extracellulaire [1]. Depuis sa description en 1923 par Perham, ce type histologique particulier de cancer du côlon est considéré comme une entité distincte et l'évolution des techniques a permis de mieux appréhender ses caractéristiques clinico-pathologiques et moléculaires. Les adénocarcinomes mucineux ont été considérés comme un groupe de tumeurs assez homogène, caractérisés par des tumeurs apparaissant chez la femme, de siège proximal, et de phénotype MSI. Néanmoins, notre équipe a récemment observé que ce groupe de tumeurs présentait en fait une grande hétérogénéité génétique. Ces tumeurs sont également caractérisées par une évolution métastatique péritonéale singulière et une moins bonne réponse aux chimiothérapies. Cette résistance pourrait s'expliquer par des anomalies génétiques spécifiques et par l'abondance de mucus propre à ces tumeurs, constituant une barrière physique aux drogues administrées.

L'émergence du cancer colorectal est considérée comme étant due à des anomalies de la différenciation, de la prolifération et de la mort cellulaire. CDX2 est un gène essentiel à la détermination de la différenciation intestinale tout au long de la vie adulte [2], permettant l'acquisition du phénotype mature des cellules épithéliales coliques. Il participe à l'acquisition du phénotype sécrétoire des cellules caliciformes responsables de la synthèse de mucus. La dysrégulation de la synthèse des mucines observée dans les adénocarcinomes mucineux pourrait donc être en partie influée par les anomalies du gène CDX2. Le rôle de CDX2 dans l'oncogénèse colique est connu. La plupart des études défendent son rôle de gène suppresseur de tumeur car son expression est perdue dans certains cancers colorectaux [3–7]. Il a été suggéré plus récemment que CDX2 agirait comme un oncogène de « survie de lignage » dans les cancers colorectaux, par un mécanisme d'amplification ou de gain du bras long du chromosome 13 [8]. De plus, il existe d'importantes interactions entre le gène CDX2 et la voie de signalisation Wnt, dont la régulation est considérée comme le phénomène initiateur de la plupart des cancers du côlon.



Compte-tenu des liens entre le gène CDX2 et la différenciation intestinale, en particulier la composante sécrétoire de la crypte intestinale, l'objectif de notre étude était de décrypter les anomalies de CDX2 présentes dans les adénocarcinomes mucineux colorectaux et d'estimer leur fréquence. Nous avons également établi les corrélats existants entre ces anomalies et le fond génétique des adénocarcinomes mucineux.

# RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

## CARACTERISATION DES ADENOCARCINOMES MUCINEUX

### Généralités et définition

Les cancers colorectaux représentent le troisième cancer le plus fréquent en France, avec 42 150 nouveaux cas par an tous sexes confondus. Leur taux de mortalité est élevé estimé à environ 18000 décès par an, représentant la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'homme et la troisième cause de mortalité par cancer chez la femme [9].

Les cancers colorectaux correspondent dans plus de 90% des cas à des adénocarcinomes, résultant de la dégénérescence de l'épithélium glandulaire intestinal. Ces adénocarcinomes sont constitués à plus de 85% d'adénocarcinomes sans autre indication (SAI) [1].

Parmi les autres sous-types histologiques, les adénocarcinomes mucineux correspondent au deuxième variant le plus fréquent après les adénocarcinomes SAI, et leur fréquence est estimée entre 5 et 15% des cancers colorectaux. Ces adénocarcinomes mucineux sont définis sur le plan histologique par la présence d'un contingent mucineux occupant plus de 50% de la surface tumorale. Celui-ci se caractérise par des plages de mucine extracellulaire contenant des structures acineuses ou des amas de cellules tumorales, ou encore des cellules tumorales isolées pouvant être de type en bague à chaton [1]. Les cellules tumorales de type en bague à chaton sont reconnaissables par la présence d'une large vacuole de mucine intracellulaire refoulant le noyau contre la membrane cytoplasmique. Elles sont présentes au sein des flaques de mucus des adénocarcinomes mucineux ou forment de larges nappes cellulaires pauvres en mucus « linite-like ».

## **Caractérisation clinique**

Historiquement, la caractérisation clinique des adénocarcinomes mucineux a été réalisée en comparant leurs caractéristiques à celles des adénocarcinomes non mucineux. L'identification des adénocarcinomes mucineux était uniquement basée sur des critères histopathologiques [10,11]. Ces tumeurs étaient fréquemment observées au niveau du côlon proximal, et chez la femme. Les adénocarcinomes mucineux colorectaux étaient souvent diagnostiqués à un stade de progression tumorale avancé comparé aux adénocarcinomes SAI, et étaient associés à un moins bon pronostic [10–14]. Certains auteurs ont également rapporté une fréquence plus importante de ce sous-type chez des patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin, comme la maladie de Crohn ou la recto-colite hémorragique, ou chez des patients avec des antécédents de radiothérapie pelvienne ou abdominale. Cependant, la relation de cause à effet est mal comprise [10,15].

## **Caractérisation moléculaire et actualisation des données cliniques**

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de reconsidérer ces tumeurs selon leurs caractéristiques moléculaires. Les adénocarcinomes mucineux ont été ainsi considérés comme un groupe de tumeurs assez homogène, caractérisé par une forte proportion de tumeurs instables pour les microsatellites (17 à 41.8%).

Il a été observé également que les voies de signalisation telles que les voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT étaient plus souvent mutées dans ce sous-type d'adénocarcinome colorectal [16].

Plus récemment, les études ont montré que les adénocarcinomes mucineux étaient des tumeurs tout aussi hétérogènes sur le plan moléculaire que les autres adénocarcinomes colorectaux. Dans une étude récente, notre équipe a pu montrer que les adénocarcinomes mucineux pouvaient être regroupés dans plusieurs groupes moléculaires issus de voies de carcinogénèse différentes [17]. L'approche analytique par clustering hiérarchisé a permis de mettre en évidence quatre sous-groupes : (i) les adénocarcinomes mutés pour le gène BRAF (MSS ou MSI), (ii) les

adénocarcinomes mucineux MSI « nuls » (c'est-à-dire sans mutation de BRAF et KRAS), (iii) les adénocarcinomes MSS « nuls », et (iv) les adénocarcinomes mucineux mutés pour le gène KRAS. Les adénocarcinomes mucineux mutés pour le gène BRAF étaient observés chez des patients plus âgés, essentiellement des femmes, au niveau du côlon droit. Ce sous-groupe de tumeurs était également caractérisé par une forte proportion de tumeurs hyperméthylées pour le gène MLH1 ou pour le gène MGMT, et par des taux d'activation bas de la voie Wnt/bêta-caténine au sein du tissu tumoral. Enfin, ce sous-groupe présentait une moins bonne survie, justifiant son identification. Les adénocarcinomes MSI « nuls » étaient observés chez des patients plus jeunes, parfois dans un contexte de syndrome de Lynch prouvé ou suspecté. Ces tumeurs étaient caractérisées par des taux d'activation plus élevés de la voie Wnt/bêta-caténine. Le troisième sous-groupe MSS « nul » et le quatrième sous-groupe « muté pour le gène KRAS » partageaient de nombreuses particularités clinico-pathologiques, et se distinguaient uniquement entre eux par la présence d'une mutation du gène KRAS. Ces tumeurs étaient plus fréquemment observées chez des hommes, au niveau du côlon gauche.

### **Evolution des données pronostiques et thérapeutiques des adénocarcinomes mucineux**

Bien que les carcinomes colorectaux soient classés en fonction de l'histologie (classification de l'OMS), cette classification n'est pas prise en compte actuellement dans la stratégie de prise en charge thérapeutique des cancers colorectaux. Les stratégies thérapeutiques habituelles reposent sur des critères cliniques et moléculaires caractérisés par la localisation rectale ou colique de l'adénocarcinome, le stade de progression tumorale et la détermination du statut microsatellitaire et de la présence d'une mutation des gènes RAS [18–20].

Les études tentent actuellement d'identifier les facteurs pronostiques et prédictifs qui pourraient améliorer la prise en charge spécifique des patients atteints d'adénocarcinomes mucineux. La faible fréquence (10-15%) de ce sous-type histologique par rapport aux adénocarcinomes SAI limite cependant la portée des investigations, et les implications pronostiques et thérapeutiques des adénocarcinomes mucineux restent mal comprises. En effet, les essais contrôlés

randomisés en cours utilisent des populations de patients atteints d'adénocarcinomes colorectaux non sélectionnés, et dont les résultats ne sont pas forcément extrapolables aux patients atteints d'adénocarcinomes mucineux. Les principaux résultats découlent de petites séries de patients atteints d'adénocarcinomes mucineux et sont généralisés à l'ensemble de la population de ces patients. De plus, la portée des résultats de certaines études est limitée en raison de l'absence de distinction entre les adénocarcinomes de localisation colique et ceux de localisation rectale ne bénéficiant pas de la même chirurgie [21].

Une revue récente de la littérature [22] réalisée en 2016 par Hugen, réalise la synthèse actuelle des implications pronostiques et prédictives connues des adénocarcinomes mucineux colorectaux.

**Dans la prise en charge des tumeurs non avancées localement**, deux études indépendantes [12,23] ont démontré que chez les patients atteints de cancer de siège colique, le sous-type mucineux n'était pas un facteur pronostique négatif comparé aux adénocarcinomes SAI. Dans une autre étude, les chercheurs ont observé une meilleure survie globale chez les patients atteints d'adénocarcinomes mucineux comparativement à ceux atteints d'adénocarcinomes SAI et moins de récurrences systémiques [24].

Concernant le traitement des tumeurs de siège rectal, les progrès considérables depuis ces trente dernières années ont permis d'améliorer la survie des patients. Les adénocarcinomes mucineux rectaux considérés initialement comme de moins bon pronostic, semblent actuellement présenter des taux de survie similaires à ceux des adénocarcinomes SAI rectaux, comme le montre une étude récente de Hugen basée sur les données de 1989 à 2007 du Registre du Cancer Néerlandais [25]. Ces améliorations sont notamment dues à l'introduction de la radiothérapie ou de la radiochimiothérapie néoadjuvante, ainsi qu'à l'amélioration de la qualité de résection chirurgicale, limitant la probabilité de récurrence loco-régionale. L'amélioration de cette dernière est due aux progrès des techniques chirurgicales, comme la résection en monobloc du mésorectum limitant la rupture de la masse tumorale mucineuse dans la cavité abdominale ; et aux progrès techniques d'imagerie, comme l'IRM pelvienne précisant mieux la taille et l'extension tumorale

loco-régionale. En effet, les adénocarcinomes mucineux sont généralement diagnostiqués à un stade T supérieur à celui des adénocarcinomes SAI rectaux, et sont donc d'exérèse complète plus difficile. Les adénocarcinomes mucineux présentent ainsi une incidence plus élevée de l'envahissement des marges de résection circonférentielles (MRC), considéré comme un important facteur pronostique péjoratif [26]. L'amélioration des techniques radiologiques et chirurgicales a ainsi abaissé le nombre de résections avec MRC positives et amélioré les résultats de survie des patients atteints d'adénocarcinomes mucineux par rapport à ceux des patients atteints d'adénocarcinomes SAI.

**Les adénocarcinomes mucineux métastatiques au bilan d'extension initial** semblent de moins bon pronostic que les adénocarcinomes SAI métastatiques. Les patients atteints d'adénocarcinomes mucineux ont plus fréquemment des métastases sur plus d'un site, et la distribution des métastases est souvent différente de celle des patients atteints d'adénocarcinomes SAI. Les métastases des adénocarcinomes mucineux sont plus souvent extra-hépatiques, de localisation ganglionnaire (à distance) ou péritonéale tandis que celles des adénocarcinomes SAI sont principalement de siège hépatique [27–29]. La présence de métastases extra-hépatiques, en particulier dans le péritoine, est associée à un pronostic très péjoratif [30,31]. Plusieurs études, dont deux essais randomisés sur des patients atteints de cancer colorectal métastatique, ont démontré que le sous-type mucineux, était un facteur de mauvais pronostic : la médiane des taux de survie globale variait entre 11,8 et 14,0 mois chez les patients atteints d'adénocarcinomes mucineux métastatiques, comparativement à 17,9-23,4 mois pour ceux atteints d'adénocarcinomes SAI métastatiques [28,29,32]. En outre, le phénotype mucineux est également un facteur pronostique défavorable chez les patients atteints de cancer colorectal qui ont bénéficié d'une résection des métastases hépatiques [33,34]. Dans ces études, les patients atteints de métastases mucineuses ont eu une réponse plus faible à la chimiothérapie préopératoire et une moins bonne survie sans progression et globale [33,34]. D'autres études montrent qu'après traitement néoadjuvant, une réponse histologique complète (correspondant à l'absence de

cellules tumorales viables résiduelles) est rarement observée chez les patients atteints d'adénocarcinomes mucineux [25,35,36].

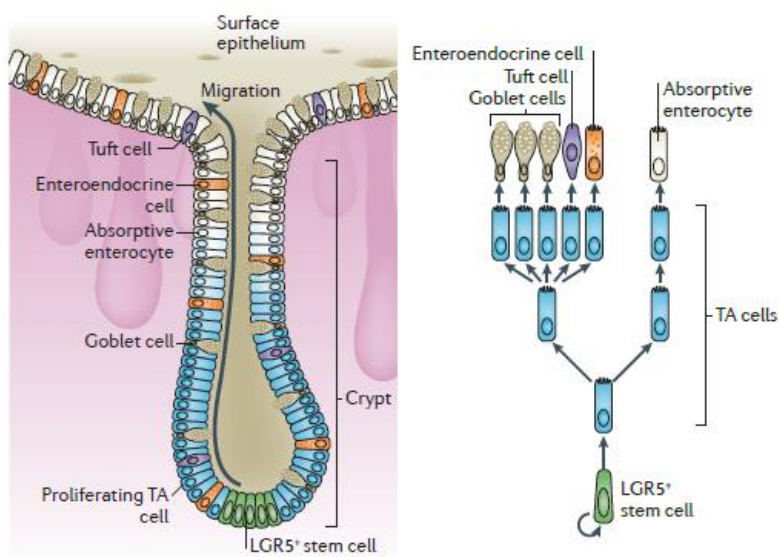
Les adénocarcinomes mucineux colorectaux semblent donc relativement résistants aux traitements par chimiothérapie et radiothérapie par rapport aux adénocarcinomes SAI. Cette résistance au traitement pourrait être expliquée par différents mécanismes. Un de ces mécanisme pourrait être en lien avec des signatures moléculaires spécifiques des adénocarcinomes mucineux. La mutation du gène KRAS, plus fréquemment observée dans les adénocarcinomes mucineux que dans les adénocarcinomes SAI, est considérée comme un biomarqueur de réponse incomplète au traitement chez les patients atteints de cancer rectal. Les patients atteints de cancers rectaux KRAS-mutants sont donc moins susceptibles de développer une réponse histologique complète après traitement par 5-FU que ceux atteints de tumeurs KRAS-sauvages [37]. La résistance au traitement pourrait également s'expliquer par les propriétés physiques particulières des tumeurs liées à la présence de mucus. Le mucus agirait comme une barrière physique naturelle protégeant les cellules tumorales de la réponse immunitaire anti-tumorale et des différentes thérapeutiques administrées. De plus, la présence de mucus induirait des profils de propagation tumorale, de cellularité tumorale et de néo-vascularisation tumorale particuliers. Une micro-vascularisation mal développée en raison du grand volume de mucus englobant la tumeur et des forces de compression induites sur le système vasculaire pénétrant, pourrait réduire la délivrance de la chimiothérapie [38,39].

Finalement, la résistance au traitement des adénocarcinomes mucineux peut s'expliquer par l'abondance de mucus synthétisé par ces tumeurs. Cette synthèse de mucus est l'une des caractéristiques principales de ces tumeurs qui les distingue des adénocarcinomes SAI. Celle-ci se traduit par la persistance d'une composante de cellules caliciformes sécrétoires au sein de ces tumeurs, qui prédomine sur les autres composantes cellulaires proliférantes ou entérocytaires. Cette composante sécrétoire reproduit le phénotype mucosécrétant des cryptes coliques. La deuxième partie de cet exposé permettra de faire un rappel sur la constitution de la crypte colique normale et sur les voies de signalisation qui la régulent.

## RENOUVELLEMENT DE LA MUQUEUSE COLIQUE NORMALE

### Renouvellement de la muqueuse colique normale chez l'Homme

La muqueuse intestinale est caractérisée par la capacité de renouvellement rapide de son épithélium. Celui-ci se renouvelle complètement en 4 à 8 jours. Ce mécanisme est assuré par la présence d'une petite population de cellules souches (progénitrices) localisées dans une « niche » à la base des cryptes. Ces cellules souches sont des cellules multipotentes, à division lente, capables de s'auto-renouveler et de générer par division asymétrique des cellules filles progénitrices multipotentes : les cellules progénitrices d'amplification du transit, situées au niveau des deux-tiers inférieurs de la crypte. Ces cellules d'amplification du transit prolifèrent rapidement et se divisent en cellules filles. Les cellules progénitrices se différencient et acquièrent un phénotype entérocytaire (absorbant) ou un phénotype sécrétoire incluant les cellules caliciformes mucosécrétantes, les cellules de Paneth et les cellules entérochromaffines. Ces cellules filles ainsi engagées dans le processus de différenciation, migrent le long de la crypte colique vers l'ostium de la crypte en 4-8 jours. A ce niveau, elles subissent un processus de mort cellulaire par apoptose et sont éliminées dans la lumière digestive (figure 1). Dans l'intestin grêle, les cellules de Paneth migrent vers le fond des cryptes où elles résident pendant une durée d'environ 28 jours [40].



**Figure 1. Renouvellement de la muqueuse colique.** D'après Barker, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014 (4).

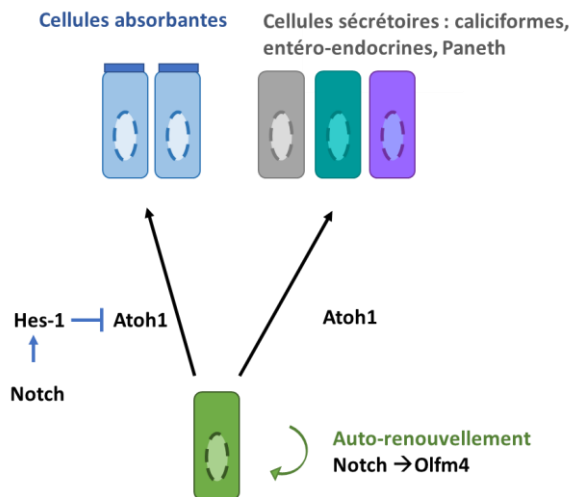


## Voies de signalisation impliquées dans le destin cellulaire intestinal

Le renouvellement et l'organisation de l'épithélium intestinal adulte fait intervenir trois voies de signalisation complémentaires : la voie Wnt/bêta-caténine, la voie Notch impliquant les facteurs de transcription ATOH1 et Hes1, et les gènes homéotiques CDX1 et CDX2. Ces voies permettent de conserver le pool de cellules souches tout en engageant les cellules épithéliales des cryptes intestinales dans le processus de différenciation. Des études ont identifié dans des modèles murins adultes les gènes clés du destin des cellules épithéliales intestinales adultes. Les mécanismes de régulation transcriptionnelle et leur hiérarchie restent toutefois peu connus.

### i) La voie Notch

La voie Notch joue un rôle majeur dans la régulation de la prolifération et le destin des cellules progénitrices de l'intestin. Dans les cellules progénitrices de la base des cryptes, la signalisation de Notch est essentielle à la prolifération et à la survie des cellules souches grâce à l'activation du facteur de transcription Olfm4 [41]. De plus, Notch peut cibler des populations de cellules progénitrices particulières pour réguler un destin ultérieur. Le facteur de transcription Hes1 (hairy and enhancer of split 1), est un des effecteurs de la voie Notch, essentiel à la différenciation des entérocytes. Hes1 réprime transcriptionnellement ATOH1 (Atonal Homolog 1), également appelé Math1 chez la souris ou HATH1 chez l'Homme, qui est un facteur de transcription essentiel à l'acquisition du phénotype sécrétoire des cellules en voie de différenciation. L'activation de la voie de signalisation Notch oriente la différenciation des cellules progénitrices vers le lignage entérocytaire plutôt que caliciforme [41–43] (figure 2). De façon schématique, l'hyperactivation de la voie Notch induit une diminution de l'expression de ATOH1, l'expansion de la zone de prolifération cellulaire et une augmentation du nombre de cellules entérocytaires. L'inhibition de la voie Notch induit à l'inverse l'augmentation de l'expression de ATOH1, la perte de la capacité de prolifération cellulaire et l'apparition d'une hyperplasie des cellules caliciformes. ATOH 1 active la transcription des gènes des mucines tels que MUC2 et MUC5AC [44–46].



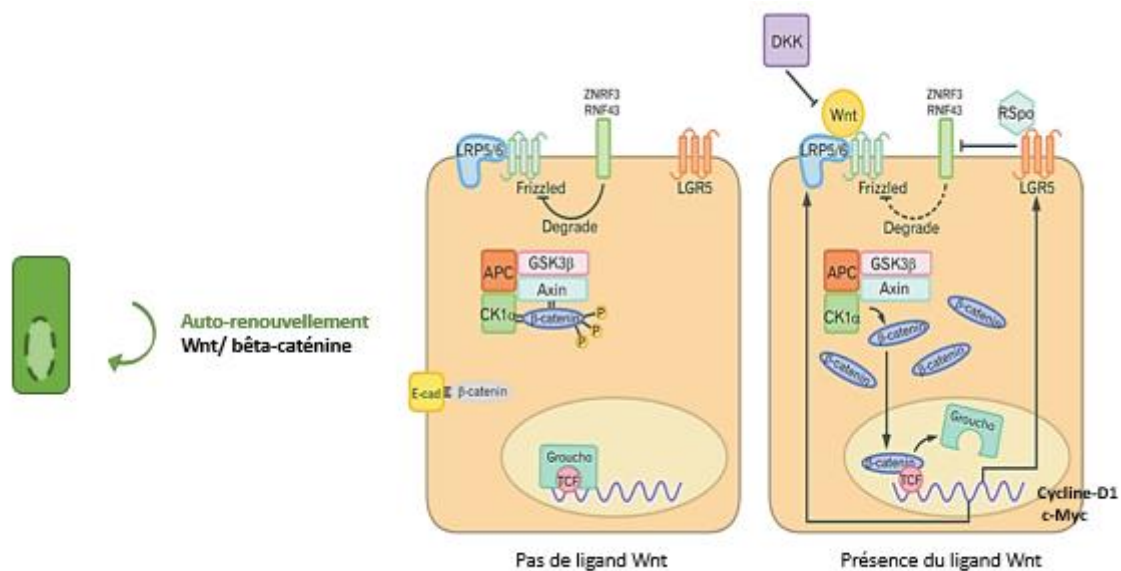
**Figure 2. Implication de la voie Notch dans le renouvellement de la muqueuse colique.**

## ii) La voie Wnt/bêta-caténine

Dans l'intestin, la voie de signalisation Wnt est impliquée dans la régulation de la balance prolifération / différenciation [47]. Son activité est maximale au sein des cryptes intestinales où elle permet le maintien de la capacité de prolifération des cellules progénitrices. Son activité décroît vers la lumière intestinale ce qui induit la perte de capacité de prolifération et la différenciation des cellules.

L'activation de la voie Wnt canonique est induite par la liaison d'une molécule Wnt sécrétée à son récepteur cible Frizzled ce qui provoque la stabilisation et la translocation de la bêta-caténine dans le noyau. L'interaction de la bêta-caténine avec les facteurs de transcription TCF / LEF entraîne la transcription de gènes cibles comme c-MYC ou la cycline D1 (figure 3). Le gène c-MYC, en bloquant la transcription de la protéine p21, inhibe la différenciation cellulaire et maintient le pool des cellules progénitrices intestinales [47,48]. Ainsi, dans des modèles murins de souris nuls pour TCF4, aucune prolifération n'est détectée et toutes les cellules épithéliales apparaissent différenciées [49]. La voie Wnt régule également l'expression des molécules de surface comme les ephrines et leurs récepteurs EPHB, responsables du positionnement ordonné des cellules épithéliales le long de l'axe crypte-villosité [50]. La voie Wnt joue également un rôle indirect dans la différenciation terminale des cellules épithéliales. La bêta-caténine peut activer des gènes cibles communs à la voie Notch comme le gène Hes1, répresseur de ATOH1 [51]. Le blocage de la voie Wnt par un inhibiteur Dickkopf1 entraîne l'absence de

différenciation de la lignée cellulaire sécrétoire de l'épithélium, sans affecter la différenciation de la lignée des cellules absorbantes [48]. De même, la voie Wnt interagit avec la voie Notch pour contrôler la détermination du destin cellulaire dans l'épithélium intestinal, notamment par la régulation de l'expression d'ATOH1. La GSK3- $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3) peut phosphoryler ATOH1 et induire sa dégradation par le protéasome [42]. Cette dégradation ciblée semble être en équilibre avec la dégradation de la  $\beta$ -caténine. Lorsque la voie Wnt est inactive, la  $\beta$ -caténine est phosphorylée par GSK3- $\beta$  et rentre dans la constitution du complexe de dégradation  $\beta$ -caténine/Axin/APC/GSK3- $\beta$ . ATOH1 échappe alors à la phosphorylation de GSK3- $\beta$  et n'est pas dégradé. Si la voie Wnt est stimulée, la  $\beta$ -caténine échappe à la phosphorylation et à la dégradation, alors qu'ATOH1 est phosphorylé par la GSK3- $\beta$ .



**Figure 3. Implication de la voie Wnt/bêta-caténine dans le renouvellement de la muqueuse colique. D'après Ratanasirintraooot, J Neurogastroenterol Motil, 2016.**

### iii) CDX2

Les gènes homéotiques CDX1 et CDX2 (caudal-related homeobox 1 et 2) codent des facteurs de transcription indispensables au développement embryonnaire de l'intestin et à la différenciation intestinale tout au long de la vie adulte [2].

A la phase précoce du développement embryonnaire (gastrulation), l'expression de CDX2 est observée dans le tropho-ectoderme où elle réprime l'expression de Oct4 et Nanog. Son expression contribue à former l'axe antéro-postérieur de l'embryon. L'expression de CDX2 est ensuite restreinte à l'endoderme intestinal, où elle se maintient jusqu'au stade adulte. Elle initie et maintient l'expression d'un groupe de facteurs de transcription pro-intestinaux, incluant CDX1 et HNF4 $\alpha$ , qui ensemble activent le transcriptome intestinal [52]. Pendant l'embryogenèse, le gène CDX2 est activé par la co-action de SMAD1, protéine sous le contrôle du facteur de croissance BMP (Bone morphogenetic protein), et de la bêta-caténine sous le contrôle de la voie Wnt [53]. Le rôle clé de CDX2 dans le développement embryonnaire est mis en évidence par les techniques de knock-out dans des modèles murins. A la phase précoce, l'inactivation constitutive de CDX2 dans des modèles murins est létale. L'inactivation ciblée de CDX2 dans l'endoderme intestinal transforme celui-ci en endoderme de type œsophagien ou gastrique [54]. A l'inverse, l'inactivation de CDX1 pendant l'embryogenèse n'est pas létale, mais il n'est pas observé de phénotype intestinal au sein des embryons [2]. CDX2 est également impliqué dans l'embryogenèse d'autres organes tels que la mise en place du squelette axial, de l'axe neural, des structures uro-rectales caudales [55], et du système hématopoïétique [56].

Chez l'adulte, l'expression de CDX1 est observée dans les cellules épithéliales intestinales de l'ensemble de l'intestin, avec une expression maximale dans le côlon distal. Au sein de l'axe crypte/villosité, un gradient d'expression est observé, diminuant de la crypte vers la surface [2]. Son rôle physiologique et notamment les cibles transcriptionnelles de CDX1 sont mal connues. Pour certains auteurs, CDX1 joue un rôle mineur et partiellement redondant avec CDX2 [57]. D'autres auteurs suggèrent que CDX1 aurait des cibles transcriptionnelles spécifiques comme la cytokératine 20, protéine du cytosquelette des cellules épithéliales intestinales, ou comme l'interleukine-18 et DPP4, molécules impliquées dans l'activation des lymphocytes T [58].

L'expression de CDX2 est observée dans l'ensemble de l'intestin, avec une intensité maximale au niveau du côlon proximal. Son expression dans les cellules épithéliales intestinales est homogène le long de l'axe crypte-villosité [2]. Le rôle de CDX2 dans l'épithélium intestinal adulte est complexe : il fournit aux cellules souches

les informations nécessaires pour maintenir leur identité intestinale, il participe à l'organisation cellulaire de la niche et au renouvellement cellulaire, et il contrôle la différenciation des cellules souches puis progénitrices en cellules épithéliales intestinales matures [59,60]. CDX2 régule ainsi de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'adhésion cellulaire, et l'activation transcriptionnelle de gènes cibles spécifiques d'organe.

CDX2 bloque la prolifération cellulaire en agissant sur des protéines inhibitrices des complexes cyclines/CDK (cyclin-dependent kinase) ce qui provoque l'arrêt de la progression des cellules en phase G1. Il active directement la transcription de la protéine p21 et agit également de façon non-transcriptionnelle en stabilisant la protéine p27 bloquant ainsi sa dégradation par le protéasome [61,62]. La protéine CDX2 peut interagir directement avec la protéine bêta-caténine, empêchant ainsi sa liaison avec Tcf4 et donc l'activation des gènes cibles de voie Wnt/bêta-caténine impliquée dans la prolifération cellulaire [63]. De même, CDX2 peut se lier à la protéine NF- $\kappa$ B, empêchant alors sa liaison et la transcription des gènes cibles [64].

Une étude réalisée par CHIP révèle que CDX2 interagirait de façon dynamique avec près de 17000 sites de liaison sur la chromatine sur l'ensemble du génome, 700 sites seraient spécifiques des cellules de type prolifératives et 14000 seraient en lien avec les cellules différenciées. Par ces mécanismes, CDX2 est un élément clé de l'acquisition du phénotype épithélial intestinal mature [59,65]. CDX2 régule l'activité de nombreux promoteurs de gènes impliqués dans des fonctions intestinales variées comme les enzymes ou les transporteurs (lactase, héphaestine), les mucines (MUC2 et MUC4), les molécules du cytosquelette (claudine-2, cadhérine-17, Mucdhl codant une proto-cadhérine régulatrice de la voie Wnt/bêta-caténine), les récepteurs et les molécules de signalisation, ou encore les peptides régulateurs (pro-glucagon) [59]. Par ce biais, CDX2 joue un rôle central dans l'acquisition du phénotype absorbant et sécrétoire des cellules épithéliales intestinales. L'activité transcriptionnelle de CDX2 est régulée par la co-occupation des régions cis-régulatrices des gènes cibles avec d'autres facteurs de transcription tels que GATA6, TCF4, et HNF4A. Dans les cellules différenciées, CDX2 se lierait à des sites chromatiniens richement co-occupés par des enhanceurs comme HNF4a, tandis que dans les cellules proliférantes, les sites seraient co-occupés par des molécules comme GATA6 ou TCF4 [59,65].

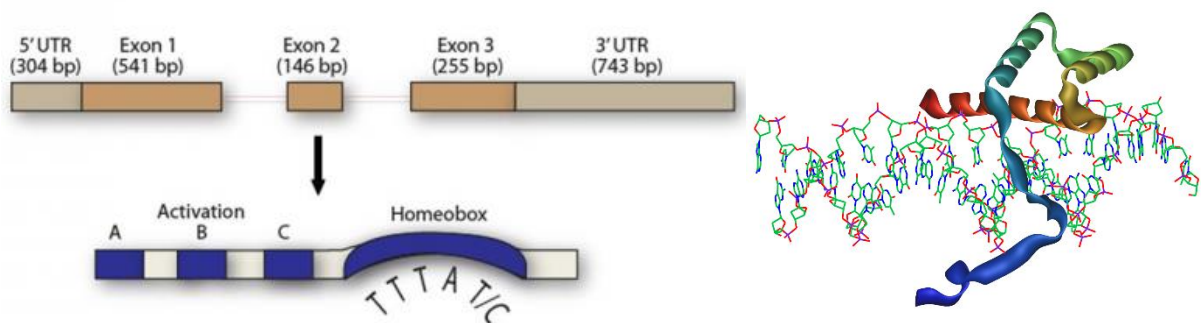


Finalement, CDX2 est un élément clé de l'identité intestinale pendant la vie embryonnaire et tout au long de la vie adulte. En tant que facteur de transcription, il interagit à de multiples niveaux avec les voies de signalisation Notch et Wnt pour permettre aux cellules souches d'acquérir l'information d'identité intestinale et de s'engager dans un processus de différenciation. Du fait de son importance au sein de la muqueuse colique, la suite de l'exposé s'intéressera à son implication en pathologie inflammatoire et tumorale.

## IMPLICATIONS DE CDX2 EN PATHOLOGIE

### Structure de CDX2

Le gène CDX2 (caudal-related homeobox 2) est localisé sur le chromosome 13q12.2. Il se compose de trois exons. Il code un facteur de transcription de 313 acides aminés composée de trois domaines à la partie amino-terminale : le domaine A composé d'une séquence de translocation nucléaire, le domaine B composé du domaine d'activation transcriptionnelle de la protéine, et le domaine C sans fonction particulière connue. L'activité transcriptionnelle de la protéine CDX2 est régulée par la présence de plusieurs sites de phosphorylation : la sérine 60 sous le contrôle des MAPKinases [69], ou encore la sérine 281 à la partie C-terminale dont la phosphorylation induit sa dégradation par le protéasome [70]. Le domaine de liaison à l'ADN de type homeobox se situe à la partie carboxy-terminale, et se lie comme un monomère ou un dimère aux séquences d'ADN TTTAT/C dans les régions enhancers ou promotrices de gènes pour initier ou réprimer la transcription génique (figure 5).



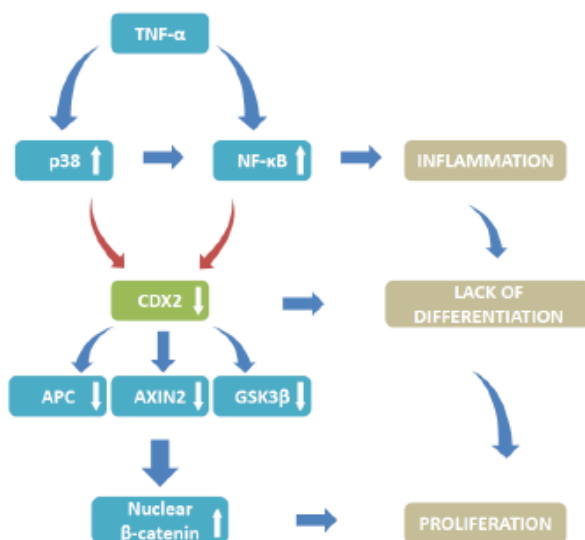
**Figure 5. Représentation schématique de la structure génomique et protéique de CDX2.** Gène composé de trois exons et de deux introns. Protéine composée de trois domaines à la partie N-terminale et d'un homéodomaine à la partie C-terminale. D'après Witek ME, Park J, Waldman SA: CDX2. In Yusuf D et al.: *The Transcription Factor Encyclopedia*, Genome Biology 2012, 13:R24.



## CDX2 en pathologie inflammatoire

Le rôle de CDX2 dans les pathologies inflammatoires de l'intestin est mal connu. L'expression de CDX2 est diminuée dans les cellules épithéliales intestinales de biopsies de patients atteints de recto-colite hémorragique active. L'un des mécanismes proposés est la régulation négative de CDX2 par le TNFalpha, cytokine pro-inflammatoire. Cette régulation est liée à l'action directe de la MAPkinase p38 et de NF-kB (dont les voies de signalisation sont activées par le TNFalpha) et par la réduction de la liaison de CDX2 aux régions régulatrices des gènes cibles [71]. Certains de ces gènes cibles comme MEP1A, MUC2, HNF4alpha sont impliqués dans le développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [71–73].

Une étude par ChiP a montré également que CDX2 interagit avec les régions régulatrices des gènes du complexe de dégradation de la bêta-caténine (APC, AXIN2 et GSK3beta). La diminution de l'activité transcriptionnelle de CDX2, via un mécanisme dépendant du TNFalpha, induit une diminution de l'expression de APC, AXIN2 et GSK3beta, et donc une activation de la voie Wnt/bêta-caténine dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [71] (figure 6).



**Figure 6. Représentation schématique du rôle de CDX2 dans la réponse inflammatoire médiée par le TNFalpha. D'après Coskun et al [71].**

## **CDX2 en pathologie tumorale**

En tant que facteur de transcription nucléaire, l'expression de CDX2 dans la muqueuse colique normale est observée dans les noyaux des cellules épithéliales intestinales. Son expression est conservée dans la quasi-totalité des adénomes colorectaux [74,75] et dans la très grande majorité des adénocarcinomes colorectaux. La perte de l'expression de CDX2 est estimée entre 4.1 à 30% des cancers colorectaux [76–79]. L'expression de CDX2 dans les cellules tumorales constitue ainsi un marqueur très sensible de la différenciation intestinale des tumeurs [74,77].

### i) CDX2 comme gène suppresseur de tumeur

Les études montrent que la perte d'expression de la protéine CDX2 dans les adénocarcinomes colorectaux serait un facteur d'intérêt pronostique indépendant en terme de survie [76,78–81]. En effet, les adénocarcinomes colorectaux ayant perdu l'expression de CDX2 seraient associés à une moins bonne survie sans progression par rapport aux adénocarcinomes ayant conservé l'expression de CDX2, conférant à CDX2 un rôle de gène suppresseur de tumeur [79].

Dans la littérature, l'hyperméthylation du promoteur du gène CDX2 est rapportée comme l'un des principaux mécanismes à l'origine de la perte d'expression de CDX2 dans les cancers colorectaux [3–6,78]. Dans une étude récente, l'hyperméthylation du promoteur du gène CDX2 serait observée dans 40% des cancers colorectaux, et associée à des taux bas d'ARNm dans ces tumeurs (4). L'expression de CDX2 serait diminuée dans les tumeurs de statut CIMP-high et MSI-high contrairement aux tumeurs CIMP-low/-0 et aux tumeurs MSI-low/MSS (46). La perte de l'expression de CDX2 serait également associée à la mutation du gène BRAF [76].

Les mutations touchant le gène CDX2 semblent être des événements rares. Quelques études ont également étudié la présence de SNP (single nucleotide

polymorphism) au sein du gène CDX2 [82,83]. De rares SNPs ont été rapportés mais aucun ne semble associé à une augmentation du risque de développer un cancer colorectal [82]. De même, aucune mutation germinale n'a été observée dans le gène CDX2 de 10 cancers colorectaux HNPCC sans instabilité microsatellitaire et 19 cancers colorectaux HNPCC avec instabilité microsatellitaire [7]. La perte de l'expression de CDX2 observée dans le contexte d'instabilité microsatellitaire sporadique semble donc plutôt être la conséquence du phénotype CIMP-H que du phénotype MSI-H.

L'activation anormale de la voie Ras/MAPKinase est fréquemment observée dans les tumeurs colorectales liées à l'instabilité chromosomique et à la voie épigénétique. Dans les cancers colorectaux, l'activation constitutionnelle des protéines ras régule de façon négative CDX2 via leur effecteur ERK1/2. ERK1/2 peut réprimer la transcription du gène CDX2 ou induire la phosphorylation de la protéine entraînant sa dégradation par le protéasome [84].

## ii) CDX2 comme oncogène

Les travaux réalisés par l'équipe de Salari suggèrent que CDX2 pourrait avoir un rôle d'oncogène, en s'appuyant sur l'observation de son amplification associée au gain partiel ou complet du bras long du chromosome 13 dans les cancers colorectaux [8]. Ces anomalies sont liées au contexte d'instabilité chromosomique des tumeurs, mécanisme d'instabilité génomique le plus fréquent en tumorigenèse colorectale. [85]. Les anomalies touchant le chromosome 13q ont été précédemment décrites dans la littérature [7,8,83,86], mais leur rôle et leur place dans la séquence adénome-carcinome ne sont pas connus.

Le rôle d'oncogène de CDX2 est démontré dans les pathologies hématopoïétiques malignes telles que les leucémies aiguës myéloïdes et lymphoblastiques. Ces pathologies sont caractérisées par une expression aberrante de CDX2 dans les cellules hématopoïétiques dans plus de 80% des cas, alors qu'à

l'état normal, CDX2 n'est pas exprimé dans le système hématopoïétique adulte. Les mécanismes à l'origine de l'expression ectopique de CDX2 n'ont pas été élucidés. Il n'a pas été observé de mutation, d'amplification de gène ou de méthylation anormale de promoteur [87]. Une translocation t(12 ;13)(p13 ;q12) a été décrite dans la leucémie aiguë myéloïde, créant une fusion entre CDX2 et ETV6 (gène essentiel à la survie des cellules hématopoïétiques souches), mais n'explique pas l'expression aberrante de CDX2 dans les cellules leucémiques de caryotype normal. CDX2 pourrait déréguler l'expression des gènes Hox, dont le rôle leucémogène est bien connu [56].

## **BUT DE L'ETUDE**

Les adénocarcinomes mucineux colorectaux se distinguent des autres tumeurs par la persistance et l'abondance de leur composante cellulaire sécrétoire à l'origine de la synthèse de mucine. Cette particularité semble être la cause de leur résistance aux différents traitements (néo)-adjuvants. Dans la muqueuse colique, l'acquisition du phénotype sécrétoire des cellules épithéliales est sous le contrôle du gène CDX2, élément moteur de l'entretien de la crypte colique. Dans cette étude, nous nous sommes ainsi intéressés à l'implication potentielle de CDX2 dans l'oncogenèse des adénocarcinomes mucineux colorectaux. Nous avons donc étudié la fréquence des anomalies de CDX2 et leur contexte génétique, en s'intéressant particulièrement aux anomalies de la voie de signalisation Wnt, autre voie déterminante dans l'entretien de la crypte colique.

# **PATIENTS ET METHODES**

## **Patients**

Notre étude incluait 60 patients présentant le diagnostic d'adénocarcinome mucineux invasif primitif colorectal, enregistrés entre 2004 et 2013 dans le Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes.

Les informations cliniques suivantes ont été recueillies : sexe, âge au diagnostic, antécédents personnels ou familiaux de pathologie tumorale faisant suspecter un syndrome de prédisposition génétique (HNPCC et syndrome de Lynch), bilan d'extension tumoral initial, type d'intervention chirurgicale initiale, localisation tumorale, compte-rendu anatomopathologique.

Cette étude, considérée comme non-interventionnelle, a été réalisée dans le respect des lois de bioéthique française. La collection des cas a été approuvée par le comité d'éthique local et répertorié sous le numéro RC15\_0307.

## **Etude anatomopathologique**

Les lésions ont été relues par deux anatomopathologistes et le sous-type histologique de carcinome colorectal a été établi selon les critères définis par la classification de l'OMS de 2010 [1]. Les critères suivants ont été enregistrés : type histologique, présence et type de contingent(s) histologique(s) minoritaire(s), grade architectural, lymphocytes intraépithéliaux infiltrant la tumeur et réaction lymphoïde de type Crohn, degré d'extension tumorale, atteinte péritonéale, invasion des vaisseaux lymphatiques, engainements périnerveux et embolies vasculaires extramuraux, métastases ganglionnaires, existence et type de lésions précessives, existence et type de polypes synchrones. Les tumeurs ont été gradées selon la 7ème édition de la classification pTNM /UICC [88].

## Etude immunohistochimique

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur des coupes de 3 µm d'épaisseur à partir des blocs de tissus inclus en paraffine après fixation dans le formol à 4%, en utilisant un système de révélation permettant, après élimination des peroxydases endogènes, l'amplification du signal par des molécules de peroxydase fixées à des polymères (Envision Flex Plus kit, Dako, Glostrup, Denmark). Les coupes ont été ensuite contre-colorées à l'hématoxyline. Les anticorps primaires utilisés étaient les suivants (tableau I) : bêta-caténine, CDX2, cytokératine (CK)7, CK20, MUC2, MUC5AC, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, et MGMT. Le pourcentage de cellules tumorales exprimant ces marqueurs était évalué semi-quantitativement par deux anatomopathologistes.

Anticorps	Clone	Référence	Type d'anticorps	Dilution	Fabricant
<b>CDX2</b>	DAK-CDX2	M3636	Monoclonal de souris	1/50e	Dako
<b>MUC2</b>	Ccp58	NCL-MUC-2	Monoclonal de souris	1/300e	Novocastra
<b>MUC5AC</b>	CLH2	M7316	Monoclonal de souris	1/200e	Dako
<b>CK20</b>	Ks20.8	M7019	Monoclonal de souris	1/50e	Dako
<b>CK7</b>	OV-TL 12/30	M7018	Monoclonal de souris	1/150e	Dako
<b>Bêta-caténine</b>	CAT-5H10	18-0226	Monoclonal de souris	1/100e	Invitrogen
<b>MLH-1</b>	ES05	IR079	Monoclonal de souris	Prêt à l'emploi	Dako
<b>MSH-2</b>	FE11	IR085	Monoclonal de souris	Prêt à l'emploi	Dako
<b>MSH-6</b>	EP49	IR086	Monoclonal de lapin	Prêt à l'emploi	Dako
<b>PMS2</b>	EP51	IR087	Monoclonal de lapin	Prêt à l'emploi	Dako
<b>MGMT</b>	MT3.1	MAB16200	Monoclonal de souris	1/50e	Millipore

**Tableau I. Anticorps primaires utilisés pour l'étude immunohistochimique.**

### Statut de CDX2

La protéine CDX2 a été étudiée en immunohistochimie, en évaluant de manière semi-quantitative le pourcentage de cellules tumorales marquées.

### Hybridation in situ en fluorescence (FISH)

La recherche de l'amplification du gène CDX2 et du gain du chromosome 13q a été recherchée par technique FISH.

### Préparation de la sonde

La préparation des sondes a été réalisée par le laboratoire de cytogénétique du CHU de Nantes (D. POULAIN).

*Prélèvements des sondes* : les sondes ADN suivantes ont été utilisées : la sonde englobant le gène CDX2 portant la référence RP11.153M24 et la sonde en 13qter (13q34) portant la référence CTC-163C9 (BACPAC Ressources, CHORI, Oakland). Pour chaque sonde, 1.2µl a été prélevé (figure 7).

*Amplification* : Dans chaque tube, 9µl de sample buffer ont été ajoutés. L'ADN a été ensuite dénaturé pendant 3mn à 95°C, puis refroidi sur glace. 10µl de mix d'amplification ont été ajoutés (mix réalisé à partir d'un mélange de tampon Reaction Buffer et Enzyme Mix V2 (enzyme Phi29), Illustra Genomiphi V2 amplification Kit, GE Healthcare). La préparation a été incubée pendant 1h30 à 30°C.

*Purification des sondes* : 500µl de TE ont été ajoutés dans chaque tube. L'ensemble de la préparation a ensuite été transféré sur une colonne de purification Amikon 30k placée sur un tube collecteur, puis centrifugé. La colonne a ensuite été retournée dans un tube collecteur propre et de nouveau centrifugée.

*Dosage de l'amplifiat* : l'ADN a été dosé et l'étape d'amplification a été validée.

*Marquage des sondes amplifiées par technique Nick-translation* : 1µg d'ADN amplifié a été prélevé et mélangé à 17.5µl d'eau et 32.5µl de mix de marquage (mélange de dNTP/tampon Nick translation, d'enzyme (Nick-translation Reagent kit, Abbott) et d'UTP-Fluorochrome (Green/Orange-dUTP, Enzo Life Sciences)). La préparation a été incubée pendant une nuit à 15°C.

*Précipitation des sondes marquées* : le marquage a été précipité à l'aide d'acétate de sodium, d'ADN cot-1 et d'éthanol 100%, puis centrifugé. L'éthanol a ensuite été retiré puis 300µl d'éthanol 70% ont été ajoutés à la solution. Celle-ci a été centrifugée et l'éthanol a été retiré. Le culot a été séché puis resuspendu avec 25µl de tampon d'hybridation. Les sondes ont ensuite été stockées à -20°C avant utilisation.



### Hybridation in situ en fluorescence

Pour chaque tumeur, une coupe de 3µm d'épaisseur a été réalisée à partir d'un bloc de tissu tumoral inclus en paraffine après fixation formolée. Ces coupes ont été déposées sur des lames silanisées et ont été séchées à 56°C pendant deux heures. Elles ont été ensuite déparaffinées puis réhydratées dans des bains de xylène puis d'éthanol.

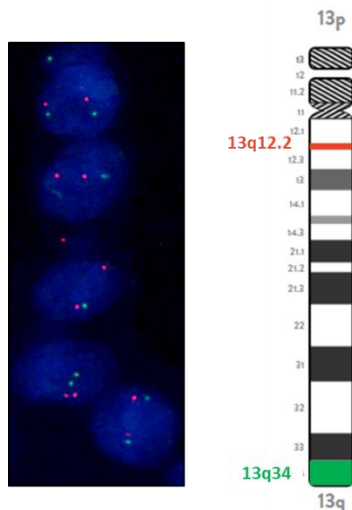
*Prétraitement* : Les lames ont été immergées pendant 10 minutes dans la solution de prétraitement diluée au 1/20e (kit Histology FISH Accessory, Dako) chauffée à 97 ±2°C au four à micro-ondes, puis lavées à deux reprises dans le tampon de lavage (kit Histology FISH Accessory, Dako) dilué au 1/20e pendant trois minutes à température ambiante.

*Digestion enzymatique* : les lames ont été incubées avec de la pepsine pendant 7mn à température ambiante dans l'Hybridizer (Dako). Ces lames ont ensuite été lavées, déshydratées puis séchées.

*Hybridation* : 5µl de la sonde CDX2 et 5µl de la sonde télomérique 13q34 ont ensuite été déposées au centre de la coupe. Les lames ont été montées avec une lamelle, puis dénaturées pendant 4 minutes à 75°C et hybridées à 37°C pendant 12-24h dans l'Hybridizer.

*Lavage stringent* : les lames ont été lavées dans le tampon de lavage stringent (kit Histology FISH Accessory, Dako) puis déshydratées et séchées.

*Montage* : le milieu de montage DAPI/anti-fading a été déposé au centre des coupes puis recouvert par une lamelle.



**Figure 7. Hybridation in situ en Fluorescence du gène CDX2.** La technique a été réalisée à l'aide de la sonde CDX2 (13q12.2) et de la sonde télomérique (13q.34). A gauche, exemple d'un cas d'adénocarcinome mucineux diploïde : deux signaux orange et deux signaux verts sont observés dans chaque noyau de cellules marqué par le DAPI (coloration bleue).

### Interprétation

L'interprétation a été effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence relié à un système informatique (Bioview Duet™ 3.3) pour la technique FISH. Le nombre de signaux orange de la sonde du gène CDX2 et le nombre de signaux verts de la sonde 13q34 au sein des cellules tumorales ont été appréciés qualitativement dans au moins cinq champs au grossissement x 600. Un gain du chromosome 13q était défini par la présence d'une polysomie incluant le site d'ancrage de la sonde CDX2 et une amplification par un ratio de signaux orange/verts augmenté (supérieur  $\geq 1.5$ ).

### **Statut mutationnel de BRAF et de KRAS**

L'ADN des 60 tumeurs colorectales a été extrait à partir de deux à trois coupes de 10 $\mu$ m d'épaisseur. L'analyse des gènes *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 gène *KRAS* ont été amplifiés par PCR. Les produits de PCR ont été purifiés et séquencés sur le séquenceur automatique ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems) et analysés avec le logiciel Seqscape (Applied Biosystems).

## **Statut d'instabilité microsatellitaire**

Pour l'étude de l'expression des quatre protéines du système de réparation des mésappariements de l'ADN (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) en immunohistochimie, les tumeurs ont été considérées soit positives (conservation du marquage) soit négatives (perte du marquage) avec pour témoin interne positif, le marquage nucléaire des lymphocytes intratumoraux ou le tissu normal péri tumoral.

Le statut microsatellitaire a été également déterminé par PCR (polymerase chain reaction) en amplifiant cinq marqueurs mononucléotidiques BAT25, BAT26, NR21, NR22 et NR24, mis au point et validés antérieurement [89]. Les produits de PCR ont été géotypés sur l'automate ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems). La tumeur était considérée comme instable pour les microsatellites (MSI), de forte amplitude (MSI-H) si au moins 2 des 5 marqueurs étaient instables, de faible amplitude (MSI-L) si un seul marqueur était instable, ou stable (MSS) si aucun des marqueurs n'était instable.

La méthylation du promoteur du gène *MLH1* a été recherchée à l'aide de la technique MethyLight. Après traitement de l'ADN génomique au bisulfite (kit Epiect Bisulfite, Quiagen), la région promotrice du gène *MLH1* a été amplifiée puis séquencée. Les amorces utilisées pour cette réaction étaient 5'-AGGAAGAGCGGATAGCGATTT-3' (sens) et 5'-TCTTCGTCCCTCCCTAAAACG-3' (anti-sens). La réaction de contrôle *CoL2A1* a été utilisée pour normaliser l'ADN traité au bisulfite. Les Loci ont été considérés comme méthylés si le pourcentage de références méthylées était supérieur à 10.

## **Statut de MGMT**

La protéine MGMT a été étudiée en immunohistochimie, en évaluant de manière semi-quantitative le pourcentage de cellules tumorales marquées.

La méthylation du promoteur du gène *MGMT* a été recherchée à l'aide de la technique MethyLight. Après traitement de l'ADN génomique au bisulfite (kit Epiect Bisulfite, Quiagen), la région promotrice du gène *MGMT* a été amplifiée puis séquencée. Les amorces utilisées pour cette réaction étaient 5'-

TGTGTTTTAAGGGGAAGATGG-3' (sens) and 5'-CCAATACCTATCCCCACCTC-3' (anti-sens). La réaction de contrôle CoL2A1 a été utilisée pour normaliser l'ADN traité au bisulfite. Les Loci ont été considérés comme méthylés si le pourcentage de références méthylées était supérieur à 10.

### **Statut de la bêta-caténine**

L'expression de la bêta-caténine en immunohistochimie a été évaluée quantitativement. Le nombre de noyaux tumoraux marqués par la bêta-caténine a été compté au centre de la tumeur, dans trois champs différents au grossissement x400, dans les zones les plus riches en noyaux marqués repérées à faible grossissement. Les noyaux marqués par la bêta-caténine ont été comptés avec le logiciel NE Elements Imaging (Nikon, Tokyo, Japan).

L'analyse du gène *CTNNB1* a été réalisée par séquençage automatisé. Les fragments encadrant l'exon 3 du gène *CTNNB1* ont été amplifiés par PCR à l'aide des amorces sens 5'-TGTA AACGACGGCCAGTGA ACCAGACAGAAAAGCGGCTG-3' et anti-sens 5'-CAGGAAACGGCTATGACCACTCATA CAGGACTTGGGAGG-3'. Les produits de PCR ont été purifiés et séquencés sur le séquenceur automatique ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems) et analysés avec le logiciel Seqscape (Applied Biosystems).

### **Analyse statistique**

Les associations entre les différentes variables catégorielles ont été calculées par test exact de Fisher. Le test de Mann Whitney a été utilisé pour étudier la relation entre le statut du gène CDX2 en FISH et les différentes variables continues (CDX2, MUC2, MUC5AC, CK20, CK7, bêta-caténine nucléaire). Le test de Spearman a été utilisé pour étudier la corrélation entre l'expression en immunohistochimie de CDX2 avec les autres variables continues. Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme statistiquement significative. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism version 7 pour Windows.

## **Analyse par regroupement hiérarchisé**

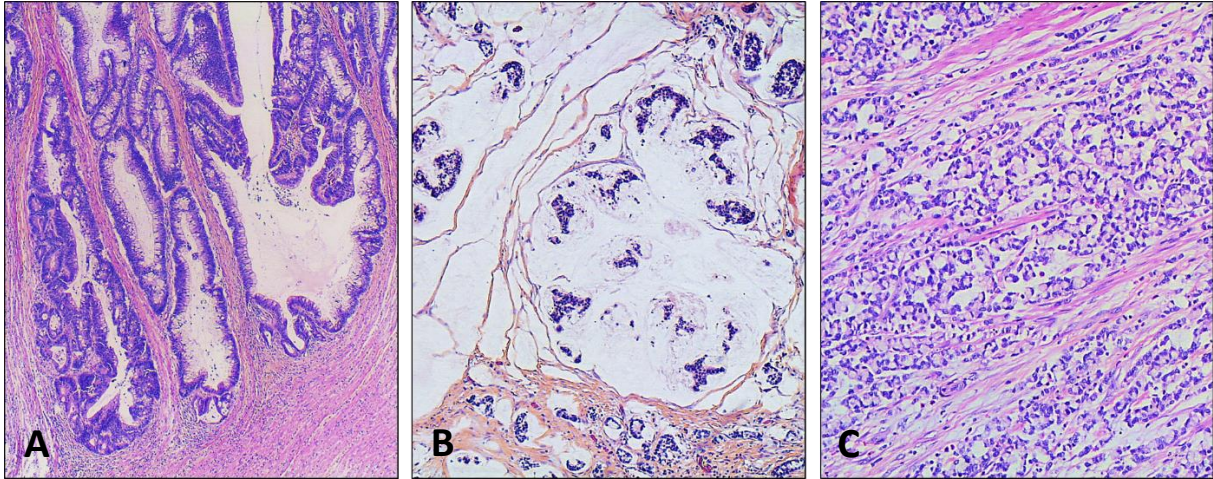
Les données moléculaires et histopathologiques ont été reformatées spécifiquement pour l'analyse par regroupement hiérarchisé. Une échelle à trois points a été utilisée : 0 = absence de l'anomalie, 1 = ininterprétable et 3 = présence de l'anomalie. L'analyse de regroupement hiérarchisé a été réalisée avec les logiciels Cluster et Tree View, disponibles gratuitement sur <http://rana.stanford.edu/software>.

# RESULTATS

## **Caractéristiques anatomo-cliniques des adénocarcinomes mucineux**

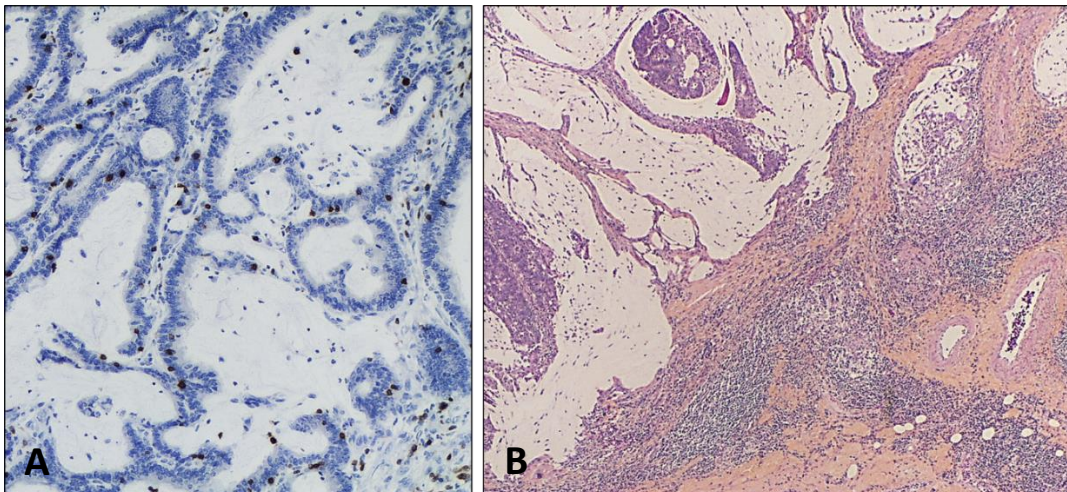
Dans notre étude, 29 femmes et 31 hommes avaient été opérés d'un adénocarcinome mucineux. Ces patients étaient âgés de 31 ans à 103 ans au diagnostic (âge moyen : 71 ans). 36 tumeurs étaient localisées dans le côlon droit, 2 dans le côlon transverse et 22 dans le côlon gauche ou le rectum.

Dans la classification OMS 2010, deux sous-groupes d'adénocarcinomes mucineux sont distingués en fonction de leur type architectural : (i) les adénocarcinomes mucineux constitués de lambeaux de cellules épithéliales polarisées autour de flaques de mucus considérés comme des adénocarcinome mucineux de bas grade architectural (figure 8A) ; et (ii) les adénocarcinomes mucineux avec des structures acineuses flottant dans les flaques de mucus, considérés comme des adénocarcinome mucineux de haut grade architectural (figure 8B). Dans notre étude, 35 adénocarcinomes mucineux (58%) présentaient des anomalies architecturales de bas grade et 25 adénocarcinomes mucineux (42%) présentaient des anomalies architecturales de haut grade, incluant 5 tumeurs avec un contingent de cellules en bagues à chaton majoritaire (figure 8C). Parmi les 60 adénocarcinomes mucineux, 8 tumeurs (13%) présentaient un contingent minoritaire de cellules en bagues à chaton (deux tumeurs de bas grade architectural et six tumeurs de haut grade architectural). Six tumeurs (10%), de haut grade architectural, présentaient un contingent minoritaire de cellules en bague à chaton infiltrant le stroma desmoplastique.



**Figure 8. Types architecturaux des adénocarcinomes mucineux colorectaux.** A) adénocarcinome mucineux constitué de lambeaux de cellules épithéliales polarisées autour de flaques de mucine. B) adénocarcinome mucineux constitué de structures acineuses flottant dans les flaques de mucus. C) adénocarcinome mucineux avec contingent de cellules en bague à chaton.

Une réaction lymphoïde de type Crohn-like était observée en périphérie de 14 adénocarcinomes mucineux (23%) (figure 9B). Des lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) étaient observés dans 12 tumeurs (20%) (figure 9A). Six tumeurs présentaient à la fois une réaction de type Crohn et des TILs.



**Figure 9. Réaction immunitaire anti-tumorale.** A) adénocarcinome mucineux avec lymphocytes intra-épithéliaux infiltrant la tumeur, marqués en immunohistochimie par l'anticorps anti-CD3. B) adénocarcinome mucineux avec réaction lymphoïde péri-tumorale de type Crohn-like.

Parmi les 60 adénocarcinomes mucineux, 5 (8%) étaient de stade I, caractérisés par une sous-séreuse intacte sans métastase ; 26 (43%) étaient de stade II, caractérisés par une atteinte de la sous-séreuse sans métastase ; 9 (15%) étaient de stade III, caractérisés par une atteinte métastatique ganglionnaire loco-régionale ; et 20 (34%) étaient de stade IV, caractérisés par la présence de métastases viscérales ou ganglionnaires à distance (tableau II). Les métastases des tumeurs étaient localisées dans le péritoine (n=13), le foie (n=9), le poumon (n=3), les ovaires (n=2) et un ganglion rétroclaviculaire (n=1).

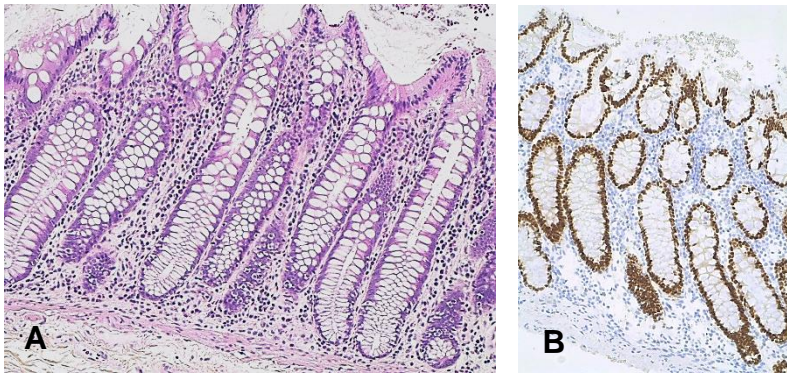
<b>Nombre de cas</b>	60
<b>Sexe</b>	
Femmes	29 (48%)
Hommes	31 (52%)
<b>Age moyen</b>	71 ans (31-103ans)
<b>Localisation tumorale</b>	
Côlon droit	36 (60%)
Côlon transverse	2 (3%)
Côlon gauche/ Rectum	22 (37%)
<b>Composante en bague à chaton</b>	13 (22%)
<b>Anomalies architecturales</b>	
Bas grade	35 (58%)
Haut grade	25 (42%)
<b>Infiltrat inflammatoire tumoral</b>	
Présence de TIL	12 (20%)
Présence d'une réaction lymphoïde Crohn-like	14 (23%)
<b>Stade pTNM selon l'UICC (7<sup>e</sup> éd.)</b>	
I	5 (8%)
II	26 (43%)
III	9 (15%)
IV	20 (34%)

**Tableau II. Caractéristiques anatomocliniques des 60 adénocarcinomes mucineux.**



## Statut de CDX2 dans la muqueuse colique normale

CDX2 était exprimé de façon intense dans le noyau de toutes les cellules épithéliales de la muqueuse colique normale. Ce marquage était observé sur toute la hauteur de la muqueuse colique, correspondant à 100% des cellules épithéliales (figure 10).

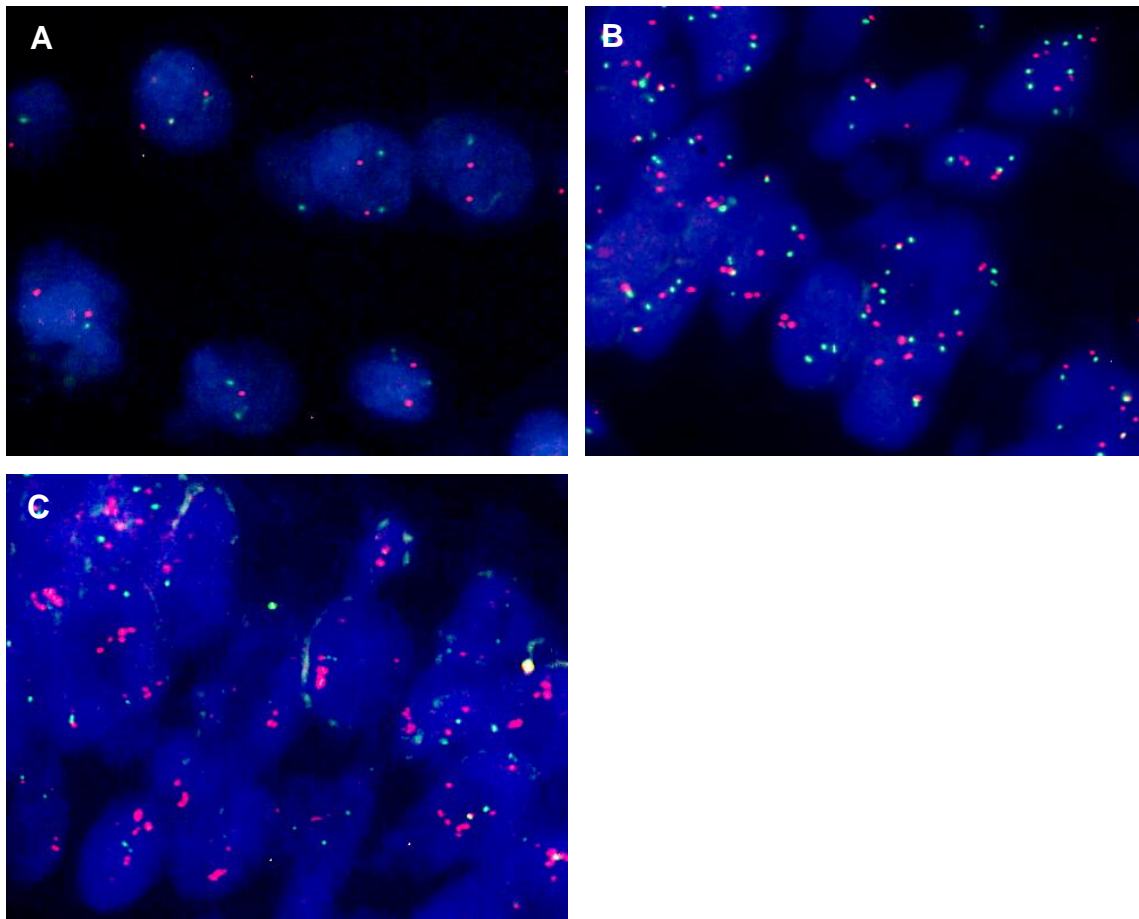


**Figure 10. Expression de CDX2 dans la muqueuse colique normale.** A) *Muqueuse colique normale (coloration HES, grossissement x100).* B) *immunomarquage avec l'anticorps anti-CDX2 : toutes les cellules épithéliales de la muqueuse colique expriment CDX2 (grossissement x100).*

## Statut de CDX2 dans les adénocarcinomes mucineux

Cinquante-sept adénocarcinomes mucineux (95%) exprimaient CDX2. Le pourcentage de cellules exprimant CDX2 était compris entre 10 % et 100% (moyenne : 82%). Trois tumeurs (5%) présentaient une perte de l'expression de CDX2.

Quinze tumeurs (25%) étaient caractérisées par un gain du bras long du chromosome 13 incluant le locus du gène CDX2 (gain, n=11) ou par une amplification du gène CDX2 (n=4) (figures 11B et 11C). Les 45 autres tumeurs étaient diploïdes (figure 11A), incluant les 3 adénocarcinomes mucineux ayant perdu l'expression de CDX2.



**Figure 11. Statut de CDX2 dans les adénocarcinomes mucineux.** Exemple d'un adénocarcinome mucineux diploïde (A), avec gain du gène *CDX2* (B), avec amplification du gène *CDX2* (C). Noyaux des cellules tumorales colorés au DAPI, co-hybridés avec une sonde *CDX2* de fluorescence orangée et une sonde télomérique 13q34 de fluorescence verte (photos A, B, C : grossissement x600).

Les 15 tumeurs avec gain/amplification du gène *CDX2* exprimaient la protéine *CDX2* en immunohistochimie. Dans ces cas, l'expression de *CDX2* était variable : le pourcentage de cellules marquées était compris entre 10 et 100% (moyenne : 77%, médiane : 90%). Quatre des 15 tumeurs avaient un pourcentage de cellules marquées inférieur à 80%. Ce pourcentage n'était pas différent de celui observé dans le groupe des tumeurs diploïdes (moyenne : 78%, médiane : 100%).

## **Statut de CDX2 et caractéristiques anatomocliniques**

Douze des 15 patients (80%) présentant un adénocarcinome mucineux avec gain/amplification du gène CDX2, étaient des hommes. Le sexe masculin était significativement associé à la présence d'un gain/amplification de CDX2 au sein des tumeurs (80% versus 42% ; test exact de Fisher :  $p=0.02$ ). Les quinze patients étaient âgés de 31 à 103 ans au diagnostic (âge moyen : 70 ans). Sept des 15 tumeurs étaient localisées dans le côlon droit, une dans le côlon transverse et 7 dans le côlon gauche ou le rectum. Aucune relation statistique significative n'était observée avec l'âge ou avec la localisation tumorale. Deux des trois patients dont la tumeur présentait une perte de l'expression de CDX2 étaient des femmes. Ces trois patients étaient âgés de 63 à 88 ans (âge moyen : 78 ans). Les tumeurs étaient toutes localisées au niveau du côlon droit.

Parmi les 15 adénocarcinomes mucineux présentant un gain/amplification du gène CDX2, 9 présentaient des anomalies architecturales de bas grade et 6 montraient des anomalies architecturales de haut grade. Deux adénocarcinomes mucineux ayant perdu l'expression de CDX2 étaient de bas grade et le troisième était de haut grade.

Deux des quinze adénocarcinomes mucineux présentant un gain/amplification du gène CDX2 présentaient un contingent de cellules en bague à chaton. Un des quinze adénocarcinomes mucineux présentant un gain/amplification du gène CDX2 et un des trois ayant perdu l'expression de CDX2 présentaient un contingent minoritaire de cellules en bague à chaton infiltrant le stroma desmoplastique.

Une réaction lymphoïde de type Crohn était observée en périphérie de 2 des 15 adénocarcinomes mucineux présentant un gain/amplification du gène CDX2. L'un d'entre eux présentait aussi des TIL. Un adénocarcinome mucineux ayant perdu l'expression de CDX2 présentait une réaction de lymphoïde de type Crohn et des TIL.

Aucune différence significative n'était observée entre les adénocarcinomes mucineux avec anomalies du gène CDX2 et les adénocarcinomes mucineux diploïdes concernant le grade architectural, la présence d'un contingent de cellules

en bague à chaton, la présence de TIL ou la présence d'une réaction lymphoïde de type Crohn-like.

Dix des 15 adénocarcinomes mucineux (67%) présentant un gain/amplification du gène CDX2 étaient de stade IV, deux (13%) étaient de stade III et trois (20%) de stade II. Les métastases des tumeurs étaient localisées dans le foie (n=6), le péritoine (n=6) et le poumon (n=3). Au bilan d'extension initial, les tumeurs avec gain/amplification du gène CDX2 étaient le plus souvent associées à des métastases à distance contrairement aux tumeurs diploïdes (67% versus 22% ; test exact de Fisher (stade I-II versus III versus IV) : p=0.003). Un des trois adénocarcinomes mucineux présentant une perte de l'expression de CDX2 étaient de stade IV, et deux étaient de stade II (tableau III).

	Diploïdie	Amplification/gain	
<b>Nombre de cas</b>	45	15	
<b>Sexe</b>			<b>p= 0.02</b>
Femmes	26 (58%)	3 (20%)	
Hommes	19 (42%)	12 (80%)	
<b>Age moyen</b>	71 ans (40-88ans)	70 ans (31-103ans)	p=NS
<b>Localisation tumorale</b>			p=NS
Côlon droit	29 (65%)	7 (47%)	
Côlon transverse	1 (2%)	1 (6%)	
Côlon gauche/ Rectum	15 (33%)	7 (47%)	
<b>Composante en bague à chaton</b>	11 (24%)	2 (13%)	p=NS
<b>Anomalies architecturales</b>			p=NS
Bas grade	26 (58%)	9 (60%)	
Haut grade	19 (42%)	6 (40%)	
<b>Infiltrat inflammatoire tumoral</b>			p=NS
Présence de TIL	11 (24%)	1 (6%)	
Présence d'une réaction Crohn-like	12 (27%)	2 (13%)	
<b>Stade pTNM selon l'UICC (7<sup>e</sup> éd.)</b>			<b>p=0.003</b>
I	5 (11%)	0 (0%)	
II	23 (51%)	3 (20%)	
III	7 (16%)	2 (13%)	
IV	10 (22%)	10 (67%)	

**Tableau III. Caractéristiques anatomocliniques des adénocarcinomes mucineux en fonction du statut de CDX2 en FISH.**

## **Statut de CDX2 et différenciation immunohistochimique des tumeurs**

Dans notre étude, le taux d'expression de CDX2 était statistiquement corrélé à l'expression de la CK20 (test de Spearman :  $r=0.26$ ,  $p=0.046$ ) et de façon inverse à l'expression de la CK7 (test de Spearman :  $r= -0.27$ ,  $p=0.04$ ). Le taux d'expression de CDX2 n'était pas corrélé statistiquement avec les taux des mucines MUC2 et MUC5AC.

Les quinze adénocarcinomes mucineux avec gain/amplification du gène CDX2 exprimaient fortement MUC2 (entre 30 et 100% de cellules marquées, moyenne : 80%). MUC5AC était exprimé dans 7 tumeurs (entre 10 et 100% de cellules marquées, moyenne 61%). La CK7 était exprimée par 3 tumeurs de façon hétérogène (entre 10 et 50% de cellules marquées, moyenne 30%). Treize (87%) adénocarcinomes mucineux avec gain/amplification du gène CDX2 exprimaient la CK20 (entre 20 et 100% de cellules marquées, moyenne 73%) (figure 12). L'expression de MUC2, de MUC5AC, de la CK7 et de la CK20 n'était pas différente entre les adénocarcinomes mucineux avec anomalies du gène CDX2 et les adénocarcinomes mucineux diploïdes.

Deux des trois adénocarcinomes mucineux ayant perdu l'expression de CDX2 exprimaient fortement MUC2 (80% de cellules marquées), le troisième l'exprimait faiblement (10% de cellules marquées). Deux des trois tumeurs exprimaient MUC5AC (20 et 50% des cellules marquées) et la CK7 (20 et 60% des cellules marquées). Une des trois tumeurs exprimait la CK20 (80% de cellules marquées) (figure 13).

## **Statut de CDX2 et statut mutationnel de BRAF et KRAS**

Trois des quinze adénocarcinomes mucineux avec gain/amplification du gène CDX2 portaient la mutation V600E et G596R du gène BRAF. Treize des 45 adénocarcinomes mucineux diploïdes portaient la mutation V600E de BRAF, incluant deux des trois adénocarcinomes mucineux avec perte de l'expression de CDX2.

Six des quinze adénocarcinomes mucineux avec gain du gène CDX2 (40%) présentaient une mutation de KRAS. Dix-sept des 45 adénocarcinomes mucineux

diploïdes (38%) présentaient une mutation dans l'exon 2 du gène KRAS. Aucun des trois adénocarcinomes mucineux avec perte de l'expression de CDX2 ne montrait de mutation de KRAS.

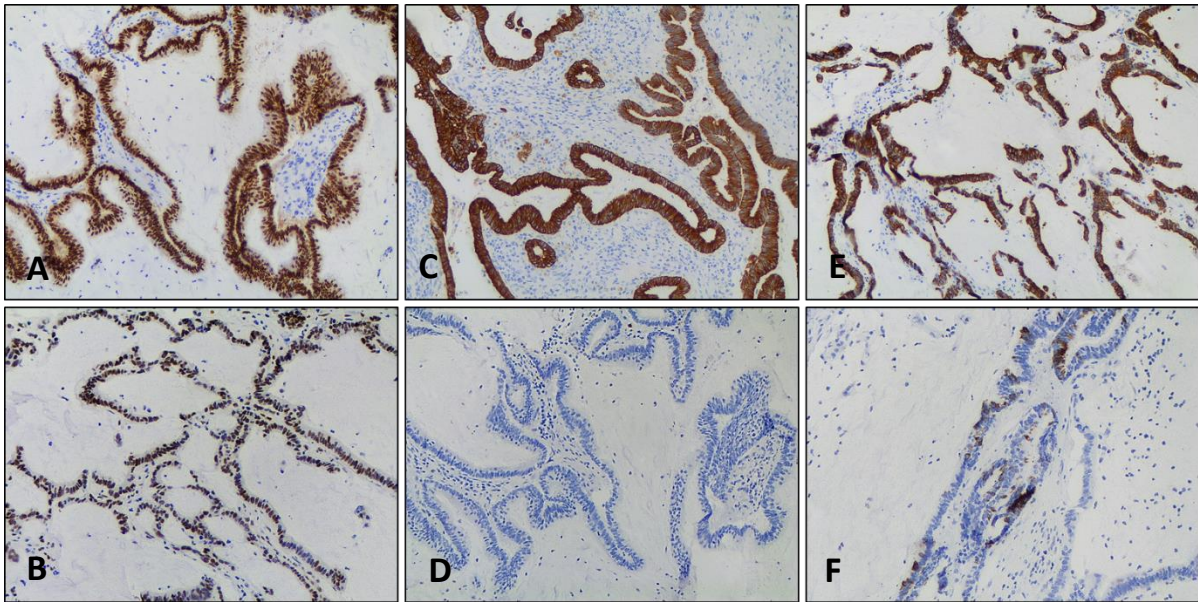
Aucune différence significative n'était observée entre les adénocarcinomes mucineux avec anomalies du gène CDX2 et les adénocarcinomes mucineux diploïdes concernant le statut mutationnel de KRAS ou de BRAF (test exact de Fisher ; tableau IV).

### **Statut de CDX2 et instabilité microsatellitaire**

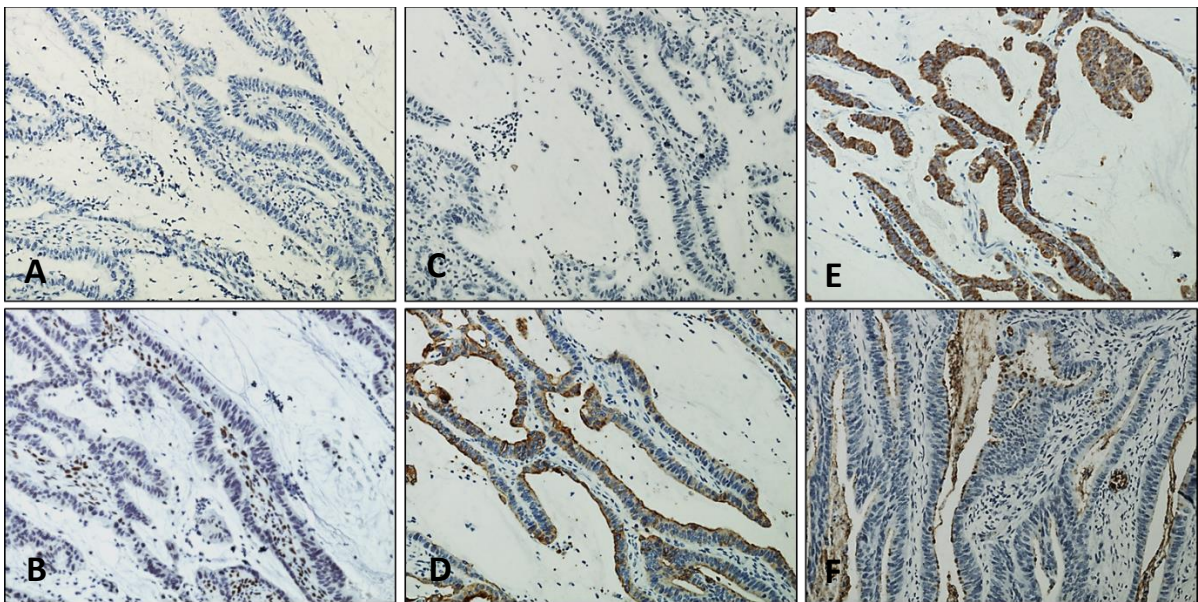
Le taux d'expression de CDX2 n'était significativement pas différent entre les adénocarcinomes mucineux de phénotype MSS et ceux de phénotype MSI (81% versus 72% ; test de Mann Whitney :  $p=0.19$ ).

Treize des 15 adénocarcinomes mucineux avec gain/amplification du gène CDX2 étaient MSS (87%) et deux étaient MSI-H (tableau IV). Les tumeurs avec gain/amplification étaient significativement associées au phénotype MSS contrairement aux tumeurs diploïdes (87% versus 56% ; test exact de Fisher  $p=0.03$ ) (figure 12). Deux tumeurs MSI-H présentaient une amplification du gène CDX2. Un de ces 2 adénocarcinomes mucineux MSI-H était associé à un syndrome de Lynch prouvé.

Deux des trois adénocarcinomes mucineux présentant une perte de l'expression de CDX2 étaient de phénotype MSI-H (figure 13). Cette instabilité microsatellitaire était associée à la perte d'expression de MLH1 avec hyperméthylation du promoteur du gène MLH1.



**Figure 12. Profil immunophénotypique d'un adénocarcinome mucineux avec gain de CDX2.** Expression de CDX2 (A), de MLH1 (B), de la CK20 (C), de MUC2 (E), et de MUC5AC (F). Absence de marquage de la CK7 (D).



**Figure 13. Profil immunophénotypique d'un des trois adénocarcinomes mucineux avec perte de l'expression de CDX2.** Absence d'expression de CDX2 (A), de MLH1 (B), et de la CK20 (C). Expression de la CK7 (D), de MUC2 (E), et de MUC5AC (F).

## **Statut de CDX2 et statut de méthylation de MGMT**

Neuf des 15 adénocarcinomes mucineux (60%) avec gain/amplification du gène CDX2 présentaient une conservation de l'expression de MGMT en immunohistochimie (30% à 100% de cellules marquées, moyenne : 80%). Les trois tumeurs avec perte de l'expression de CDX2 en immunohistochimie exprimaient MGMT (80% et 100% de cellules marquées, moyenne : 87%).

Cinq adénocarcinomes mucineux (33%) avec gain/amplification du gène CDX2 étaient hyperméthylés pour le gène MGMT. Les trois tumeurs avec perte de l'expression de CDX2 présentaient un statut de méthylation normal du gène MGMT.

Aucune différence significative n'était observée entre les adénocarcinomes mucineux avec gain/amplification du gène CDX2 et les adénocarcinomes mucineux diploïdes concernant le statut de MGMT (test exact de Fisher) (tableau IV).

## **Statut de CDX2 et activation de la voie Wnt**

Le taux d'expression de CDX2 était statiquement corrélé à l'expression nucléaire de la bêta-caténine dans les adénocarcinomes mucineux (test de Spearman :  $r=0.49$ ,  $p<0.0001$ ).

Le pourcentage de cellules tumorales exprimant la bêta-caténine dans le noyau n'était pas significativement différent entre le groupe des adénocarcinomes mucineux avec gain/amplification du gène CDX2 et celui des tumeurs diploïdes (moyenne : 23% vs 20%, test de Mann Whitney  $p=0.43$  ; tableau IV).

Les trois tumeurs avec perte de l'expression de CDX2 montraient un pourcentage faible de noyaux marqués par la bêta-caténine (entre 0% et 10%), moins élevé que dans les autres tumeurs diploïdes.

Dans notre étude, deux adénocarcinomes mucineux avec gain/amplification du gène CDX2 présentaient une mutation du gène CTNNB1 codant la bêta-caténine. Il s'agissait de deux transitions c.134C>T. L'expression nucléaire de la bêta-caténine au sein de ces tumeurs était de 16 et 31%. L'expression de CDX2 était intense (pourcentage de cellules positives de 90% et 100%). Deux tumeurs diploïdes



présentaient une délétion ou une mutation du gène CTNNB1 (c.133\_135del et c.189G>A) (tableau IV).

Les quatre tumeurs mutées pour CTNNB1 étaient de phénotype MSI-H ; deux (dont une amplifiée pour le gène CDX2) étaient associées à un syndrome de Lynch démontré.

	Diploïdie	Amplification/gain	
<b>Nombre de cas</b>	45	15	
<b>Statut du gène KRAS</b>			p=NS
Sauvage	28 (62%)	9 (60%)	
Muté	17 (38%)	6 (40%)	
<b>Statut du gène BRAF</b>			p=NS
Sauvage	32 (71%)	12 (80%)	
Muté	13 (29%)	3 (20%)	
<b>Statut microsatellitaire</b>			<b>p = 0.03</b>
MSS	25 (56%)	13 (87%)	
MSI	20 (44%)	2 (13%)	
<b>Statut de méthylation de MGMT</b>			p=NS
Normal	34 (76%)	10 (67%)	
Hyperméthylation	11 (24%)	5 (33%)	
<b>Statut du gène CTNNB1</b>			p=NS
Sauvage	43 (96%)	13 (87%)	
Muté	2 (4%)	2 (13%)	
<b>Activation de la voie Wnt</b>			p=NS
Bêta-caténine nucléaire <10%	26 (58%)	6 (40%)	
Bêta-caténine nucléaire ≥10%	19 (42%)	9 (60%)	

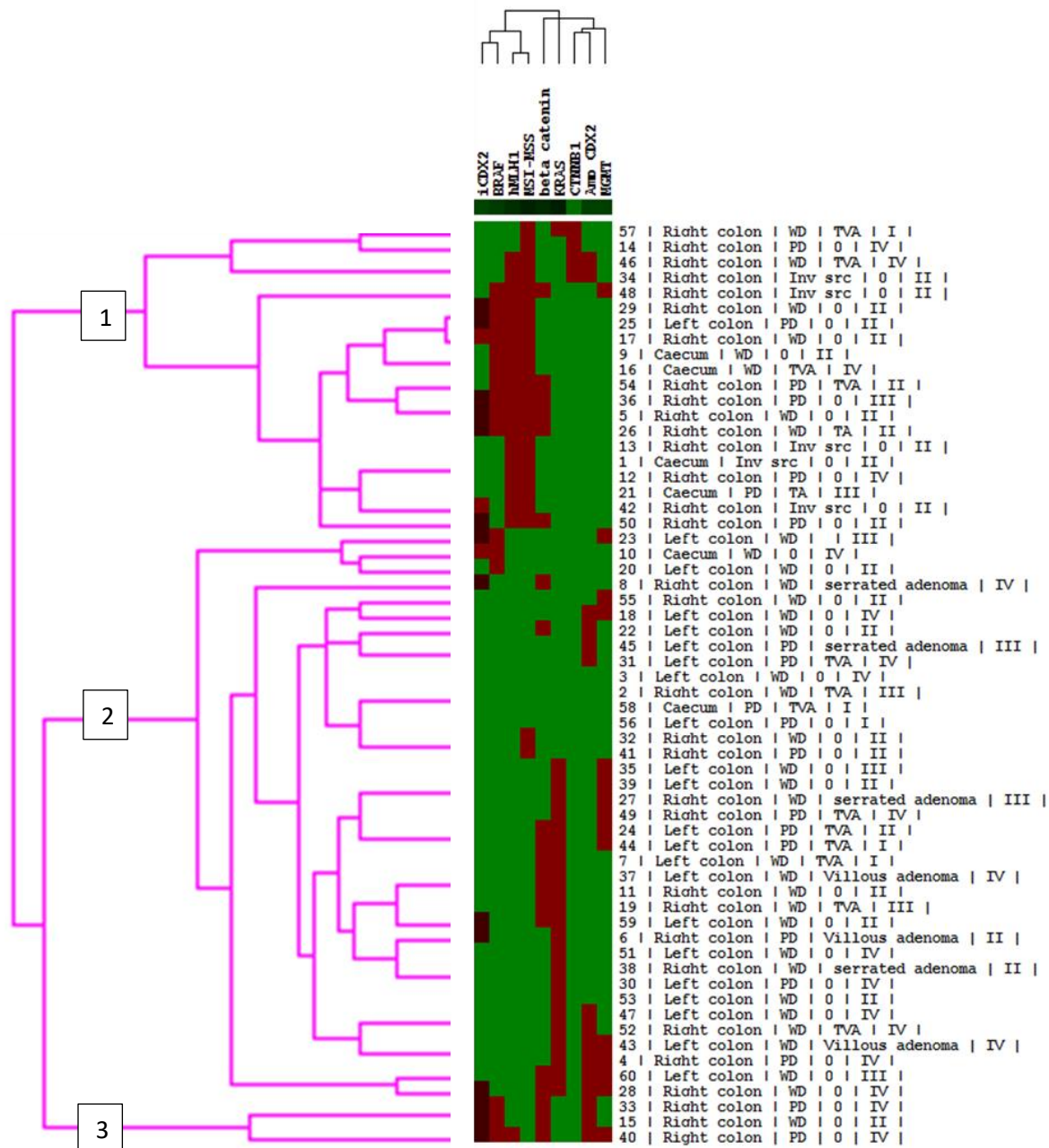
**Tableau IV. Caractéristiques moléculaires des adénocarcinomes mucineux en fonction du statut de CDX2 en FISH.**

## **Analyse par regroupement hiérarchisé**

L'analyse de regroupement hiérarchisé reposait sur les données moléculaires et histologiques décrites précédemment : le statut mutationnel de BRAF, KRAS et CTNNB1, le statut MSS/MSI-H, le statut d'hyperméthylation de MLH1 et de MGMT, l'expression nucléaire de la bêta-caténine et de CDX2 en immunohistochimie, et le gain du gène CDX2. Le regroupement hiérarchisé permettait de répartir les adénocarcinomes mucineux en trois groupes (figure 14) : un premier groupe caractérisé par des tumeurs MSI-H, un second groupe constitué de tumeurs MSS, et un troisième constitué de tumeurs MSS mutées pour le gène BRAF.

Les tumeurs avec gain/amplification de CDX2 étaient majoritairement observées dans les deuxième et troisième groupes correspondant aux tumeurs de phénotype MSS. Un petit nombre de ces tumeurs étaient également observées au sein du premier groupe caractérisé par une instabilité microsatellitaire. Comme l'a montré l'analyse précédemment, ces tumeurs semblaient être associées à un contexte de syndrome de Lynch. Les tumeurs avec perte de l'expression de CDX2 étaient majoritairement observées dans le premier groupe.

L'analyse permettait également d'individualiser un troisième groupe caractérisé par des tumeurs de phénotype MSS avec mutation du gène BRAF. Au sein de ce groupe, les tumeurs étaient caractérisées à la fois par une diminution de l'expression de la protéine CDX2 (pourcentage de cellules tumorales marquées <80%), et par un gain/amplification du gène. Ce groupe semblait également associé à une absence d'expression nucléaire de la bêta-caténine.



**Figure 14. Analyse par regroupement hiérarchisé des 60 adénocarcinomes mucineux du côlon.** Les tumeurs sont d'abord regroupées selon leur proximité entre les biomarqueurs : le statut mutationnel de BRAF, KRAS et CTNNB1, le statut MSS/MSI-H, le statut d'hyperméthylation de MLH1 (hMLH1) et de MGMT, l'expression de CDX2 (i CDX2) et de la bêta-caténine en immunohistochimie, et le gain du gène CDX2 (Amp CDX2). 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 (côté gauche). Les mutations de BRAF, KRAS et CTNNB1, le statut MSI, l'hyperméthylation de MLH1 et de MGMT, la présence d'un gain/amplification de CDX2, la diminution (5-80%) ou la perte de l'expression (<5%) de CDX2 et l'absence d'expression nucléaire de la bêta-caténine (<5%) sont représentés par des carrés rouges. L'absence de mutations de BRAF, KRAS et CTNNB1, le statut MSS, le statut diploïde de CDX2, l'expression nucléaire de la bêta-caténine (>5%) et de CDX2 (>80%), le statut non

hyperméthylé de MLH1 et de MGMT sont représentés par des carrés verts. Sur le côté droit de la figure, sont précisées les caractéristiques clinico-pathologiques suivantes : première colonne, identification du cas ; deuxième colonne, localisation de la tumeur ; troisième colonne : différenciation de la tumeur mucineuse ; quatrième colonne : présence et type de lésion précessive ; cinquième colonne : stade. Trois groupes de tumeurs ont ainsi été isolés sur le côté gauche de la figure (carrés noirs 1, 2, et 3). Abréviations : TVA : adénome tubulovilleux ; TA : adénome tubuleux ; WD : bien différenciée ; PD : peu différenciée ; Inv src : contingent invasif de cellules en bague à chaton.

## DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons étudié les anomalies génétiques de CDX2 dans les adénocarcinomes mucineux du côlon. Nous montrons pour la première fois que le gène CDX2 est amplifié dans les adénocarcinomes mucineux colorectaux. Cette amplification de CDX2 apparaît dans les adénocarcinomes mucineux de phénotype MSS sous forme de gain chromosomique. Elle apparaît aussi sous forme d'amplification génique isolée dans les adénocarcinomes mucineux de phénotype MSI dans un contexte de syndrome HNPCC. Il n'y a pas de corrélation entre le statut génétique de CDX2 et le niveau d'expression de sa protéine dans les adénocarcinomes mucineux : l'amplification génique peut être accompagnée d'une diminution de l'expression de CDX2, suggérant que l'amplification du gène n'est pas exclusive de l'hyperméthylation dans les adénocarcinomes mucineux. Cette étude montre enfin que l'amplification/gain du gène CDX2 est plus fréquente dans les tumeurs de stade avancé suggérant que cette anomalie génétique est un marqueur pronostique péjoratif des adénocarcinomes mucineux.

Dans cette étude, la présence d'un gain ou d'une amplification du gène CDX2 était détectée grâce à des sondes spécifiquement dirigées contre le gène CDX2 et la région télomérique du chromosome 13q. L'amplification du gène CDX2 était ainsi directement mise en évidence pour la première fois dans 25% des adénocarcinomes mucineux. Elle s'intégrait toutefois dans un gain du chromosome 13q dans 73% des cas et était isolée dans 27% des cas. D'autres auteurs ont déjà suggéré l'existence de l'amplification de CDX2 dans les cancers du côlon exclusivement instables pour les chromosomes, par des techniques de réaction d'amplification en chaîne ciblant les microsatellites flanquant le locus du gène CDX2 [86]. Notre méthode in situ permettait quant à elle de détecter à la fois l'amplification de CDX2 et le gain du chromosome 13q. La fréquence de l'amplification du chromosome 13q dans les adénocarcinomes mucineux de cette étude (25%) est plus basse que celle rapportée jusqu'à présent dans les adénocarcinomes colorectaux (42 - 56%) par les études antérieures [8,83,90]. Ces études ont analysé les réarrangements du chromosome

13q, mais n'étaient pas focalisées sur les anomalies du gène CDX2 [83,90–93]. Subtil et coll. ont rapporté une fréquence de l'amplification de la région génique de CDX2 dans 70% des adénocarcinomes coliques de statut instable pour les chromosomes [86]. Dans notre étude, l'analyse par FISH montrait que les tumeurs avec anomalies du gène CDX2 présentaient un gain faible du nombre de copies (3 à 4 copies). Cette observation est concordante avec les données de la littérature qui montrent que l'instabilité chromosomique dans les tumeurs colorectales de phénotype MSS est caractérisée par un gain faible du nombre de copies, essentiellement à type de triploïdie [94].

Dans notre étude, les tumeurs avec amplification/gain du gène CDX2 étaient généralement de phénotype MSS. Dans cette population, la fréquence de l'amplification du gène CDX2 était estimée à 34%. L'association entre l'amplification du gène CDX2 et le phénotype MSS s'explique probablement par la plus grande fréquence des réarrangements chromosomiques dans cette population. Dans les cancers colorectaux, ces réarrangements chromosomiques sont le plus souvent observés au niveau des chromosomes 8q où est localisé le gène C-MYC, 13q où est localisé CDX2 et 20 où est localisé HNF4A [83]. Alors que l'étude de Subtil et coll. montrait une fréquence de ce réarrangement de 70% [86], la seule étude centrée sur les altérations du nombre de copies chromosomiques dans les adénocarcinomes mucineux MSS comparativement aux adénocarcinomes non mucineux montrait une fréquence du gain du chromosome 13q proche de celle observée dans notre étude (environ 25%) [90]. La fréquence des anomalies du nombre de copies chromosomiques en 13q était significativement inférieure dans les adénocarcinomes mucineux par rapport aux adénocarcinomes non mucineux. La fréquence du gain en 13q était toutefois un peu plus élevée dans le sous-groupe des adénocarcinomes mucineux de la cohorte du TCGA et la différence significative n'apparaissait plus [83,90].

Nous avons mis en évidence pour la première fois une amplification du gène CDX2 dans deux adénocarcinomes mucineux MSI-High. Cette observation était

inattendue dans la mesure où les adénocarcinomes mucineux MSI-H sont caractérisés par une forte charge mutationnelle et sont généralement considérés comme étant diploïdes [95,96]. Il est intéressant de noter que ces deux tumeurs montraient une mutation activatrice de l'exon 3 du gène CTNNB1. Ces mutations sont souvent décrites dans la littérature comme spécifiques de la présence d'un syndrome de Lynch [97–99]. La mutation de CTNNB1 serait présente dans environ 20% des tumeurs survenant dans un contexte d'HNPCC [97,98]. Dans notre étude, une des deux tumeurs, présentant à la fois une amplification du gène CDX2 et une mutation de CTNNB1, était associée à un syndrome de Lynch génétiquement prouvé. Les anomalies constitutionnelles des gènes du système de réparation des mésappariements de l'ADN n'ont pas été recherchées chez l'autre patient dont le diagnostic de cancer a été posé à un âge supérieur à 60 ans. Au vu de la spécificité de la mutation de CTNNB1, le diagnostic du syndrome de Lynch peut être suspecté chez ce second patient. L'observation concomitante de la mutation du gène CTNNB1 et de l'amplification du gène CDX2 dans ces tumeurs diploïdes pose la question de leur interrelation, d'autant que des interactions entre la voie Wnt/bêta-caténine et CDX2 ont été décrites [63,68,100].

Dans notre étude, l'expression de la protéine CDX2 en immunohistochimie n'était pas corrélée à l'anomalie génétique de CDX2. En effet, une diminution de l'expression de CDX2 était observée dans plusieurs adénocarcinomes mucineux présentant un gain du chromosome 13q et une amplification du gène CDX2. CDX2 est une protéine exprimée dans la muqueuse colique normale par la totalité des cellules épithéliales des cryptes intestinales. L'expression de CDX2 est conservée dans la majorité des cancers colorectaux. Dans notre étude, la perte de l'expression de CDX2 était observée dans trois adénocarcinomes mucineux (5%) et diminuée dans 14 autres adénocarcinomes mucineux (23%) dont quatre présentaient une amplification de CDX2. Selon les études, la perte ou la diminution de l'expression de CDX2 est observée dans 4.1 à 30% des cancers colorectaux [76–79]. La faible fréquence de la perte de CDX2 constatée dans notre étude est comparable à la fréquence de 4.1% constatée par Dalerba dans leur grande cohorte de 2115 tumeurs colorectales [79]. Il est rapporté que la diminution de l'expression de CDX2, secondaire à l'hyperméthylation du gène serait la contribution majeure de CDX2 à la

carcinogénèse colorectale. Cette hypothèse fait de CDX2 un gène suppresseur de tumeur. La découverte récente de l'amplification de la région du chromosome 13q incluant le locus du gène CDX2 a remis en question cette thèse et pose CDX2 comme un « oncogène de survie de lignage » [8]. Cette hypothèse est confortée par l'observation que des tumeurs extra-digestives telles que les leucémies surexpriment CDX2 par un mécanisme non décrypté. CDX2 est alors considéré dans ces tumeurs comme oncogène. Notre étude, en montrant que l'amplification de CDX2 peut être associée à une diminution de l'expression de CDX2, suggère que dans ce gène, amplification et phénotype CIMP-H ne sont probablement pas mutuellement exclusifs. Cette hypothèse est appuyée dans notre étude par la grande fréquence de la mutation du gène BRAF observée dans les adénocarcinomes mucineux MSS montrant à la fois une amplification et une diminution de l'expression de CDX2. Cette association non statistiquement vérifiée est bien mise en évidence par l'étude de clustering hiérarchisé. Il a été en effet montré que BRAF pourrait être un moteur du statut d'hyperméthylation des cancers colorectaux [101]. Nos observations ne vont pas par conséquent dans le sens du rôle oncogène de CDX2 dans les adénocarcinomes mucineux.

Dans la littérature, les tumeurs colorectales ayant perdu l'expression de CDX2 sont associées à une morphologie peu différenciée incluant le sous-type médullaire, un nombre augmenté de TIL, la présence de métastases ganglionnaires, une instabilité microsatellitaire (perte de MLH1), un statut BRAF muté, et un phénotype CIMP-High [78,102,103]. Dans notre étude, deux des trois adénocarcinomes mucineux ayant perdu l'expression de CDX2 étaient effectivement de phénotype MSI-H, dans un contexte CIMP-H attesté par l'hyperméthylation du gène MLH1. L'un d'entre eux portait la mutation V600E de BRAF. Les trois tumeurs étaient diploïdes pour le gène CDX2. Ces deux adénocarcinomes mucineux rentraient par conséquent parfaitement dans le cadre jusqu'à présent décrit des tumeurs associées aux anomalies moléculaires de CDX2.



Notre hypothèse était que le phénotype mucineux des cancers colorectaux pouvait être en lien avec la dysrégulation positive de CDX2. CDX2 joue un rôle important dans l'entretien de l'épithélium intestinal. Parmi ces interventions à ce niveau, CDX2 active directement la transcription du gène MUC2 et du gène ATOH1 qui sont impliqués dans la différenciation des cellules mucosécrétantes coliques [66,104]. Contrairement à la plupart des adénocarcinomes sans composante mucineuse, les adénocarcinomes mucineux coliques sont caractérisés par un maintien de l'expression de la mucine MUC2 et par une expression aberrante de la mucine gastrique MUC5AC [105–107]. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de relation entre l'expression de CDX2 en immunohistochimie et l'expression des mucines MUC2 et MUC5AC. De même, aucune relation n'était observée entre les anomalies à type de gain/amplification de CDX2 et l'expression de ces mucines. Les anomalies à type de gain/amplification de CDX2 ne semblent donc pas expliquer la forte expression de ces mucines dans les adénocarcinomes mucineux coliques. Dans notre étude, deux des trois tumeurs ayant perdu l'expression de CDX2 exprimaient MUC2 et MUC5AC. Dans une étude de 722 adénocarcinomes colorectaux, il a été montré une relation inverse entre l'expression de CDX2 et celle des mucines MUC2 et MUC5AC [108]. Dans notre étude, l'expression de CDX2 est par contre assez bien corrélée avec l'expression nucléaire de la bêta-caténine témoignant de l'activation de la voie Wnt. La voie de signalisation Wnt privilégie par son activation la prolifération cellulaire et la différenciation non sécrétoire des cellules épithéliales coliques. La corrélation entre CDX2 et la voie de signalisation Wnt observée dans les adénocarcinomes mucineux peut témoigner des nombreuses interactions modulatrices existant entre ces 2 voies dans l'entretien de la différenciation et de la prolifération de la crypte intestinale normale. L'analyse du clustering hiérarchisé montre que cette corrélation entre CDX2 et la voie Wnt pourrait aussi être le résultat de fluctuation identique selon le contexte génétique général de l'adénocarcinome mucineux colique. En effet, dans les cas associant un CDX2 diminué malgré son amplification et une faible expression de la bêta-caténine, la mutation de BRAF est détectée et le phénotype CIMP-H probable. Finalement, l'interaction de la voie Wnt et de CDX2 dans la différenciation des cellules épithéliales ne semble pas être altérée dans les adénocarcinomes mucineux, ne favorisant pas l'action de CDX2 sur la stimulation de la composante épithéliale sécrétoire.

Les anomalies de CDX2 ont été rapportées dans la littérature comme associées à un plus mauvais pronostic [76,78–80,83,102,103,109]. En particulier, l'impact de la perte d'expression de CDX2 est débattu. Dans certaines études, aucune valeur pronostique indépendante n'est retrouvée [78] alors que dans une étude de 2115 tumeurs de stade II et III, Dalerba et coll. observaient que les tumeurs ayant perdu l'expression de CDX2 présentaient des taux de survie sans progression à 5 ans plus faibles que les tumeurs ayant conservé l'expression de CDX2 [79]. L'expression de CDX2 serait un marqueur en faveur du bénéfice de l'introduction d'une chimiothérapie adjuvante dans les tumeurs de stade II, apportant un gain de survie significatif. Dans notre étude, douze des quinze tumeurs avec gain/amplification du gène CDX2 étaient associées de façon significative à un stade métastatique ganglionnaire ou viscéral lors du bilan d'extension initial. Nos données sont en accord avec les données de la littérature, où il est rapporté que le gain du chromosome 13q est associé à un stade tumoral avancé [8,83]. Ces données sont en faveur de la survenue tardive de l'amplification du gène CDX2 dans l'oncogenèse en plusieurs étapes des cancers colorectaux et plus particulièrement des adénocarcinomes mucineux. L'amplification de CDX2 apparaît donc comme un marqueur pronostique péjoratif. Il faut noter que l'amplification de CDX2 n'est pas mutuellement exclusive avec la diminution d'expression de CDX2. Par conséquent, la valeur pronostique de l'amplification de CDX2 n'est pas en contradiction avec celle de la perte d'expression de CDX2. Le rôle oncogène de l'amplification/gain du gène CDX2 a été suggéré à partir d'étude in vitro de lignées cellulaires de cancer du côlon [8]. Dans ces lignées portant l'amplification de CDX2, l'inhibition génétique de CDX2 entraîne l'apoptose rapide des cellules, montrant que la survie de ces lignées dépend de CDX2. Ces observations suggèrent par conséquent que CDX2 est une cible thérapeutique d'intérêt pour les adénocarcinomes colorectaux métastatiques. Toutefois l'expression de CDX2 à un niveau élevé et son rôle dans la survie et le maintien de la différenciation de la crypte intestinale à l'état normal le rendent difficilement « druggable » in vivo chez l'homme. L'observation de la persistance probable de l'interaction entre CDX2 et la voie de signalisation Wnt dans les adénocarcinomes mucineux constitue un argument pour cibler plutôt le nœud de cette interaction qui est le facteur de transcription TCF4, dont il a été montré qu'il était « druggable » [110].

En conclusion, cette étude montre que les anomalies du gène CDX2 sont fréquentes dans les adénocarcinomes mucineux colorectaux quel que soit leur contexte génétique de fond, MSS ou MSI. L'expression de CDX2 n'est pas corrélée à l'amplification du gène dans les adénocarcinomes mucineux coliques mais au niveau d'expression de la voie Wnt/bêta-caténine. L'amplification du gène CDX2, souvent associée au gain du chromosome 13q, est un phénomène tardif de l'oncogenèse colique en plusieurs étapes et constitue un marqueur de mauvais pronostic.

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] Hamilton S, Bosman F, Boffeta P. Carcinoma of the colon and rectum. Bosman FT Carneiro F Hruban RH Etal Eds WHO Classif. Tumours Dig. Syst., Lyon: International Agency for Research on Cancer: 2010, p. 131–82.
- [2] Guo R-J, Suh ER, Lynch JP. The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer Biol Ther* 2004;3:593–601.
- [3] Kawai H, Tomii K, Toyooka S, Yano M, Murakami M, Tsukuda K, et al. Promoter methylation downregulates CDX2 expression in colorectal carcinomas. *Oncol Rep* 2005;13:547–51.
- [4] Jiang G, Luo C, Sun M, Zhao Z, Li W, Chen K, et al. Methylation of CDX2 as a Predictor in Poor Clinical Outcome of Patients with Colorectal Cancer. *Genet Test Mol Biomark* 2016;20:710–4. doi:10.1089/gtmb.2016.0136.
- [5] Bae JM, Rhee Y-Y, Kim KJ, Wen X, Song YS, Cho N-Y, et al. Are clinicopathological features of colorectal cancers with methylation in half of CpG island methylator phenotype panel markers different from those of CpG island methylator phenotype–high colorectal cancers? *Hum Pathol* 2016;47:85–94. doi:10.1016/j.humpath.2015.09.008.
- [6] Wang Y, Li Z, Li W, Liu S, Han B. Methylation of promoter region of CDX2 gene in colorectal cancer. *Oncol Lett* 2016. doi:10.3892/ol.2016.5109.
- [7] Yagi OK, Akiyama Y, Yuasa Y. Genomic structure and alterations of homeobox gene CDX2 in colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 1999;79:440.
- [8] Salari K, Spulak ME, Cuff J, Forster AD, Giacomini CP, Huang S, et al. CDX2 is an amplified lineage-survival oncogene in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:E3196–205. doi:10.1073/pnas.1206004109.
- [9] Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff A, Bossard N. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 – Tumeurs solides. Saint-Maurice (Fra): Institut de veille sanitaire; 2013.
- [10] Symonds DA, Vickery AL. Mucinous carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 1976;37:1891–900. doi:10.1002/1097-0142(197604)37:4<1891::AID-CNCR2820370439>3.0.CO;2-Z.
- [11] Umpleby HC, Ranson DL, Williamson RCN. Peculiarities of mucinous colorectal carcinoma. *Br J Surg* 1985;72:715–8. doi:10.1002/bjs.1800720915.
- [12] Hyngstrom JR, Hu C-Y, Xing Y, You YN, Feig BW, Skibber JM, et al. Clinicopathology and Outcomes for Mucinous and Signet Ring Colorectal Adenocarcinoma: Analysis from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol* 2012;19:2814–21. doi:10.1245/s10434-012-2321-7.
- [13] Kang HMD, O'Connell JBMD, Maggard MAMD, Sack JMD, Ko CYMD. A 10-Year Outcomes Evaluation of Mucinous and Signet-Ring Cell Carcinoma of the Colon and Rectum. *Dis Colon Rectum* 2005;48:1161–8. doi:10.1007/s10350-004-0932-1.
- [14] Wang M-J, Ping J, Li Y, Holmqvist A, Adell G, Arbman G, et al. Prognostic Significance and Molecular Features of Colorectal Mucinous Adenocarcinomas: A Strobe-Compliant Study. *Medicine (Baltimore)* 2015;94. doi:10.1097/MD.0000000000002350.
- [15] Hugen N, Beek JJP van, Wilt JHW de, Nagtegaal ID. Insight into Mucinous Colorectal Carcinoma: Clues from Etiology. *Ann Surg Oncol* 2014;21:2963–70. doi:10.1245/s10434-014-3706-6.
- [16] Hugen N, Simons M, Halilović A, van der Post RS, Bogers AJ, Marijnissen-van Zanten MA, et al. The molecular background of mucinous carcinoma beyond MUC2: Molecular background of mucinous carcinoma. *J Pathol Clin Res* 2015;1:3–17. doi:10.1002/cjp2.1.
- [17] Liddell C, Droy-Dupre L, Metairie S, Airaud F, Volteau C, Beziau S, et al. Mapping clinicopathological entities within colorectal mucinous adenocarcinomas : a hierarchical clustering approach. *Mod Pathol* n.d.
- [18] Phelip J, Bouché O, Conroy T, Michel P, Penna C, Tournigand C, et al. Cancer du colon métastatique. *Thésaurus Natl. Cancérologie Dig.*, 2016.

- [19] Gérard J, André T, Bibeau F, Conroy T, Legoux J, Portier G. Cancer du rectum. *Thésaurus Natl. Cancérologie Dig.*, 2016.
- [20] Lecomte T, André T, Panis Y, Laurent-Puig L, Bibeau F, Taieb J. Cancer du côlon non métastatique. *Thésaurus Natl. Cancérologie Dig.*, 2016.
- [21] Verhulst J, Ferdinande L, Demetter P, Ceelen W. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol* 2012;65:381–8. doi:10.1136/jclinpath-2011-200340.
- [22] Hugen N, Brown G, Glynne-Jones R, de Wilt JHW, Nagtegaal ID. Advances in the care of patients with mucinous colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13:361–9. doi:10.1038/nrclinonc.2015.140.
- [23] Hugen N, Verhoeven RHA, Radema SA, Hingh D, T IJH, Pruijt JFM, et al. Prognosis and value of adjuvant chemotherapy in stage III mucinous colorectal carcinoma. *Ann Oncol* 2013;24:2819–24. doi:10.1093/annonc/mdt378.
- [24] Hogan J, Burke JP, Samaha G, Condon E, Waldron D, Faul P, et al. Overall survival is improved in mucinous adenocarcinoma of the colon. *Int J Colorectal Dis* 2014;29:563–9. doi:10.1007/s00384-013-1826-2.
- [25] Hugen N, Velde CJ van de, Bosch SL, Fütterer JJ, Elferink MA, Marijnen CA, et al. Modern Treatment of Rectal Cancer Closes the Gap Between Common Adenocarcinoma and Mucinous Carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2015;22:2669–76. doi:10.1245/s10434-014-4339-5.
- [26] Nagtegaal ID, Quirke P. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008;26:303–12. doi:10.1200/JCO.2007.12.7027.
- [27] Numata M, Shiozawa M, Watanabe T, Tamagawa H, Yamamoto N, Morinaga S, et al. The clinicopathological features of colorectal mucinous adenocarcinoma and a therapeutic strategy for the disease. *World J Surg Oncol* 2012;10:109. doi:10.1186/1477-7819-10-109.
- [28] Catalano V, Loupakis F, Graziano F, Torresi U, Bissoni R, Mari D, 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* 2009;100:881–7. doi:10.1038/sj.bjc.6604955.
- [29] Negri FV, Wotherspoon A, Cunningham D, Norman AR, Chong G, Ross PJ. Mucinous histology predicts for reduced fluorouracil responsiveness and survival in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 2005;16:1305–10. doi:10.1093/annonc/mdi244.
- [30] Lemmens VE, Klaver YL, Verwaal VJ, Rutten HJ, Coebergh JWW, de Hingh IH. Predictors and survival of synchronous peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: A population-based study. *Int J Cancer* 2011;128:2717–25. doi:10.1002/ijc.25596.
- [31] Franko J, Shi Q, Goldman CD, Pockaj BA, Nelson GD, Goldberg RM, et al. Treatment of Colorectal Peritoneal Carcinomatosis With Systemic Chemotherapy: A Pooled Analysis of North Central Cancer Treatment Group Phase III Trials N9741 and N9841. *J Clin Oncol* 2012;30:263–7. doi:10.1200/JCO.2011.37.1039.
- [32] Mekenkamp LJM, Heesterbeek KJ, Koopman M, Tol J, Teerenstra S, Venderbosch S, et al. Mucinous adenocarcinomas: Poor prognosis in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2012;48:501–9. doi:10.1016/j.ejca.2011.12.004.
- [33] Viganò L, Russolillo N, Ferrero A, De Rosa G, Ferreri E, Forchino F, et al. Resection of liver metastases from colorectal mucinous adenocarcinoma: is this a different disease? Results of a case-control study. *Ann Surg* 2014;260:878-884-885. doi:10.1097/SLA.0000000000000981.
- [34] Lupinacci RM, Mello ES, Coelho FF, Kruger JAP, Perini MV, Pinheiro RS, et al. Prognostic implication of mucinous histology in resected colorectal cancer liver metastases. *Surgery* 2014;155:1062–8. doi:10.1016/j.surg.2014.01.011.
- [35] Shin US, Yu CS, Kim JH, Kim TW, Lim S-B, Yoon SN, et al. Mucinous Rectal Cancer: Effectiveness of Preoperative Chemoradiotherapy and Prognosis. *Ann Surg Oncol* 2011;18:2232–9. doi:10.1245/s10434-011-1612-8.

- [36] Simha V, Kapoor R, Gupta R, Bahl A, Nada R. Mucinous adenocarcinoma of the rectum: a poor candidate for neo-adjuvant chemoradiation? *J Gastrointest Oncol* 2014;5:276–9. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2014.020.
- [37] Garcia-Aguilar J, Chen Z, Smith DD, Li W, Madoff RD, Cataldo P, et al. Identification of a biomarker profile associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. *Ann Surg* 2011;254:486–93. doi:10.1097/SLA.0b013e31822b8cfa.
- [38] Stylianopoulos T, Jain RK. Combining two strategies to improve perfusion and drug delivery in solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:18632–7. doi:10.1073/pnas.1318415110.
- [39] Wendum D, Boëlle P-Y, Rigau V, Sebbagh N, Olschwang S, Mourra N, et al. Mucinous colon carcinomas with microsatellite instability have a lower microvessel density and lower vascular endothelial growth factor expression. *Virchows Arch* 2003;442:111–7. doi:10.1007/s00428-002-0737-3.
- [40] Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:19–33. doi:10.1038/nrm3721.
- [41] VanDussen KL, Carulli AJ, Keeley TM, Patel SR, Puthoff BJ, Magness ST, et al. Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* 2012;139:488–97. doi:10.1242/dev.070763.
- [42] Kazanjian A, Shroyer NF. NOTCH Signaling and ATOH1 in Colorectal Cancers. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2011;7:121–7. doi:10.1007/s11888-011-0090-5.
- [43] Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D, Artavanis-Tsakonas S. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 2005;435:964–8. doi:10.1038/nature03589.
- [44] Sekine A, Akiyama Y, Yanagihara K, Yuasa Y. Hath1 up-regulates gastric mucin gene expression in gastric cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344:1166–71. doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.238.
- [45] Leow CC, Romero MS, Ross S, Polakis P, Gao W-Q. Hath1, Down-Regulated in Colon Adenocarcinomas, Inhibits Proliferation and Tumorigenesis of Colon Cancer Cells. *Cancer Res* 2004;64:6050–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0290.
- [46] Souazé F, Bou-Hanna C, Kandel C, Leclair F, Devallière J, Charreau B, et al. Differential Roles of Hath1, MUC2 and P27Kip1 in Relation with Gamma-Secretase Inhibition in Human Colonic Carcinomas: A Translational Study. *PLOS ONE* 2013;8:e55904. doi:10.1371/journal.pone.0055904.
- [47] van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002;111:241–50.
- [48] Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 2003;17:1709–13. doi:10.1101/gad.267103.
- [49] Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 1998;19:379–83. doi:10.1038/1270.
- [50] Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MMW, Sancho E, Huls G, et al. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 2002;111:251–63.
- [51] Peignon G, Durand A, Cacheux W, Ayrault O, Terris B, Laurent-Puig P, et al. Complex interplay between  $\beta$ -catenin signalling and Notch effectors in intestinal tumorigenesis. *Gut* 2011;60:166–76. doi:10.1136/gut.2009.204719.
- [52] Gao N, White P, Kaestner KH. Establishment of Intestinal Identity and Epithelial-Mesenchymal Signaling by Cdx2. *Dev Cell* 2009;16:588–99. doi:10.1016/j.devcel.2009.02.010.
- [53] Stevens ML, Chaturvedi P, Rankin SA, Macdonald M, Jagannathan S, Yukawa M, et al. Genomic integration of Wnt/ $\beta$ -catenin and BMP/Smad1 signaling coordinates foregut and hindgut transcriptional programs. *Development* 2017;144:1283–95. doi:10.1242/dev.145789.

- [54] Freund J-N. [Identity and intestinal pathologies: the Cdx2 homeotic gene]. *Ann Pathol* 2012;32:S24-27. doi:10.1016/j.annpat.2012.08.005.
- [55] Ven C van de, Bialecka M, Neijts R, Young T, Rowland JE, Stringer EJ, et al. Concerted involvement of Cdx/Hox genes and Wnt signaling in morphogenesis of the caudal neural tube and cloacal derivatives from the posterior growth zone. *Development* 2011;138:3451–62. doi:10.1242/dev.066118.
- [56] Rawat VPS, Humphries RK, Buske C. Beyond Hox: the role of ParaHox genes in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 2012;120:519–27. doi:10.1182/blood-2012-02-385898.
- [57] Verzi MP, Shin H, Ho L-L, Liu XS, Shivdasani RA. Essential and Redundant Functions of Caudal Family Proteins in Activating Adult Intestinal Genes. *Mol Cell Biol* 2011;31:2026. doi:10.1128/MCB.01250-10.
- [58] Chan CW, Wong NA, Liu Y, Bicknell D, Turley H, Hollins L, et al. Gastrointestinal differentiation marker Cytokeratin 20 is regulated by homeobox gene CDX1. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:1936–1941.
- [59] Freund J-N. Extending the functions of the homeotic transcription factor Cdx2 in the digestive system through nontranscriptional activities. *World J Gastroenterol* 2015;21:1436. doi:10.3748/wjg.v21.i5.1436.
- [60] Stringer EJ, Duluc I, Saandi T, Davidson I, Bialecka M, Sato T, et al. Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm. *Development* 2012;139:465–74. doi:10.1242/dev.070722.
- [61] Aoki K, Kakizaki F, Sakashita H, Manabe T, Aoki M, Taketo MM. Suppression of Colonic Polyposis by Homeoprotein CDX2 through its Nontranscriptional Function that Stabilizes p27Kip1. *Cancer Res* 2011;71:593–602. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2842.
- [62] Bai Y-Q, Miyake S, Iwai T, Yuasa Y. CDX2, a homeobox transcription factor, upregulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene. *Oncogene* 2003;22:7942–9. doi:10.1038/sj.onc.1206634.
- [63] Guo R-J, Funakoshi S, Lee HH, Kong J, Lynch JP. The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits  $\beta$ -catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the  $\beta$ -catenin–TCF protein complex. *Carcinogenesis* 2010;31:159. doi:10.1093/carcin/bgp213.
- [64] Mutoh H, Sakamoto H, Hayakawa H, Arao Y, Satoh K, Nokubi M, et al. The intestine-specific homeobox gene Cdx2 induces expression of the basic helix–loop–helix transcription factor Math1. *Differentiation* 2006;74:313–21. doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00074.x.
- [65] Verzi MP, Shin H, He HH, Sulahian R, Meyer CA, Montgomery RK, et al. Differentiation-Specific Histone Modifications Reveal Dynamic Chromatin Interactions and Partners for the Intestinal Transcription Factor CDX2. *Dev Cell* 2010;19:713–26. doi:10.1016/j.devcel.2010.10.006.
- [66] Tamagawa Y, Ishimura N, Uno G, Yuki T, Kazumori H, Ishihara S, et al. Notch signaling pathway and Cdx2 expression in the development of Barrett’s esophagus. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 2012;92:896–909. doi:10.1038/labinvest.2012.56.
- [67] Verzi MP, Hatzis P, Sulahian R, Philips J, Schuijers J, Shin H, et al. TCF4 and CDX2, major transcription factors for intestinal function, converge on the same cis-regulatory regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:15157. doi:10.1073/pnas.1003822107.
- [68] Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund J-N, et al. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the *CDX2* and *MUC2* genes. *J Cell Biol* 2004;166:37–47. doi:10.1083/jcb.200311021.
- [69] Rings EHM, Boudreau F, Taylor JK, Moffett J, Suh ER, Traber PG. Phosphorylation of the serine 60 residue within the Cdx2 activation domain mediates its transactivation capacity. *Gastroenterology* 2001;121:1437–50. doi:10.1053/gast.2001.29618.
- [70] Gross I, Lhermitte B, Domon-Dell C, Duluc I, Martin E, Gaiddon C, et al. Phosphorylation of the homeotic tumor suppressor Cdx2 mediates its ubiquitin-dependent proteasome degradation. *Oncogene* 2005;24:7955.
- [71] Coskun M. The role of CDX2 in inflammatory bowel disease. *Dan Med J* 2014;61:B4820.
- [72] Darsigny M, Babeu J-P, Dupuis A-A, Furth EE, Seidman EG, Lévy E, et al. Loss of hepatocyte-nuclear-factor-4alpha affects colonic ion transport and causes chronic inflammation resembling

- inflammatory bowel disease in mice. *PLoS One* 2009;4:e7609. doi:10.1371/journal.pone.0007609.
- [73] Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, Van Goudoever JB, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 2006;131:117–29. doi:10.1053/j.gastro.2006.04.020.
- [74] Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2003;27:303–310.
- [75] Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, Spichtin H, Stoios D, Bundi M, et al. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2004;17:1392–9. doi:10.1038/modpathol.3800205.
- [76] Bae JM. Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2015;21:1457. doi:10.3748/wjg.v21.i5.1457.
- [77] Moskaluk CA, Zhang H, Powell SM, Cerilli LA, Hampton GM, Frierson HF. Cdx2 Protein Expression in Normal and Malignant Human Tissues: An Immunohistochemical Survey Using Tissue Microarrays. *Mod Pathol* 2003;16:913–9. doi:10.1097/01.MP.0000086073.92773.55.
- [78] Baba Y, Noshio K, Shima K, Freed E, Irahara N, Philips J, et al. Relationship of CDX2 Loss with Molecular Features and Prognosis in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:4665–73. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0401.
- [79] Dalerba P, Sahoo D, Paik S, Guo X, Yothers G, Song N, et al. CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med* 2016;374:211–22. doi:10.1056/NEJMoa1506597.
- [80] Lugli A, Tzankov A, Zlobec I, Terracciano LM. Differential diagnostic and functional role of the multi-marker phenotype CDX2/CK20/CK7 in colorectal cancer stratified by mismatch repair status. *Mod Pathol* 2008;21:1403–1412.
- [81] Hong KD, Lee D, Lee Y, Lee SI, Moon HY. Reduced CDX2 expression predicts poor overall survival in patients with colorectal cancer. *Am Surg* 2013;79:353–60.
- [82] Olsen J, Espersen MLM, Jess P, Kirkeby LT, Troelsen JT. The clinical perspectives of CDX2 expression in colorectal cancer: A qualitative systematic review. *Surg Oncol* 2014;23:167–76. doi:10.1016/j.suronc.2014.07.003.
- [83] Network TCGA. Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer. *Nature* 2012;487:330. doi:10.1038/nature11252.
- [84] Krueger F, Madeja Z, Hemberger M, McMahon M, Cook SJ, Gaunt SJ. Down-regulation of Cdx2 in colorectal carcinoma cells by the Raf–MEK–ERK 1/2 pathway. *Cell Signal* 2009;21:1846–56. doi:10.1016/j.cellsig.2009.07.020.
- [85] Pino MS, Chung DC. THE CHROMOSOMAL INSTABILITY PATHWAY IN COLON CANCER. *Gastroenterology* 2010;138:2059–72. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.065.
- [86] Subtil C, Guérin E, Schneider A, Chenard M-P, Martin E, Domon-Dell C, et al. Frequent rearrangements and amplification of the CDX2 homeobox gene in human sporadic colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Lett* 2007;247:197–203. doi:10.1016/j.canlet.2006.04.004.
- [87] Scholl C, Bansal D, Döhner K, Eiwien K, Huntly BJP, Lee BH, et al. The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis. *J Clin Invest* 2007;117:1037–48. doi:10.1172/JCI30182.
- [88] Sobin L, Brierley J. Colon and rectum. *TNM Classif. Malig. Tumours*. 7th edn, Wiley-Blackwell, Oxford: Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (eds); 2009, p. 100–5.
- [89] Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002;123:1804–11. doi:10.1053/gast.2002.37070.
- [90] Hugen N, Simmer F, Mekenkamp LJ, Koopman M, van den Broek E, de Wilt JH, et al. Reduced rate of copy number aberrations in mucinous colorectal carcinoma. *Oncotarget* 2015;6:25715–25725.



- [91] Kim M, Yim S, Kwon M, Kim T, Shin S, Kang H, et al. Recurrent Genomic Alterations With Impact on Survival in Colorectal Cancer Identified by Genome-Wide Array Comparative Genomic Hybridization. *Gastroenterology* 2006;131:1913–24. doi:10.1053/j.gastro.2006.10.021.
- [92] Platzer P, Upender MB, Wilson K, Willis J, Lutterbaugh J, Nosrati A, et al. Silence of chromosomal amplifications in colon cancer. *Cancer Res* 2002;62:1134–1138.
- [93] Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schröck E, Heselmeyer K, et al. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;15:234–245.
- [94] Abdel-Rahman WM, Katsura K, Rens W, Gorman PA, Sheer D, Bicknell D, et al. Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2538–43. doi:10.1073/pnas.041603298.
- [95] Lin EI, Tseng L-H, Gocke CD, Reil S, Le DT, Azad NS, et al. Mutational profiling of colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncotarget* 2015;6:42334. doi:10.18632/oncotarget.5997.
- [96] Deng G, Kakar S, Tanaka H, Matsuzaki K, Miura S, Sleisenger MH, et al. Proximal and distal colorectal cancers show distinct gene-specific methylation profiles and clinical and molecular characteristics. *Eur J Cancer* 2008;44:1290–301. doi:10.1016/j.ejca.2008.03.014.
- [97] Ahadova A, von Knebel Doeberitz M, Bläker H, Kloor M. CTNNB1-mutant colorectal carcinomas with immediate invasive growth: a model of interval cancers in Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2016;15:579–86. doi:10.1007/s10689-016-9899-z.
- [98] Johnson V. Exon 3 -catenin mutations are specifically associated with colorectal carcinomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Gut* 2005;54:264–7. doi:10.1136/gut.2004.048132.
- [99] Albuquerque C, Baltazar C, Filipe B, Penha F, Pereira T, Smits R, et al. Colorectal cancers show distinct mutation spectra in members of the canonical WNT signaling pathway according to their anatomical location and type of genetic instability. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:746–59. doi:10.1002/gcc.20786.
- [100] Benahmed F, Gross I, Gaunt SJ, Beck F, Jehan F, Domon-Dell C, et al. Multiple Regulatory Regions Control the Complex Expression Pattern of the Mouse Cdx2 Homeobox Gene. *Gastroenterology* 2008;135:1238–1247.e3. doi:10.1053/j.gastro.2008.06.045.
- [101] Fang M, Ou J, Hutchinson L, Green MR. The BRAF Oncoprotein Functions through the Transcriptional Repressor MAFG to Mediate the CpG Island Methylator Phenotype. *Mol Cell* 2014;55:904–15. doi:10.1016/j.molcel.2014.08.010.
- [102] Kim JH, Rhee Y-Y, Bae JM, Cho N-Y, Kang GH. Loss of CDX2/CK20 expression is associated with poorly differentiated carcinoma, the CpG island methylator phenotype, and adverse prognosis in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2013;37:1532–1541.
- [103] Hinoi T, Tani M, Lucas PC, Caca K, Dunn RL, Macri E, et al. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol* 2001;159:2239–48. doi:10.1016/S0002-9440(10)63074-X.
- [104] Yamamoto H, Bai Y-Q, Yuasa Y. Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:813–8. doi:10.1016/S0006-291X(02)02935-2.
- [105] Tozawa E, Ajioka Y, Watanabe H, Nishikura K, Mukai G, Suda T, et al. Mucin expression, p53 overexpression, and peritumoral lymphocytic infiltration of advanced colorectal carcinoma with mucus component: Is mucinous carcinoma a distinct histological entity? *Pathol - Res Pract* 2007;203:567–74. doi:10.1016/j.prp.2007.04.013.
- [106] Park SY, Lee HS, Choe G, Chung JH, Kim WH. Clinicopathological characteristics, microsatellite instability, and expression of mucin core proteins and p53 in colorectal mucinous adenocarcinomas in relation to location. *Virchows Arch* 2006;449:40–7. doi:10.1007/s00428-006-0212-7.

- [107] Hanski C, Hofmeier M, Schmitt-Gräff A, Riede E, Hanski ML, Borchard F, et al. Overexpression or ectopic expression of MUC2 is the common property of mucinous carcinomas of the colon, pancreas, breast, and ovary. *J Pathol* 1997;182:385–91. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199708)182:4<385::AID-PATH861>3.0.CO;2-Q.
- [108] Walsh MD, Clendenning M, Williamson E, Pearson S-A, Walters RJ, Nagler B, et al. Expression of MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 mucins in colorectal cancers and their association with the CpG island methylator phenotype. *Mod Pathol* 2013;26:1642–1656.
- [109] Winn B, Tavares R, Matoso A, Noble L, Fanion J, Waldman SA, et al. Expression of the intestinal biomarkers Guanylyl cyclase C and CDX2 in poorly differentiated colorectal carcinomas. *Hum Pathol* 2010;41:123–8. doi:10.1016/j.humpath.2009.07.009.
- [110] Yan M, Li G, An J. Discovery of small molecule inhibitors of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway by targeting  $\beta$ -catenin/Tcf4 interactions. *Exp Biol Med* 2017;242:1185–97. doi:10.1177/1535370217708198.

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

Pr Jean-François Mosnier

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

Pr Jean-François Mosnier

Vu, le Doyen de la Faculté,

Professeur Pascal JOLLIET

NOM : DANSETTE

PRENOM : Delphine

**Titre de Thèse :**

**ETUDE DES VARIATIONS DE L'EXPRESSION DE CDX2 DANS LES ADENOCARCINOMES MUCINEUX COLIQUES**

---

### RESUME

L'objectif était d'étudier le type et la fréquence des anomalies de CDX2 dans les adénocarcinomes mucineux colorectaux et de préciser leur contexte génétique. L'expression de CDX2 était étudiée en immunohistochimie et l'amplification de CDX2 par FISH dans 60 tumeurs. Cette étude montre que l'amplification du gène CDX2 est fréquente (25%) et la perte rare (5%). Ces deux anomalies ne sont pas mutuellement exclusives. L'expression de CDX2 évolue parallèlement au niveau d'activation de la voie Wnt/bêta-caténine. L'amplification du gène CDX2, souvent associée au gain du chromosome 13q, est un phénomène tardif de l'oncogenèse colique en plusieurs étapes et constitue un marqueur de mauvais pronostic.

---

### MOTS-CLES

**Adénocarcinome mucineux colorectal ; CDX2 ; oncogène ; voie Wnt.**