

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE (547)

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement par

CAMILLE BOULAGNON-ROMBI

Le 28 juin 2017

**ETUDE DU REPECTEUR D'ENDOCYTOSE LRP1 DANS LES ADENOCARCINOMES COLIQUES :
CARACTERISTIQUES CLINIQUES, PATHOLOGIQUES ET MOLECULAIRES ASSOCIEES ET
VALEUR PRONOSTIQUE**

Thèse dirigée par **GEORGES BELLON**

JURY

Mme Marie-Danièle DIEBOLD,	Professeur,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Président
M. Georges BELLON,	MCU-PH,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Directeur de thèse
M. Frédéric BIBEAU,	Professeur,	Université de Caen,	Rapporteur
M. Georges NOEL,	Professeur,	Université de Strasbourg,	Rapporteur
Mme Séverine VALMARY-DEGANO,	Professeur,	Université de Besançon,	Rapporteur
M. Stéphane DEDIEU,	Professeur,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Examineur
M. Christophe SCHNEIDER,	Docteur,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Invité

Résumé

Titre : Etude du récepteur d'endocytose LRP1 dans les adénocarcinomes coliques : caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires associées et valeur pronostique

LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1), un récepteur endocyttaire multifonctionnel, a récemment été identifié comme pivot d'un réseau de biomarqueurs pour la prédiction pronostique de plusieurs types de cancers. Son rôle dans le cancer du côlon n'a pas été caractérisé. Notre travail porte sur l'étude de la relation entre expression de LRP1 et cancer du côlon.

L'expression de l'ARNm LRP1 a été déterminée dans des échantillons d'adénocarcinome et de muqueuses coliques appariées, ainsi que dans les cellules stromales et tumorales obtenues après microdissection laser. Les associations clinicopathologiques et moléculaires ont été étudiées par immunohistochimie dans une série de cancer colique (n = 307). La présence de méthylation ou mutation du gène LRP1 et l'expression de miR-205 ont été évaluées et comparées aux niveaux d'expression de LRP1.

L'ARNm de LRP1 est sous exprimé dans les cellules d'adénocarcinome colique par rapport à la muqueuse colique par rapport aux cellules stromales. La faible expression immunohistochimique de LRP1 dans les adénocarcinomes était associée à un âge plus élevé, à localisation droite, une perte d'expression de CDX2, une expression d'Annexine A10, un statut CIMP-H, MSI-H et BRAFV600E muté. Cette faible expression était associée à un mauvais pronostic, en particulier chez les patients de stade IV. Les mutations du gène LRP1 entraînaient une sous-expression de LRP1. L'expression était peu modifiée par miR-205. Le promoteur de LRP1 n'était jamais méthylé.

La perte d'expression de LRP1 est associée à un profil clinico-pathologique et moléculaire particulier et à un mauvais pronostic dans les cancers du côlon.

Mots clés : Cancer colorectal, LRP1, BRAF, instabilité des microsatellites, miR-205

Title: Study of endocytosis receptor LRP1 in colon adenocarcinomas: associated clinical, pathological and molecular characteristics and prognosis impact

LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1), a multifunctional endocytic receptor, has recently been identified as a hub in a biomarker network for multi-cancer clinical outcome prediction. Its role in colon cancer has not been characterized. Here, we investigate the relationship between LRP1 and colon cancer.

LRP1 mRNA expression was determined in colon adenocarcinoma and paired colon mucosa samples, and in stromal and tumoral cells obtained after laser capture microdissection. The clinical potential was further investigated by immunohistochemistry in a population-based colon cancer series (n = 307). LRP1 methylation, mutation and miR-205 expression were evaluated and compared to LRP1 expression levels.

LRP1 mRNA levels are significantly decreased in colon adenocarcinoma cells compared to colon mucosa and stromal cells. Low LRP1 immunohistochemical expression in adenocarcinomas was associated with higher age, right-sided tumor, loss of CDX2 expression, Annexin A10 expression, CIMP-H, MSI-H and BRAFV600E mutation. Low LRP1 expression correlates with poor clinical outcome, especially in stage IV patients. LRP1 expression was downregulated by LRP1 mutation. LRP1 expression was slightly modified by miR-205 expression. LRP1 promoter was never methylated.

Loss of LRP1 expression is associated with peculiar clinicopathological and molecular characteristics and with worse colon cancer outcomes.

Keys Words: Colorectal cancer, LRP1, BRAF, microsatellite instability, miR-205

Thèse effectuée au sein de l'Equipe 1 : Protéolyse et Cancer, Work Package 1 : Régulation de la progression tumorale par endocytose de l'Unité MEDyC UMR CNRS/URCA N° 7369, dirigée par Mr le Professeur MAQUART.

« They didn't know it was impossible so they did it. »
Mark Twain

« Quand ça veut pas, ça veut pas »
Raymond Domenech, juin 2010

Table des matières

Résumé.....	3
Table des matières.....	5
Liste des communications et des publications.....	7
Liste des publications.....	7
Liste des communications.....	7
Communications orales.....	7
Communications affichées.....	8
Liste des abréviations.....	9
Liste des figures et tableaux.....	11
Liste des Figures.....	11
Liste des tableaux.....	12
Introduction.....	13
1. Les cancers du côlon.....	16
1.1 Epidémiologie, causes, facteurs de risque et prévention.....	16
1.1.1 Epidémiologie.....	17
1.1.2 Causes et facteurs de risques.....	21
1.1.3 Dépistage et prévention.....	24
1.2 Diagnostic du cancer colorectal.....	26
1.2.1 Clinique, endoscopie et imagerie.....	26
1.2.2 Diagnostic anatomopathologique.....	30
1.2.3 Les tests moléculaires.....	40
1.3 Voies de cancérogenèse colique.....	48
1.3.1 Voie classique : séquence adénome-adénocarcinome.....	50
1.3.2 Voie festonnée.....	51
1.4 Traitements.....	52
1.4.1 Chirurgie.....	52
1.4.2 Chimiothérapies.....	53
1.4.3 Thérapies ciblées.....	55
1.4.4 Radiothérapie.....	56
1.4.5 Options thérapeutiques par stade.....	57
1.5 Eléments pronostiques.....	58
1.5.1 Le stade tumoral.....	58
1.5.2 Le patient et le contexte opératoire.....	60
1.5.3 La localisation du cancer.....	61
1.5.4 Les critères histopronostiques.....	61
1.5.5 Les marqueurs moléculaires.....	62
2. Biomarqueurs et cancers du côlon.....	63
2.1 Définitions.....	63
2.2 Les biomarqueurs utilisés en cancérologie colorectale.....	65
2.2.1 Les biomarqueurs diagnostiques – de dépistage.....	65
2.2.2 Les biomarqueurs prédictifs.....	69
2.2.3 Les biomarqueurs pronostiques.....	72
3. LRP1 et cancer.....	75
3.1 LRP1 : structure et fonctions.....	75
3.1.1 Structure de LRP1.....	76
3.1.2 Fonctions de LRP1.....	81
3.2 Expression et rôle de LRP1 dans les cancers.....	87

3.2.1 Expression et rôle de LRP1 dans les cellules malignes	89
3.2.2 Expression et rôle de LRP1 dans les cellules du stroma tumoral.....	92
3.3 Régulation et modulation de l'expression de LRP1 dans les cancers	94
3.3.1. Altérations génétiques du gène LRP1 dans les cancers	94
3.3.2. Altérations épigénétiques du gène LRP1 dans les cancers	95
3.3.3. Régulation de LRP1 par les microARN dans les cancers	96
3.3.4. Shedding de LRP1 dans les cancers	96
3.4 Impact pronostique de LRP1 dans les cancers	98
3.5 Thérapeutiques anti-cancéreuses utilisant ou ciblant LRP1	103
4. LRP1 et cancers du côlon.....	106
But du travail	108
Manuscrit 1.....	110
Contexte scientifique.....	111
Principaux résultats	112
Conclusion.....	113
Manuscrit 2.....	123
Contexte scientifique.....	124
Principaux résultats	125
Conclusion.....	126
Manuscrit 3.....	145
Contexte scientifique.....	146
Principaux résultats	147
Conclusion.....	148
Discussion et perspectives.....	182
Partie méthodologique du travail de thèse : synthèse et perspectives.....	183
Partie principale du travail de thèse : discussion et perspective	184
1. Expression de LRP1 dans les tissus coliques sains et adénocarcinomateux	184
2. Expression de LRP1 dans les adénocarcinomes coliques : association clinico-pathologiques et moléculaires, et valeur pronostique	185
3. Régulation de l'expression de LRP1 dans les adénocarcinomes coliques.	187
4. Perspectives.....	189
Bibliographie.....	191
Annexes.....	221
Annexe 1 : Profil d'expression génique de LRP1 dans les tissus sains.	221
Annexe 2 : Niveaux d'expression de l'ARNm de LRP1 dans les lignées cellulaires d'adénocarcinome colorectaux.....	222

Liste des communications et des publications

Liste des publications

Boulagnon C, Duzdez O, Beaudoux O, Dalstein V, Kianmanesh R, Bouché O, Diebold MD. BRAF V600E gene mutation in colonic adenocarcinomas. Immunohistochemical detection using tissue microarray and clinicopathological characteristics: a 86 case series. *App Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24(2):88-96.

Galissier T, Schneider C, Nasri S, Kanagaratnam L, Fichel C, Coquelet C, Diebold M-D, Kianmanesh R, Bellon G, Dedieu S, Bressenot-Marchal A, **Boulagnon-Rombi C**. Biobanking of fresh-frozen human adenocarcinomatous and normal côlon tissues: which parameters influence RNA quality? *PloS One*. 2016;11(4):e0154326.

Boulagnon-Rombi C, Schneider C, Leandri C, Jeanne A, Grybek V, Marchal Bressenot A, Barbe C, Marquet B, Nasri S, Coquelet C, Fichel C, Bouland N, Bonnomet A, Kianmanesh R, Lebre A-S, Bouche O, Diebold M-D, Bellon G, Dedieu S. LRP1 expression in colon cancer predict clinical outcome. *Submitted May xx 2017 (Oncotarget)*

Liste des communications

Communications orales

Boulagnon C, Duzdez O, Beaudoux O, Dalstein V, Kianmanesh R, Bouché O, Diebold M- D. Detection of BRAF V600E gene mutation in colonic adenocarcinomas: Performance of immunohistochemistry using Tissue MicroArray. 7^{ème} forum du Cancéroole Grand Est, Strasbourg 25-26 novembre 2013

Boulagnon C, Duzdez O, Beaudoux O, Dalstein V, Kianmanesh R, Bouché O, Diebold M- D. Caractérisation immunohistochimique de la mutation BRAFV600E. Les caractéristiques clinico-pathologiques associées à cette mutation : à partir d'une série retropective de 86 cas de cancer colique. Carrefour de Pathologie, Paris 17-21 Novembre 2014

Boulagnon-Rombi C, Galissier T, Schneider C, Nasri S, Kanagaratnam L, Fichel C, Coquelet C, Diebold M-D, Kianmanesh R, Bressenot-Marchal A, Dedieu S, Bellon G. Biobanking of fresh-frozen human adenocarcinomatous and normal côlon tissues: which parameters influence RNA quality? Journée des Jeunes Chercheurs de la SFR CAP Santé, Amiens, 18 mars 2016.

Boulagnon-Rombi C, Galissier T, Schneider C, Nasri S, Kanagaratnam L, Fichel C, Coquelet C, Diebold M-D, Kianmanesh R, Bressenot-Marchal A, Dedieu S, Bellon G. Biobanking of fresh-frozen human adenocarcinomatous and normal côlon tissues: which parameters influence RNA quality? 14^{ème} Journée de la Recherche Clinique du CHU de Reims, 6 octobre 2016, Reims

Galissier T, Schneider C, Nasri S, Kanagaratnam L, Fichel C, Coquelet C, Diebold M-D, Kianmanesh R, Dedieu S, Bellon G, Bressenot-Marchal A, **Boulagnon-Rombi C**. Tissus coliques sains et tumoraux congelés issus des Biobanques : quels paramètres influencent la qualité des ARN ?
Carrefour de Pathologie, 7-10 novembre 2016, Paris

Communications affichées

Boulagnon C, Dudez O, Beaudoux O, Dalstein V, Kianmanesh R, Bouché O, Diebold M- D. Caractérisation immunohistochimique de la mutation BRAFV600E. Les caractéristiques clinico-pathologiques associées à cette mutation : à partir d'une série rétrospective de 86 cas de cancer colique.
JFOHD 2014, Paris 20-23 mars 2014

Galissier T, Schneider C, Nasri S, Kanagaratnam L, Fichel C, Coquelet C, Diebold M-D, Kianmanesh R, Bellon G, Dedieu S, Bressenot-Marchal A, **Boulagnon-Rombi C**. Biobanking of fresh-frozen human adenocarcinomatous and normal colon tissues: which parameters influence RNA quality?
9ème Forum du Cancéropôle Grand Est, Strasbourg, 12-13 Novembre 2015.

Boulagnon-Rombi C, Schneider C, Leandri C, Jeanne A, Grybek V, Marchal Bressenot A, Barbe C, Nasri S, Coquelet C, Fichel C, Bouland N, Bonnomet A, Lebre A-S, Bouche O, Diebold M-D, Bellon G, Dedieu S. Etude du récepteur LRP1 dans les adénocarcinomes coliques et détermination de sa valeur clinique
Journée des Jeunes Chercheurs de la SFR CAP Santé, Reims, 31 mars 2017.

Liste des abréviations

a2M	alpha2 Macroglobuline
A β	Protéine β Amyloïde
ACE	Antigène CarcinoEmbryonnaire
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
AF	Adénome Festonné
AKt	Protéine Kinase B
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
BACE	<i>Beta Secretase</i>
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BUDhigh/BUDlow	Important phénomène de <i>budding</i> /faible phénomène de <i>budding</i>
CAF	<i>Cancer Associated Fibroblast</i>
CCR1,2,3,4	<i>Cystein rich Complement domain Repeat 1,2,3,4</i>
CCR	Cancer colorectal
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CIN	Chromosomal instability
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
GDP	Guanosine Di-Phosphate
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
HAS	Haute Autorité de Santé
HNPCC/Syndrome de Lynch	<i>Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue</i>
LDL	<i>Low density Lipoprotein</i>
LDLR	<i>Low density Lipoprotein Receptor</i>
LRP1	<i>LDL-receptor related protein 1</i>
LRP1B	<i>LDL-receptor related protein 1 B</i>
LRP1-ICD	<i>LDL-receptor related protein 1 – Intracellular Domain</i>
LRP2/Mégaline	<i>LDL-receptor related protein 2</i>
LRP4/MEGF7	<i>LDL-receptor related protein 4 / Multiple Epidermal Growth Factor-like domains 7</i>
LRP5	<i>LDL-receptor related protein 5</i>
LRP6	<i>LDL-receptor related protein 6</i>
LRP8/apolipoprotein E receptor 2	<i>LDL-receptor related protein 8 / Apolipoprotein E receptor 2</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEK	<i>MAP Kinase – ERK Kinase</i>
MET	<i>MET proto-oncogene receptor tyrosine kinase / Hepatocyte Growth Factor Receptor</i>
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales
MINT	<i>Methylated in tumor</i>
miARN	microARN
MLH1	<i>human mutL homologue 1</i>
MSH2	<i>human mutS homologue 2</i>

MSH6	<i>human mutS homologue 6</i>
MSI	Microsatellites Instables : MSI-L (<i>Low</i>) quand < de 2 locus microsatellites sur 5 sont instables et MSI-H (<i>High</i>) quand plus de 2 locus microsatellites sur 5 sont instables
MMP	<i>Matrix MetalloProteinase</i>
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
MSS	Microsatellites Stables
MT-MMP	<i>Membrane Type- Matrix Metalloproteinase</i>
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycine</i>
MUTYH	<i>mutY DNA glycosylase</i>
NF1	Neurofibromine 1
NF-κB	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
NOS	<i>Not otherwise specified</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homologue</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
p53	Protéine de 53 000 Dalton régulant le cycle cellulaire
PAF	Polypose adénomateuse Familiale
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD-1	<i>Programmed cell Death 1</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGF-R	<i>Platelet Derived Growth Factor-Receptor</i>
PFS	Polype Festonné Sessile
PH	Polype Hyperplasique
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinases</i>
PIP3	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PMS2	<i>Post-Meiotic Segregation 2</i>
POLD1	<i>Polymerase Delta 1</i>
POLE	<i>Polymerase Epsilon</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10</i>
RAP	<i>Receptor-Associated Protein</i>
RASGAP	<i>RAS GTPase-activating protein</i>
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RCT	Radio-chimiothérapie
RE	Réticulum Endoplasmique
RER	<i>Replication Error Repeat</i>
RQI	<i>RNA Quality Index</i>
sLRP	<i>Soluble LDL-receptor related protein</i>
SCNA	<i>Somatic copy number alterations</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i>
SMAD2/4	<i>Similar Mothers Against Decapentaplegic homolog 2/4</i>
SNAIL	<i>Snail family transcriptional repressor</i>
SOS1	<i>Son of sevenless homolog 1</i>
SRE	<i>Sterol Regulatory Element</i>
TIMP-1	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 1</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i>
tPA	<i>tissue Plasminogen Activator</i>
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
uPA	<i>urokinase Plasminogen Activator</i>
VEFG	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cell</i>

Liste des figures et tableaux

• Liste des Figures

- Figure 1 : Anatomie du côlon.** page 16
- Figure 2 : Evolution de l'incidence du cancer colorectal dans le monde entre 1975 et 2012 [Globocan].**page 18
- Figure 3 : Évolution du nombre de cas incidents de cancer colorectal et de la mortalité par cancer colorectal chez l'homme et chez la femme de 1980 à 2012 en France [Bouvier].**page 19
- Figure 4 : Evolution de la mortalité liée au cancer colorectal dans le monde entre 1975 et 2012 [Globocan].**page 19
- Figure 5 : Recommandations de la haute autorité de santé pour le suivi post-polypectomie en fonction de la nature histologique de la lésion [HAS].**.....page 28
- Figure 6 : Classification OMS 2010 des tumeurs du côlon-rectum [Hamilton].**.....page 30
- Figure 7 : Classification TNM des cancers du côlon-rectum [TNM].**.....page 33
- Figure 8 : Illustration de la méthode de quantification de phénomène de *budding* selon la méthode de Wang [Wang LM].**.....page 37
- Figure 9 : Principe de fonctionnement du système *MisMatch Repair*.**.....page 41
- Figure 10 : La voie des MAP kinases [Becher].**.....page 44
- Figure 11. Les systèmes actuels de classification moléculaire des CCR [Müller].**...page 49
- Figure 12 : Séquence adénome-adénocarcinome de la cancérogenèse colorectale [Whalter].**page 50
- Figure 13 : Pourcentage de survie à 5 ans en fonction du stade UICC pour les patients atteints d'adénocarcinome colique.**.....page 59
- Figure 14 : Algorithme de décision thérapeutique pour les patients de stade II/III basée sur la prédiction pronostique de CDX2 et de l'instabilité microsatellitaire [Rodriguez-Salas].**.....page 71
- Figure 15 : Représentation schématique des principaux membres de la famille des protéines liées aux récepteurs des LDL [Wassan].**.....page 75
- Figure 16 : Représentation de l'organisation structurale de LRP1 et modélisation d'un des principaux domaine de répétitions riches en cystéines de type complément [Gonias].**.....page 77

Figure 17 : Meta-analyse de l'expression de l'ARNm de LRP1 dans de nombreux cancers et tissus sains appariés sur la plateforme web Oncomine (<https://www.oncomine.org>) [Meng]..... page 88

Figure 18 : Valeur pronostique de l'expression de l'ARNm dans les adénocarcinomes pulmonaires [Meng].....page 98

Figure 19 : Valeur pronostique de l'expression de l'ARNm et de la protéine LRP1 dans les adénocarcinomes pulmonaires [Meng].....page 99

Figure 20 : Valeur pronostique de LRP1 dans les carcinomes hépatocellulaires [Huang].....page 101

Figure 21 : Présentation du panel de biomarqueurs multi-réseau d'association clinique (multi-NCA) identifié dans l'étude de Martinez-Lesdema E et al. [Martinez].....page 102

Figure 22 : Principe d'action combinée de la molécule GRN1005 et de LRP1[Drappatz].....page 104

Figure 23 : Présentation schématique d'un mécanisme impliqué dans la baisse d'expression de LRP1 dans les cellules malignes et dans l'impact pronostique de cette baisse d'expression de LRP1 dans les cancers coliques..... page 188

- **Liste des tableaux**

Tableau I : Traitement des cancers coliques par stade.....page 34

Tableau II. Descripteurs, optionnels de la classification TNM de l'UICC, 2009 [TNM]..... page 35

Tableau III. Critères pour établir le grade histopathologique des adénocarcinomes colorectaux [Hamilton].....page 36

Tableau IV : Traitement des cancers coliques par stade..... page 57

Tableau V : Performance Status de l'Eastern Cooperative Oncology Group [Oken]...page 60

Tableau VI : Définitions de la sensibilité, spécificité, Valeur prédictive positive, valeur prédictive négative [Sarivalasis].....page 64

Première partie :

Introduction

Introduction

Le cancer colorectal (CCR) est un problème de santé publique majeur en France et dans le monde. Le CCR est le troisième cancer le plus fréquent et le quatrième cancer le plus mortel. Actuellement, la classification TNM est la seule classification utilisée pour décider du traitement des patients et évaluer ces traitements dans des groupes de patients homogènes. Cependant, cette classification est très mauvaise pour la prédiction pronostique des patients avec un CCR de stade intermédiaire (II et III) [Cancer.org, SEER]. Le stade TNM est complété par d'autres indicateurs pronostiques comme la présence d'invasion des vaisseaux et des nerfs. Au niveau moléculaire, la présence d'une instabilité des microsatellites (MSI) améliore le pronostic, alors que la présence d'une mutation *BRAF* est un facteur indépendant de mauvais pronostic. Des marqueurs moléculaires prédictifs de la réponse à la thérapie ciblée sont également utiles pour la décision thérapeutique. Ces marqueurs utilisés en pratique courante pour moduler la décision thérapeutique basée sur le stade tumoral sont encore insuffisants pour la prédiction individuelle du pronostic. D'autres marqueurs sont donc nécessaires pour améliorer la prédiction pronostique et la réponse au traitement.

LRP1 (*low density lipoprotein-receptor related protein 1*) est un récepteur d'endocytose multifonctionnel qui appartient à la famille des récepteurs LDL. Ce récepteur est impliqué dans la régulation de la protéolyse matricielle et dans la modulation de certaines voies de signalisation. De part ces multiples fonctions, LRP1 joue un rôle important dans la progression du cancer. En raison de sa multifonctionnalité, son rôle n'est pas toujours évident à appréhender et il varie d'un type de cancer à l'autre. Son rôle dans les cancers a majoritairement été étudié *in vitro* ou *in vivo*. Peu d'études cliniques ont évaluées son rôle pronostique dans des cohortes de patients mais ont tout de même permis de confirmer son rôle pronostique, notamment dans les cancers du poumon ou du foie.

L'expression de LRP1 a été très peu étudiée dans les cancers du côlon et uniquement sur des très petits nombres de cas. L'impact clinique et pronostique de l'expression de LRP1 dans les cancers coliques et son association à un profil moléculaire ou morphologique particulier n'a pas encore été étudié à ce jour. De plus, les mécanismes génétiques et épigénétiques impliqués dans la régulation de l'expression de LRP1 dans les cancers du côlon ne sont à ce jour pas connus.

Le but de ce travail de thèse est de décrire l'expression de LRP1 dans les tissus coliques sains et adénocarcinomateux dans une cohorte de patient et de déterminer les paramètres clinico-pathologiques et moléculaires associés à cette expression ainsi que sa valeur pronostique.

Avant de présenter les travaux et les principaux résultats, dans cette partie introductive en trois parties, nous allons exposer dans un premier temps les données actuelles portant sur le diagnostique, le pronostique et les traitements des cancers colorectaux. Dans une seconde partie, nous allons définir les biomarqueurs et présenter les principaux biomarqueurs actuels et en devenir utiles au diagnostique et à la prédiction thérapeutique et pronostique dans les cancers colorectaux. La dernière partie portera sur la description du rôle de LRP1 dans les conditions physiologiques et dans les cancers.

Cette partie introductive est suivie de la présentation de nos travaux. La première partie des travaux (manuscrits 1 et 2) est une partie de validation méthodologique de certaines techniques qui seront utilisées dans la partie principale du travail. La seconde partie (manuscrit 3) de nos travaux concerne l'évaluation de l'expression de LRP1 dans une série de cancers coliques ainsi que l'évaluation des paramètres clinico-pathologiques et moléculaires associés à l'expression de LRP1 et la détermination de sa valeur pronostique. Nous avons également étudiés certains mécanismes génétiques et épigénétiques qui pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression de LRP1 dans les cancers du côlon.

1. Les cancers du côlon

1.1 Épidémiologie, causes, facteurs de risque et prévention

Le cancer colorectal (CCR) est un cancer de l'adulte, et de l'adulte âgé. Il survient rarement avant 50 ans. Environ 40 % des cancers colorectaux touchent le rectum et 60 % le côlon, principalement dans sa partie sigmoïde (la plus distale, cf. Figure 1). La proportion de cancers proximaux (c'est à dire situé en amont de l'angle gauche/splénique) augmente avec l'âge des patients et est plus importante chez la femme [Cress, Hamilton, Siegel]. Depuis 1980, il a été constaté aux États-Unis une augmentation du ratio cancers proximaux/cancers sigmoïde-rectum [Cress]. Cette augmentation des cancers proximaux serait relative au dépistage des cancers du sigmoïde par sigmoidoscopie. Ce type d'endoscopie permet de retirer des lésions précancéreuses localisées au rectum et au sigmoïde et éviter l'évolution vers le cancer. Le cadre colique situé en amont du sigmoïde ne peut pas être examiné par cette technique et donc les lésions précancéreuses ne sont pas retirées et peuvent évoluer vers le cancer [Cress, Schoen, Zauber].

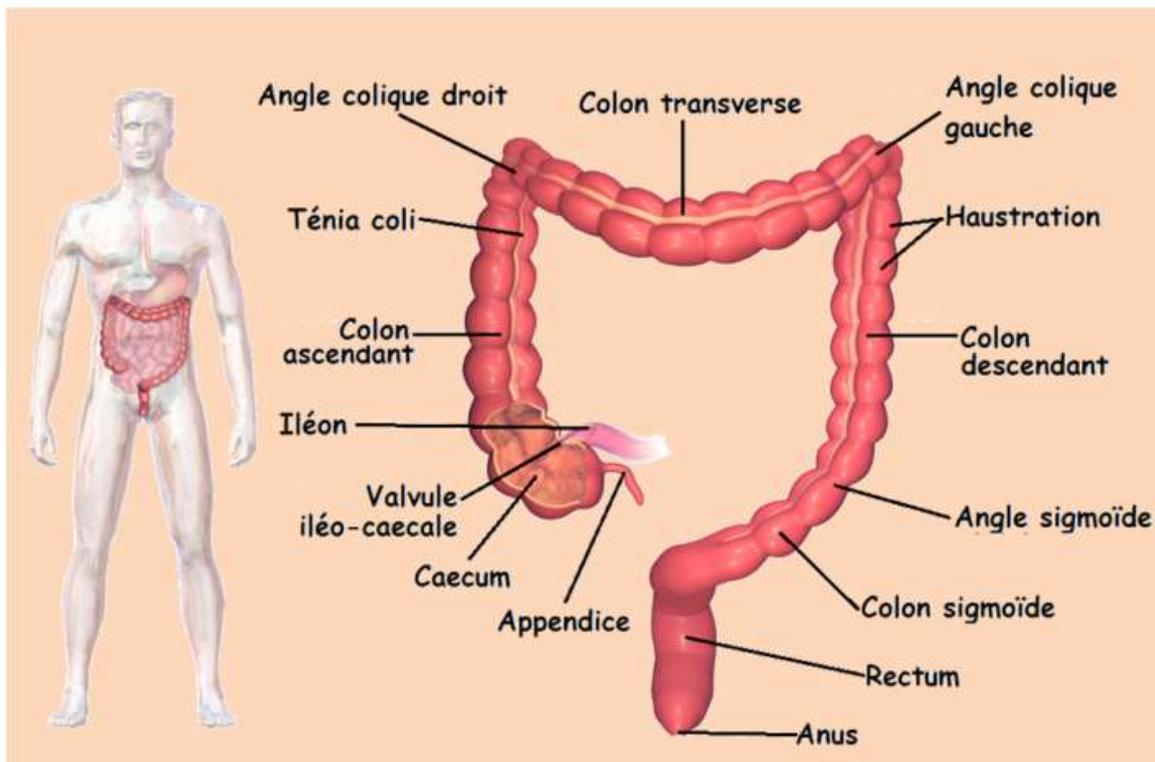


Figure 1 : Anatomie du côlon.

Image disponible à l'URL http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/grain8b_1.html

En effet, la majorité des cancers du côlon-rectum se développe à partir de lésions bénignes, les adénomes, qui au cours de leur évolution peuvent se transformer en cancer : les adénocarcinomes. Les adénomes et adénocarcinomes peuvent provoquer des saignements invisibles à l'œil nu mais qui peuvent être détectés par des tests de recherche de sang dans les selles. La détection des adénomes et leur ablation permettent de réduire le risque de cancer colorectal [Nishihara, Corley]. La majorité (>90%) des cancers colorectaux surviennent de façon sporadique, c'est à dire en dehors de toute prédisposition génétique ou maladie inflammatoire intestinale prédisposant au cancer. Environ 25% des patients atteints de CCR auraient des antécédents familiaux de CCR, mais seulement 5 à 6% de l'ensemble des cas ont des mutations génétiques héréditaires avérées [Hamilton].

1.1.1 Epidémiologie

1.1.1.1 Incidence du cancer colorectal

Dans le monde, en 2012, il a été répertorié 1,3 millions nouveaux cas de CCR, représentant 9,7% de l'ensemble des cancers incidents. Le CCR se situe au 3^{ème} rang des cancers après les cancers du poumon (13% de l'ensemble des cancers incidents) et du sein (11,9%) en terme d'incidence mais aussi de prévalence à 5 ans. Chez l'homme, le CCR se situe au 3^{ème} rang des cancers incidents (10,1%) derrière le cancer du poumon (16,8%) et de la prostate (14,8%). Chez la femme le CCR se situe au 2^{ème} rang des cancers incidents (9,2%) après le cancer du sein (25,8%). L'incidence est très variable d'un pays à l'autre mais plus de 65% des nouveaux cas concernent des patients de pays développés. Près de la moitié des nouveaux cas estimés concernent des patients d'Europe et d'Amérique du Nord. L'incidence est très faible dans la majorité des pays d'Afrique. L'évolution de l'incidence dans le temps varie aussi en fonction de l'origine des patients (Figure 2). L'incidence augmente fortement dans les pays en transition économique et se stable voire diminue dans les pays développés. Les CCR resprésentent à eux seuls plus de la moitié des cancers digestifs [Bosman 2014, Globocan 2012, Hamilton].

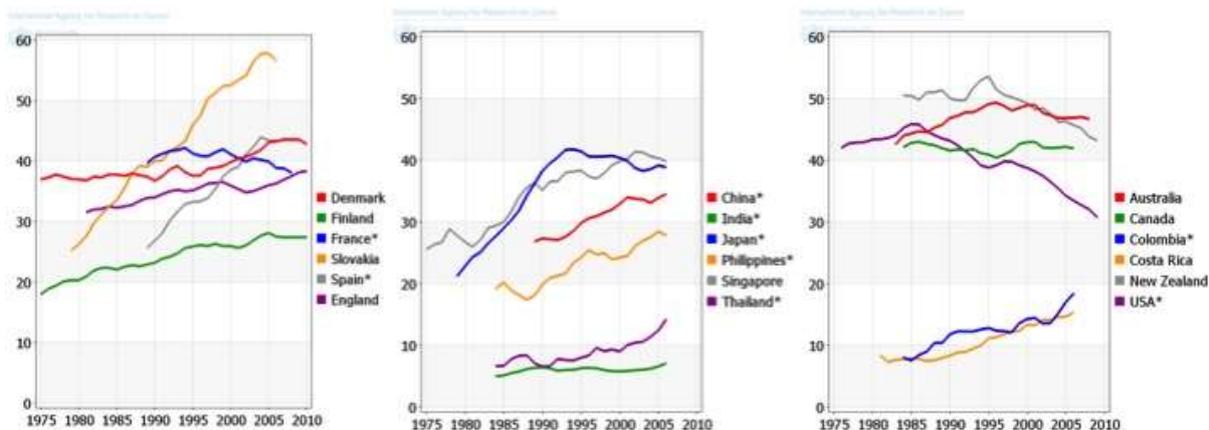
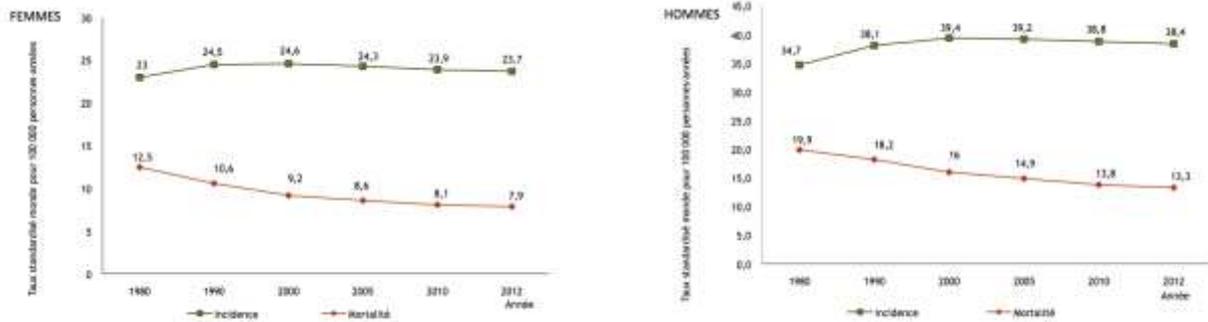


Figure 2 : Evolution de l'incidence du cancer colorectal dans le monde entre 1975 et 2012 [Globocan].

En France, avec 42 152 nouveaux cas estimés en 2012 dont 55 % survenant chez l'homme, le cancer colorectal (CRC) se situe, tous sexes confondus, au 3ème rang des cancers les plus fréquents après le cancer de la prostate et le cancer du sein. Chez l'homme, le CCR se situe au 3ème rang des cancers incidents masculins, derrière le cancer du poumon et de la prostate, avec 23 226 nouveaux cas estimés en 2012. Chez la femme, il se situe au 2ème rang des cancers incidents (18 926 nouveaux cas) derrière le cancer du sein [e-cancer]. En 2012, les CCR se sont développés à plus de 95% chez des patients de plus de 50 ans. L'âge médian au diagnostic était de 71 ans chez l'homme et 75 ans chez la femme [e-cancer].

Chez l'homme et la femme, l'incidence a augmentée jusqu'en 2000 puis s'est stabilisée jusqu'en 2005 pour diminuer ensuite jusqu'en 2012 (Figure 3). Le vieillissement de la population, l'amélioration des techniques de dépistage mais aussi des modifications du mode de vie (augmentation du niveau de sédentarité non compensée par une baisse des apports caloriques, entre autres) ont probablement favorisé une augmentation de l'incidence à partir des années 1980 [Bouvier, e-cancer].

L'efficacité du dépistage et de l'exérèse des lésions précancéreuses a récemment été démontrée. Le dépistage et l'exérèse des polypes expliquent en partie la diminution de l'incidence du CCR observée en France, mais aussi dans les autres pays industrialisés [Nishihara, Corley], à condition que la coloscopie soit complète [Schoen].



Sources : Binder-Foucard F, 2013. Traitement: INCa 2013

Figure 3 : Évolution du nombre de cas incidents de cancer colorectal et de la mortalité par cancer colorectal chez l'homme et chez la femme de 1980 à 2012 en France [Bouvier].

1.1.1.2 Mortalité du cancer colorectal

Dans le monde, en 2012, avec 694000 décès estimés, le CCR se situait au 4^{ème} rang des cancers en terme de mortalité (8.5% de l'ensemble des décès par cancer) derrière le cancer du poumon (19,4%), du foie (9,1%) et de l'estomac (8,9%). Chez l'homme, le CCR se situe au 4^{ème} rang des cancers les plus mortels derrière le cancer du poumon (23,6%), du foie (11,2%) et de l'estomac (10,1%). Chez la femme, le CCR se situe au 3^{ème} rang (9%) derrière les cancers du sein (14,7%) et du poumon (13,8%).

Le taux de survie à 5 ans moyen est de 65% et de 58% à 10 ans. Ce taux varie bien évidemment en fonction de plusieurs critères, notamment le stade du cancer que nous développerons ci-dessous et de facteurs démographiques comme l'âge, le sexe et l'origine du patient. De façon globale, la mortalité par CCR est moindre chez la femme que chez l'homme en dehors des Caraïbes. Le taux de mortalité varie d'un pays à l'autre (Figure 4) mais est plus élevé dans les pays en voie de développement, du fait principalement de l'accès au diagnostic et aux soins [Bosman 2014, Globocan 2012, Hamilton, Siegel].

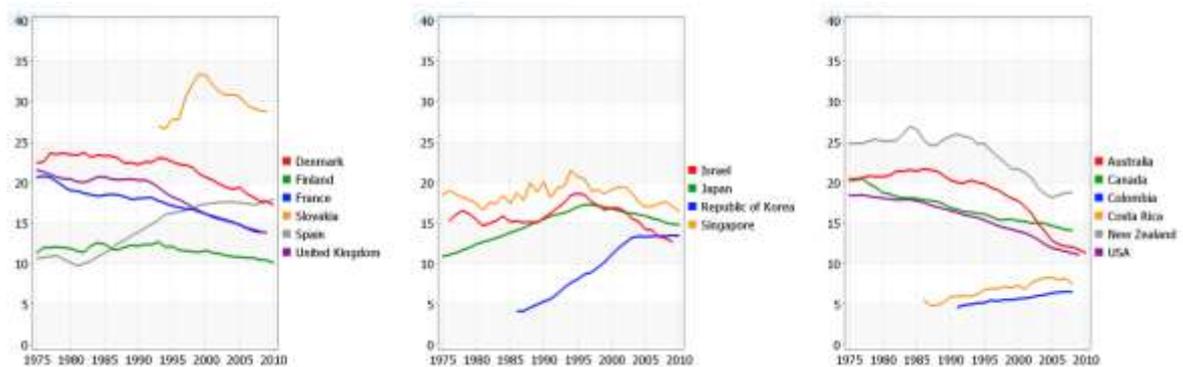


Figure 4 : Evolution de la mortalité liée au cancer colorectal dans le monde entre 1975 et 2012 [Globocan].

En France et en Europe, le CCR se situe au 2^{ème} rang des décès par cancer derrière le cancer du poumon et représente environ 12% de l'ensemble des décès par cancer avec 17 772 décès estimés en 2012. Chez l'homme, le CCR se situe au 2^{ème} rang (11%) des cancers les plus mortels derrière le cancer du poumon. Chez la femme, le CCR se situe au 3^{ème} rang (13,5%) derrière les cancers du sein et du poumon. L'âge médian au décès estimé en 2012 est de 77 ans chez les hommes et 81 ans chez les femmes [e-cancer].

La survie relative à 5 ans en France du CCR tous stades confondus est de 56%. La survie s'est améliorée depuis 1989 [12]. En 2012 en France, 17 722 décès ont été attribués au cancer colorectal (9 275 hommes et 8 447 femmes), soit un taux de mortalité de 13,3 pour 100 000 chez l'homme et 7,9 pour 100 000 chez la femme. Le taux de survie à 5 ans et celui à 10 ans sont respectivement de 56 % et 50 %. Si aucune différence entre sexes n'est observée pour la survie nette à 5 ans (57 % chez la femme et 56 % chez l'homme), celle à 10 ans est plus élevée chez la femme (52 % vs 48 % chez l'homme) [Grosclaude]. Tous sexes confondus, la survie nette à 5 ans diminue avec l'âge, passant de 66 % chez les 15-44 ans (68 % chez la femme et 64% chez l'homme) à 50% chez les 75 ans et plus (50% chez la femme et 49 % chez l'homme). À 10 ans, cette survie passe de 60 % chez les plus jeunes (61 % chez la femme et 58 % chez l'homme) à 45 % chez les plus âgés (46 % chez la femme et 43 % chez l'homme). La survie nette à 5 ans s'est améliorée au cours du temps, passant de 53 % pour les hommes diagnostiqués entre 1989-1991 à 58 % pour ceux diagnostiqués en 2001-2004 et de 56 à 61 % pour les femmes diagnostiquées sur les mêmes périodes [e-cancer, Grosclaude].

Depuis 1980, le taux de mortalité lié au CCR ne cesse de baisser (Figure 3). Comme pour l'incidence du CCR, le dépistage du CCR et l'exérèse des lésions préneoplasiques ont permis en France et dans les pays industrialisés en général de diminuer la mortalité par cancer [Shaukat, Zauber].

1.1.2 Causes et facteurs de risques

1.1.2.1. Les lésions prénéoplasiques

L'adénome colorectal est une lésion précurseur de l'adénocarcinome. Au niveau macroscopique, les adénomes colorectaux peuvent être de trois types : polypoïde (pédiculés ou sessiles), plan ou déprimé [Bosman]. Les adénomes polypoides représente environ 65% de l'ensemble des polypes [Carr, Lash, Diebold]. Au niveau microscopique, l'adénome est défini par la présence d'une néoplasie intra-épithéliale (ou dysplasie) caractérisée en histologie par une augmentation du nombre de glandes de Lieberkühn et des modifications épithéliales telles qu'une diminution de la mucosécrétion et une modification des noyaux : augmentation de taille, hyperchromasie et des degrés variables de stratification nucléaire et de perte de polarité. La dysplasie peut être de haut ou de bas grade. Le grade de la dysplasie dépend de la complexité architecturale des glandes/villosités, de l'extension de la stratification nucléaire et de la sévérité des anomalies de la morphologie du noyau [Bosman]. La caractérisation des différents grades de dysplasie permet d'orienter le suivi des patients en fonction de la classification de Vienne [Schlemper] et des recommandations de la Haute Autorité de Santé en France [HAS].

En 1971, une étude portant sur 433 patients ayant des polypes coliques a montré qu'un type de polype, les adénomes conventionnels avec dysplasie de haut grade pouvaient évoluer vers le cancer. Cette étude morphologique a permis de proposer un modèle de cancérogenèse colique : la séquence adénome cancer [Morson, Potet]. Cette séquence : muqueuse saine, adénome en dysplasie de bas grade, adénome en dysplasie de haut grade, adénocarcinome a été vérifiée depuis 40 ans dans d'autres études, qui ont associées à cette séquence morphologique une séquence oncogénétique avec à chaque étape morphologique une accumulation d'altérations génétiques [Bedenne, Bosman, Fearon, Vogelstein]. Les adénomes seraient à l'origine de 60 à 80% des cancers colorectaux sporadiques par leur transformation en cancer [Bedenne, Hamilton, Markowitz]. Tous les adénomes ne se transforment pas en cancer, le risque de transformation dépend du nombre, de la taille, du degré de dysplasie et de la présence d'un composant vilieux [Bedenne, Potet]. Cette voie de cancérogenèse colorectale est la plus connue, et sa compréhension permet par la résection endoscopique des polypes adénomateux et le suivi programmé des patients aux antécédents d'adénome de prévenir l'apparition d'un cancer.

Bien qu'il soit admis que la plupart des cancers coliques se développent à partir de précurseurs que sont les adénomes tubuleux, tubulo-villeux ou villeux selon la séquence adénome-carcinome, il a été mis en évidence que les adénocarcinomes colorectaux pouvaient se développer *de novo*, c'est à dire sans précurseur [Bedenne] ou également selon une autre voie morphologique et oncogénétique de cancérogenèse : la voie festonnée [Fujita, Hamilton, Mäkinen 2001]. Il s'agit d'un spectre morphologique et moléculaire particulier qui pourrait se définir comme un "ensemble de lésions de potentiel évolutif croissant de la lésion bénigne au cancer ayant un aspect morphologique festonné/dentellé commun". Cette voie morphologique comprend les polypes hyperplasiques (PH) qui n'évoluent presque jamais vers le cancer et des lésions potentiellement évolutives : les polypes festonnés sessiles (PFS) et adénomes festonnés traditionnels (AF). Les adénocarcinomes développés à partir de cette voie peuvent également avoir une morphologie festonnée et sont appelés l'adénocarcinome festonné [Bosman, Mäkinen 2001, Mäkinen 2007]. La proportion de PFS et AF qui se transforment en adénocarcinome n'est pas connue, mais du fait du risque de transformation ces polypes doivent être retirés et surveillés comme les adénomes classiques [HAS].

1.1.2.2 Les facteurs liés aux patients

La majorité (>90%) des cancers colorectaux surviennent de façon sporadique, c'est à dire en dehors de toute prédisposition génétique ou maladie inflammatoire intestinale prédisposant au cancer. Un patient qui présente un risque « moyen » de développer un CCR a environ 5% de risques de réellement le développer [Cancer.net, CancerResearch UK]. Les CCR héréditaires sont rares (environ 5%) et se produisent lorsque des mutations génétiques ou des modifications sont transmises dans une famille d'une génération à la suivante. Le plus souvent, la cause du CCR n'est pas connue. Cependant, certains facteurs peuvent augmenter le risque de développer un CCR. Nous allons les détailler ci-dessous.

- **L'âge.** Comme nous l'avons vu dans le sous-chapître précédent, le CCR est un cancer du sujet âgé, le risque augmente donc avec l'âge.
- **Le sexe.** Les hommes ont un risque légèrement supérieur à la femme de développer un CCR (cf. chapître précédent).

- **Les antécédents familiaux de CCR.** En dehors des CCR héréditaires, le risque de développer un CCR double en cas d'antécédent familial de CCR avant 60 ans chez un apparenté au premier degré.

- **Les CCR héréditaires.**

Environ 5% des CCR se développent dans un contexte de prédisposition génétique. Ces affections sont très rares mais exposent le patient à développer un ou des CCR plus précocément que les patients développant un CCR sporadique. Le syndrome de prédisposition génétique aux CCR le plus fréquent (3 à 5% des CCR) est le syndrome de Lynch ou HNPCC (*Hereditary non Polyposis Colorectal Cancer*). Ce syndrome de transmission autosomique dominante est lié à une mutation germinale d'un gène codant pour une protéine impliquée dans le système de réparation des mésappariement de l'ADN : le système MMR (*Mismatch Repair*). La déficience de ce système entraîne l'accumulation d'erreurs lors de la réplication notamment aux niveaux de certaines régions du génomes plus à risque d'erreurs de réplication : les microsatellites. Les patients atteints de ce syndrome ont un risque accru (80%) de développer un CCR, mais aussi d'autres cancers, notamment urothéliaux, de l'endomètre, des gliomes (syndrome de Turcot) ou des cancers des glandes sébacées (syndrome de Muir-Torre).

Le second syndrome de prédisposition héréditaire en fréquence (1% des CCR) est la polypose adénomateuse familiale (PAF). La PAF dans sa forme classique autosomique dominante est liée à des mutations germinales du gène *APC* (*Adenomatosis Polyposis Coli*). Cette mutation entraîne une activation constitutionnelle d'une voie de signalisation impliquée dans la croissance cellulaire : la voie Wnt/ β -caténine. Ce gène est très fréquemment muté dans les CCR sporadique mais cette mutation est limitée aux cellules cancéreuses et non transmise aux descendants. Les patients atteints de PAF développent de très nombreux adénomes dans tout le tube digestif dès l'adolescence et ont un risque proche de 100% de développer un adénocarcinome avant 40 ans. Il existe des variantes associant une PAF à d'autres cancers comme les gliomes dans le syndrome de Turcot ou le carcinome papillaire de la thyroïde, le fibrome desmoïde, les ostéomes multiples, les kytes épidermiques dans le cadre du syndrome de Gardner. Il existe également une forme atténuée, autosomique récessive de polypose familiale : la polypose adénomateuse familiale atténuée liée à *MUTYH* (2% des CCR). Cette affection est liée à une mutation du gène *MUTYH* (*mutY DNA glycosylase*) qui code une protéine impliquée dans la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN. Les patients atteints de cette forme de polypose

développent des polypes plus tardivement et généralement en nombre moins élevé que dans la forme classique de la PAF.

D'autres syndrômes de prédisposition héréditaire aux CCR plus rares existent également. [Bosman, Cancer.net, Cancer Research UK, Hamilton, INCa, PDQ].

- **Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI).** Les patients atteints de MICI comme la rectocolite hémorragique ou la maladie de Crohn ont un risque accru de développer un CCR après plus de 10 ans d'évolution de la maladie.
- **Les adénomes et les polypes festonnés.** En tant que lésions précancéreuses, ces lésions augmentent le risque de développer un CCR ainsi que le risque de développer d'autres lésions pré-néoplasiques. Cela impose de surveiller régulièrement les patients ayant un antécédent d'adénome ou de lésion festonnée [HAS].
- **Hygiène de vie.** Certaines études ont démontré que l'inactivité physique, l'obésité, un régime alimentaire riche en viande rouge et le tabagisme augmente le risque de CCR. Ceci explique en partie l'incidence plus élevée des CCR dans les pays développés [Bosman, Cancer.net, Cancer Research UK, Hamilton, INCa].

1.1.3 Dépistage et prévention

Sur la base des facteurs de risque précédemment décrits, 3 niveaux de risque de développer un CCR ont été établis : moyen, élevé ou très élevé. A chaque niveau de risque correspond des recommandations de suivi adaptées [INCa, PDQ].

- **Les patients à risque moyen de Cancer Colorectal (70 à 90%)**

Les hommes et les femmes de plus de 50 ans sans facteur de risque sont considérés comme des individus à risque moyen de développer un cancer colorectal. Le cancer colorectal est en effet très rare avant 40 ans. Le risque augmente à partir de 50 ans. L'âge moyen au moment du diagnostic est de 70 ans. Le suivi pour ces patients repose sur la réalisation tous les 2 ans entre 50 ans et 74 ans d'un test de recherche immunologique de sang dans les selles dans le cadre du programme national de dépistage organisé. Lorsque ce test est positif, une coloscopie est réalisée. Moins de 2% des patients réalisant le test de recherche de sang dans les selles ont un test positif. Parmi les patients avec un test positif, près de la moitié n'ont

aucune anomalie à la coloscopie, entre 40-50% ont un adénome et 7-10% un CCR [Geraghty, Lee TJ].

Le dépistage organisé du CCR par recherche de sang dans les selles puis coloscopie en cas de résultats positif a démontré sont inérêt dans la réduction de l'incidence et de la mortalité par cancer [Corley, Shaikat, Zauber], surtout si la coloscopie est totale [Schoen] et que les adénomes réséqués sont de bas grade [Løberg].

- **Les patients à risque élevé de cancer colorectal (10 à 30%)**

Il s'agit des sujets aux antécédents de CCR, ou d'adénome de haut risque (adénomes en dysplasie de haut grade, ou plus de trois adénomes, ou adénome de plus d'un centimètre ou polype/adénome festonné dysplasique). Les patients dont un parent du premier degré (père, mère, frère, sœur, enfant) a été atteint d'un cancer colorectal ou d'un polype de haut risque avant 65 ans, et celles dont deux parents ont été atteints quel que soit l'âge au moment du diagnostic sont également concernées, ainsi que les patients atteintes de MICI étendue au moment du diagnostic et évoluant depuis plus de 10 ans.

Pour ces patients, le suivi consiste en la réalisation régulière d'une coloscopie qui peut être couplée à la chromocoloscopie notamment chez les patients atteints de MICI [Kiesslich, Hurlstone 1, Rutter].

- **Les patients à risque très élevé de cancer colorectal (<5%)**

Il s'agit des patients qui ont une prédisposition génétique aux CCR : les patients atteintes PAF ou de syndrome de Lynch.

Pour les patients atteints de PAF, le suivi consiste en la réalisation d'une coloscopie totale annuelle à partir de l'âge de 12 ans qui vise à dépister et à enlever les adénomes avant qu'ils ne dégénèrent. Etant donné que ces patients ont un risque proche de 100% de développer un CCR, une colectomie prophylactique est envisagée à partir de l'âge de 20 ans. Après la chirurgie, la prise en charge continue tout au long de la vie car le risque de cancer lié à la PAF concerne tout le tube digestif, notamment le duodénum et l'estomac.

Pour les patients atteints de syndrome de Lynch, le suivi consiste en la réalisation régulière d'une coloscopie complète avec chromocoloscopie tous les 2 ans à partir de l'âge de 20 ans. Par ailleurs, les femmes atteintes du syndrome de Lynch présentent aussi un risque élevé de développer un cancer de l'endomètre. Une surveillance de l'endomètre dès l'âge de 30 ans (échographie endovaginale tous les 2 ans et prélèvement) est recommandée chez les femmes

atteintes du syndrome en raison du risque d'adénocarcinome de l'endomètre [INCa, Hurlstone 2, Lecomte, PDQ].

1.2 Diagnostic du cancer colorectal

1.2.1 Clinique, endoscopie et imagerie

Le diagnostic du CCR peut se faire dans le cadre du dépistage organisé ou personnalisé en fonction du niveau de risque du patient mais peut aussi être orienté par des symptômes liés au cancer ou encore être découvert de façon fortuite lors d'un examen réalisé à la recherche d'une autre affection.

1.2.1.1 Diagnostic clinique

La majorité des cancers colorectaux sont asymptomatiques et peuvent évoluer pendant plusieurs années sans devenir symptomatiques. Cependant certains symptômes non spécifiques peuvent faire rechercher un CCR. Ces symptômes sont liés au stade du cancer (localisé, étendu à d'autres organes, métastatique), à sa localisation (côlon droit, gauche, rectum) et à son caractère sténosant.

Il peut s'agir de troubles du transit intestinal soudains ou persistants comme une constipation soudaine ou qui s'aggrave, une diarrhée qui se prolonge, une sensation d'évacuation incomplète, des douleurs abdominales, un syndrome rectal, des vomissements. Le CCR peut également être suspecté comme d'autres affections en cas de sang dans les selles macroscopiquement visible et non pas recherché avec le test de dépistage. Le CCR comme d'autres cancers peuvent être évoqués en cas d'altération de l'état général (anorexie, amaigrissement, asthénie). La découverte d'une anémie ferriprive sans saignement extériorisé amenant à une exploration endoscopique est aussi un motif de découverte de CCR [Cancer.net, CancerResarch UK, INCa].

La première étape du diagnostic est donc clinique. L'interrogatoire initial et l'examen clinique permettront de cibler les examens secondaires les plus pertinents pour étayer les hypothèses diagnostiques du médecin clinicien.

En fonction des symptômes, les examens complémentaires de première intention pourront être un examen sanguin afin d'évaluer ou rechercher une anémie ; un examen endoscopique comme une coloscopie ou une imagerie dans le cadre du bilan initial ou d'extension.

1.2.1.2 Diagnostic endoscopique

La coloscopie permet l'examen de la partie terminale du côlon (recto-sigmoidoscopie) ou de tout le côlon et de la partie toute terminale de l'iléon (coloscopie totale). Le gastro-entérologue qui la pratique peut donc, grâce à la caméra sur le coloscope, visualiser les lésions colique : polypes, ulcérations, tumeurs bourgeonnantes, ulcéro-bourgeonnantes ou ulcériformes. Les lésions planes ou situées dans le bas-fond caecal peuvent être difficiles à visualiser surtout sur un côlon mal préparé [Benedict, McGill].

La coloscopie permet l'exérèse d'une lésion polypoïde ou plane si elle n'est pas trop volumineuse ou permet la réalisation de biopsies de lésion volumineuses pour caractériser histologiquement la lésion et définir l'attitude thérapeutique à adopter. En cas de découverte d'une lésion accessible à l'exérèse endoscopique, il est conseillé de réaliser une exérèse « en bloc » c'est à dire en un seul morceau. Ce type d'exérèse diminue le risque de laisser des résidus lésionels et permet une meilleure analyse anatomopathologique car l'orientation anatomique du prélèvement est respectée et les marges plus facile à analyser. En cas de lésion volumineuse (>2 cm) ce type d'exérèse n'est plus possible et la résection est réalisée par fragments.

Pour les lésions prénéoplasiques, en fonction des facteurs de risque du patient, du caractère complet ou incomplet de la résection, du type d'exérèse et de la nature histologique de la lésion (polype de bas ou de haut risque, Figure 5), un contrôle endoscopique plus ou moins rapproché (3 mois à 5 ans) est réalisé. Si l'exérèse est macroscopiquement incomplète ou diagnostiquée microscopiquement après analyse anatomopathologique ou si une exérèse par fragments a été réalisée, un contrôle endoscopique doit être réalisé au minimum 3 mois après la polypectomie [Benedict, HAS]. En cas d'exérèse complète, la nature de la lésion permettra de guider le suivi. Les lésions sont classées en fonction de leur niveau de risque de transformation en CCR. Les adénomes en dysplasie de bas grade, les lésions festonnées sans dysplasie et les lésions peu nombreuses (<3) ou de petites tailles sont qualifiées de « polypes de bas risque ». Les adénomes en dysplasie de haut grade, les polypes festonnés avec dysplasie (quelque soit le grade) et les lésions multiples (>3) ou de grande taille (>1 cm) sont qualifiées de « polypes de haut risque ». Le détail des critères et les modalités de suivi sont détaillés dans la figure ci-dessous issue des recommandations de la Haute Autorité de Santé (Figure 5) [HAS].

3. FACTEURS LIÉS AUX(ES) POLYPE(S) // COLOSCOPIE DE QUALITÉ OPTIMALE & POLYPE(S) ENTIÈREMENT RÉSEQUÉ(S)

Tableau 1. Évaluation du risque de récurrence d'un ou plusieurs polypes ou de survenue d'un CCR (cancer colo-rectal) en fonction des caractéristiques du (des) polype(s) enlevé(s)

PA : polype adénomateux ou PF : polype fœtonné <small>NB : Les PF sont tenus pour responsables dans 90% importante des cas de l'intestin, notamment au niveau du colon droit</small>		Cas particulier des PH (polype hyperplasique)
PBR (Polype à bas risque)	PHR (Polype à haut risque)	<ul style="list-style-type: none"> Les PH < 10mm du RS (recto-sigmoïde), ne sont pas un facteur de risque de survenue de CCR et relèvent d'une surveillance endoscopique selon le niveau de risque du patient. Les PH ≥ 10mm ou en amont du RS doivent faire l'objet d'une concertation avec l'anatomo-pathologiste pour le diagnostic différentiel avec les PF.
<ul style="list-style-type: none"> nombre < 3 taille < 10 mm dysplasie de bas grade pour PA ou pas de dysplasie pour PF 	<ul style="list-style-type: none"> nombre ≥ 3 taille ≥ 10 mm dysplasie de haut grade (ou pTis) pour PA ou dysplasie pour PF 	
<p>Les autres facteurs de risque liés aux(ES) polype(s)</p> <ul style="list-style-type: none"> L'augmentation du risque de récurrence liée à la présence d'une composante vilieuse n'est pas démontrée de façon probante quand cette caractéristique est considérée indépendamment des autres (notamment taille et nombre des adénomes). Donc, en l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible de formuler de recommandations en termes de délai de réconvocation sur cet argument histologique pris isolément. La localisation proximale de l'adénome (en amont de l'angle sigmoïde gauche) pour le moment n'est retenue dans les recommandations internationales apparait comme un facteur pouvant modifier la décision, car son impact à une valeur proche, voire supérieure au facteur « dysplasie de haut grade ». 		

Tableau 2. Proposition de calendrier de suivi en cas de PA et PF

Les colonoscopies suivantes notamment à partir de la colo 4) recroisent sur un axe d'apex.
Ce calendrier initial sera à revisiter en fonction des caractéristiques du cas clinique (âge pour la première colonoscopie, Age du patient, etc.)

Colo Index	Colo 2	Colo 3	Colo 4 et ...
Évaluation risque	Date	Résultats	Date
PBR	→ 5 ans	PHR	→ 3 ans
		PBR	→ 5 ans
		Pas de polype	→ 5 ou 10 ans*
PHR	→ 3 ans	PHR	→ 3 ans
		PBR	→ 5 ans
		Pas de polype	→ 5 ans

* Selon le niveau de risque du patient défini par les ATCO personnels ou familiaux de CCR ou d'adénomes, risque élevé (3 ans) ou risque moyen (10 ans). ** Selon le niveau de risque du patient défini par les ATCO personnels ou familiaux de CCR ou d'adénomes, risque élevé (3 à 10 ans) ou risque moyen (10 ans) et retour à la stratégie de dépistage national.

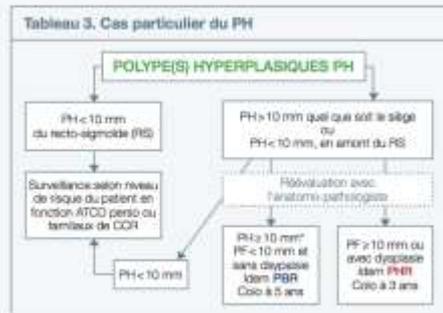


Figure 5: Recommandations de la haute autorité de santé pour le suivi post-polypectomie en fonction de la nature histologique de la lésion [HAS].

Lorsque l'examen microscopique de la biopsie diagnostique un adénocarcinome, un bilan complémentaire biologique et d'imagerie est réalisé afin d'évaluer l'extension de la tumeur, sa résectabilité et l'opérabilité du patient. En fonction de ces 3 paramètres une décision thérapeutique adaptée est décidée en Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP). Le délai entre la réalisation du bilan d'extension et la décision thérapeutique doit être le plus court possible.

1.2.1.3 Examens d'imagerie

Dans le cadre du bilan d'extension à la recherche notamment de lésions secondaires (de métastases) un scanner thoraco-abdomino-pelvien avec injection de produit de contraste est réalisé, ou en cas d'impossibilité de scanner avec injection, une IRM hépatique injectée au gadolinium et un scanner thoracique sans injection. Ces examens permettent également d'évaluer la taille et la profondeur de la tumeur. Compte tenu des stratégies dans la prise en charge des cancers avancés (traitements néo-adjuvants), il est nécessaire de réaliser un *staging* pré-opératoire précis [TNCD 1, TNCD2].

Pour une lésion de la charnière recto-sigmoïdienne, en cas de doute avec une lésion du haut rectum, une IRM rectale avec remplissage du rectum et des images de profil sont réalisées pour préciser la hauteur de la lésion et son siège sus ou sous-péritonéal. Une écho-endoscopie (sonde d'endoscopie couplée à une sonde d'échographie) rectale doit être réalisée en cas de tumeur rectale pour évaluer l'invasion en profondeur de la tumeur.

En cas de coloscopie incomplète (tumeur infranchissable) ou en cas de problème de repérage de la lésion lors de la coloscopie, un colo-scanner avec distension à l'eau peut être réalisé.

En cas d'occlusion aiguë, un scanner thoraco-abdomino-pelvien avec opacification colique peut être réalisé pour préciser l'extension locale de la tumeur et rechercher des lésions secondaires afin de décider si le geste chirurgical réalisé en urgence peut être thérapeutique d'emblée (exérèse complète de la tumeur et de la perforation) ou seulement symptomatique.

L'extension locale et métastatique évaluées par l'imagerie d'un CCR prouvé histologiquement (biopsies) conditionne la résecabilité et la décision thérapeutique initiale [TNCD 1 et 2] :

- En cas de tumeur non métastatique si le patient est opérable et la tumeur résecable, l'exérèse du cancer et des organes et structures envahies peut donc être réalisée en bloc en marge saines ou précédée d'un traitement pré-opératoire (chimiothérapie seule pour le côlon et chimiothérapie + radiothérapie pour le rectum) si elle n'est pas résecable d'emblée. Ces décisions thérapeutiques sont établies lors des RCP.
- En cas de tumeur métastatique non résecable, il n'y a pas d'indication formelle au traitement initial du cancer primitif sauf si la tumeur primitive est symptomatique et/ou compliquée (hémorragie, syndrome occlusif ou sub-occlusif, perforation, abcès péri-tumoral, distension colique en amont de la tumeur primitive au scanner). Une chimiothérapie première est alors discutée en RCP.
- En cas de tumeur métastatique résecable, la résection de la tumeur primitive et des métastases en un ou plusieurs temps en fonction des symptômes et des localisations avec chimiothérapie péri-opératoire est indiquée.

1.2.2 Diagnostic anatomopathologique

Que ce soit sur biopsie ou sur pièce opératoire, le diagnostic anatomo-pathologique ne se limite pas à déterminer la nature de la lésion : adénome, lésion festonnée ou adénocarcinome. Comme nous allons le développer ci-dessous, d'autres éléments microscopiques importants pour la décision thérapeutique doivent être précisés. De plus en raison des progrès dans la caractérisation moléculaire des cancers et dans le développement de thérapies ciblées, la caractérisation anatomopathologique des CCR n'est plus seulement histologique, elle est histo-moléculaire.

1.2.2.1 La classification histologique de l'OMS

L'appellation CCR regroupe en fait plusieurs types de tumeurs malignes qui se développent dans le côlon-rectum. Ces tumeurs sont répertoriées et décrites par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Figure 6). Plus de 90% des CCR sont des adénocarcinomes [Hamilton].

Tumeurs épithéliales	Néoplasies neuroendocrines
Lésions précancéreuses	Tumeur neuroendocrine (NET)
Adénomes	NET Grade 1 (carcinoïde)
Tubuleux	NET Grade 2
Villeux	Carcinome neuroendocrine (NEC)
Tubulo-villeux	NEC à grande cellules
Dysplasie (néoplasie intra-épithéliale) de bas grade	NEC à petites cellules
Dysplasie (néoplasie intra-épithéliale) de haut grade	Carcinome mixte adénoneuroendocrine
Lésions festonnées	NET à cellules EC, produisant de la sérotonine,
Polype hyperplasique	à cellule L, produisant du peptide glucagon-like et
Polype/Adénome festonné sessile	produisant PP/PYY
Adénome festonné traditionnel	Tumeurs mésoenchymateuses
Hamartomes	Leiomyome
Polype associé à la maladie de Cowden	Lipome
Polype juvénile	Angiosarcome
Polype de Peutz-Jeghers	Tumeur stromale gastro-intestinale
Carcinomes	Sarcome de Kaposi
Adénocarcinomes	Leiomyosarcome
Cribriforme de type comédo	Lymphomes
Carcinome médullaire	Tumeurs secondaires
Carcinome micropapillaire	
Adénocarcinome mucineux	
Adénocarcinome festonné	
Carcinome à cellules en bague à chaton	
Carcinome adénoquameux	
Carcinome à cellules fusiformes	
Carcinome à cellules squameuses	
Carcinome indifférencié	

Figure 6 : Classification OMS 2010 des tumeurs du côlon-rectum [Hamilton].

Il existe plusieurs sous types d'adénocarcinomes coliques, classés en fonction de leur morphologie microscopique : les adénocarcinomes cribriformes de type comédo, les carcinomes médullaires, les carcinomes micropapillaires, les adénocarcinomes mucineux (ou colloïde muqueux), les adénocarcinomes festonnés et les carcinomes à cellules en bague à chaton (Figure 6). Les adénocarcinomes qui ressemblent aux glandes coliques normales (les glandes de Lieberkühn) et n'ont aucun critère pour appartenir à un des six sous types suscités sont appelés adénocarcinomes Lieberkühnien ou NOS (*Not Otherwise Specified*). Ce sont les adénocarcinomes les plus fréquents (environ 70%). Certains sous type ont des critères histopathologiques précis, par exemple les adénocarcinomes mucineux et en bague à chaton doivent être formé d'au moins 50% de contingent mucineux ou en bague à chaton respectivement. Les autres n'ont pas de pourcentage seuil requis pour définir leur sous-type mais le composant morphologique doit être relativement majoritaire [Hamilton].

L'intérêt de cette classification morphologique réside dans sa valeur pronostique et thérapeutique. En effet, certains sous-types d'adénocarcinomes ont des particularités cliniques et/ou moléculaires.

Les adénocarcinomes mucineux, à cellules en bague à chaton, festonnés et médullaires ont une localisation plus fréquemment droite, surviennent plus fréquemment chez la femme âgée et ont plus fréquemment une instabilité des microsatellites, une mutation du gène *BRAF* et un phénotype méthylateur (CIMP, *CpG island Methylator Phenotype*) que dans les autres sous type d'adénocarcinome. L'instabilité des microsatellites (MSI) peut être liée à une mutation d'un gène codant pour une protéine du système MMR dans le cadre du syndrome de Lynch ou à des modifications épigénétiques par hyperméthylation du gène *MLH1* codant une protéine de ce système dans les CCR sporadiques [Arifi, Chang SC, Hamilton, Mäkinen 2007, Pyo]. Les adénocarcinomes mucineux du rectum sont associés à une mauvaise réponse à la radiochimiothérapie (RCT) pré-opératoire et à un mauvais pronostic global [McCawley, Wang MJ]. L'impact pronostic n'est pas clairement établi dans les cancers coliques [Chang SC, Hogan, Inamura, Maeda, Wang MJ, Warschkow]. Les adénocarcinomes festonnés à cellules en bague à chaton ont un mauvais pronostic [Arifi, Garcia-Solano, Huguen, Inamura, Shida]. L'impact pronostique des adénocarcinomes médullaires n'est pas défini [Knox, Pyo]. Les adénocarcinomes cribriformes de type comédo ont été peu étudiés. Une étude avec peu de cas à des stades avancés rapporte qu'ils sont de mauvais pronostic [Lino-Silva]. Cependant du fait du petit nombre de cas et de l'absence d'analyse multivariée, ces données nécessitent d'être confirmées.

Les adénocarcinomes micropapillaires ont le plus souvent un phénotype microsatellitaire stable (MSS) et sont associés à un envahissement lymphatique et ganglionnaire plus important et semble associés à un mauvais pronostic [Lee HJ, Lei, Verdù].

1.2.2.2 La stadification de l'UICC : TNM et stades

La stadification des cancers colorectaux peut être effectuée par de nombreux systèmes. Le plus utilisé dans le monde est le système TNM [TNM] qui classe les cancers selon leur extension anatomique. Ce système de classification est le plus utilisé principalement car c'est le seul paramètre d'évaluation pronostic validé, et parce qu'il est simple, actualisé et standardisé. Ce système a été introduit entre 1943 et 1952 par le chirurgien français Pierre Denoix, puis repris et développé par *the Union Internationale Contre le Cancer* (UICC). Depuis la première édition de 1968, plusieurs révisions ont été publiées et des descripteurs histopathologiques optionnels ont été ajoutés. La dernière révision date de 2009 [TNM].

Le principe de séparer les cancers en groupes de stades TNM vient du fait que la survie des patients ayant un cancer localisé est supérieure à celle des patients ayant un cancer étendu au-delà de l'organe d'origine. Les objectifs de cette classification sont :

1. Aider le clinicien dans la planification du traitement
2. Donner des indications sur le pronostic
3. Permettre l'évaluation des traitements des cancers à stades égaux
4. Faciliter l'échange des informations entre différents centres
5. Contribuer à la recherche et à la compréhension des cancers humains
6. Participer au contrôle des cancers.

L'établissement du stade TNM d'un cancer est basé sur trois composants :

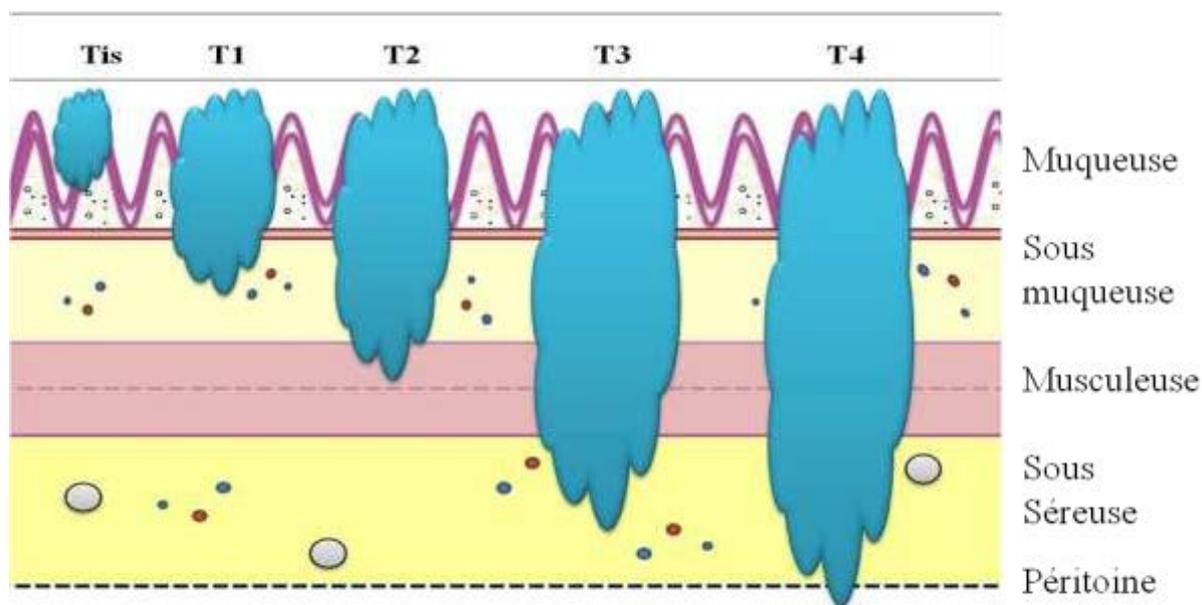
T : L'extension anatomique de la **T**umeur primitive au niveau de la paroi colique et au-delà.

N : L'absence ou la présence d'envahissement ganglionnaire (**N**ode) régional

M : L'absence ou la présence de **M**étastases.

Tous les cas doivent être confirmés par un examen microscopique [TNM]. Les cancers classés par le clinicien (après examens complémentaires éventuels) sont précédés du préfixe 'c'TNM. Les cancers classés par le pathologiste après résection chirurgicale sont précédés du préfixe 'p'TNM.

La classification TNM actuelle des CCR est reportée et illustrée ci-après (Figure 7).



<p>T - Tumeur primitive</p> <p>TX : La tumeur primaire ne peut être examinée</p> <p>T0 : Absence de tumeur primitive</p> <p>Tis : Carcinome <i>in situ</i> : intra-épithélial ou invasion du choriion</p> <p>T1 : La tumeur envahit la sous muqueuse sans la dépasser</p> <p>T2 : La tumeur envahit la musculeuse sans la dépasser</p> <p>T3 : La tumeur envahit la sous séreuse ou les tissus péricoliques/péri-rectaux non péritonéalisés</p> <p>T4 : La tumeur envahit directement d'autres organes ou structures et/ou perfore le péritoine viséral</p> <p> T4a : La tumeur perfore le péritoine viséral</p> <p> T4b : La tumeur envahit directement d'autres organes ou structures</p>
<p>N – Ganglions lymphatiques régionaux</p> <p>NX : Les ganglions lymphatiques régionaux ne peuvent être examinés</p> <p>N0 : Absence de métastase ganglionnaire régionale</p> <p>N1 : Métastase ganglionnaire dans 1 à 3 ganglions régionaux</p> <p> N1a : Métastase dans 1 ganglion régional</p> <p> N1b : Métastase dans 2 à 3 ganglions régionaux</p> <p> N1c : Dépôts tumoraux satellites dans la sous séreuse ou dans le tissus péricolique/périmrectal non pentonéalisé <u>sans</u> métastase ganglionnaire régionale</p> <p>N2 : Métastase ganglionnaire dans plus de 4 ganglions régionaux</p> <p> N2a : Métastase dans 4 à 6 ganglions régionaux</p> <p> N2b : Métastases dans 7 ou plus ganglions régionaux</p>
<p>M- Métastase à distance</p> <p>M0 : Pas de métastase à distance</p> <p>M1 : Métastase(s) à distance</p> <p> M1a : Métastase(s) confinée(s) à un organe (foie, poumon, ovaire, ganglions non régionaux)</p> <p> M1b : Métastase(s) dans plus de un organe ou carcinose péritonéales</p>

Figure 7 : Classification TNM des cancers du côlon-rectum [TNM].

En haut : illustration des différents stades « T » du cancer colorectal. En bas : Tableau récapitulatif du TNM du cancer colorectal.

Après avoir catégorisé le T, le N et le M de chaque cancer, il faut regrouper ces descripteurs en stades (Tableau I). Ces stades ont été établis de façon à homogénéiser des groupes de patients pour l'étude des effets des traitements et de la survie [TNM].

Tableau I. Groupes de Stades TNM de l'UICC 2009 [TNM].

Groupes de Stades			
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1 ou T2	N0	M0
Stade II	T3 ou T4	N0	M0
Stade IIA	T3	N0	M0
Stade IIB	T4a	N0	M0
Stade IIC	T4b	N0	M0
Stade III	Tous T	N1 ou N2	M0
Stade IIIA	T1 ou T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Stade IIIB	T3 ou T4a	N1	M0
	T2 ou T3	N2a	M0
	T1 ou T2	N2b	M0
Stade IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stade IVA	Tous T	Tous N	M1a
Stade IVB	Tous T	Tous N	M1b

D'autres descripteurs optionnels informant sur le risque métastatique peuvent être ajoutés au stade TNM [TNM]. Pour le CCR, les deux descripteurs optionnels mentionnés de manière systématique dans les comptes-rendus histopathologiques français (recommandations INCa) sont l'absence/présence d'embol veineux macro ou microscopique, l'absence/présence d'engainement tumoral microscopique périnerveux et l'absence/présence d'embolie lymphatique (Tableau II).

La qualité de la résection et la présence/absence de résidus tumoraux sont classés par le descripteur « R ». Une résection R0 indique l'absence de résidus tumoraux, c'est-à-dire que la résection est complète. Une résection R1 indique la présence de résidus tumoraux microscopiques, c'est-à-dire que l'examen microscopique a révélée qu'une limite de résection chirurgicale est envahie. Une résection R2 indique la présence de résidus tumoraux macroscopiques, c'est-à-dire que l'envahissement d'au moins une limite chirurgicale par la tumeur est visible à l'œil nu par le chirurgien et le pathologiste. C'est le cas notamment des excrèses palliatives ou à visée de réduction tumorale lorsqu'une chirurgie complète est impossible.

Tableau II. Descripteurs, optionnels de la classification TNM de l'UICC, 2009 [TNM].

V – Envahissement veineux	
VX	L'envahissement veineux ne peut être examiné
V0	Absence d'envahissement veineux
V1	Envahissement veineux microscopique
V2	Envahissement veineux macroscopique
Pn – Invasion périnerveuse	
PnX	L'invasion périnerveuse ne peut être examinée
Pn0	Absence d'invasion périnerveuse
Pn1	Présence d'invasion périnerveuse
L –Envahissement lymphatique	
LX	L'envahissement lymphatique ne peut être examiné
L0	Absence d'envahissement lymphatique
L1	Présence d'envahissement lymphatique

1.2.2.3 Les grades de différenciation

Les adénocarcinomes colorectaux étaient traditionnellement gradés en quatre grades de différenciation : 1-bien, 2-modérément, 3-peu ou 4-indifférenciés sur la base du pourcentage de formations glandulaires. Le carcinome indifférencié (grade 4) est maintenant un terme d'exclusion réservé aux tumeurs épithéliales malignes qui ne montrent aucune formation glandulaire, ni sécrétion de mucine, ni différenciation endocrine ou épithélioïde ou sarcomatoïde. Actuellement les termes "bas" et "haut" grades sont privilégiés pour l'utilisation clinique car les carcinomes bien et modérément différenciés ont le même comportement clinique (évolution moins rapide que les cancers de grade 3/peu différenciés) et cette appellation serait plus reproductible. De plus, les avancées dans les classifications moléculaires des adénocarcinomes coliques ont abouti à reclasser tous les adénocarcinomes avec haut niveau d'instabilité des microsatellites (MSI-H), même indifférenciés en "bas" grade (Tableau III) [Hamilton, Rosty].

Certains variants morphologiques, comme le carcinome mucineux ou l'adénocarcinome à cellules en bagues à chaton, ont leur propre grade de différenciation indépendant du pourcentage de formation glandulaire [Hamilton].

Tableau III. Critères pour établir le grade histopathologique des adénocarcinomes colorectaux [Hamilton].

Critère	Catégorie de différentiation	Grade numérique	Grade descriptif
> 95% de formations glandulaires	Bien différencié	1	bas
50 – 95% de formations glandulaires	Modérément différencié	2	bas
> 0 – 49% de formations glandulaires	Peu différencié	3	haut
MSI-H	Variable	Variable	bas

1.2.2.4 Le budding

Le bourgeonnement tumoral ou *budding* est actuellement définis comme un phénomène morphologique observé au front d'invasion de la tumeur, où des cellules isolées ou des petits amas de moins de 5 cellules, des *buds*, se détachent de l'adénocarcinome et migrent sur une petite distance au sein d'un stroma le plus souvent desmoplasique [Hase, Max, Ueno 2002]. Le *budding* représenterait un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse localisé, bien que ce concept soit encore débattu [Yamada]. De façon plus consensuelle, dans les CCR, le *budding* est un puissant facteur prédictif d'embols lymphatiques, de métastases ganglionnaires, de récurrence et décès à 5 ans quelque soit le stade du CCR [Rogers]. En pratique courante son évaluation est utile pour discuter la colectomie complémentaire après exérèse d'un polype transformé avec infiltration de la sous-muqueuse (stade pT1), du fait du risque de métastase ganglionnaire [Bosch, Pai], ou pour discuter une chimiothérapie adjuvante dans les CCR de stade II [Petrelli].

Plusieurs systèmes de quantification de ce phénomène de *budding* ont été proposés dans la littérature utilisant les lames d'histologie standard ou l'immunohistochimie anti-pancytokératines. Ces systèmes reposent sur la quantification du nombre de *buds* visible sur une surface définie ou un nombre de champs défini au front d'invasion de la tumeur. Bien que le *budding* soit un puissant indicateur pronostique, son évaluation et son utilisation ne se sont pas encore généralisées du fait d'un manque de consensus sur la façon dont il faut l'évaluer. L'utilisation de l'immunohistochimie anti-pancytokératine permet de voir plus de *buds* et serait donc plus performante pour l'évaluation et la gradation du *budding* mais impose un surcoût et un délai supplémentaire de réponse [Koelzer 2015]. Certains auteurs rapportent que l'immunohistochimie n'apporte pas d'indication supérieure à l'évaluation sur lame seulement colorée par HES (Hématéine-Eosine-Safran) pour la prédiction des métastases ganglionnaires dans les CCR pT1 [Okamura].

Un système simple, rapide, peu coûteux et reproductible (kappa test à 0,85) a été mis au point par Wang et coll. en 2009 [Wang LM]. Le principe est d'examiner sur les lames colorées par Hématéine-Eosine 5 champs au grossissement x200 (objectif x20 et oculaires x10), dans la zone de plus haut *budding* repérée au faible grossissement x40. Pour chaque champ, on reporte (+) si au moins 1 *bud* est présent ou (-) s'il n'y a pas de *bud* sur la zone examinée. Le cas est considéré comme ayant un phénomène de *budding* important (BUDhigh) quand >50% des champs examinés sont positifs et comme ayant un phénomène de *budding* faible (BUDlow) quand <50% des champs examinés sont positifs (figure 8). La valeur pronostique péjorative de ce système a été validée pour les CCR de stade II dans l'étude qui l'a proposée [Wang LM].

En 2016, une conférence de Consensus qui a eu lieu à Bern avait pour but de standardiser la méthode de détermination de *budding*. Les conférenciers sont parvenus au consensus suivant : le *budding* doit être évalué sur 1 lame HES dans 1 champ microscopique de 0,785 mm² repéré à faible grossissement comme étant le champ de plus fort *budding* du cas. Trois grades de *budding* résultent de ce compte : Low (0-4 *buds*), intermédiaire (5-9 *buds*), high (≥10 *buds*) [Lugli]. Les conférenciers proposent d'intégrer ce système de qualification du *budding* dans le prochain TNM pour standardiser les résultats les études à venir utilisant ce système.

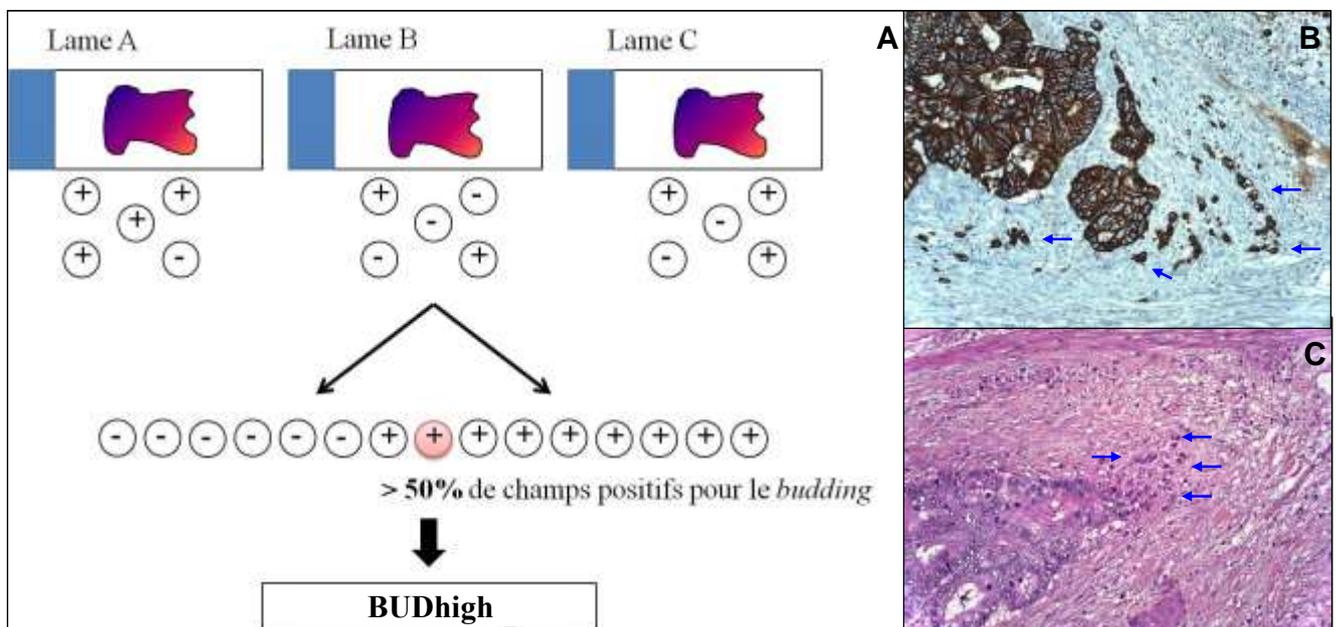


Figure 8 : Illustration de la méthode de quantification de phénomène de *budding* selon la méthode de Wang [Wang LM]

A. Système de quantification rapide décrit par Wang [Wang LM]. Quand plus de 1 champ au grossissement x200 sur 2 contient des *buds*, le cas est classé en BUDhigh. **B-C.** Présence de phénomène de budding (flèches bleues) dans un champ examiné au grossissement x200. **B.** Immunomarquage par anti-AE1/AE3. **C.** Coloration Hématéine Eosine Safran (HES).

1.2.2.5 L'inflammation stromale et l'immunoscore

La caractérisation des critères histopronostiques prend en compte essentiellement l'adénocarcinome en lui-même, c'est-à-dire les glandes/cellules tumorales, mais de plus en plus de travaux montrent l'importance du microenvironnement tumoral, c'est-à-dire le stroma, dans la progression tumorale et par conséquent le pronostic [Buache]. La caractéristique stromale la plus étudiée dans les cancers colorectaux est l'inflammation.

L'inflammation stromale par des lymphocytes T CD3+, CD8+, CD45RO+ est indicatrice de bon pronostic et est associée à l'instabilité des microsatellites [Galon 2006, Hamilton, Mlecnick]. La prédiction pronostique de l'infiltration stromale serait même meilleure que celle donnée par le TNM [Galon 2006]. L'association inflammation stromale – instabilité microsatellitaire a été confirmée dans la dernière classification moléculaire des cancers. Les CCR MSI-H y sont appelés *Consortium Molecular Subtype 1* (CMS1) MSI-hyperimmuns [Guinney, Muller]. L'instabilité des microsatellites dans les CCR entraîne des accumulations d'erreurs. Les CCR MSI ont 10 à 100 fois plus de mutations somatiques que les CCR MSS [TCGA, Timmermann]. En conséquence, la cellule produit de nombreuses protéines mutées qui peuvent être reconnues comme des néo-épitopes par le système immunitaire et stimuler l'inflammation. La valeur pronostique de l'infiltration lymphocytaire par des lymphocytes T se vérifie aussi pour les cancers MSS [Dahlin].

L'intérêt pour la réaction immunitaire stromale dans les cancers connaît un regain depuis le développement des immunothérapies. En effet, l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses est leur capacité à échapper à l'activité de contrôle du système immunitaire. L'un des mécanismes est l'inactivation des lymphocytes T par liaison des cellules cancéreuses avec le récepteur PD-1 (*Programmed cell Death 1*) à la surface du lymphocyte [Mittal]. Récemment, de nouveaux agents de thérapie ciblée anti-PD1 tels que pembrolizumab ont été développés pour restaurer la réponse immunitaire anti-tumorale et ont montré des résultats encourageants dans les CCR métastatiques MSI [Le].

L'évaluation microscopique de l'inflammation stromale n'est pas encore standardisée. Elle peut se faire de façon qualitative (présence/absence) sur lames HES, mais cette méthode ne permet pas de différencier les différents types de lymphocytes. Par exemple, les lymphocytes avec des fonctions régulatrices comme les lymphocytes CD4+, les lymphocytes *Natural Killer*, des lymphocytes B ou les lymphocytes T CD8 cytotoxiques, ne peuvent pas être distingués sans marqueur approprié. La meilleure façon d'évaluer l'inflammation stromale

reposerait donc sur une évaluation immunohistochimique des lymphocytes T CD3+ et CD8+ au centre et au front d'invasion de la tumeur. Ce type d'évaluation est celui proposé sous le nom d'Immunoscore qui a montré son efficacité dans la prédiction du pronostic des CCR [Mlecnik]. Ce score, en cours d'évaluation et de standardisation [Galon 2014], doit être évalué par une technique d'analyse d'image sur les lames d'immunohistochimie anti-CD3 et CD8, ce qui limite son usage en routine.

1.2.2.6 Les scores de régression tumorale pour les cancers traités avant exérèse

Outre l'étude de la morphologie, la différenciation, l'extension tumorale, le micro-environnement tumoral, le pathologiste doit évaluer la réponse histologique aux traitements néo-adjuvants, c'est à dire délivrés avant l'exérèse.

Dans les CCR, cette réponse histologique est évaluée principalement dans 2 contextes : les adénocarcinomes du rectum traités par RCT néo-adjuvante et les métastases hépatiques des CCR traités par chimiothérapie.

Pour chaque scénario clinique, plusieurs scores ont été proposés dans la littérature reposant sur l'évaluation du pourcentage de cellules tumorales résiduelles et sur l'évaluation de la réponse fibro-inflammatoire au traitement. Pour les cancers du rectum, le premier système d'évaluation de la réponse tumorale qui a été développé est actuellement le plus utilisé. Il s'agit du score de régression tumorale de Dworak [Dworak]. D'autres scores basés sur le même principe ont depuis été développés. Tous ont montré que la réponse histologique complète ou presque complète était associée à une meilleure survie sans progression [Kim SH].

Comme pour les adénocarcinomes rectaux, un score basé sur l'évaluation du pourcentage de cellules tumorales résiduelles et sur l'évaluation de la réponse fibro-inflammatoire a été développé pour les métastases hépatiques de CCR en 2007 [Rubbia-Brandt]. La réponse histologique complète ou presque complète était associée à une meilleure survie sans progression. D'autres scores ont été proposés depuis mais le score de Rubbia-Brandt reste le plus utilisé actuellement.

Une étude a récemment révélé que le score de régression tumorale était également un facteur prédictif de survie sans progression pour les patients atteints de carcinose péritonéale d'origine colorectale et traitée par chimiothérapie néo-adjuvante [Passot].

1.2.3 Les tests moléculaires

Lors du diagnostic d'adénocarcinome colorectal, plusieurs tests moléculaires sont utiles pour compléter le diagnostic anatomopathologique ou pour guider la décision thérapeutique. Nous allons ci-dessous détailler les principales anomalies moléculaires utilisées pour le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des CCR.

1.2.3.1 Instabilité microsatellitaire

Le CCR est la conséquence d'une accumulation d'altérations génétiques avec deux principaux profils d'altérations décrits : l'instabilité chromosomique et l'instabilité génétique. L'instabilité chromosomique avec perte d'hétérozygotie est impliquée dans environ 85% des CCR sporadiques. L'instabilité génétique avec déficit du système MMR, initialement observée dans les CCR héréditaires du syndrome de Lynch, est observée dans environ 15% des CCR sporadiques [Müller]. Dans les cancers héréditaires, le déficit du système MMR est en rapport avec une mutation d'un gène codant une des protéines de ce système : *MLH1* ou *MSH2* le plus souvent, plus rarement *MSH6* ou *PMS2*. De façon exceptionnelle, la mutation peut concerner un gène non directement impliqué dans le système MMR : le gène *EPCAM*. La mutation de ce gène entraîne de façon indirecte une hyperméthylation du promoteur de *MSH2* et donc son inactivation [Tiwari]. Dans les cancers sporadiques, le déficit du système MMR est en rapport avec la méthylation du promoteur du gène *MLH1*, empêchant sa traduction. Le déficit du système MMR (figure 9) qu'il soit d'origine héréditaire ou sporadique est responsable de l'accumulation et la persistance de mutations sur tout le génome et plus particulièrement dans des séquences répétées mono, di, tri ou tétranucléotidiques appelées microsatellites, donnant lieu au phénomène d'instabilité des microsatellites (MSI) [Timmermann, Tiwari].

Les CCR sporadiques MSI-H ont un profil clinico-pathologique particulier : CCR prédominant chez la femme, au côlon droit, composante tumorale mucineuse, peu différenciée ou festonnée plus fréquente, stroma inflammatoire. Au niveau moléculaire, les CCR MSI sporadiques sont fréquemment associés à mutation du gène *BRAF* et à un phénotype hyperméthylateur (CIMP-H) responsable de la méthylation du promoteur du gène *MLH1* [Hamilton, Tiwari].

La recherche d'instabilité microsatellitaire est recommandée dans de très nombreuses situations cliniques à tel point que certains recommandent une recherche systématique dans tous les CCR [Tiwari].

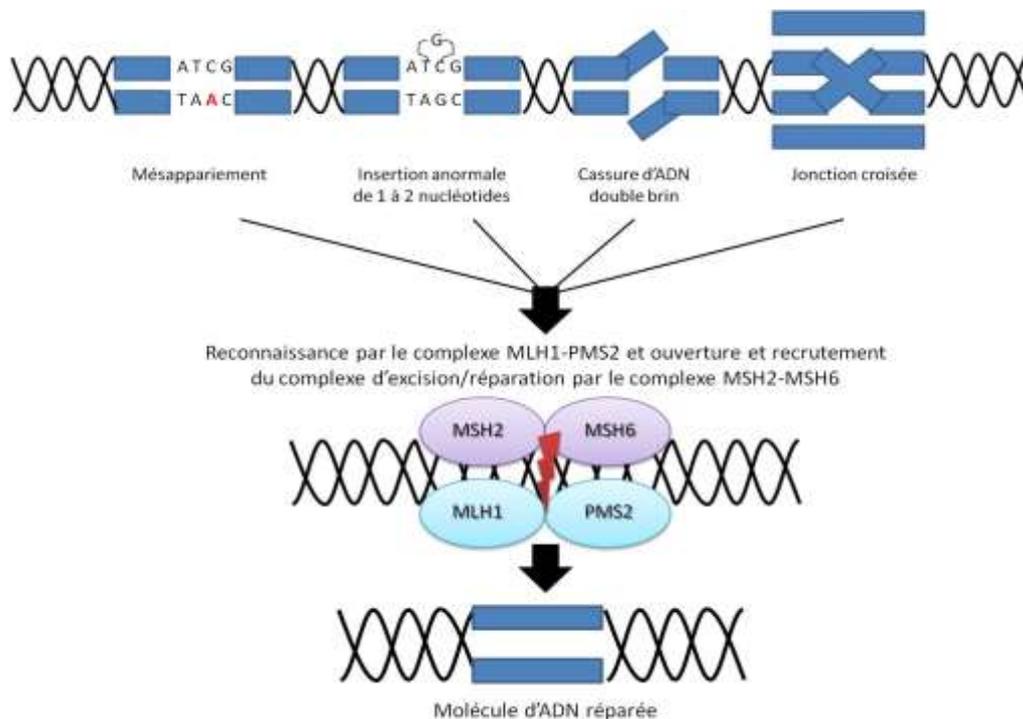


Figure 9 : Principe de fonctionnement du système *MisMatch Repair*

La recherche de l'instabilité microsatellitaire a tout d'abord pour but de dépister un syndrome de Lynch, lorsque le CCR survient chez un patient âgé de moins 60 ans ou quelque soit l'âge au moment du diagnostic en cas de cancers multiples du spectre du syndrome de Lynch chez un même patient ou chez deux apparentés au 1er degré selon les critères d'Amsterdam revisités à Bethesda [Umar]. Parmi les CCR de phénotype MSI, il faut distinguer les cancers sporadiques (environ 80%), qui sont décrits majoritairement chez des sujets âgés, de ceux observés chez les patients atteints d'un syndrome de Lynch (20%). La recherche de déficit du système MMR peut être réalisée soit en recherchant une extinction de l'une des protéines MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 ou d'un couple de protéine (MLH1/PMS2 ou MSH2/MSH6) en immunohistochimie ou en recherchant une instabilité des microsatellites en biologie moléculaire à partir de coupes tissulaires sur biopsie ou prélèvements tumoraux opératoires [Ward]. Les études de biologie moléculaire vont classer le cas en 3 catégories : MSS, MSI-High et MSI-Low. En cas de tumeur MSI(-H) en biologie moléculaire et dans le cadre d'une suspicion de syndrome de Lynch, l'analyse immunohistochimique s'impose afin d'orienter le diagnostic génétique en ciblant les gènes codant la protéine ou le couple de protéine dont l'expression immunohistochimique est non détectable dans les cellules cancéreuses. Cette analyse immuno-histochimique complémentaire en cas de tumeur MSI en biologie moléculaire n'est pas nécessaire en cas de tumeur *BRAF* mutée car les mutations du gène *BRAF* ne sont observées que dans les CCR MSI sporadiques [Domingo].

Le statut MSI-L est très rare. Il n'est pas associé au syndrome de Lynch et semble conférer un mauvais pronostic [Kohonen-Corish].

Dans le cadre de la prise en charge des cancers du côlon de stade II la recherche d'un phénotype tumoral moléculaire MSI permet de décider du type de traitement à adopter. Les CCR sporadiques MSI-H ont un meilleur pronostic et répondent moins bien aux chimiothérapies à base de 5-Fluorouracile ou d'oxaliplatine que les CCR MSS [Cohen, Gryfe, Hutchins, Ribic, Sargent, Sinicrope, Zaanani].

En cas de CCR avancé (localement avancé et/ou métastatique), la détermination du statut MSI peut être utile pour orienter le patient vers un traitement par immunothérapie.

La détermination systématique du statut tumoral MSI dont la fréquence augmente avec l'âge (> 20% après 75 ans et > 30% après 85 ans), peut se justifier chez le sujet âgé pour des raisons pronostiques et éventuellement thérapeutiques vis à vis de l'indication d'une chimiothérapie adjuvante pour les stades II [Aparicio 2013, Aparicio 2014].

1.2.3.2 Voie des MAP Kinases : Statut RAS / BRAF

Les protéines RAS (*rat sarcoma viral oncogene*) sont impliquées dans l'une des principales voies de signalisation cellulaire : la voie des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). Cette voie de signalisation est située en aval de nombreux récepteurs et en particulier du récepteur de l'*Epidermal Growth Factor* (EGFR). Il s'agit d'un récepteur à activité tyrosine kinase, c'est à dire que lorsqu'il est activé il se dimérise, s'auto-active, recrute et active des protéines de signalisation par phosphorylation. Dans les cellules normales, cette voie est activée lorsque le ligand (EGF) se lie à son récepteur (EGFR). Cette liaison entraîne une dimérisation de l'EGFR et l'activation et le recrutement de la protéine adaptatrice GRB2 (*Growth Factor receptor-Bound protein 2*) qui à son tour recrute SOS1 (*Son of sevenless homolog 1*), une protéine d'échange de co-enzyme de transfert de phosphates GTP-GDP (Guanosine Triphosphate – Guanosine Diphosphate). Cette protéine SOS1 active RAS par transfert d'un groupement GTP à la place d'un groupement GDP. RAS active RAF (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase) par phosphorylation puis s'en suit une cascade de phosphorylation : RAF active MEK (MAP kinase-ERK kinase) qui active ERK (extracellular regulated MAP kinase) qui est transloqué dans le noyau pour aboutir à l'activation des facteurs de transcription MAP (*Mitogen Activated Protein*), qui activent la transcription de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire (Figure 10). RAS-GTP peut être désactivé par son activité GTPasique propre, stimulée par la protéine RASGAP (*RAS GTPase-activating protein*) ou par la Neurofibromine 1 (NF1) [Bollag, Robert, Vakiani].

En plus de cette voie dite « classique » des MAPK, RAS est également capable d'activer la voie de la PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) également impliquée dans la régulation de la survie cellulaire et la prolifération mais aussi l'angiogenèse. PI3K peut être activée directement par un récepteur à tyrosine-kinase ou par l'intermédiaire de la protéine RAS. PI3K peut être inhibée par PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*). La PI3K activée participe à la formation d'un composé lipidique membranaire, le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). Ce composé recrute la sérine/thréonine kinase AKT à proximité de la membrane plasmique, où elle est alors phosphorylée et activée. AKT activé va réguler mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) par phosphorylation. mTOR est également régulé par l'état nutritionnel de la cellule, c'est-à-dire par le taux en acides aminés ou en nutriments cytoplasmiques, et par l'hypoxie [Dreyer].

Il existe 3 protéines RAS homologues : K-RAS (Kirsten-RAS), N-RAS (Neuroblastoma RAS) et H-RAS (Harvey RAS) qui se distinguent par leur spécificité tissulaire. Ces protéines sont des membres de la superfamille des GTPases capable d'activer/inhiber d'autres GTPases [Robert].

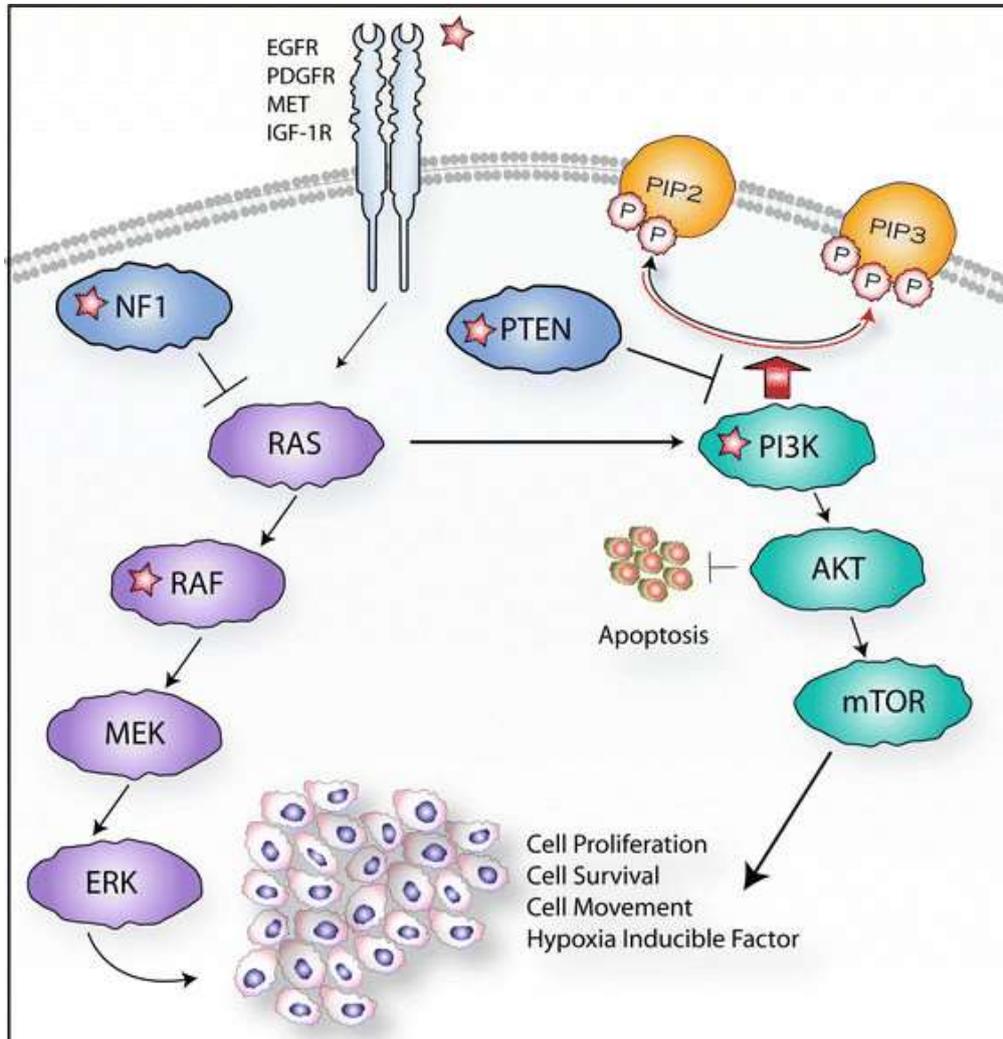


Figure 10 : La voie des MAP kinases [Becher].

Dans cette voie de signalisation, l'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase par liaison à son ligand entraîne une activation en cascade par phosphorylation des protéines de cette voie pour aboutir à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération, la survie et la migration cellulaire. RAS activé par le récepteur peut activer la « voie classique » RAS/RAS/MEK/ERK ou la voie PI3K/AKT/mTOR. NF1 et PTEN respectivement sont capable d'inhiber ses 2 voies.

Dans environ 40 à 50% des CCR, une activation constitutionnelle de cette voie de signalisation est observée. Elle résulte le plus souvent d'une mutation du gène *KRAS* (35-45%), mais également des gènes *PI3K* (4-14%), *NRAS* (4-10%) et *BRAF* (2-12%) dont la fréquence de mutation varie en fonction de l'origine géographique des patients [Al-Shamsi,

Balschun, Chang, Negru, Palomba, Zhang J]. Les protéines mutées restent sous une forme activée, indifférente aux signaux inhibiteurs et envoient en permanence en « aval » un message de prolifération. Pour le gène *KRAS*, une seule substitution d'acide aminé est responsable d'une mutation activatrice. Les sites de mutations les plus fréquents (90%) se situent aux codons 12 et 13 de l'exon 2 [Neumann, Peeters]. Pour le gène *NRAS*, les sites de mutations les plus fréquents se situent aux codons 12 et 13 de l'exon 2 et au niveau du codon 61 de l'exon 3 [Balschun, Peeters]. Pour le gène *PI3K*, les mutations les plus fréquentes se situent au niveau de l'exon 20 [Balschun]. Pour le gène *BRAF*, une seule substitution d'acide aminé au niveau de l'exon 2 est responsable d'une mutation activatrice. La mutation activatrice la plus fréquente (95%) et la plus oncogénique est une mutation ponctuelle responsable de la transition Valine > Glutamine en position 600 de la protéine BRAF (V600E). Les mutations impliquant les oncogènes *RAS* et *BRAF* sont mutuellement exclusives [Davies, Vakiani].

L'activation oncogénique des protéines *KRAS*, *NRAS* par mutation est associée à une non réponse au traitement ciblé par anti-EGFR et semblerait être indicatrice d'un mauvais pronostic du cancer [Douillard, Karapetis, Lièvre, Schwartzberg]. En pratique courante la détermination du statut RAS, combinant la recherche des mutations les plus fréquentes des gènes *KRAS* et *NRAS* est réalisée pour tous les patients avec un CCR métastatique afin de décider de la prescription ou non de thérapie ciblées anti-EGFR. La recherche de ces mutations a donc un intérêt pronostique et thérapeutique. Cette recherche peut être effectuée par différentes techniques de biologie moléculaire à partir de coupes tissulaires sur la biopsie ou les prélèvements tumoraux de la pièce opératoire. L'intérêt de la recherche de mutation *BRAFV600E* et *PI3K* pour cette même indication pronostique et thérapeutique est actuellement controversé [Dietel, Garcia-Alfonso, Rowland]. Cependant, du fait de la valeur pronostique péjorative reconnue de la mutation *BRAFV600E* dans les CCR, plusieurs essais thérapeutiques ciblant cette protéine mutée et d'autres protéines de la voie des MAPK sont en cours [Jones]. La recherche de mutation BRAF peut donc être réalisée en vue de l'inclusion de patients dans des protocoles thérapeutiques.

La recherche de mutation du gène *BRAF* est réalisée en pratique courante en cas de CCR MSI avec perte d'expression de MLH1 en immunohistochimie. Dans cette situation la mutation *BRAFV600E* permet de distinguer les CCR sporadiques (MSI BRAF mutés) des CCR entrant potentiellement dans le cadre du syndrome de Lynch. En effet, la mutation *BRAFV600E* est

présente dans 40 à 60% des CCR MSI sporadique et n'est pas retrouvée dans les CCR liés au syndrome de Lynch [Boissière-Michot, Domingo, Roth]. Le fait d'avoir un statut *BRAF* muté exclut donc le syndrome de Lynch. En revanche si *BRAF* n'est pas muté, le CCR peut être sporadique ou héréditaire. Dans ce cas des analyses complémentaires peuvent être réalisées comme la recherche du phénotype hyperméthylateur CIMP ou la recherche de méthylation du promoteur du gène *MLH1*. En effet, comme précisé ci-dessus, les CCR MSI sporadiques ont une instabilité microsatellitaire liée à la non transcription du gène *MLH1* en raison d'une hyperméthylation de son promoteur ce qui entraîne une absence de la protéine MLH1 et donc un déficit du système MMR. Le phénotype hyperméthylateur et en particulier la méthylation de MLH1 signent donc le caractère sporadique du CCR.

Ces analyses de méthylations ne sont demandées qu'en seconde intention en pratique courante car (1) toutes les plateformes de biologie moléculaire française ne disposent pas de la technique, (2) cette technique nécessite idéalement des prélèvements frais congelés pour limiter le nombre de faux négatifs (10% environ) sur prélèvement paraffinés [Boissière-Michot, Roth, Tournier]. Ces contraintes limitent donc sa recherche en pratique courante.

Concernant la recherche de mutation *BRAF*, plusieurs techniques sont disponibles, essentiellement des techniques de biologie moléculaire, mais un anticorps spécifique de la protéine BRAFV600E mutée a été développé. Cet anticorps utilisé en immunohistochimie semble performant pour screener le statut BRAFV600E des CCR [Boissière-Michot, Roth].

Dans le cadre de notre travail nous avons évalué la performance de cet immunomarquage sur des échantillons de CCR inclus dans des blocs de paraffine multi-tissulaires : les *Tissue MicroArray* (TMA).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons confirmé la performance diagnostique de cet immunomarquage sur TMA (Manuscrit 1). Nous avons cependant observé des faux positifs dans les cas de CCR à composante à cellules indépendantes en bague à chaton [Boulagnon].

1.2.3.3 Phénotype hyperméthylateur (CIMP)

La méthylation de l'ADN est un processus épigénétique de régulation de l'expression des gènes. La méthylation de l'ADN est une modification de l'une des quatre bases nucléotidiques (thymine, adénine, guanine et cytosine) qui consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (-CH₃) à la place d'un atome d'hydrogène. Bien que les quatre types de base puissent être méthylés, la cytosine est la plus fréquemment méthylée. La méthylation observée sur l'ADN normal a un rôle de régulation et d'empreinte génétique. Ce phénomène s'accroît avec l'âge. Dans le cadre du développement des cancers, ce sont des régions spécifiques du génome, nommées "îlots CpG", qui sont méthylées. Ces régions du génome sont connues pour être des régions de la régulation de l'expression des gènes : les promoteurs. Ce phénomène est appelé *CpG island methylator phenotype* (CIMP) [Issa]. En 1999, une étude a décrit pour la première fois ce phénomène dans les CCR [Toyota]. Depuis, un panel de 5 marqueurs spécifiques de l'hyperméthylation dans les CCR a été validé : le panel « classique ». Il permet de distinguer les cancers CIMP-H (*High* : 4-5 marqueurs méthylés sur les 5), CIMP-L (*Low* : 1-3 marqueurs méthylés sur les 5) et CIMP-Negative (aucun marqueur méthylé) [Barault, Issa, Juo]. Ce panel comprend 3 gènes *MINT* (*Methylated in tumor*) : *MINT1*, *MINT2* et *MINT31* et les gènes *CDKN2A* et *MLH1*.

Comme nous l'avons vu ci-dessus, la détermination du phénotype CIMP peut être utile dans les CCR MSI-H *BRAF* sauvage afin de départager les CCR sporadiques des CCR héréditaires pour lesquels une prise en charge spécifique et oncogénétique s'impose.

Cependant, ce phénotype n'est pas recherché en pratique courante pour les raisons évoquées précédemment (disponibilité de la technique et de prélèvements congelés) et aussi de problèmes liés à l'hétérogénéité des classifications CIMP dans la littérature (CIMP-*positive* et CIMP-*Negative* versus CIMP-H, CIMP-L et No CIMP) et l'hétérogénéité des panels de gènes utilisés pour déterminer ce phénotype [Juo].

Le phénotype CIMP-H (ou CIMP-*positive*) est observé dans en moyenne 18% des CCR [Barault, Juo]. Les CCR CIMP-H sont plus fréquents chez la femme, dans les CCR de localisation droite et sont associés à la mutation *BRAFV600E* et au phénotype MSI-H [Boissière-Michot, Barault, Juo, Hamilton].

Le phénotype CIMP-H ou CIMP est un facteur indépendant de mauvais pronostic pour les CCR colorectaux, son impact sur l'efficacité de la chimiothérapie au 5-Fluorouracile est encore discuté [Juo]. Comme pour *BRAF*, la recherche de ce phénotype est également intéressante dans le cadre de protocoles thérapeutiques.

1.3 Voies de cancérogenèse colique

On sait depuis les années 70, que le CCR est un processus multi-étapes avec des précurseurs : les adénomes (tubuleux, vilieux, tubulo-vilieux, avec dysplasie de bas ou de haut grade), qui aboutissent au cancer [Potet]. La connaissance de ce modèle de cancérogenèse a permis par la résection des adénomes et le suivi de prévenir le développement de cancer [Winawer]. Dans les années 90, des étapes moléculaires ont été superposées aux étapes morphologiques [Fearon, Vogelstein], réalisant un modèle multi-étapes linéaire d'accumulation d'altérations moléculaires au cours de la progression morphologique des lésions impliquées dans la cancérogenèse.

Depuis 30 ans, la découverte de nouvelles entités morphologiques et les progrès de la biologie moléculaire des cancers influencés par l'avancée des thérapies ciblées ont enrichi et élargi ce modèle de cancérogenèse. Certains auteurs classent désormais les CCR en fonction de leur profil moléculaire. De plus, l'OMS, dans sa dernière classification a pris en compte le statut MSI pour définir le grade des adénocarcinomes coliques [Hamilton]. La classification des CCR devient donc de plus en plus histomoléculaire à l'instar d'autres cancers.

Historiquement, 2 voies moléculaires avaient été décrites dans les CCR. La voie majoritaire est celle de l'instabilité chromosomique (CIN, Chromosomal Instability) avec des changements bruts dans le nombre et la structure des chromosomes, y compris les délétions, les gains, les translocations et autres réarrangements chromatiques. Ceux-ci sont souvent détectables par une fréquence élevée des altérations du nombre de copies somatiques (SCNA, *Somatic copy number alterations*) de l'ADN, qui est une caractéristique de la plupart des tumeurs qui surviennent par la séquence adénome-adénocarcinome. La seconde voie moléculaire en fréquence est celle de l'instabilité génétique avec instabilité microsatellitaire qui entraîne une hypermutation des gènes et un profil génique presque diploïde. Cette voie moléculaire correspondrait à la voie festonnée de la cancérogenèse colique [Müller].

A l'heure du séquençage haut débit, la classification moléculaire a été enrichie et plusieurs groupes ont été définis (Figure 11). Certains groupes se recoupent avec les 2 voies historiques [Müller]. Une voie minoritaire d'instabilité génétique avec hypermutation liée à la mutation des gènes DNA Polymerase Epsilon ou Delta 1 (*POLE* ou *POLD1*) impliqués dans la réparation de l'ADN a été mise en évidence dans l'une de ces études [TCGA]. Dans une autre étude, l'inflammation stromale a été ajoutée au profil moléculaire pour définir les sous groupes (Figure 11).

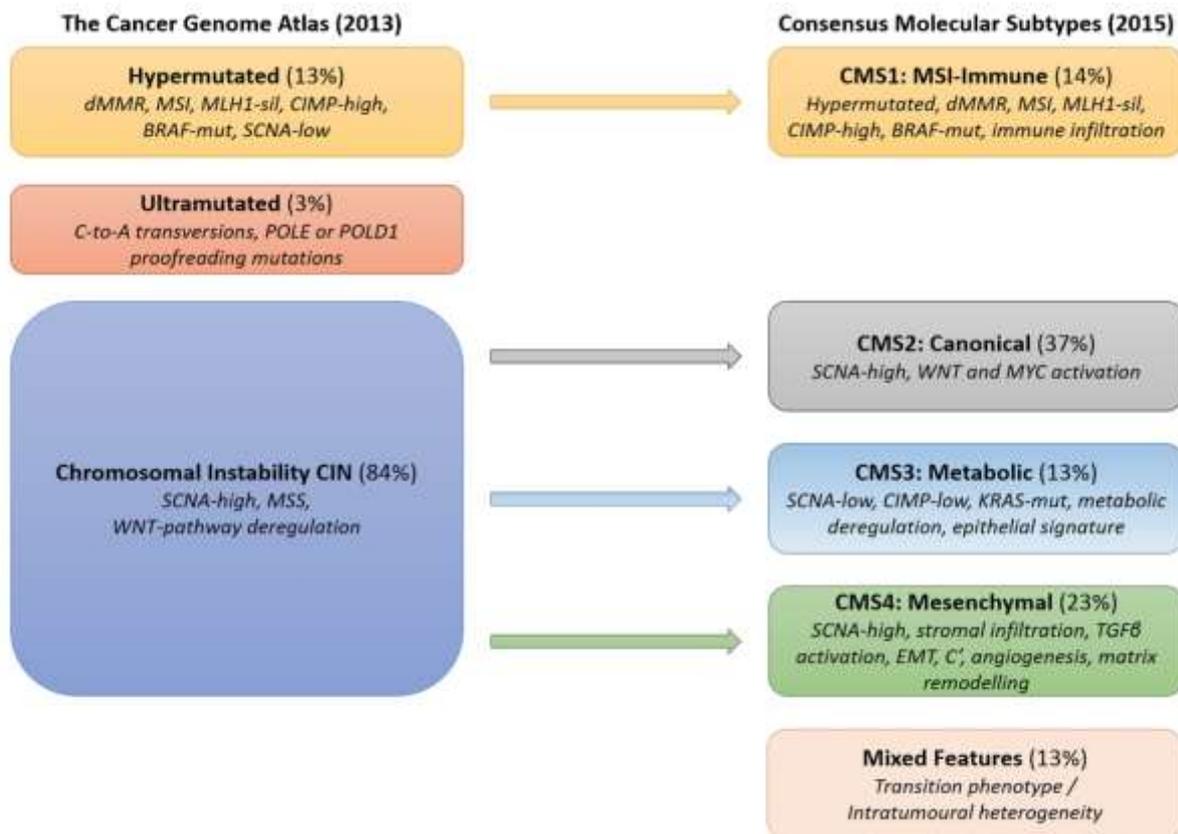


Figure 11. Les systèmes actuels de classification moléculaire des CCR [Müller].

Cette figure regroupe les données moléculaires des études menées par The Cancer Genome Atlas [TCGA] et l'équipe de Guinney [Guinney] qui a défini des sous-types moléculaires consensuels s'appuyant sur les études précédentes.

Les données morphologiques, moléculaires et évolutives décrites dans les lésions pré-néoplasiques et les adénocarcinomes colorectaux ont permis de décrire 2 voies de cancérogènes morphologiques et moléculaires. La découverte de nouvelles mutations et de nouveaux groupes moléculaires de CCR permettra certainement d'enrichir ces séquences morphologiques et moléculaires à l'avenir.

Ci-dessous, nous allons décrire brièvement ces 2 voies.

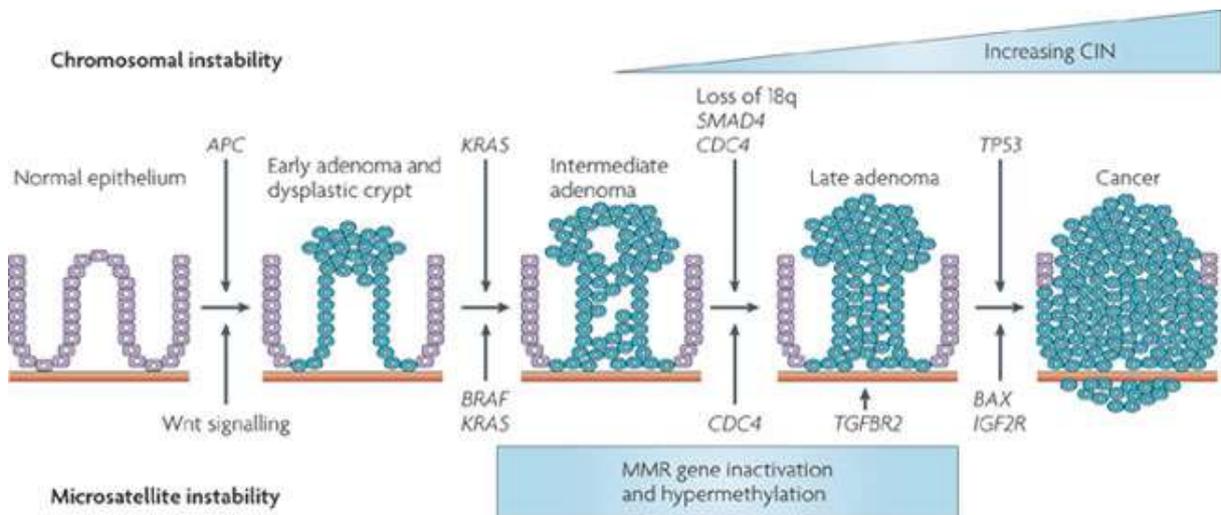
1.3.1 Voie classique : séquence adénome-adénocarcinome

Au niveau génétique, cette séquence est initiée par l'instabilité chromosomique par perte d'hétérozygotie de certains gènes et par les mutations du gène suppresseur de tumeur *APC*. Lorsque ce gène est muté, la protéine anormale synthétisée ne peut plus inhiber la translocation de la protéine bêta-caténine de la membrane plasmique vers le noyau, ce qui va entraîner la transcription de gènes impliqués dans la progression tumorale.

Puis apparaissent avec la progression dans la séquence des mutations activatrices de certains oncogènes comme *KRAS*, et des mutations inhibitrices de gènes suppresseurs de tumeur comme *SMAD2/4* (*Mothers against decapentaplegic homolog*), *P53*, ... aboutissant à un adénocarcinome ayant le plus souvent un profil *APC* muté, *KRAS* muté, MSS, *BRAF* non muté et CIMP négatif [Markowitz, Whalter].

L'instabilité génétique par défaut du système MMR liée à une hyperméthylation du promoteur de *MLH1* observée dans 10 à 15% des adénocarcinomes colorectaux n'est presque jamais observée dans les adénomes conventionnels (par opposition aux lésions festonnées) [Mäkinen 2001, O'Brien, Renaud]. L'instabilité génétique par défaut du système MMR n'est donc pas impliquée dans la séquence adénome-adénocarcinome.

La séquence morphologique et moléculaire de cette voie est illustrée dans la figure 12 ci-dessous.



Nature Reviews | Cancer

Figure 12 : Séquence adénome-adénocarcinome de la cancérogenèse colorectale [Walter].

1.3.2 Voie festonnée

Comme nous venons de le décrire ci-dessus, 10 à 15% des CCR se développent *via* la voie de l'instabilité génétique mais cette voie moléculaire n'est pas impliquée dans la séquence adénome-adénocarcinome. D'autres précurseurs sont impliqués dans la cancérogenèse des CCR avec instabilité génétique : les lésions festonnées. Les études portant sur une ou plusieurs des lésions de ce spectre ont montré un profil moléculaire particulier en comparaison avec les adénomes conventionnels avec une fréquence accrue de mutations du gène *BRAF* associée à une instabilité des microsatellites (MSI-H) et un phénotype CIMP-H [Mäkinen 2001, O'Brien, Renaud]. Ce profil moléculaire est celui observé dans les adénocarcinomes mucineux, à cellules en bague à chaton ou festonnés [Arifi, Chang SC, Hamilton, Mäkinen 2007, Pyo]. La concordance moléculaire et morphologique entre les polypes/adénomes festonnés sessiles et les adénocarcinomes festonnés appuie la réalité de cette voie de cancérogenèse. Le rôle de la mutation *BRAF* comme initiateur de cette voie de cancérogenèse a été démontré chez la souris [Rad].

Récemment, une anomalie moléculaire commune aux lésions de morphologie festonnées (polype hyperplasique, polype festonné sessile, adénome festonné traditionnel, adénocarcinome festonné) non présente dans les lésions non festonnées a été décrite : la surexpression de l'Annexine A10 en qRT-PCR et l'expression nucléaire de l'Annexine A10 en immunohistochimie [Gonzalo, Kim JH, Sajanti]. Le rôle cellulaire et le rôle dans la cancérogenèse festonné de l'Annexine A10 n'est pas encore connu. Ce marqueur est pour l'instant utilisé pour différencier une lésion festonnée d'une lésion non festonnée dans des lésions qui présentent un chevauchement morphologique.

1.4 Traitements

Le traitement du CCR dépend de plusieurs paramètres. Le stade du cancer catégorisé selon l'UICC, l'état de santé du patient, les caractéristiques morphologiques et moléculaires de la tumeur font partie des éléments importants discutés en RCP et qui permettent de décider de l'attitude thérapeutique à adopter. Les décisions suivent des recommandations et sont évaluées au cas par cas et certains patients peuvent être inclus dans des essais thérapeutiques évaluant de nouveaux schémas thérapeutiques.

Ci-dessous, différentes options thérapeutiques vont être détaillées.

1.4.1 Chirurgie

La chirurgie est indiquée dans certains cas après polypectomie pour un adénome transformé ou en cas d'adénocarcinome invasif accessible à la chirurgie chez un patient dont l'état de santé permet l'opération. Le type de résection dépend bien entendu de la localisation du cancer et de son caractère éventuellement plurifocal et du contexte de la résection (en urgence ou programmée). La résection du segment colique ou rectal atteint permet d'enlever également les ganglions péri-coliques/rectaux [Hohenberger]. En cas de CCR localement avancé ou métastatique, l'exérèse peut être étendue aux organes de voisinages ou à d'autres organes distants atteints. Idéalement l'exérèse doit être curative en emportant la tumeur en totalité. Dans certaines situations, l'exérèse est dite palliative car réalisée à visée symptomatique, c'est à dire pour soulager le patient de symptômes invalidants ou pour réduire la masse tumorale au maximum avant traitement complémentaire adjuvant.

Les options chirurgicales pour le cancer colique comprennent :

- la chirurgie dite « ouverte » lors de laquelle la résection segmentaire colique/rectale est réalisée après une incision plus ou moins large de la paroi abdominale (laparotomie), et
- la chirurgie laparoscopique, c'est à dire sous coelioscopie avec une ouverture limitée de la cavité abdominale, permettant une meilleure préservation de la paroi abdominale et un temps de récupération plus court.

La chirurgie laparoscopique donne des résultats comparables à la chirurgie ouverte concernant la qualité de l'exérèse (son caractère complet) et le taux de récurrence post-chirurgie. Ce type d'approche chirurgicale n'est pas encore recommandé pour les cancers du rectum [Guillou, Kuhry].

En cas de CCR métastatique, la chirurgie de la tumeur primitive et de la/des métastase(s) en 1 ou 2 temps peut se discuter avant ou après la chimiothérapie. La discussion en RCP repose sur le rapport risque/bénéfice de la chirurgie.

Pour les métastases hépatiques, les critères sont :

- le terrain : compatible avec anesthésie et résection de métastases
- carcinologiques : résection complète (R0) possible de toutes les métastases
- anatomiques : en cas d'envahissement vasculaire (pédicule portal, veines sus-hépatiques), résection permettant de laisser un parenchyme avec sa propre vascularisation et son drainage biliaire
- techniques : possibilité de laisser en place un volume résiduel > 25 % à 40 % de foie sain, selon l'existence ou non d'une hépatopathie sous-jacente
- chimiosensibilité : absence de progression sous chimiothérapie [TNCD 2].

Cette sélection et cette démarche s'applique aussi pour les métastases colorectales d'autres organes [Ribeiro Gomes].

La chirurgie pour le traitement des métastases hépatiques peut être associée à des traitements locaux visant à détruire ou à réduire la tumeur. Il s'agit de la radiofréquence ou du *microwave* qui consiste à détruire la métastase par un courant électrique dégageant de la chaleur appliqué dans la tumeur à l'aide d'une sonde en percutané ou peropératoire [TNCD 2].

1.4.2 Chimiothérapies

Une chimiothérapie n'est pas proposée de façon systématique à tous les patients atteints d'un cancer du côlon. Son utilité et son efficacité dépendent du stade du cancer. La chimiothérapie traditionnelle est basée sur le principe que les cellules tumorales prolifèrent plus que les cellules normales. La plupart des médicaments atteignent la cellule cancéreuse au moment où elle se divise, en faussant le mécanisme de la division cellulaire. Les tumeurs peu actives seront donc peu touchées. A l'inverse, les tissus sains très actifs (cellules sanguines, muqueuse, peau) seront atteints, et devront donc régénérer. Toutes les chimiothérapies ont donc une toxicité plus ou moins prononcée pour les tissus sains qui se renouvellent rapidement. L'utilisation de la chimiothérapie prendra donc en compte comme pour la chirurgie le rapport bénéfice/risque.

Pour les cancers localisés du côlon (stades I), la chirurgie peut suffire à elle seule à guérir le cancer. Le risque de récurrence est très faible et le bénéfice de la chimiothérapie non démontré.

Pour les cancers du côlon de stade II, en cas de tumeur à haut risque (pT4, tumeur perforée ou en occlusion, avec moins de 12 ganglions examinés, peu différenciée, avec embolies vasculaires, ou MSS), une chimiothérapie adjuvante (après la chirurgie) peut être envisagée en complément de la chirurgie [Niedzwiecki, TNCD1]. Les schémas de chimiothérapies proposés dans cette situation utilisent le plus souvent un antimétabolite analogue des bases pyrimidiques, le 5-FluoroUracile (5FU) ou la capécitabine. L'emploi de sels de platines, comme l'oxaliplatine, qui inhibent la sythèse de l'ADN par action alkylante peut se discuter. Les schémas recommandés sont le LV5FU2 (Acide folinique + 5 FU), le FOLFOX4 simplifié (LV5FU2 + oxaliplatine), XELOX (oxaliplatine + capécitabine) ou une fluoropyrimidine orale (analogue du 5FU mais administré par voie orale, comme la capécitabine par exemple). L'âge du patient, son état général et la neurotoxicité de l'oxaliplatine sont des éléments supplémentaires pour la décision thérapeutique.

Pour les cancers de stade III (avec métastases ganglionnaires), une chimiothérapie adjuvante est recommandée. Le schéma de chimiothérapie proposés dans cette situation est une bichimiothérapie (FOLFOX ou XELOX) et en option une monochimiothérapie. La décision dépend également de l'âge et l'état général du patient et tolérance aux agents de chimiothérapie utilisés (exemple de la neurotoxicité de l'oxaliplatine). L'emploi de thérapie ciblée associée à la chimiothérapie à large spectre n'est pas recommandé pour les stades III [TNCD1].

Pour les cancers de stade IV (métastatiques), le type de chimiothérapie dépendra de l'état général du patient, de la résecabilité du cancer, du statut RAS et de l'évolution du volume tumoral sous chimiothérapie. Plusieurs lignes de chimiothérapie, c'est à dire des schémas différents et de plus en plus agressifs vis à vis de la tumeur, pourront être proposés en cas d'évolution (de croissance ou diffusion) de la tumeur sous chimiothérapie. En situation métastatique, des agents de thérapie ciblée peuvent être associés aux agents de chimiothérapie à large spectre dès la première ligne de chimiothérapie. Les schémas de chimiothérapie peuvent être LV5FU2, FOLFOX, FOLFIRI (5FU + un inhibiteur de l'ADN topoisomérase 1 : l'irinotecan) ou FOLFIXIRI (FOLFOX + acide folinique + irinotecan) seuls ou en association avec un agent de thérapie ciblée [TNCD2]. Une nouvelle chimiothérapie orale de type analogue nucleosidique (Longsurf®) vient d'être approuvée en cas d'échec des autres chimiothérapies [Kish].

Dans les cancers du moyen et du bas rectum en cas de cancer de plus de 3 cm ou évalué au minimum T2 par imagerie, un traitement néoadjuvant (avant la chirurgie) par RCT est

indiqué. Une chimiothérapie adjuvante peut être proposée après l'opération en cas de cancer peut régressif, étendu au méso, dont la résection est incomplète microscopiquement ou avec métastases ganglionnaires. Les schémas de chimiothérapie utilisées sont le LV5FU2 ou le FOLFOX [TNCD3].

1.4.3 Thérapies ciblées

La thérapie ciblée est contrairement à la chimiothérapie à large spectre un traitement qui cible des protéines précises le plus souvent spécifiques du cancer ou du micro-environnement tumoral, limitant ainsi les dommages sur les tissus sains. Afin de délivrer la bonne thérapie ciblée, les patients doivent être sélectionnés en fonction du profil moléculaire de la tumeur (cf. 1.2.3 ci dessus).

Les thérapies ciblées indiquées dans le traitement du CCR métastatique sont, en dehors des essais thérapeutiques, des thérapies anti-angiogéniques ciblant le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou des thérapies ciblant l'EGFR. Le VEGF est un des facteurs pro-angiogéniques les plus importants, indispensable pour le développement des nouveaux vaisseaux tumoraux. Le récepteur à l'EGF est comme nous l'avons décrit ci-dessus (chapitre 1.2.3) un récepteur impliqué dans la principale voie de survie et de prolifération cellulaire : la voie MAPK. Nous allons ci-dessous lister les thérapies ciblées les plus utilisées pour le traitement des CCR métastatiques seules ou en monothérapie [TNCD2, e-cancer]:

- Le bevacizumab (Avastin) est un anticorps monoclonal qui se lie au VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et inhibe de ce fait la liaison du VEGF à ses récepteurs, VEGFR-1 et VEGFR-2, situés à la surface des cellules endothéliales. Le bévacizumab peut être utilisé en première ligne ou en deuxième ligne en association à la chimiothérapie.
- L'aflibercept (Zaltrap) est une protéine recombinante du VEGF qui se lie à ses récepteurs, VEGFR-1 et VEGFR-2 et les bloque. Il peut être combiné avec la chimiothérapie FOLFIRI en tant que traitement de deuxième intention.
- Le cetuximab (Erbix) est un anticorps monoclonal chimérique qui bloque l'EGFR. Il est indiqué en première ou deuxième ligne en association à la chimiothérapie chez les patients qui ont un cancer RAS sauvage.
- Le panitumumab (Vectibix) est un anticorps monoclonal humain qui bloque l'EGFR. Il est indiqué en première ou deuxième ligne en association à la chimiothérapie ou en monothérapie en dernière ligne chez les patients qui ont un cancer RAS sauvage.

- Le regorafenib (Stivarga) est un inhibiteur multikinase qui cible notamment RAF, VEGFR1 et 2. Il a été approuvé en 2012 pour les patients atteints de cancer colorectal métastatique qui ont déjà reçu certains types de chimiothérapie et d'autres thérapies ciblées. Il est indiqué en monothérapie en cas d'échec ou de contre-indication aux fluoropyrimidines, anti-VEGF et anti-EGFR.

Les traitements ciblés anti-BRAFV600E, efficaces dans le traitement des mélanomes n'ont pas montré leur efficacité pour le traitement des CCR métastatiques *BRAFV600E* mutés. Un mécanisme de résistance à ces traitement serait la réactivation de la voie des MAPK par mutation d'autres protéines de la voie MAPK comme MEK ou activation de MET (MET proto-oncogene) [Corcoran, Pietrantonio, Straussman]. Des schémas associant les anti-BRAFV600E à d'autres inhibiteurs de la voie MAPK ou aux inhibiteurs de MET sont en cours d'évaluation [Jones].

Les agents de thérapie ciblée anti-PD1, tels que le pembrolizumab ou le nivolumab, sont en cours d'évaluation pour le traitement des CCR métastatiques MSI (NCT01876511, NCT02563002, NCT02460198 de ClinicalTrial).

1.4.4 Radiothérapie

Dans le traitement des CCR, la radiothérapie est essentiellement indiquée pour le traitement des adénocarcinomes rectaux.

Les adénocarcinomes rectaux sont modérément radiosensibles, une dose de 92 Gy étant nécessaire pour stériliser les tumeurs T3 dans 50 % des cas [TNCD3].

La radiothérapie ou RCT préopératoire est préférée à la radiothérapie postopératoire en raison d'une meilleure observance, d'une plus faible toxicité et d'une plus grande efficacité sur le contrôle local même en cas de marge envahie. La radiothérapie préopératoire diminue la fréquence des récurrences locales, y compris en cas d'exérèse optimale du mésorectum. L'association radio-chimiothérapie préopératoire permet de diminuer de moitié le taux de récurrence locale à 5 ans par rapport à la radiothérapie seule (8% vs 16%) au prix d'une légère surtoxicité. La radiothérapie est efficace sur le contrôle local mais n'influence pas la survie. Depuis l'amélioration de l'exérèse chirurgicale et la diminution du taux de récurrence locale entre 5% et 10%, aucun essai n'a pu montrer un bénéfice de survie liée au traitement [TNCD3].

Pour le traitement des métastases hépatiques, une radiothérapie stéréotaxique peut être discutée dans des centres experts lorsque les métastases sont peu nombreuses et non

résécables. Les patients éligibles pour la radiothérapie stéréotaxique sont des patients ayant une maladie contrôlée, avec 1 à 3 métastases hépatiques de taille ≤ 6 cm présentant une contre-indication chirurgicale, un bon état général, un volume de foie sain ≥ 700 cm³ et une fonction hépatique correcte [TNCD2].

1.4.5 Options thérapeutiques par stade

Les différentes possibilités de traitements détaillées ci-avant sont résumées dans le tableau IV ci-dessous pour chaque stade du cancer du côlon. Le traitement des cancers du rectum peut comporter en plus de la radiothérapie ou RCT pré ou post-opératoire.

Tableau IV : Traitement des cancers coliques par stade.

Stades	Traitements
Stade I	- Chirurgie : exérèse du segment colique atteint
Stade II	- Chirurgie : exérèse du segment colique atteint - Dans certains cas, une chimiothérapie peut être envisagée en complément de la chirurgie, notamment si la tumeur présente des caractéristiques agressives
Stade III	- Chirurgie : exérèse du segment colique atteint - Chimiothérapie adjuvante recommandée pour réduire le risque de récurrence
Stade IV	- Chirurgie : deux interventions peuvent être envisagées ; la première pour retirer la portion du côlon atteinte, la deuxième pour retirer la ou les métastases. Parfois, une même intervention permet de retirer à la fois la tumeur primitive du côlon et la ou les métastases. Dans d'autres cas, il n'est pas possible d'opérer. - Chimiothérapie : elle peut être réalisée avant la chirurgie ou entre 2 chirurgies pour réduire la taille des métastases et faciliter l'exérèse, ou en traitement principal en cas de cancer inopérable - Thérapie ciblée anti-EGFR ou anti-VEGF en fonction du statut RAS et de l'évolution sous-chimiothérapie

1.5 Eléments pronostiques

1.5.1 Le stade tumoral

Le stade tumoral, c'est-à-dire l'extension anatomique du cancer au moment du diagnostic est le principal élément pronostique. Comme nous l'avons vu ci-dessus, le stade tumoral est l'indicateur principal de groupes pronostiques utilisé pour la décision thérapeutique.

- Pour les cancers du côlon :

Les chiffres ci-dessous proviennent de la base de données SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*) de l'Institut national du cancer américain, examinant les patients diagnostiqués avec un cancer du côlon entre 2004 et 2010 [Cancer.org, SEER].

Le taux de survie relative à 5 ans pour les patients atteints de cancer du côlon de **stade I** est d'environ **92%**.

La survie n'est pas homogène pour les patients atteints de cancer du côlon de stade II et III avec des chevauchements entre ces deux stades.

Les patients atteints d'un cancer du côlon de **stade IIA** (pT3N0) ont un pourcentage de survie relative à 5 ans d'environ **87%**. Pour le cancer de **stade IIB/C** (pT4N0), le pourcentage de survie est d'environ **63%**. Le pourcentage de survie relative à 5 ans pour les cancers du côlon au **stade IIIA** est d'environ **89%**. Pour les cancers de **stade IIIB**, le pourcentage de survie est d'environ **69%** et, pour les cancers de **stade IIIC**, le pourcentage de survie est d'environ **53%**. Les cancers du côlon métastatique (**stade IV**) ont un pourcentage de survie relatif de 5 ans d'environ **11%**.

Ces données représentées dans le graphique ci-dessous, montrent que le stade UICC est insuffisant pour bien séparer les groupes de pronostique dans les cancers coliques de stades II-III. D'autres indicateurs pronostiques sont donc utiles pour décider du traitement complémentaire après la chirurgie. D'autres études ont confirmé que l'édition 2009 du TNM n'améliorait pas la prédiction pronostique par rapport à l'édition précédente [Nitsche].

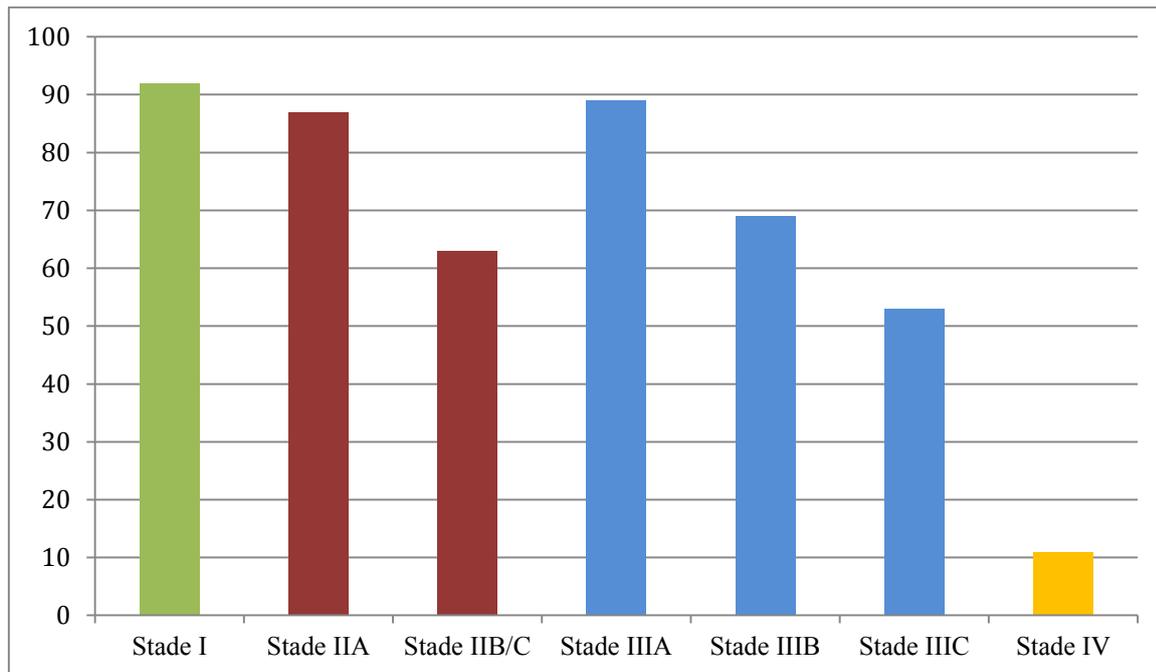


Figure 13 : Pourcentage de survie à 5 ans en fonction du stade UICC pour les patients atteints d'adénocarcinome colique.

- Pour les cancers du rectum :

Les chiffres ci-dessous proviennent de la base de données SEER de l'Institut national du cancer américain, examinant les patients diagnostiqués avec un cancer du rectum entre 2004 et 2010 [Cancer.org, SEER].

Le taux de survie relative à 5 ans chez les patients atteints d'un cancer rectal au **stade I** est d'environ **87%**.

Pour les patients atteints de cancer du rectum au **stade IIA**, le pourcentage de survie relative à 5 ans est d'environ **80%**. Pour le cancer de **stade IIB/C**, le pourcentage de survie est d'environ **49%**. Le pourcentage de survie relative à 5 ans pour les cancers rectaux au **stade IIIA** est d'environ **84%**. Pour les cancers de **stade IIIB**, le pourcentage de survie est d'environ **71%** et, pour les cancers de stade **IIIC**, le pourcentage de survie est d'environ **58%**. Les cancers rectaux de **stade IV** ont un pourcentage de survie relative à 5 ans d'environ **12%**.

Ces données montrent que, comme pour les cancers du côlon, le stade UICC est insuffisant pour bien séparer les groupes de pronostiques dans les cancers rectaux de stades II-III. D'autres indicateurs pronostiques sont donc utiles pour décider du traitement complémentaire après la chirurgie.

Dans les cancers du rectum, la détermination des marges chirurgicales, et notamment circonférentielles, au niveau du méso-rectum apporte un élément pronostique supplémentaire au stade TNM. L'atteinte des marges circonférentielles (c'est-à-dire des marges de résection

du mésorectum) est associée à un stade de cancer rectal plus avancé et à une moins bonne survie sans récurrence et globale [Bhangu, Kennelly].

La qualité des marges de résection est également un facteur prédictif de survie pour les CCR avec métastase(s) hépatique(s) opérée(s). Dans cette situation, lorsque cela est possible, une marge >1 cm permet d'améliorer la survie [Liu].

1.5.2 Le patient et le contexte opératoire

L'état général du patient évalué par le *Performance Status* défini par l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) en 1982 (Tableau V) vient compléter le TNM pour la décision thérapeutique [Oken]. Un patient en bon état général sera capable de supporter des traitements plus agressifs et donc potentiellement plus efficaces qu'un patient en mauvais état général. Les patients avec un faible index de masse corporelle et un âge avancé sont également plus fragiles. Ces éléments cliniques, en plus du *Performance Status* sont indicateurs de mortalité précoce chez les patients atteints de CCR métastatiques [Renfro]. Pour ces patients fragiles, la mortalité précoce est plus liée à l'état de santé globale du patient qu'au cancer [Niedzwiecki].

Tableau V : *Performance Status* de l'Eastern Cooperative Oncology Group [Oken].

Score	description
0	Asymptomatique (activité normale : aucune restriction à poursuivre les activités précédant l'affection)
1	Symptomatique (gêné pour les activités physiques soutenues mais capable de se déplacer seul et d'assurer un travail léger ou sédentaire, par exemple un travail de bureau ou le ménage)
2	Symptomatique, alité moins de 50 % de la journée (capable de se déplacer seul et de s'occuper de soi-même mais incapable de produire un travail léger).
3	Symptomatique, alité plus de 50 % de la journée, sans y être confiné (capable de prendre soin de soi-même de manière limitée, alité ou confiné au fauteuil plus de 50 % de la journée)
4	Confiné au lit (totalement dépendant, incapable de prendre soin de soi-même, confiné au lit ou au fauteuil)
5	Mort

Le contexte opératoire est aussi un facteur pronostic important. En effet les patients opérés en urgence dans un contexte d'obstruction ou de tumeur perforée ont une moins bonne survie

globale que les patients pour lesquels la chirurgie est programmée, en raison d'une mortalité opératoire accrue et de CCR de stades plus avancés [Charbonnet, Wong].

La survenue de lachage anastomotique après la chirurgie est également un facteur de mauvais pronostic [Bakker]. Lorsque la chirurgie est programmée, le délai d'intervention ne semble pas influencer la survie [Amri].

1.5.3 La localisation du cancer

Les tumeurs du côlon droit sont associés à un moins bon pronostic que les tumeurs du côlon gauche quel que soit le stade du cancer [Brungs, He, Ishihara, Tejpar 2016]. De plus, les cancers du côlon droit métastatiques répondent moins bien à la chimiothérapie que les cancers du côlon gauche. Ceci suggère que pour les CCR métastatiques la localisation de la tumeur primitive doit être prise en compte, en plus du statut RAS pour la décision thérapeutique [He, Tejpar 2016].

Les tumeurs du rectum n'ont pas un pronostic très différent des cancers du côlon gauche [Lee YC].

1.5.4 Les critères histopronostiques

Les critères histopronostiques sont des critères pronostiques évalués après analyse microscopique de la tumeur ou de biopsies tumorales. L'examen microscopique des CCR est toujours précédé d'un examen macroscopique. Dans les CCR, celui-ci est capital pour prélever l'ensemble des ganglions du méso-côlon/rectum. Afin que l'analyse des ganglions puisse être exhaustive pour ne pas sous-grader le statut ganglionnaire du patient, les pathologistes peuvent avoir recours à des fixateurs particuliers. En dépit d'une recherche exhaustive de ganglions péricoliques, lorsque le nombre total de ganglions est inférieur à 12, le pronostic est moins bon [Niedzwiecki]. Il se peut aussi qu'aucun ganglion ne soit observé mais que le pathologiste retrouve des dépôts tumoraux péri-coliques/rectaux qui sont considérés dans le TNM de 2009 comme équivalent à une atteinte ganglionnaire : stade pN1c. La présence de dépôts tumoraux péri-coliques/rectaux est associée à un mauvais pronostic [Nagtegaal].

De façon tout à fait compréhensive, les embolies vasculaires ou lymphatique et les engainements périnerveux sont des facteurs de mauvais pronostic [Compton].

La mauvaise limitation du front d'invasion en profondeur est également associée à un mauvais pronostic [Koelzer 2014]. La présence de phénomène de budding au front d'invasion est associée à un mauvais pronostic [Petrelli, Rogers, Wang].

Le sous-type histologique d'adénocarcinome peut aussi influencer le pronostic, comme nous l'avons décrit ci-avant. Les adénocarcinomes mucineux du rectum sont associés à une mauvaise réponse à la radiochimiothérapie (RCT) pré-opératoire et à un mauvais pronostic global [McCawley, Wang MJ]. L'impact pronostic n'est pas clairement établi dans les cancers coliques [Chang SC, Hogan, Inamura, Maeda, Wang MJ, Warschkow]. Les adénocarcinomes festonnés à cellules en bague à chaton et micropapillaires sont associés à un mauvais pronostic [Arifi, Garcia-Solano, Huguenot, Inamura, Lee HJ, Lei, Shida, Verdù]. L'impact pronostique des adénocarcinomes médullaires n'est pas défini [Knox, Pyo].

La mauvaise différenciation et la perte d'expression du marqueur de différenciation intestinal CDX2 en immunohistochimie sont aussi associés à une moins bonne survie, notamment dans les stades II et III, ainsi qu'à une moins bonne réponse à la chimiothérapie [Dalerba].

L'inflammation stromale par des lymphocytes T CD3+, CD8+, CD45RO+ est indicatrice de bon pronostic [Galon 2006, Hamilton, Mlecnick]. La prédiction pronostique de l'infiltration stromale serait même meilleure que celle donnée par le TNM [Galon 2006].

La réponse histologique complète ou presque complète sur le site primitif et les métastases est associée à une meilleure survie sans progression [Kim SH, Passot, Rubbia-Brandt].

1.5.5 Les marqueurs moléculaires

Parmi les marqueurs moléculaires recherchés en pratique courante dans les CCR, certains sont des indicateurs pronostiques.

Les CCR sporadiques MSI-H ont un meilleur pronostic et répondent moins bien aux chimiothérapies à base de 5-Fluorouracile ou d'oxaliplatine que les CCR MSS [Cohen, Gryfe, Hutchins, Ribic, Sargent, Sinicrope, Zaanan].

La présence de mutation *RAS* chez les patients atteints de CCR métastatiques est indicatrice de non-réponse au traitement aux thérapies ciblées anti-EGFR. La valeur pronostique pour la survie du statut *RAS* est plus controversée [Palomba].

La présence d'une mutation *BRAFV600E* dans les CCR est un facteur indépendant de mauvais pronostic reconnu dans plusieurs études [Jones, Palomba]. Le phénotype CIMP-H est également un facteur indépendant de mauvais pronostic pour les CCR colorectaux [Juo].

2. Biomarqueurs et cancers du côlon

2.1 Définitions

Le diagnostic médical repose depuis l'antiquité sur l'observation, la description et la quantification de signes cliniques. Depuis le développement de la médecine de laboratoire, des marqueurs de diagnostic, de suivi, de réponse ou contre-indication au traitement ou de pronostic ont été décrits et sont utilisés quotidiennement. Par exemple, la glycémie, identifiée dès 1848, est un biomarqueur reconnu tant pour caractériser le diabète que pour évaluer l'efficacité des molécules antidiabétiques. Le dosage des biomarqueurs peut correspondre à des procédures extrêmement simples comme celui de la glycémie ou de la cholestérolémie ou à des procédures plus récentes et complexes comme l'identification d'une mutation spécifique du génome. Le développement des biomarqueurs est lié à l'apparition de nouvelles connaissances (génomique, protéomique), et à de nouveaux outils économiques et rapides permettant de les identifier et de les quantifier. A l'heure des thérapies ciblées et des analyses biologiques à haut débit, de plus en plus de candidats sont décrits et permettent de personnaliser de plus en plus la prise en charge thérapeutique des patients.

Un biomarqueur (contraction de « marqueur biologique ») a été défini de façon précise en 1998 par le National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group comme « une caractéristique objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur des processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique » [Biomarkers]. L'OMS en 2001 a élargi la définition à « toute substance, structure ou processus qui peut être mesuré dans le corps ou ses produits et qui influence ou prédit l'incidence, le pronostic de la maladie » [WHO 2001]. Les explorations endoscopiques ou d'imagerie peuvent donc être considérés comme des biomarqueurs car ils permettent de détecter et de quantifier des structures dans le corps. Pour simplifier ce chapitre, nous le limiterons aux marqueurs biologiques.

Le biomarqueur en tant qu'entité biologique n'a pas de statut réglementaire en lui-même mais peut-être breveté. En revanche, l'outil utilisé pour identifier et/ou doser le biomarqueur aura un statut réglementaire et devra être développé et mis sur le marché conformément au cadre applicable [ANSM].

Dans la pratique oncologique courante, les oncologues font appel à des marqueurs tumoraux. Le marqueur idéal devrait avoir une capacité de discrimination complète grâce à d'excellentes spécificité et sensibilité, permettant des valeurs prédictives positives et négatives maximales (Tableau VI). Il devrait également avoir un faible coût, la procédure devrait être simple, standardisée et reproductible avec des limites de référence clairement définies. En plus, il ne devrait pas être trop contraignant pour les sujets examinés. Finalement, son utilité clinique devrait être validée par de grandes études prospectives. Ce marqueur idéal n'existe bien évidemment pas. En dépit de cette constatation, plusieurs marqueurs sont utiles dans la prise en charge de patients cancéreux [Sarivalasis].

Tableau VI : Définitions de la sensibilité, spécificité, Valeur prédictive positive, valeur prédictive négative [Sarivalasis].

Sensibilité	La sensibilité d'un test est la probabilité que le test soit positif si la personne est atteinte de la maladie
Spécificité	La spécificité d'un test est la probabilité que le test soit négatif si la personne testée est indemne de la maladie
Valeur prédictive positive	La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité que le patient, dont le test est positif, soit effectivement malade
Valeur prédictive négative	La valeur prédictive négative (VPN) est la probabilité que le patient, dont le test est négatif, ne soit pas malade

En cancérologie, les biomarqueurs sont utilisés pour :

- Le dépistage, comme le test de recherche de sang dans les selles pour le dépistage du cancer colorectal.
- Le diagnostic lorsque le diagnostic différentiel est possible avec une autre lésion non cancéreuse
- La prédiction du pronostic sur la survie globale
- La prédiction de la récurrence du cancer
- La prédiction de la réponse à certains traitements
- La prédiction de la pharmacosensibilité et la pharmacodynamie à certaines molécules

Ces éléments de diagnostic et de prédiction sont bien entendus très importants pour discuter et définir la prise en charge des patients cancéreux.

2.2 Les biomarqueurs utilisés en cancérologie colorectale

2.2.1 Les biomarqueurs diagnostiques – de dépistage

Dans le cadre du CCR les biomarqueurs de diagnostic et de dépistage sont utilisés ou développés pour trois applications principales : dépister un CCR non symptomatique, dépister précocement la rechute d'un CCR traité et diagnostiquer le caractère potentiellement héréditaire du cancer.

2.2.1.1 Dépister un cancer colorectal non symptomatique

L'intérêt de tests permettant le dépistage d'un CCR avant qu'il ne soit symptomatique c'est de dépister des CCR très précoces et donc curables. Le dépistage a un intérêt si lorsque la lésion est détectée, le patient peut bénéficier d'un traitement. L'intérêt est donc moindre chez les patients très âgés ou en mauvais état général qui ne pourront pas supporter le traitement du cancer dépisté.

Pour les patients avec un risque moyen de CCR le dépistage repose sur la réalisation tous les 2 ans entre 50 ans et 74 ans d'un test de recherche immunologique de sang dans les selles dans le cadre du programme national de dépistage organisé. Ce test utilise des anticorps monoclonaux ou polyclonaux pour détecter la globine de l'hémoglobine humaine en utilisant un dosage immuno-enzymatique (ELISA) [Levin]. Ce test est spécifique au saignement du tractus gastro-intestinal distal du fait que la globine est progressivement dégradée au passage de l'intestin [Gonzalez-Pons]. Lorsque ce test est positif, une coloscopie est réalisée. Moins de 2% des patients réalisant le test de recherche de sang dans les selles ont un test positif. Parmi les patients avec un test positif, près de la moitié n'ont aucune anomalie à la coloscopie, entre 40-50% ont un adénome et 7-10% un CCR [Geraghty, Lee TJ]. Malgré les progrès réalisés dans les analyses de sang fécales, ils ont encore une faible sensibilité (50%) pour détecter le CRC et les adénomes en raison en partie du fait que d'autres maladies non néoplasiques gastro-intestinales provoquent également un saignement et que tous les adénomes ou cancers ne saignent pas.

D'autres approches de dépistage utilisant le principe de l'élimination de produits issus de l'adénome/du cancer ou le principe du saignement occulte sont développées mais non utilisées en pratique courante. On peut citer tout d'abord le score de décroissance de

l'hémoglobine mesuré par 3 prises de sang sur un intervalle de 6 mois [Kinar]. On peut également citer la recherche dans les selles de la méthylation du gène de la Vimentine, observé dans 53 à 83% des tumeurs colorectales [Chen WD, Zou]. La performance de ce marqueur dans la détection d'adénomes avancés n'a pas encore été définie, mais la sensibilité et la spécificité pour dépister le cancer colorectal vont de 72,5 à 83% et de 53 à 86,9% respectivement [Gonzalez-Pons, Zou]. La recherche de mutation de gènes fréquemment mutés dans les cellules adénomateuses ou cancéreuses telles que *KRAS*, *APC* et le gène codant pour la protéine P53 a également été testée mais la détection d'une seule ou d'une combinaison de mutations n'a pas atteint la spécificité et la sensibilité nécessaires pour une méthode de dépistage. En effet, comme nous l'avons décrit ci-dessus, ce profil moléculaire est celui de la voie adénome-adénocarcinome. Il est donc inapproprié pour dépister les lésions de la voie festonnée de la cancérogenèse colique. En raison de l'hétérogénéité des tumeurs et de la grande quantité de gènes mutés dans le CCR, un test de dépistage des selles uniquement basé sur les biomarqueurs de mutation et de méthylation nécessiterait de tester un grand nombre de gènes ce qui permettrait d'augmenter la sensibilité et la spécificité mais par là même d'augmenter le coût [Gonzalez-Pons, Imperiale].

La détection des marqueurs d'ARN dans les selles n'a pas été aussi largement étudiée que les biomarqueurs d'ADN en partie du fait que l'ARN est moins stable que l'ADN dans les selles. Les progrès technologiques dans les tampons de conservation de l'ARN ont permis d'étudier les transcrits d'ARN spécifiques de la tumeur CRC comme biomarqueurs des selles. La détection d'un seul ou d'une combinaison de transcrits d'ARNm de tumeurs, tels que la cyclo-oxygenase 2 et la métalloprotéine 7, ont donné une spécificité élevée pour le dépistage du CCR [Gonzalez-Pons, Takai]. Les recherches en cours sur les profils d'expression génique des CCR et les profils d'expression de petits ARN non codants comme les microARN (miARN) sont en cours d'évaluation pour leurs applications possibles en tant qu'instruments de détection du CCR [Gonzalez-Pons].

Comme nous venons de le voir, l'amélioration continue des techniques de dosages et de recherche d'anomalies génétiques ou épigénétiques permettra peut-être dans le futur de proposer un test de dépistage sanguin ou dans les selles permettant le dépistage des lésions pré-néoplasiques ou des CCR avec une sensibilité et une spécificité optimale afin de ne pas faire subir de coloscopie inutile à des patients qui n'ont pas de lésion colique.

2.2.1.2 Dépister précocement la rechute d'un CCR traité

Les récurrences du cancer du côlon sont principalement métastatiques et surviennent dans environ 80% des cas durant les 3 premières années qui suivent le traitement curatif. Environ 25% des récurrences sont accessibles à un traitement à visée curative [TNCD1]. Une surveillance clinique, radiologique et endoscopique sera proposée chez les patients capables de supporter une ré-intervention ou une chimiothérapie.

Le seul biomarqueur de dépistage de la rechute des CCR traités utilisé en pratique courante est le dosage de l'Antigène Carcinoembryonnaire (ACE). L'ACE est une glycoprotéine de haut poids moléculaire qui se trouve dans le tissu embryonnaire et les tumeurs colorectales. Cependant une concentration élevée d'ACE peut s'observer dans de nombreuses situations comme les maladies inflammatoires intestinales, les maladies hépatiques, pancréatites, etc. Ce marqueur n'est pas utilisé pour le dépistage du cancer en lui-même. En revanche, la cinétique d'évolution chez un patient opéré d'un CCR permet de dépister la récurrence des CRC. En effet, la concentration d'ACE diminue après la résection tumorale. Une réascension est donc en faveur d'une récurrence, en dehors d'une autre cause d'élévation de l'ACE. Cette surveillance de la concentration de l'ACE après chirurgie a montré un bénéfice en termes de récurrences accessibles à un traitement à visée curative et de survie globale [Primrose, Verberne]. Cependant le dépistage de récurrence par l'ACE n'est pas supérieur au dépistage des récurrences par imagerie [Verberne]. De plus une étude récente remet en cause la pertinence de ce dosage pour dépister la rechute en raison d'une sensibilité très faible et de faux positifs [Shinkins]. La place de l'ACE dans la surveillance des patients après chirurgie est donc encore débattue.

Un autre marqueur protéique sérique est en cours d'évaluation pour la même application que l'ACE dans une large étude prospective. Il s'agit de TIMP-1 (*TIMP metalloproteinase inhibitor 1*). Il semble légèrement meilleur que l'ACE pour prédire le risque de CCR mais peut également être augmenté dans des pathologies non cancéreuses limitant son utilisation potentielle au dépistage de la rechute après traitement [Christensen, Holten-Andersen]. L'utilisation d'un cocktail de protéine sérique incluant l'ACE et TIMP-1 a également donné des résultats encourageants [Wilhelmsen].

D'autres biomarqueurs sanguin sont en cours de développement pour dépister précocement les récurrences tumorales. Les acides nucléiques circulants, les protéines et les cellules tumorales circulantes sont des outils de diagnostic CCR en cours d'évaluation. Leurs niveaux de sensibilité et de spécificité sont prometteurs.

La libération d'ADN, d'ARN et miARN dans le sang des patients cancéreux est attribuée à une combinaison de nécrose tumorale, d'apoptose et éventuellement de sécrétion cellulaire [Gonzalez-Pons]. L'ADN libre extracellulaire dosé dans le sang aurait une meilleure sensibilité que l'ACE pour dépister la rechute d'un CCR traité chirurgicalement [Frattini].

La détection des altérations génétiques et épigénétiques dérivées de tumeurs dans le sang a été explorée en tant que biomarqueurs de dépistage de la récurrence des CCR potentiels. Les détections mutationnelles ont été surtout concentrées sur la recherche de mutations du gène *KRAS*. Les niveaux de sensibilité obtenus étaient au maximum de 43% avec une spécificité de 93% [Anker, de Kok, Gonzalez-Pons, Kopreski]. Cependant, ce type de test nécessite de connaître le statut RAS au préalable et que la tumeur soit mutée. De plus l'hétérogénéité mutationnelle de *KRAS* au sein de la tumeur limite encore l'utilisation de ces tests [Jeantet].

Le dépistage de rechute de CCR par la recherche d'ARNm sériques a porté principalement sur l'expression de marqueurs épithéliaux intestinaux comme l'ACE, la cytokératine 19 et la cytokératine 20. Les résultats n'ont pas été meilleurs que le dosage de l'ACE ou que la recherche de mutation *KRAS* dans le sang [Gonzalez-Pons].

Depuis la découverte des miARN et l'association de miRNAs particuliers avec les CCR, des efforts de recherche intensifs ont porté sur l'identification de miARN spécifiques des CCR en tant que biomarqueurs sanguins potentiels. Ces miARN sont des ARN de petite taille (une vingtaine de nucléotides) dont le rôle est de réguler la traduction de certains gènes. Leur dérégulation par sous ou surexpression est impliquée dans la cancérogenèse [Xu]. Ces miARN sont pour certains dosables dans le sang. Différents panels de miARN dosés dans le plasma permettant de différencier les patients atteints de CCR des patients en bonne santé avec une bonne sensibilité et spécificité ont été identifiés [Gonzalez-Pons].

2.2.1.3 Dépister un cancer colorectal potentiellement héréditaire

Cette démarche s'applique principalement aux CCR MSI. La recherche de mutation *BRAF* ou de méthylation de *MLH1* permet de différencier les CCR MSI sporadique des CCR MSI entrant potentiellement dans le cadre d'un syndrome de Lynch. L'identification d'un syndrome de Lynch chez un patient développant un CCR repose sur l'interrogatoire du patient, en l'absence de signe endoscopique spécifique comme pour la polypose adénomateuse familiale. Les critères d'Amsterdam révisés à Bethesda [Umar] prennent en compte l'âge du patient, les antécédents personnels et familiaux de cancers du spectre

HNPCC et l'histologie de l'adénocarcinome pour rechercher l'instabilité des microsatellites sur le prélèvement ainsi que la perte d'expression immunohistochimique d'une ou plusieurs protéines impliquées dans le système MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6). En cas de CCR MSI avec perte d'expression immunohistochimique de MLH1 et/ou PMS2, la recherche de mutation BRAF ou de méthylation de MLH1 permet de séparer les CCR sporadiques des CCR potentiellement héréditaire. Cette démarche oncogénétique permet de définir un phénotype et de cibler des gènes à analyser pour dépister la mutation dans le cas index et la rechercher ensuite chez les apparentés.

2.2.2 Les biomarqueurs prédictifs

2.2.2.1 Marqueurs prédictifs d'une réponse à la thérapie ciblée

Les biomarqueurs prédictifs sont utilisés en cancérologie digestive principalement pour prédire la réponse à un traitement et notamment à une thérapie ciblée.

Les biomarqueurs prédictifs d'une réponse à la thérapie ciblée anti-EGFR utilisés en pratique courante sont KRAS et NRAS. En effet, l'activation oncogénique des protéines KRAS ou NRAS par mutation est associée à une non réponse au traitement ciblé par anti-EGFR qu'il soit délivré seul ou en association à la chimiothérapie traditionnelle. Ce traitement permet d'augmenter de près de 2 fois la survie globale et sans progression de la majorité des patients qui ont un CCR RAS sauvage [Douillard, Karapetis, Lièvre, Schwartzberg]. En pratique courante la détermination du statut RAS, combinant la recherche des mutations les plus fréquentes des gènes *KRAS* et *NRAS* est réalisée pour tous les patients avec un CCR métastatique afin de décider de la prescription ou non de thérapie ciblées anti-EGFR. Sur la base des preuves provenant de grands essais, l'Autorisation de mise sur le marché (AMM) Européenne des 2 principaux traitements anti-EGFR utilisés en cancérologie digestive (cetuximab et panitumumab) a été restreinte aux patients avec un CCR métastatique RAS sauvage. La recherche de mutation KRAS/NRAS est réalisée sur les prélèvements tissulaires : biopsie ou pièce opératoire inclus en paraffine. Lorsqu'aucun prélèvement tissulaire n'est disponible, ces mutations pourraient éventuellement être recherchées dans le sang sur l'ADN circulant [Thierry]. Cette méthode de diagnostic mutationnel n'est pas encore utilisée en pratique courante.

L'intérêt de la recherche de mutation *BRAFV600E* pour la prédiction de la réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR est actuellement controversé [Dietel, Garcia-Alfonso, Rowland]. Les mutations du gène *BRAF* semblent également associées à un très mauvais pronostic indépendamment du traitement, ce qui peut être une confusion entre son rôle de marqueur prédictif pour la réponse aux thérapies anti-EGFR et son rôle pronostique. Plusieurs essais thérapeutiques ciblant cette protéine mutée et d'autres protéines de la voie des MAPK sont en cours [Jones]. La recherche de mutation *BRAF* peut donc être réalisée en vue de l'inclusion de patient en protocoles thérapeutiques.

Certains miARN pourraient également être des indicateurs de non-réponse aux anti-EGFR, comme miR-31-5p/3p [Mlcochova]. La valeur prédictive de ces miARN doit bien évidemment être validée sur de plus larges cohortes.

Un nouveau traitement ciblé, le crizotinib qui cible le récepteur à activité tyrosine kinase ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) est en cours d'essai de phase II en France dans le traitement de nombreux types de cancers métastatiques dont le CCR dans le cadre du programme AcSé [AcSé]. Ce traitement a actuellement l'AMM pour les patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules métastatiques avec translocation du gène *ALK*. Le crizotinib est également capable d'inhiber un autre récepteur à activité tyrosine kinase : MET (*MET proto-oncogene receptor tyrosine kinase*) [Rodig]. Dans le cadre du programme AcSé, les critères d'inclusion pour les CCR sont : les CCR métastatiques avec mutation ou amplification du gène *MET*. Cependant, les premiers éléments de l'étude semblent montrer que le crizotinib n'a pas d'activité sur les cancers du côlon ayant une amplification du gène *MET* [AcSé]. La place de la recherche de mutation *MET* comme biomarqueur prédictif de l'efficacité du crizotinib sera donc connue à la fin de l'étude, prévue en 2019.

En cas de CCR avancé (localement avancé et/ou métastatique), la détermination du statut MSI peut être utile pour orienter le patient vers un traitement par immunothérapie [Le].

2.2.2.2 Marqueurs prédictifs d'une réponse à chimiothérapie conventionnelle

La recherche d'instabilité microsatellitaire est également effectuée dans le cadre de la décision thérapeutique, essentiellement pour les patients de stades II-III. Les CCR sporadiques MSI-H ont un meilleur pronostic global mais répondent moins bien aux chimiothérapies à base de 5-Fluorouracile ou d'oxaliplatine que les CCR MSS [Cohen, Gryfe,

Hutchins, Ribic, Sargent, Sinicrope, Zaanan]. L'apport de l'irinotecan pour le traitement adjuvant des patients de stades II-III est plus discuté [Bertagnolli, Tejpar 2009]. Chez les patients avec un CCR MSI de stade II de haut risque, l'intérêt d'une chimiothérapie adjuvante est discutable et doit être évalué au cas par cas [TNCD1].

La perte d'expression du marqueur de différenciation intestinale CDX2 (*Caudal Type Homeobox 2*) par les cellules adénocarcinomeuses a récemment été mis en évidence comme un facteur de prédiction du bénéfice de la chimiothérapie adjuvante chez les patients avec un CCR de stade II [Dalerba]. Cette perte d'expression peut être très facilement recherchée par immunohistochimie sur les biopsies ou la pièce opératoire. La recherche de cette anomalie n'est pas encore utilisée pour la décision thérapeutique en pratique courante mais certains proposent des algorithmes de décision thérapeutique pour les patients de stade II utilisant la recherche de perte d'expression de CDX2 (Figure 14) [Rodriguez-Salas].

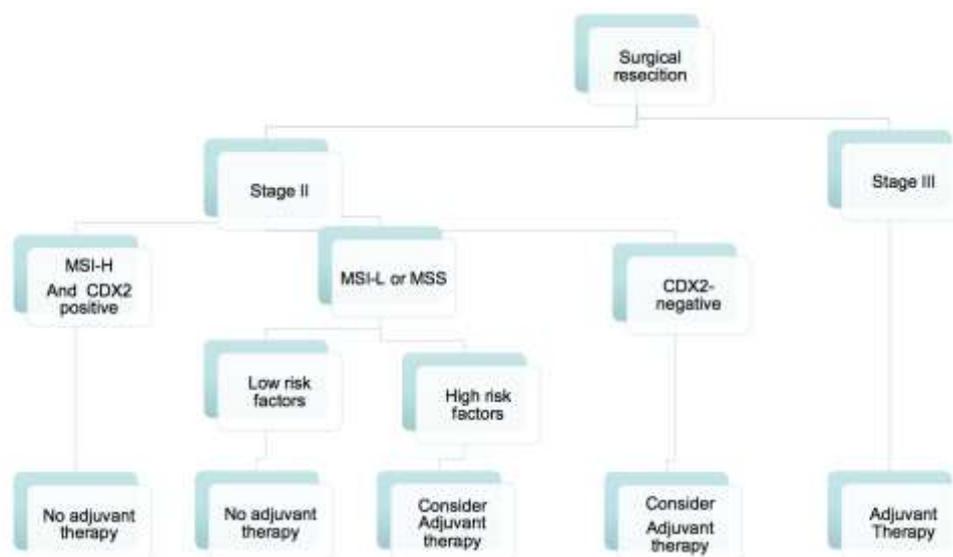


Figure 14 : Algorithme de décision thérapeutique pour les patients de stade II/III basée sur la prédiction pronostique de CDX2 et de l'instabilité microsatellitaire [Rodriguez-Salas]

D'autres marqueurs de moins bonne réponse à la chimiothérapie utilisant le 5 FU ou l'irinotecan ont été décrits mais ne sont pas utilisés en pratique car non validés. On peut citer la perte du bras long du chromosome 18 (18q) comme indicateur de non réponse au 5FU [Boulay, Watanabe], la perte d'expression immunohistochimique de la Topoisomérase I comme indicateur de non réponse à l'irinotecan, son inhibiteur [Braun] et la méthylation de certains gènes [Cheetham, Ebert, Yiu].

Un miARN semble promoteur comme marqueur de non réponse à la chimiothérapie 5FU-oxaliplatine pour les patients de stade III, il s'agit du miR-320e [Perrez-Carbonnel]. La valeur prédictive de ce miARN doit bien entendu être validée par d'autres études avant d'être utilisé en pratique courante pour la décision thérapeutique.

2.2.3 Les biomarqueurs pronostiques

L'évaluation du pronostic sur la survie globale d'un cancer ou sur le risque de récurrence permet d'adapter le suivi et les traitements d'un patient qui peuvent supporter des traitements plus lourds et une réintervention éventuelle. En effet, lorsque le risque de récurrence est élevé, la surveillance est plus rapprochée et les traitements plus agressifs. De nombreux marqueurs pronostiques sont décrits dans la littérature mais peu sont utilisés en pratique courante.

Le dosage de l'ACE est utilisé pour dépister la rechute des CCR traités. Plusieurs études ont montré que la concentration d'ACE sérique après traitement avait également une valeur prédictive pour la survie sans progression, notamment pour les patients de stade II et IV [Abe, Araujo, Neofytou, Ozawa, Tsai].

D'autres biomarqueurs sériques semblent prometteurs. On peut citer notamment l'ADN sérique et les cellules tumorales circulantes. En effet, la combinaison du dosage sérique de l'ADN extracellulaire, la qualification de son intégrité et la recherche de mutation *KRAS* et *BRAF* sur cet ADN semble être un indicateur pronostique intéressant chez les patients avec CCR métastatique [El Messaoudi]. La présence de cellules tumorales circulantes (CTC) dans le sang est associée à une maladie progressive ou métastatique. Avec le développement de techniques de détection plus avancées, l'utilité clinique des CTC comme biomarqueurs prédictifs ou pronostiques pour la gestion du CRC est prometteuse. Il a été démontré que la présence et la concentration de CTC dans le sang pré et postopératoire chez des patients avec CCR de stade III et IV est corrélée avec la durée de survie globale et sans récurrence [Cohen, Uen]. Un système de détection des CTC dans le sang, le système Cellsearch (Veridex LLC, Raritan, NJ) a été approuvé par la Food and Drug Administration aux Etats Unis pour la détection de CTC dans la surveillance du cancer du sein, de la prostate et du CCR [Gonzalez-Pons]. L'utilisation de ce système en pratique courante pour la surveillance des patients opérés de leur CCR est donc possible. Des études futures permettront d'évaluer la performance et la faisabilité de la détection des CTC comme marqueur prédictif, pronostique

et / ou de surveillance permettant d'aider les cliniciens à prendre des décisions de traitement, à prédire les métastases futures et à surveiller la récurrence de la maladie respectivement.

Les biomarqueurs sanguins sont prometteurs car peu invasifs, mais la majorité des biomarqueurs pronostiques est recherchée directement sur la tumeur.

Parmi les marqueurs pronostiques tissulaires, certains marqueurs prédictifs ont également une valeur pronostique. L'instabilité des microsatellites, recherchée pour de multiples applications, est un indicateur de meilleur pronostic global [Cohen, Gryfe, Hutchins, Ribic, Sargent, Sinicrope, Zaanan]. La présence de mutation *RAS* chez les patients avec un CCR métastatique est associée à une non réponse aux anti-EGFR et est de ce fait associée à une survie moins longue [Douillard, Lièvre, Richman]. La valeur pronostique isolée du statut *RAS* est plus discutée [Karapetis]. Cette valeur prédictive et pronostique du statut *RAS* ne s'applique pas aux CCR non métastatiques [Shen]. La présence d'une mutation *BRAF* est un facteur indépendant de mauvais pronostic mais seulement pour les CCR de stades métastatiques [Chen KH, Shen]. Dans la voie des MAPK, il semblerait que la présence d'une mutation du gène *PI3K* soit indicatrice de récurrence tumorale et de mauvais pronostic pour les patients de stade III seulement [Shen]. L'utilité pratique de la recherche de mutation *PI3K* reste à définir.

Les analyses d'expression génique différentielle entre la tumeur et le tissu normal ont contribué à une meilleure compréhension de l'interaction entre les gènes surexprimés ou sous-exprimés et les voies affectées dans la cancérogenèse colorectale. Ces efforts ont abouti à une foule de données d'expression d'ARN accessibles à tous sur des plateformes publiques utilisées pour identifier des signatures d'expression ou de sous-expression génique prédictives d'une réponse aux traitements ou d'un meilleur/moins bon pronostic ou d'un risque accru de récurrence. Cette technique a notamment été utilisée pour la détermination de CDX2 comme biomarqueur pronostique et prédictif [Dalerba]. De plus, la bonne corrélation expression génique/immunohistochimique de CDX2 permet une utilisation simple, routinière de l'évaluation de ce biomarqueur. Il en est de même pour l'Annexine A10 [Gonzalo] et bien d'autres marqueurs. Pour ces études utilisant l'ARN extrait des tissus frais congelés, il est important que l'ARN soit d'excellente qualité afin de ne pas fausser les résultats. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons confirmé l'importance de la qualité de l'ARN pour l'interprétation des résultats (Manuscrit 2). En effet, les niveaux d'expression des gènes de

ménages, utilisés pour la normalisation des résultats d'expression d'ARN des gènes d'intérêts, varient en fonction de l'index de qualité de l'ARN : le RQI (RNA Quality Index) [Galissier]. Plusieurs panels d'expressions géniques académiques ou commerciaux ont été développés dans un but prédictif et pronostique, notamment pour les patients avec des CCR de stade II et III. Certains tests ont l'avantage d'être utilisables sur tissus paraffinés [Lopez]. Ces tests ont donnés des résultats encourageant pour une utilisation clinique. Leur valeur en pratique courante reste cependant à définir.

Les miARN recherchés dans le sang ou sur les tissus tumoraux seraient également des indicateurs pronostiques intéressants. Plusieurs études ciblant un miARN ou un panel de miARN vont dans ce sens [Perrez-Carbonnel, Xia, Xu]. De plus le fait que certains soient dosables dans le sang et que ces miARN sont stables dans les tissus inclus en paraffine potentialise leur utilisation en pratique courante. Il reste cependant à définir le miARN ou le panel de miARN qui aura le plus d'impact prédictif ou pronostique.

3. LRP1 et cancer

3.1 LRP1 : structure et fonctions

La famille des protéines liées aux récepteurs des lipoprotéines de faible densité (*Low density lipoprotein*, LDL) est une classe de glycoprotéines transmembranaires simples, généralement reconnues comme récepteurs endocytaires de la surface cellulaire, qui lient et internalisent les ligands extracellulaires pour leur dégradation par les lysosomes. Structuellement, les membres de la famille des protéines liées au récepteur du LDL (*LDL receptor-related protein*, LRP) partagent une structure modulaire et des motifs communs dont des domaines de liaison aux ligands aussi appelés CCR1 à 4 (*Cystein rich Complement-like Repeat*) riches en cystéines suivies par des répétitions de type EGF (*Epidermal Growth Factor*) riches en cystéines également, des domaines en hélice bêta (*beta-propeller*), un segment unique traversant la membrane plasmique et un court domaine cytoplasmique possédant au moins un motif de signalisation de l'endocytose NPXY (Figure 15A). Chez l'homme, plus de neuf membres de cette famille ont été répertoriés. Les principaux membres sont : LDLR, LRP1, LRP1B, megalin/LRP2, VLDL receptor, MEGF7/LRP4, LRP5, LRP6 et LRP8/apolipoprotein E receptor 2 [Wassan, Chung, Jeon, May 2007] (Figure 15B).

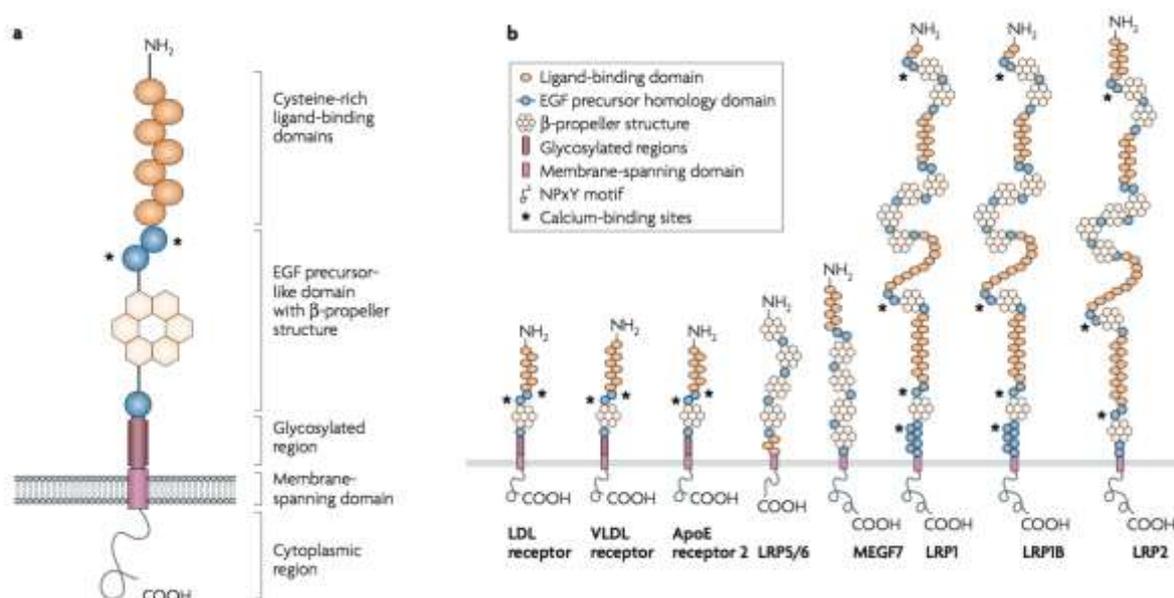


Figure 15 : Représentation schématique des principaux membres de la famille des protéines liées aux récepteurs des LDL [Wassan].

A. Représentation schématique du LDLR. B. Représentation schématique des principaux membres de la superfamille des protéines liées aux récepteurs du LDL.

Historiquement, le LDLR (Low-Density Lipoprotein Receptor), a été découvert en 1986 à cause de son dysfonctionnement dû à une mutation de son gène dans l'hypercholestérolémie familiale [Brown]. Par la suite, plus de huit autres protéines partageant une homologie structurale avec le LDLR ont été regroupées pour former la superfamille des protéines liées au LDLR. Si le LDLR est principalement exprimé dans le foie, siège du métabolisme lipidique, les autres membres présentent une répartition tissulaire plus large, voire ubiquitaire, ce qui suppose qu'ils peuvent remplir des fonctions variées [Herz 2002]. Dans ce travail, nous nous focaliserons sur l'un des principaux membre de cette famille : LRP1.

3.1.1 Structure de LRP1

LRP1 (*LDL receptor-related protein 1*) a été décrit pour la première fois en 1988, peu après la découverte de LDLR [Herz 1988]. Du fait de son homologie structurale avec le LDLR, il a d'abord été supposé que LRP1 intervenait uniquement dans le métabolisme lipidique. Initialement synthétisé sous forme d'un précurseur de 600 kDa, LRP1 est clivé dans l'appareil de Golgi par une furine-convertase pour former une sous-unité extracellulaire de haut poids moléculaire (chaîne α , 515 kDa) et une sous-unité intracellulaire de faible poids moléculaire (chaîne β , 85 kDa) qui seront toutes deux liées de manière non covalente [Strickland].

3.1.1.1 Domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire de LRP1 est composé de différents domaines fondamentaux : les répétitions riches en cystéines de type complément (CCR 1 à 4), aussi appelées répétitions de liaison au ligand. Ces domaines sont composés d'une structure en épingle β suivie par une série de coudes β qui forme une cage entourant un ion calcium qui stabilise la structure. Les CCR sont regroupés dans 4 régions, numérotées de 1 à 4 à partir de l'extrémité N-terminale (Figure 16A) [Neels, Strickland 2002]. CCR2 et CCR4 contiennent respectivement 8 et 11 répétitions complémentaires, et sont responsables de la majeure partie de l'activité de liaison aux ligands de LRP1 [Neels, Gonias, Obermoeller]. Les ligands de LRP1, notamment l'apolipoprotéine E (ApoE), l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1), l' α_2 -macroglobuline ou encore RAP (*Receptor Associated Protein*) possèdent des acides aminés basiques tels que des lysines ou arginines qui permettent la liaison aux domaines CCR de

LRP1 (Figure 16B). En effet, en cas de modifications par mutation de ces acides aminés, cela entraîne une diminution de l'affinité de ces ligands pour LRP1 [Lillis].

Le domaine extracellulaire comprend également des régions homologues au précurseur de l'EGF consistant en des successions de domaines de type EGF riches en cystéines encadrant des motifs YWTD, formant un propulseur β . Ces domaines YWTD ont une importance capitale dans le découplage de LRP1 avec ses ligands au niveau du compartiment lysosomal puisqu'à faible pH, ils s'associent avec les CCR, induisant la séparation du ligand.

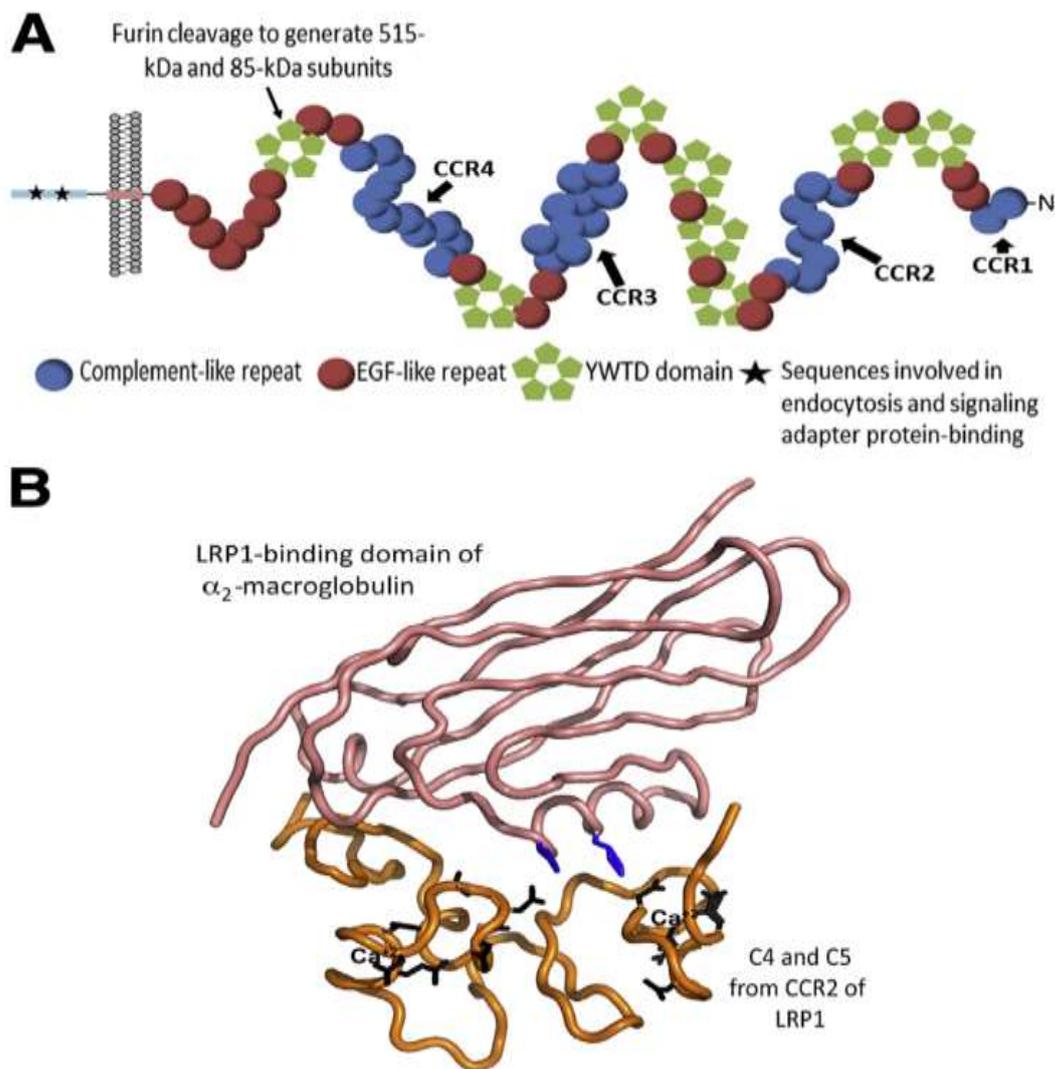


Figure 16 : Représentation de l'organisation structurale de LRP1 et modélisation d'un des principaux domaine de répétitions riches en cystéines de type complément [Gonias].

A. Représentation schématique de LRP1 et notamment de ses différents domaines extracellulaires. **B.** Modélisation de l'interaction de LRP1 au niveau de son domaine CCR2 (en orange) avec le domaine de liaison à LRP1 de l' α_2 -macroglobuline dans sa forme active (en rose). Deux résidus de Lysine en hélice α (en bleu) sont essentiels pour la liaison à LRP1 car ils interagissent avec des acides aminés présent dans le domaine C4 et C5 du CCR2 de LRP1 (en noir).

La variété de ligands de LRP1 suppose l'existence d'un mécanisme empêchant l'association prématurée du récepteur avec ceux-ci durant la voie de synthèse et de sécrétion des protéines. Une protéine chaperonne, appelée RAP (Receptor Associated Protein), remplit ce rôle. Cette protéine de 39 kDa, se lie étroitement aux récepteurs du LDL à pH neutre et joue le rôle d'antagoniste ; la liaison de RAP au récepteur s'effectuant par l'intermédiaire des domaines CCR2, 3 et 4 [Jensen]. RAP est composé de trois domaines, D1 à D3, montrant tous trois une topologie similaire. Ils sont constitués chacun de trois hélices α séparées par une boucle flexible, chaque domaine étant stabilisé par des interactions hydrophobes [Lillis]. Il est important de noter que RAP n'est pas sécrété par les cellules puisqu'il possède dans sa région C-terminale le motif HNEL, permettant sa séquestration dans le réticulum endoplasmique (RE). Après avoir accompagné LRP1 du RE au Golgi, RAP doit se dissocier de LRP1. Ce mécanisme est permis par la diminution de pH ayant lieu au cours de la voie sécrétoire via le domaine D3 de RAP. En effet, une région de ce domaine voit sa charge positivement augmenter dans des conditions acides, grâce à la présence de résidus histidines. Ce changement de charge module finement la balance liaison/libération de RAP par LRP1.

La fonction d'antagoniste de cette protéine chaperonne a souvent été exploitée pour l'étude de LRP1 puisque ajoutée de manière exogène sur des cellules en culture, RAP empêche la liaison du récepteur avec la plupart de ses ligands.

3.1.1.2 Domaine intracellulaire

Le domaine intracellulaire de LRP1 est de petite taille par rapport au reste du récepteur. Il comporte une centaine d'acides aminés et des motifs fortement conservés dont 2 motifs NPXY et deux motifs dileucine (LL) et YXXL. Les motifs YXXL et LL servent de signaux d'endocytose principaux [Li 2000]. Dans une autre étude, le motif YXXL ainsi que le motif LL étaient impliqués dans le trafic vésiculaire de LRP1 et notamment dans son recyclage [Donoso]. Les 2 motifs NPXY fonctionnent comme des signaux d'endocytose secondaire pour une endocytose rapide de LRP1 par les vésicules à clathrine et comme sites de liaison pour les protéines adaptatrices de la signalisation intracellulaire [Li 2000, Lillis]. Les tyrosines contenues dans les motifs NPXY (NPXY₄₄₇₃ et NPXY₄₅₀₇) peuvent subir des phosphorylations. Ces phosphotyrosines interagissent avec les protéines adaptatrices intracellulaires grâce à leurs domaines PTB (*PhosphoTyrosine-Binding*) ce qui est le cas pour les protéines Fe65 et Disabled, deux adaptateurs protéiques neuronaux [Radzimanowski,

Trommsdorff]. Des 2 motifs NPXL, le motif NPXY₄₅₀₇ (distal) est celui qui interagit le plus avec les ligands intracellulaires. Les interactions peuvent se faire à l'état phosphorylé ou non [Guttman]. Le motif NPXY proximal a été décrit comme dirigeant le trafic de LRP1 durant sa biosynthèse [Donoso]. Il est également essentiel à la maturation de LRP1 [Reekmans]. Enfin, le motif NPXYXXL distal, où se chevauchent les motifs NPXY et YXXL, sert à la maturation et à l'internalisation du récepteur [Roeboeck, Reekmans].

3.1.1.3 Répartition membranaire de LRP1

Les premières hypothèses concernant la fonction de LRP1 en tant que récepteur endocytaire étaient basées sur son analogie avec LDLR, qui se localise dans des puits de clathrine et subit une endocytose en présence ou en l'absence de LDL [Goldstein]. Des études en microscopie électronique de cellules de muscle lisse vasculaire (VSMC) ont montré que LRP1 était situé exclusivement dans des puits revêtus de clathrine, comme le LDLR [Weaver 1996]. Les puits de clathrine sont des domaines de la membrane plasmique tapissés de clathrine qui servent à la formation de vésicule d'endocytose.

LRP1 a également été identifié dans les cavéoles/radeaux lipidiques, dans les fibroblastes et les adipocytes 3T3-L1 [Boucher 2002, Zhang H]. Les cavéoles sont des domaines de 50 à 100-nm correspondant à des invaginations de la membrane plasmique. Ces microdomaines de la membrane plasmique sont revêtus d'une protéine transmembranaire de 22 kDa appelée cavéoline et ils sont riches en cholestérol et en sphingomyéline. L'association lipides-cavéoline constitue les radeaux lipidiques (ou rafts - structures connues pour leur résistance aux détergents) où sont concentrés les récepteurs spécifiques de certaines hormones et cytokines. Les chaînes des récepteurs situés dans les rafts sont le plus souvent ubiquitinylés avant d'être endocytées. Ces vésicules vont exclusivement de la membrane vers l'intérieur de la cellule. [Frank]. La localisation de LRP1 dans les radeaux lipidiques aide à expliquer la phosphorylation du domaine intracellulaire de LRP1 par le facteur de croissance dérivé des plaquettes BB (PDGF-BB, *Platelet Derived Growth Factor-BB*) [Boucher 2002, Loukinova]. En outre, la présence de LRP1 dans les radeaux lipidiques explique la formation de complexes dans lesquels le LRP1 est lié au récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPAR) par un ligand commun : une protéine glycosylphosphatidylinositol (GPI) connue pour sa localisation dans les radeaux lipidiques [Conese, Weaver 1997]. Cependant cette localisation de LRP1 semble dépendre du type cellulaire [Wu]. De plus, cette localisation membranaire

semble être transitoire et est supposée faciliter l'endocytose de protéines localisées dans ces microdomaines membranaires [Wu]. Si la localisation de LRP1 dans les radeaux lipidiques semble momentanée dans certains types cellulaires, dans d'autres, elle peut être induite. En effet, il a été observé dans les adipocytes 3T3-L1 que suite à un traitement à l'insuline, la proportion de LRP1 localisé dans les cavéoles était significativement augmentée [Zhang].

LRP1 semble donc se trouver dans des domaines spécialisés de la membrane cellulaire : les puits de clathrine ou les cavéoles/radeaux lipidiques. Cependant sa localisation précise semble varier d'un type de cellule à l'autre ou être transitoire et dépendante de certains stimuli. Certains auteurs décrivent que la localisation transitoire de LRP1 dans les radeaux lipidiques est suivie par une migration de celui-ci dans la membrane plasmique vers des puits enduits de clathrine, où il subit une endocytose et un recyclage [Gonias]. Même si le trafic et la fonction précise de LRP1 dans ces microdomaines restent obscurs, il semble que l'endocytose ne soit pas sa seule activité. En effet, les cavéoles forment de véritables plateformes de signalisation où entre autres, la tyrosine kinase Src est fortement exprimée. Il a d'ailleurs été montré que la liaison du PDGFBB à LRP1 provoquait sa phosphorylation par le PDGFR et que ce mécanisme avait lieu dans les cavéoles [Loukinova, Boucher 2002]. Enfin, d'autres données, concernent le *shedding* de LRP1. En effet, il a été montré que la libération de l'ectodomaine de LRP1 pouvait être augmenté par une déplétion en cholestérol [Selvais 2011].

3.1.2 Fonctions de LRP1

La suppression de LRP1 chez les souris KO est mortelle, ce qui montre l'importance de ce récepteur dans l'embryogenèse et le développement [Herz 1992]. LRP-1 est exprimé dans de très nombreux types cellulaires tels que les hépatocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les neurones et les astrocytes [Moestrup]. Du fait de son homologie avec le LDLR, LRP1 a été d'abord perçu comme un récepteur d'endocytose impliqué dans le métabolisme des lipides. Cette implication dans le métabolisme lipidique a rapidement été confirmée car le premier ligand de LRP1 identifié était l'apolipoprotéine E [Kowal]. Par la suite, LRP1 a été identifié comme le récepteur de l' α 2-macroglobuline activée (a2M) [Strickland], ce qui a entraîné une confusion considérable dans la littérature dans laquelle le LRP1 a été appelé pendant plusieurs années : récepteur de l'a2M activée. Actuellement, plus de 40 ligands de LRP1 ont été identifiés, tant au niveau de son domaine extracellulaire, qu'au niveau de son domaine intracellulaire. Les ligands de LRP1 appartiennent à une grande variété de molécules comme des lipoprotéines, des virus, des toxines, des facteurs de croissance, des protéases associées ou non à leur inhibiteur ou des molécules de la matrice extracellulaire [May 2007, Gonias, Herz 2001]. Cette diversité de ligands implique plus ou moins directement LRP1 dans des mécanismes variés comme le métabolisme des lipides ou encore l'homéostasie des protéases matricielles. Par sa multitude de ligands ainsi que par les nombreuses molécules adaptatrices avec lesquelles il peut interagir au niveau de son domaine intracellulaire, LRP1 apparaît comme un récepteur multifonctionnel avec pour fonctions principales l'endocytose et la signalisation. De part la diversité de ses ligands, LRP1 est impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires comme la survie, la différenciation, la migration ou encore l'invasion cellulaire et la nature multifonctionnelle de ce récepteur dans la signalisation cellulaire aboutit à un élargissement de la définition des récepteurs. LRP1 n'a pas évolué pour répondre à une seule ou même petite famille de ligands. Au lieu de cela, de nombreuses interactions et un éventail diversifié de réponses cellulaires physiologiquement significatives sont observées. Il est donc difficile d'établir une liste exhaustive de ses fonctions. Ci-dessous, quelques unes de ses fonctions dans les conditions physiologiques et pathologiques (hors cancer) vont être détaillées.

3.1.2.1. Métabolisme lipidique et protection vasculaire.

L'une des premières fonctions décrites pour LRP1 consiste en la capacité de clairance des protéines plasmatiques dans le foie, y compris de l' α 2-macroglobuline, du facteur VIII et des lipoprotéines, comme le chylomicron [Saenko, Mahley, Willnow]. Ces études ont montré que lorsque LRP1 est supprimé, il se produit une augmentation des protéines plasmatiques. Dans le foie, LRP1 a un rôle protecteur vis à vis de la stéatose. En effet, LRP1 en association avec le récepteur à l'insuline co-régule l'absorption et la sécrétion des lipides et empêche leur accumulation intra-hépatocytaire [Ding]. L'intervention de LRP1 dans le métabolisme lipidique ne se situe pas uniquement dans le foie puisqu'il a été mis en évidence que le récepteur était exprimé dans les adipocytes et qu'il y contrôlait à la fois l'adipogenèse et l'homéostasie lipidique [Masson, Terrand, Woldt].

LRP1 a également été défini comme protecteur pour la vascularisation. Grâce à l'endocytose du PDGF-R (*Platelet Derived Growth Factor-Receptor*) dans les cellules musculaires lisses, LRP1 peut moduler la voie de signalisation du PDGF, qui est connu pour être impliqué dans le développement de l'athérosclérose [Boucher 2003]. L'altération de l'endocytose et du trafic du PDGFR- β n'étaient que partiellement impliqués dans ce modèle d'athérosclérose. La fonction de signalisation cellulaire de LRP1 est également impliquée, car le PDGFR- β va induire la phosphorylation sur la tyrosine du second motif NPXY de LRP1 et ainsi entraîner le recrutement de kinases de la famille Src [Boucher 2002]. Cette phosphorylation de LRP1 va permettre son association avec la protéine adaptatrice Shc [Loukinova]. Ce mécanisme de phosphorylation de LRP1 impliquant le PDGFR- β se produit dans les cavéoles, où se situe LRP1 [Boucher 2002]. Ces observations soulignent la possibilité pour LRP1 de se comporter comme un co-récepteur. Afin de limiter l'athérogenèse, LRP1 est aussi impliqué dans la modulation de l'expression de médiateurs de l'inflammation comme le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) et de métalloprotéases matricielles (MMP) dans les macrophages comme la MMP-9, limitant leur recrutement et leur accumulation dans la plaque d'athérosclérose [Gonias, Gaultier, Yancey, Overton, Zhu].

3.1.2.2. *Neuroprotection.*

En plus du foie, LRP1 est fortement exprimé dans le cerveau et joue un rôle important dans la régulation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et l'intégrité des neurones. Il a été démontré que l'activateur de plasminogène de type tissulaire (tPA) peut augmenter la perméabilité vasculaire de la BHE par une voie dépendante de LRP1 [Yepes]. De plus, LRP1 apparaît jouer un rôle très important dans le développement et l'évolution d'une pathologie neurodégénérative très étudiée de nos jours, la maladie d'Alzheimer. L'un des aspects de cette maladie se caractérise par l'accumulation de peptide amyloïde β ($A\beta$) issu de la dégradation protéolytique de l'APP (β -Amiloïd Precursor Protein). Cette accumulation va être à l'origine de la formation de plaques amyloïdes essentiellement sur le néocortex et l'hippocampe. LRP1 est capable d'interagir avec l'APP, de l'endocyter et de faciliter sa conversion en $A\beta$ [Waldron, Ulery]. Cette fonction semble désigner LRP1 comme un promoteur de la maladie d'Alzheimer. D'ailleurs, un défaut dans l'endocytose de LRP1 provoque une accumulation de l'APP à la surface des neurones et une diminution de sa conversion en $A\beta$ [Cam]. Toutefois, son rôle dans la maladie d'Alzheimer est controversé puisque son expression au niveau de la BHE facilite l'efflux de l' $A\beta$ du cerveau vers la circulation sanguine, limitant ainsi son accumulation dans le cerveau. D'ailleurs, une diminution de l'expression du récepteur au niveau de la BHE est souvent associée à cette pathologie [Ulery et Strickland]. Il apparaît donc évident que le rôle de LRP1 dans la maladie d'Alzheimer dépend en majorité du type cellulaire dans lequel il est exprimé : au niveau des neurones, il semble présenter un effet plutôt délétère ; au niveau de la BHE, LRP1 apparaît au contraire bénéfique. De plus, l'ectodomaine soluble de LRP1 ayant subi le *shedding* est présent dans le plasma sanguin et sa forme localisée dans les cellules hépatiques peuvent se lier à $A\beta$ pour moduler sa clairance systémique [Sagare].

Dans le système nerveux toujours, LRP1 est impliqué dans la réparation des dommages cellulaires des cellules du système nerveux central et périphérique au cours des traumatismes et des maladies inflammatoires démyélinisantes. En effet, des ligands de LRP1 sont présents dans la myéline, y compris la protéine basique de la myéline et la glycoprotéine associée à la myéline. LRP1 peut participer à la phagocytose des débris de myéline [Gaultier, Stiles]. En liant la calréticuline, LRP1 s'associe avec des membres de la famille des collectines, y compris C1q et la lectine de liaison au mannose, et participe à la phagocytose des cellules apoptotiques [Ogden, Vandivier, Gardai]. LRP1 sert également de récepteur endocytaire à de nombreuses protéines intracellulaires libérées par des cellules nécrotiques [Fernandez-

Castaneda]. Ces activités LRP1 sont importantes car l'incapacité à éliminer efficacement les protéines intracellulaires, les cellules apoptotiques et les débris cellulaires peuvent être associée à l'apparition d'une maladie auto-immune [Gonias]. En effet, il a été montré une progression plus rapide de la maladie dans un modèle expérimentale de sclérose en plaque chez la souris avec des cellules microgliales (les macrophages du système nerveux central) délétés pour LRP1. Ces cellules microgliales avec LRP1 inactif adoptaient un phénotype pro-inflammatoire avec augmentation de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF- α [Chuang]. Chez l'homme une surexpression de LRP1 a été observée dans les macrophages qui bordaient les plaques de démyélinisation de patients atteints de sclérose en plaque [Hendrickx].

3.1.2.3. Régulation de l'inflammation.

Comme nous venons de le voir dans la section précédente, LRP1 est impliqué dans la modulation de la réponse inflammatoire des macrophages dans le contexte de l'athérogenèse et des maladies démyélinisantes du système nerveux central. Dans les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B, LRP1 est également impliqué dans la présentation de l'antigène et dans la stimulation des lymphocytes T régulateurs CD4⁺ et effecteurs CD8⁺. Les protéines du choc thermique HSP (*Heat Shock Protein*), relarguées par les cellules lors des phénomènes de nécrose cellulaire, fonctionnent comme des chaperones pour des peptides antigéniques, notamment bactériens ou viraux. Ces complexes HSP-peptide sont endocytés par LRP1 et redistribués vers le complexe d'histocompatibilité majeur I (CMH-I) essentiellement mais aussi le CMH-II pour la re-présentation antigénique aux lymphocytes T effecteurs ou régulateurs [Basu, Binder, Tobian, Fischer]. Les peptides extracellulaires peuvent également être présentés aux cellules T lorsqu'elles sont liées à a2M et internalisées par LRP1 [Chu, Pawaria]. Ces voies, en particulier celles impliquant des HSP, peuvent être extrêmement importantes dans les pathologies associées à une mort cellulaire étendue.

LRP1 a également un rôle de modulation de l'inflammation. Il a été démontré que LRP1 module l'activation des macrophages par les voies de signalisation *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B) et *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) [Chuang, Yang L] et l'activation des lymphocytes T Natural Killer par la modulation de la sécrétion d'interleukine 4 [Covarrubias].

3.1.2.4. Interaction cellule/matrice et migration cellulaire.

Une des fonctions très étudiée de LRP1, principalement dans les modèles tumoraux est sa capacité à réguler la migration cellulaire et l'invasion. Les deux systèmes protéolytiques les plus étudiés, les MMPs et le système du plasminogène, ainsi que leurs inhibiteurs ou des complexes protéases-inhibiteurs peuvent être régulés par LRP1. C'est pour cela que l'inhibition de LRP1 utilisant des molécules antagonistes, des anticorps bloquants ou une stratégie d'interférence de l'ARN ont conduit parfois à des résultats contrastés rendant la compréhension des mécanismes moléculaires difficiles à appréhender. Quoi qu'il en soit, il est maintenant bien admis que LRP1 constitue l'un relais moléculaire principal lors de la fixation, de la propagation et de la migration de cellules normales ou tumorales. Ces complexes protéases-inhibiteurs ont pour rôle le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC). Ce remodelage résulte d'une balance activation/inhibition de la dégradation de certains constituants bien spécifiques de la MEC [Langlois, Chantrain]. Cette surdégradation de la MEC liée à un défaut d'endocytose des protéases médiée par LRP1 est impliquée dans le développement et la progression de l'arthrose [Yamamoto K].

LRP1 peut également coordonner l'adhésion/désadhésion de la cellule à la MEC indispensable à la migration cellulaire grâce notamment à une coopération avec le récepteur CD44 [Perrot]. LRP1 est également impliqué dans l'organisation du cytosquelette et le désassemblage des contacts focaux, notamment par son interaction avec la thrombospondine 1 et la calréticuline [Orr, Orr, Dedieu & Langlois 2008]. En outre, LRP1 joue un rôle dans la maturation de l'intégrine $\beta 1$, impliquée dans l'adhésion cellulaire et la migration [Salicioni]. L'importance de ce rôle de LRP1 dans la migration a été démontrée *in vitro* dans les cellules de Schwann dans le cadre d'un modèle de réparation du système nerveux périphérique blessé. Dans ce modèle, LRP1 se comporte comme un récepteur de signalisation cellulaire médié par des petites GTPases pour réguler la migration impliquant des protéases comme MMP9 et tPA [Mantuano]. L'implication de LRP1 dans la migration a également été mise en évidence dans un modèle de cicatrisation cutanée. Dans ce modèle, après libération de HSP-90 α suite à la nécrose tissulaire, LRP1 était indispensable à la migration des fibroblastes cutanés humains au cours de la cicatrisation. Le mécanisme impliquait une interaction entre HSP-90 α et le domaine CCR2 de LRP1. Ensuite, via le motif NPXY non phosphorylé, l'activation de la voie de signalisation de la phosphokinase B (AKt) entraînait la migration des fibroblastes [Tsen].

Dans des conditions physiologiques ou pathologiques non cancéreuses LRP1 est donc impliqué dans la régulation de l'attachement cellulaire à la MEC, de la migration et de la dégradation de la MEC. La perte de régulation de ces propriétés peut-être impliquée dans diverses pathologies, comme nous l'avons vu pour l'arthrose, mais confère un avantage indéniable aux cellules tumorales dans la pathologie cancéreuse.

Dans le chapitre suivant nous allons donc examiner l'implication de LRP1 dans les cancers.

3.2 Expression et rôle de LRP1 dans les cancers

Les premières études, centrées principalement sur les lignées cellulaires tumorales, ont suggérées que la transformation maligne peut être associée à la perte d'expression de LRP1 [Van Leuven 1979]. Cependant, nous savons maintenant que l'expression de LRP1 est sensiblement augmentée par des conditions hypoxiques fréquentes dans les tumeurs malignes *in vivo* [Montel]. De ce fait, les cellules tumorales cultivées *in vitro* avec un taux d'oxygène ambiant peuvent ne pas refléter avec précision l'expression et l'activité de LRP1 telles qu'elles se produisent dans le cancer.

L'expression de LRP1 dans les tissus normaux et néoplasiques appariés examiné en utilisant la base de données Oncomine qui contient des études d'expression génique de multiples types de cancers a montré des différences spécifiques d'organe dans l'expression de LRP1 (Figure 17). Par comparaison, les profils d'expression de LRP1 dans les tissus sains issus d'une étude transcriptomique multi-tissus est reportée en annexe 1. Dans certains tissus, tels que les tumeurs gliales, une augmentation marquée de l'expression du LRP1 est observée, suggérant que LRP1 joue un rôle dans la promotion de la croissance du gliome. En revanche, dans d'autres types de cancer comme le cancer du poumon, l'expression de LRP1 est réduite dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus pulmonaires normaux, ce qui suggère que LRP1 pourrait exercer des fonctions spécifiques liées au contexte dans les tumeurs [Meng].

Des études immunohistochimiques dans les tissus tumoraux ont confirmé cette variation d'expression de LRP1 en fonction du type tumoral. Dans les carcinomes hépatocellulaire [Huang], les adénocarcinomes pulmonaires [Meng], les adénocarcinomes prostatiques [Gilardoni] et pancréatiques [Leca], l'expression de LRP1 était nettement diminuée dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales et aux cellules du stroma tumoral. Alors que dans les adénocarcinomes mammaires [Catasus 1, Pires], et les carcinomes de l'endomètre [Catasus 2], LRP1 était au contraire sur exprimé dans les cellules tumorales

L'expression de LRP1 dépend donc du type cellulaire et le rôle de LRP1 dans les cancer varie donc d'un type tumoral à l'autre.

	Normal vs. Normal	Cancer vs. Normal	Cancer vs. Cancer
Adipocytes	2		
Appendix	1		
Brain	1	8 3	3 3
Cervix	1		1
Head-Neck	3 1	1	
Heart	1		
Liver	2		
Lung	3	8	2 2
Muscle	2 2		
Others	1		
Ovarian	3	4	1
Peripheral Nervous System	2 1		
Placenta	2		
Spinal Cord	2		
Testis	1 1	2	1
Trachea	1		
Uterus	2		
Vulva	1		
Lymphoma		2	2 2
Multi-cancer	1	1	13 8
Pancreas		1 1	
Renal	4	3	1 1
Seminoma		1	
Bladder	1	1	1
Breast		1	1 1

Figure 17 : Meta-analyse de l'expression de l'ARNm de LRP1 dans de nombreux cancers et tissus sains appariés sur la plateforme web Oncomine (<https://www.oncomine.org>) [Meng].

Cette figure montre que l'expression de LRP1 est très variable d'un type cellulaire à l'autre. En effet, LRP1 est surexprimé dans les tumeurs cérébrales par rapport aux tissus sains dans 8 bases de données sur 11 (flèche du haut) et est au contraire sous exprimé dans les 8 bases de données de cancers du poumon (flèche du bas).

3.2.1 Expression et rôle de LRP1 dans les cellules malignes

Comme décrit ci-dessus, l'expression de LRP1 est modifiée dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines ou aux cellules du stroma. Le plus souvent, il s'agit d'une baisse/perte d'expression de LRP1.

Dans les carcinomes hépatocellulaires [Huang], les adénocarcinomes prostatiques [Gilardoni] et les tumeurs de Wilms [Desrosiers], l'expression diminuée de LRP1 dans les cellules tumorales est corrélée à une augmentation de l'expression de la MMP9. La baisse d'expression de LRP1 dans ces cellules tumorales entraîne donc une augmentation de la protéolyse matricielle autour de la cellule tumorale. Ce phénomène est utile aux processus d'invasion et de migration tumorale. Cet avantage a été confirmé dans des études sur lignée cellulaire. En effet, dans des lignées cellulaires de carcinome hépatocellulaire, la faible expression de LRP1 était associée à une augmentation de l'expression de MMP9 et à un potentiel métastatique accru [Huang]. L'expression de LRP1 est considérablement diminuée dans les sous-clones invasifs par rapport aux sous-clones non invasifs de cellules cancéreuses prostatiques, les cellules de mélanome et les cellules de carcinome vésiculaire thyroïdien [de Vries, Kancha, Sid]. Dans les lignées de carcinome vésiculaire thyroïdien, la faible expression de LRP1 était également associée à une forte expression de MMP9 et aussi de uPA mais n'affectait pas l'expression de MMP2. L'augmentation de l'uPA était dans cette étude l'un des mécanisme impliqué dans l'augmentation de l'invasion cellulaire [Sid]. Dans une lignée de fibrosarcome, la perte d'expression de LRP1 était associée à une augmentation de uPA et à une activation de la voie de signalisation *Extracellular signal-Regulated Kinase* (ERK) entraînant une migration accrue de ces cellules [Webb]. Dans les glioblastomes, la faible expression de LRP1 était corrélée à une augmentation de l'expression de uPA et une invasion accrue *in vivo* [Amos]. Cependant, dans les mélanomes, la faible expression de LRP1 n'était pas corrélée à l'expression de uPA [de Vries].

En contradiction apparente, d'autres études dans les cellules de carcinome vésiculaire thyroïdien ont révélé que en condition 3D la perte d'expression de LRP1 inhibait la migration des cellules tumorales [Appert-Collin]. Une étude de la physique cellulaire par microscopie à force atomique a confirmé que la perte de LRP1 inhibait la migration cellulaire de ces cellules de cancer thyroïdien en abolissant les contacts focaux liés à l'intégrine $\beta 1$ [Le Cigne]. Dans les gliomes, LRP1 est surexprimé dans les gliomes de haut grade (astrocytome anaplasique grade III et glioblastome grade IV) en comparaison avec les gliomes de bas grade

(astrocytome diffus, grade II). Cette augmentation de l'expression de LRP1 était corrélée à une augmentation de l'expression du récepteur de l'uPA (uPAR) [Yamamoto M]. Dans les glioblastome, l'activation de LRP1 par HSP90 facilite la migration cellulaire en devenant co-récepteur de EphA2 (*Ephrin-type A Receptor 2*) et en activant la voie AKt [Gopal]. Dans les cellules malignes de dermatofibrosarcome protuberans LRP1 est également surexprimé en comparaison aux fibroblastes dermiques et cette surexpression est impliquée dans la prolifération cellulaire via la voie ERK [Kajihara]. De plus, LRP1 a été décrit comme étant le plus fortement exprimé dans les lignées les plus invasives de carcinome mammaire [Li Y 1998].

Comme nous venons de le voir, même pour un même type de cancer, un niveau d'expression ou un rôle contradictoire de LRP1 a été décrit dans différentes études. D'autres études ont donné des éléments d'explications pour ces résultats discordants. Tout d'abord, dans des conditions de culture cellulaire, le niveau d'expression de LRP1 peut varier en fonction de l'hypoxie/la normoxie cellulaire [Montel] et en fonction du nombre de passages de la lignée [Grimsley]. En cas d'injection chez la souris, l'effet de LRP1 sur la croissance ou la survie des cellules tumorales peut être différent entre la lignée cellulaire initiale et les métastases [Montel]. De plus, dans les xénogreffes de lignées cellulaires qui produisent des grandes quantités de LRP1, il a été observé qu'en fait, une petite fraction de cellules produisait LRP1 [de Vries]. Il pourrait donc dans certaines des études *in vitro* y avoir un phénomène de sélection de sous-clone qui pourrait induire des variations de résultats à partir d'une même lignée cellulaire.

Le niveau d'expression de LRP1 peut aussi dépendre du matériel étudié : cellule, tissu frais congelé, immunohistochimie sur coupe tissulaire fixée au formol et incluse dans la paraffine. Certaines études ont montré une excellente corrélation entre les niveaux d'expression immunohistochimique et de l'ARNm de LRP1 et par dans un même tissu [Huang, Meng], mais des études différentes portant sur le même type de tumeur ont parfois donné des résultats contradictoires comme nous le verrons plus loin pour le cancer du poumon.

D'autre part, il semblerait que la voie de cancérogenèse par laquelle s'est développée la cellule puisse influencer le niveau d'expression de LRP1. En effet, dans une étude portant sur des patients atteints de carcinomes épidermoïdes oropharyngés, LRP1 était surexprimé dans les carcinomes épidermoïdes induits par le papillomavirus humain (HPV) et pas dans les carcinomes épidermoïdes non HPV-induits [Suarez]. Les traitements pourraient également modifier l'expression de LRP1. En effet, une étude portant sur un petit nombre de patientes

atteintes de cancer mammaire a montré une modification de l'expression de LRP1 après radiothérapie par comparaison à l'expression sur biopsie avant radiothérapie. Il s'agissait le plus souvent d'une perte d'expression, mais dans quelques cas très une nette augmentation de l'expression de LRP1 était notée [Pires].

L'expression de LRP1 semble donc varier énormément en fonction des types de cancer, mais aussi pour un même cancer en fonction de multiples facteurs.

Dans les modèles de cancer décrits ci-dessus, quelque soit le niveau d'expression de LRP1 dans les cellules tumorales, les principales protéases impliquées dans l'invasion et la migration médiée par LRP1 était l'uPA et la MMP9. La voie du plasminogène a été décrite comme la voie « directe » par laquelle LRP1 régule la signalisation cellulaire et promeut la survie cellulaire et la migration. LRP1 est également impliquée dans la voie de signalisation ERK1/2 médiée par uPAR qui favorise la survie, la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales. L'activité activatrice ou inhibitrice de LRP1 dans la signalisation médiée par uPAR dépend de la présence de l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1) et de l'abondance de l'uPAR dans la membrane plasmique [Gonias 2011].

La voie du plasminogène n'est pas la seule impliquée dans la signalisation cellulaire dépendante de LRP1. En effet, la liaison directe des ligands de LRP1, en particuliers la protéine chaperone Hsp90 ou le facteur de croissance midkine, peut activer directement la signalisation cellulaire dans les cellules cancéreuses, comme cela a été observé dans les cellules non transformées telles que les neurones et les fibroblastes interstitiels [Chen S, Gopal]. Lorsque ERK1/2 est activé en aval de LRP1, l'expression de la MMP9 et la MMP2 augmente [Song]. Parce que ces MMP sont impliquées dans l'invasion et le processus métastatique de cellules cancéreuses, l'activation de ERK1/2 en aval de LRP1 peut favoriser la progression du cancer. Un autre ligand de LRP1, l'apolipoprotéine E, inhibe l'invasion de cellules tumorales et la formation de métastases par une voie qui nécessite également LRP1 [Pencheva].

3.2.2 Expression et rôle de LRP1 dans les cellules du stroma tumoral

Le stroma ou microenvironnement tumoral est constitué de populations diverses de cellules normales d'origine mésenchymateuse, incluant des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles, lymphocytes), des cellules souches mésenchymateuses et des préadipocytes/adipocytes qui sont inclus dans une MEC. La nature du microenvironnement tumoral est bien évidemment dépendante de la composition d'origine de l'organe dans lequel se développe la tumeur (sein, côlon, prostate, ...) et d'évènements dépendants de la tumeur conduisant à son altération. Ces cellules stromales vont au cours de la progression tumorale être recrutées ou inhibées par les cellules malignes afin de constituer un environnement favorable à la progression tumorale puis à la colonisation de l'individu dans sa globalité [Buache].

Nous allons examiner ci-dessous comment l'expression de LRP1 dans les cellules du stroma tumoral, comme les cellules inflammatoires ou les fibroblastes, peut favoriser ou inhiber la progression tumorale.

Les monocytes et les macrophages qui infiltrent les tumeurs peuvent favoriser la progression du cancer et les métastases en exprimant des facteurs de croissance et des protéases qui sont exploités par les cellules malignes et en favorisant l'angiogenèse tumorale [Qian]. Une étude a montré que LRP1 est impliqué dans ce processus [Staudt]. Dans cette étude, le recrutement des monocytes/macrophages par des cellules tumorales pancréatiques greffées chez la souris était accru lorsque ceux-ci n'exprimaient pas LRP1. Les macrophages déficients en LRP1 exprimaient plus de chimiokines, et notamment de chimiokines connues pour amplifier l'inflammation via l'activation de la voie NF- κ B, ce qui expliquait le recrutement et la migration accrue de ces macrophages. L'augmentation de l'infiltration tumorale par les macrophages déficients en LRP1 s'accompagnait d'une augmentation de l'angiogenèse tumorale indépendante du VEGF reflétant très probablement la libération d'autres protéines pro-angiogéniques par les macrophages [Staudt]. Dans une autre étude, il a cependant été démontré que la liaison de LRP1 à certains de ses ligands, comme a2M, dans les macrophages stimulait la sécrétion de MMP9 par ceux-ci via l'activation des voies de signalisation ERK et NF- κ B [Carceres]. Dans cette étude l'expression de LRP1 semble donc requise pour activer les macrophages. De plus, dans un autre modèle tumoral, l'expression de LRP1 était également requise pour permettre le recrutement des mastocytes par des cellules de gliome de haut grade via la voie du plasminogène [Roy]. Il apparaît donc que, comme pour les cellules malignes, le rôle de LRP1, bien qu'indéniable varie en fonction du type de cellules

inflammatoires impliquées et certainement aussi en fonction du couple cellule stromale/cellule tumorale impliqué. Il est cependant à noter que comme pour les cellules malignes, les voies du plasminogène, ERK et NF- κ B semblent déterminantes pour l'acquisition du phénotype pro-inflammatoire ou pro-migratoire dépendant de LRP1.

En ce qui concerne les fibroblastes du stroma, également appelés fibroblastes associés au cancer (CAF, *Cancer associated fibroblasts*), la majorité des études s'accorde sur le fait que ceux-ci surexpriment LRP1 [Leca, Meng, Obermeyer]. Dans les cancers du sein, il a été démontré que les cellules malignes recrutent les fibroblastes par une voie impliquant LRP1 [Derocq, Beaujourn]. Dans les adénocarcinomes coliques, la forte expression de LRP1 par les CAF était associée à une forte expression de uPA [Obermeyer]. Dans les adénocarcinomes canaux pancréatiques, LRP1 est surexprimé dans les cellules du stroma alors qu'il n'est peu ou pas exprimé dans les cellules malignes. Cette forte expression de LRP1 associée à l'expression de l'annexine A6 dans les CAF entraîne une diminution de l'activation de l'apoptose, et notamment de l'activation de la caspase 3, dans les cellules tumorales et à une augmentation de l'expression de SNAIL (*Snail family transcriptional repressor*), un facteur de transcription qui promeut la transition épithélio-mésenchymateuse et la migration [Leca]. Dans ce modèle l'expression combinée de LRP1 et Annexine A6, dont la fonction n'est pas encore connue, dans les CAF aurait un rôle protumoral. Dans les adénocarcinomes pulmonaires, une étude en culture cellulaire a montré un rôle anti-prolifératif des fibroblastes sur les cellules cancéreuses [Meng].

Ainsi, la surexpression de LRP1 par les fibroblastes du stroma permettrait d'une part leur recrutement par les cellules malignes et d'autre part orienterait les cellules malignes vers un phénotype mésenchymateux, pro-migratoire, peu proliférant caractéristique des cellules malignes en transition épithélio-mésenchymateuse. Ce phénotype favorise l'invasion tumorale et le développement de métastases. De ce fait, même si peu d'études ont été réalisées sur le rôle de l'expression de LRP1 par les CAF à ce jour, l'expression accrue de LRP1 par ceux-ci semble conférer un avantage invasif aux cellules malignes qu'elles secrètent ou non LRP1.

3.3 Régulation et modulation de l'expression de LRP1 dans les cancers

Dans les cellules malignes comme dans les cellules du stroma, l'expression de LRP1 est variable. Dans de nombreux types de cancers, il est observé une sous-expression de LRP1 dans les cellules malignes et une surexpression dans les fibroblastes du stroma. Cependant, comme nous l'avons vu ci-dessus, l'expression de LRP1 peut varier en fonction des conditions de culture pour un même type cellulaire ou en fonction des tissus. Dans ce sous-chapitre nous allons donc examiner les mécanismes de régulation de l'expression de LRP1 décrits dans les cancers.

3.3.1. Altérations génétiques du gène *LRP1* dans les cancers

Le gène *LRP1* humain situé sur le bras court du chromosome 12 en position 12q13-14 comprend 89 exons couvrant 92 kb d'ADN génomique [Van Leuven 1994, Myklebost]. Le promoteur du gène *LRP1* est particulier car il n'a pas de boîte TATA. De plus, contrairement à d'autres gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, comme le *LDLR*, *LRP1* ne contient pas de séquence de liaison aux éléments régulateurs de stérol (SRE) [Kütt]. Des séquences similaires ont depuis été mises en évidence en dehors de la région promotrice du gène *LRP1* [Llorente-Cortes].

Hors cancer, la substitution K1245R dans le gène *LRP1* a été observée à l'état homozygote dans des familles atteintes de Kératose pileuse atrophique suggérant que cette substitution soit à l'origine de la maladie [Klar]. C'est actuellement la seule maladie qui serait liée à une mutation du gène *LRP1*. Des polymorphismes du gène *LRP1* ont été mis en évidence chez des patients atteints de trouble du métabolisme lipidique [Van Leuven 2001]. D'autres polymorphismes de signification indéterminée ont également été décrits.

Bien qu'aucune mutation du gène *LRP1* liée à l'initiation ou à la progression du cancer n'ai été trouvée à ce jour, une étude a montré que le polymorphisme C766T dans le gène *LRP1* est associé à un risque accru de développement du cancer du sein [Benes]. De plus, on ne sait pas si la présence de mutation affecte l'expression de *LRP1*.

Une amplification du gène *LRP1* a été rapportée dans les gliomes de haut grade, connus pour leur surexpression de LRP1, mais pas dans les autres tumeurs primitives du système nerveux central étudiées (méningiome, tumeur fibreuse solitaire/hémangiopéricytome, méduloblastome, schwannome, ...) [Baum]. Cependant, l'impact de l'amplification de *LRP1* sur son expression génique n'a pas été recherché. Dans les adénocarcinomes pulmonaires

l'amplification du gène *LRP1* n'était pas fréquente et n'était pas associée à une surexpression de l'ARNm de *LRP1* [Meng].

Récemment, un gène de fusion *LRP1-SNRNP25*, a été identifié dans l'ostéosarcome humain [Yang J]. Le séquençage a révélé que la fusion se situait entre l'exon 8 de *LRP1* et l'exon 2 de *SNRNP25* (small nuclear ribonucleoprotein U11/U12 subunit 25) situé sur le bras court du chromosome 16. Ce gène de fusion *LRP1-SNRNP25* est amplifié dans les ostéosarcomes. La transfection du transcrite de fusion *LRP1-SNRNP25* dans des cellules d'ostéosarcome humain SAOS-2 a montré que l'expression de *LRP1-SNRNP25* favorise la migration et l'invasion des cellules SAOS-2 [Yang]. Ce gène de fusion n'est présent que dans 6 % des ostéosarcomes, mais il semble être spécifique des ostéosarcomes car il n'a pas été observé dans 240 autres sarcomes (56 sarcomes pléomorphes indifférenciés, 50 liposarcomes, 24 leiomyosarcomes, 4 rhabdomyosarcomes, 21 synoviosarcomes, 13 chondrosarcomes, 8 tumeurs neuro-ectodermiques primitives/ sarcome d'Ewing et 64 tumeurs malignes des gaines des nerfs périphériques) [Yang]. Ce gène de fusion pourrait donc être utile au diagnostic moléculaire des ostéosarcomes dans les cas difficiles ou pourrait servir de base pour une approche thérapeutique [Xing].

3.3.2. Altérations épigénétiques du gène LRP1 dans les cancers

Les modifications épigénétiques du gène *LRP1* telles que la méthylation de son promoteur ou la modification des histones (méthylation ou acétylation) n'ont pas encore été étudiées à ce jour. En revanche, des phénomènes de méthylation de la région promotrice ont été rapportées pour d'autres gènes de la famille LRP, notamment *LRP1B* [Lu, Sonoda] et *LRP2* [Knutson].

La méthylation du promoteur du gène *LRP1B* a été observée dans 61% des adénocarcinomes gastriques [Lu] et dans 43% des carcinomes épidermoïde de l'œsophage [Sonoda]. Dans ces cancers, la méthylation du promoteur de *LRP1B* était associée à une baisse de l'expression génique de *LRP1B*.

Le gène *LRP1B* a une identité de séquence à 59% avec le gène *LRP1*. De plus, leur structure est presque identique. Fonctionnellement, *LRP1B* est différent de *LRP1* et est connu comme un suppresseur de tumeur [Emonard]. De part leur homologie et leurs baisse d'expression fréquente dans les cancers, il est logique de penser que peut-être la baisse d'expression de *LRP1* dans certains cancers peut être liée à un phénomène épigénétique tel que la méthylation du promoteur de *LRP1*.

3.3.3. Régulation de LRP1 par les microARN dans les cancers

Les microARN (miARN) sont de petits ARN non codants qui jouent un rôle important dans la régulation de l'expression génique post-transcription dans divers cancers humains. Les miARN sont impliqués dans la tumorigenèse, la régulation des métastases, l'invasion, la prolifération cellulaire et l'apoptose [Esquela-Kerscher].

LRP-1 est prédit comme pouvant être la cible de 43 miARN dans les bases de données actuelles (miRDB). Parmi ces miARN, les principaux candidats sont miR-205, la famille des miR-200 et miR-103 (TargetScan.org). Cependant, à ce jour, un seul miARN impliqué dans la régulation de l'expression de LRP1 a été décrit : miR-205 [Song]. Dans des lignées de glioblastome et d'adénocarcinome pulmonaire qui surexprimaient LRP1, miR-205 diminuait l'expression de LRP1 ainsi que le potentiel invasif de ces cellules [Song]. miR-205 se lie à sa séquence complémentaire située dans la région 3' non traduites de l'ARNm de LRP1, et régule ainsi l'expression de LRP1 en inhibant sa traduction [Song].

Une autre étude a montré que miR-205 est exprimé par les fibroblastes dermiques sains qui n'expriment pas LRP1 et n'est pas exprimé par les cellules malignes de dermatofibrosarcome qui elles, sur-expriment LRP1 [Kajihara]. Dans cette étude, l'inhibition de miR-205 dans les fibroblastes dermique a entraîné une augmentation de l'expression de LRP1, confirmant ainsi le rôle de régulateur de miR-205 vis à vis de l'expression de LRP1.

Inversement, dans les macrophages, il a été mis en évidence un miARN régulé par LRP1 : miR-155 [Montuano]. L'expression de ce miARN, essentielle au maintien de la réponse inflammatoire, est inhibée par LRP1 [Montuano].

3.3.4. Shedding de LRP1 dans les cancers

Une forme soluble de LRP1 (sLRP) circulant dans le plasma humain a été décrite il y a une vingtaine d'année [Quinn 1997]. La caractérisation du sLRP a montré qu'il était composé de la chaîne α du récepteur liée de façon non covalente à une partie de sa chaîne β d'un poids moléculaire de 55 kDa, indiquant que LRP1 peut subir le relargage de son ectodomaine après clivage de sa chaîne β à proximité de la membrane plasmique. Les métalloprotéases ont été les premières enzymes impliquées dans le clivage (*shedding*) de LRP1 décrites [Quinn 1999]. Actuellement, plus d'une dizaine d'enzymes impliquées dans le *shedding* de LRP1 ont été décrites. Il s'agit de protéines transmembranaires telles que les MT-MMP (*Membrane-Type Matrix MetalloProteinase*) et les ADAM (*A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein*) et BACE (*Beta-secretase-1*) mais également tPA [Emonard].

Le *shedding* de LRP1 peut avoir différentes conséquences. D'une part, la diminution de la présence du récepteur à la surface cellulaire qui va provoquer en conséquence une diminution de l'endocytose de ses ligands préférentiels. C'est par exemple le cas des protéases matricielles dont la quantité au niveau péricellulaire augmente de façon importante en l'absence d'endocytose dépendante de LRP1, ce qui aboutit à une augmentation de la protéolyse matricielle [Selvais 2009]. D'autre part, le sLRP pourrait être capable de séquestrer ses ligands empêchant leur liaison à leur récepteur(s) membranaire(s) spécifique(s). Enfin, le *shedding* de l'ectodomaine de LRP1 peut induire dans un second temps la protéolyse de la partie intracellulaire restante de LRP1 : LRP-ICD (*LRP-intracellular domain*) par une γ -sécrétase [May 2002]. Cette portion intracellulaire contient à 1 fois les motifs d'endocytose et de signalisation. Il a notamment été montré que LRP-ICD pouvait interagir avec le facteur de régulation de l'interféron γ entraînant son exportation du noyau vers le cytoplasme et sa dégradation par le protéasome. Ainsi, LRP-ICD pourrait influencer l'expression de l'interféron γ [Zurhove].

Ce phénomène de *shedding* pourrait tout de même être régulé. En effet il a été montré que la liaison de la pro-cathepsine-D à LRP1 inhibait la libération du LRP-ICD notamment en empêchant le premier clivage protéolytique de l'ectodomaine du récepteur [Derocq].

L'impact de la régulation de l'expression de LRP1 par ce phénomène de *shedding* n'a pas encore été étudié en pathologie cancéreuse.

3.4 Impact pronostique de LRP1 dans les cancers

Comme nous venons de le voir dans la section précédente, LRP1 est souvent sous-exprimé dans de nombreux types de cancers, suggérant un rôle anti-tumoral de LRP1. Cependant, dans certains autres types de cancers et notamment les gliomes, LRP1 est surexprimé ce qui suggère au contraire un rôle oncogénique de LRP1. Le rôle de LRP1 a été principalement étudié *in vitro* sur différents types de lignées cellulaires et *in vitro* chez la souris. Peu d'études ont évaluées son expression dans des cohortes de patients. Dans la majorité de ces études, la faible expression de LRP1 dans les tumeurs était associée à des stades tumoraux plus avancés comme dans les mélanomes [de Vries] ou les tumeurs de Wilms [Desrosiers], à une moindre différenciation avec un score de Gleason plus élevé dans les adénocarcinomes prostatiques [Gilardoni] ou à un mauvais pronostic global comme dans les adénocarcinomes pulmonaires [Meng] ou les carcinomes hépatocellulaires [Huang]. Dans d'autres types de cancers, la surexpression de LRP1 était au contraire associée à des éléments de mauvais pronostic (stade avancé, haut grade histologique), comme dans les cancers du sein [Catusus 1, Pires], de l'endomètre [Catusus 2], et de la prostate [McGarvey]. L'impact de la surexpression de LRP1 sur la survie n'a pas été évalué ou s'est révélé non concluant dans ces études.

Dans une cohorte de 439 adénocarcinomes pulmonaires, la sous-expression de l'ARNm de LRP1 était associée à une moins bonne survie indépendamment de l'âge, du sexe et du stade tumoral, comme représenté dans la figure 18 ci-dessous extraite de l'article de Meng et al. [Meng].

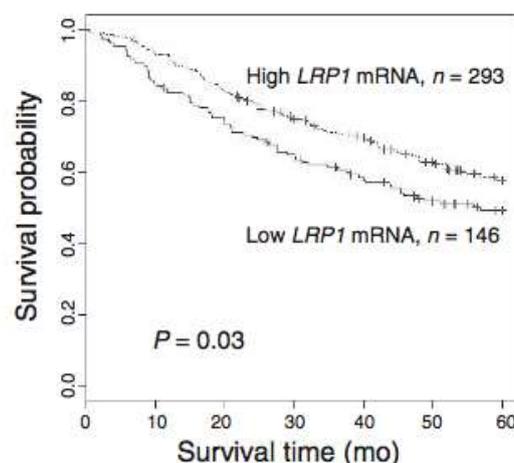


Figure 18 : Valeur pronostique de l'expression de l'ARNm dans les adénocarcinomes pulmonaires [Meng].

Courbe de survie de Kaplan Meier montrant l'impact positif de l'expression de l'ARNm de LRP1 sur la survie globale.

Dans cette étude, l'expression de LRP1 n'avait pas de valeur pronostique dans les carcinomes épidermoïdes pulmonaires [Meng].

Les données observées sur leur cohorte ont été confirmées dans cette même étude au niveau génique et protéique dans une cohorte indépendante de patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires, comme montré dans la figure 19 ci-dessous issue du même article.

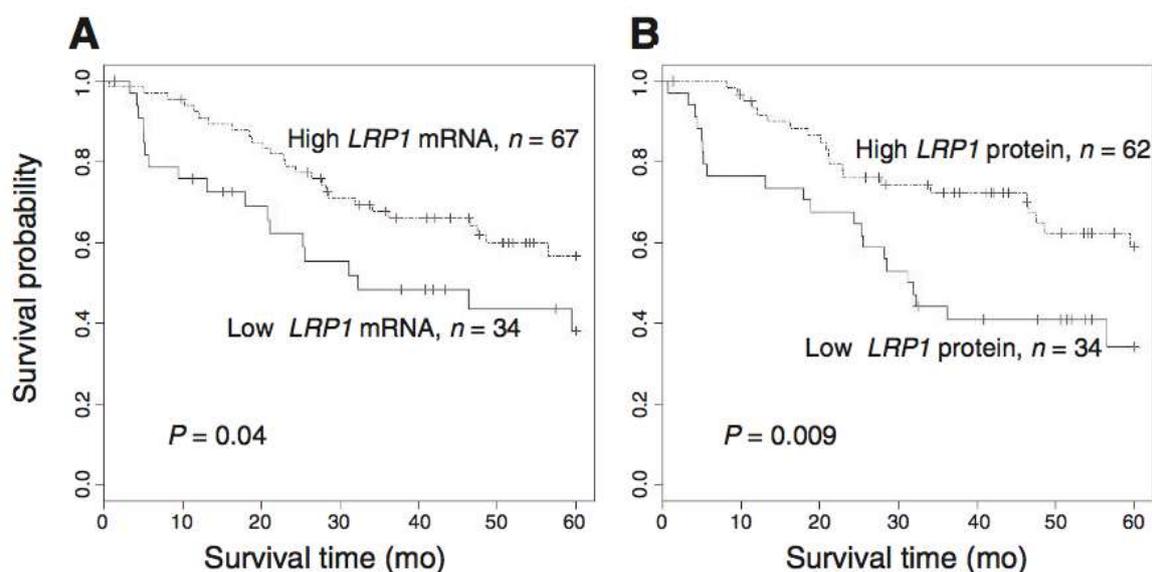


Figure 19 : Valeur pronostique de l'expression de l'ARNm et de la protéine LRP1 dans les adénocarcinomes pulmonaires [Meng].

Courbe de survie de Kaplan Meier confirmant l'impact positif de l'expression de l'ARNm de LRP1 sur la survie globale dans une cohorte indépendante (A). Ces données sont confirmées au niveau protéique (B).

Dans l'étude de Meng et al., les études immunohistochimiques réalisées dans 2 cohortes indépendantes ont montré qu'alors que LRP1 est fréquemment sous-exprimé dans les cellules tumorales, il était fréquemment surexprimé dans les fibroblastes du stroma. Des études menées sur des fibroblastes embryonnaires de souris ont montrées que cette surexpression de LRP1 dans les fibroblastes était associée à une diminution de la prolifération de 3 lignées différentes de cellules de cancer du poumon (H460, H2347, et HCC4006) en co-culture. L'adjonction de RAP, la protéine chaperone de LRP1 qui inhibe son activité in vitro, confirmait l'implication de LRP1. En effet, la prolifération des cellules tumorales en co-culture n'était plus inhibée après adjonction de RAP [Meng]. Il semblerait donc que cette surexpression de LRP1 dans les fibroblastes du stroma a pour rôle de contrôler la prolifération des cellules tumorales.

Dans une cohorte de 327 carcinomes hépatocellulaires, il a également été observé une perte d'expression immunohistochimique dans les cellules cancéreuses dans près de la moitié des cas et une plus faible expression dans les cellules cancéreuses comparé aux cellules du stroma et aux cellules saines adjacentes [Huang]. Dans cette étude, comme pour les adénocarcinomes pulmonaires, LRP1 était un facteur indépendant de mauvais pronostic pour la survie globale et sans progression, comme illustré dans la figure ci-dessous issue de cette étude. Leurs données ont été validées dans une cohorte indépendante. De plus dans cette étude, il a été observé une corrélation négative entre l'expression de LRP1 et de la MMP9 dans les cellules cancéreuses. Le groupe avec sous-expression de LRP1 et surexpression de la MMP9 (groupe II de la partie C et D de la figure 20 ci-dessous) avait le plus mauvais pronostic et le risque de récurrence le plus élevé.

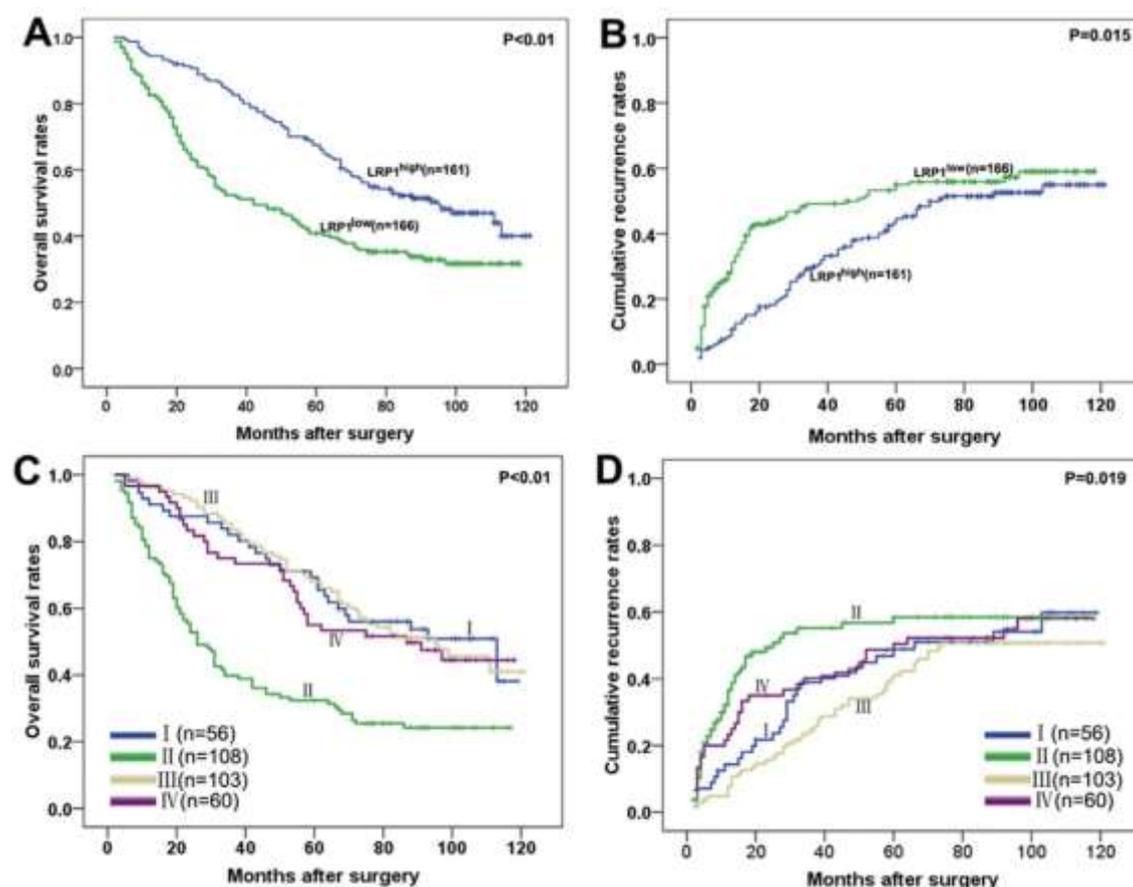


Figure 20 : Valeur pronostique de LRP1 dans les carcinomes hépatocellulaires [Huang]. La signification pronostique a été évaluée par les analyses Kaplan-Meier et log-rank. Les patients avec carcinome hépatocellulaire (CHC) exprimant faiblement LRP1 (LRP1^{low}) avaient une survie globale (A) et sans récurrence (B) plus courte. Les patients atteints de CHC avec LRP1^{low}/MMP9^{high} avaient le moins bon pronostic parmi les quatre sous-groupes (C et D). Groupe I LRP1^{high}/MMP9^{high} (n = 56), groupe II LRP1^{low}/MMP9^{high} (n = 108), groupe III LRP1^{high}/MMP9^{low} (n = 103), Groupe IV LRP1^{low}/MMP9^{low} (n = 60).

Les études cliniques réalisées chez des patients atteints de deux types de carcinomes différents : adénocarcinome pulmonaire et carcinome hépatocellulaire, s'accordent donc sur la valeur pronostique péjorative de la sous-expression/perde d'expression de LRP1 dans les cellules tumorales. Cette diminution d'expression dans les cellules cancéreuse peut être facilement recherchée en immunohistochimie en pratique courante. Si l'intérêt pronostic de LRP1 dans ces tumeurs se confirme, il pourrait, après définition de seuils précis, devenir un biomarqueur utile pour la stratification du pronostic et donc pour la décision thérapeutique.

Dans une étude portant sur la détermination d'une signature d'expression génétique multi-cancers, *LRP1* et d'autres gènes (*ESR1*, *PRKACA*, *JUN* et *SMAD2*) étaient au centre de l'algorithme de connexion de 41 biomarqueurs de prédiction pronostique pour 11 types de cancer différents (vessie, côlon, sein, glioblastome, ORL, carcinome à cellules rénales à cellules claires du rein, leucémie myéloïde aigue, adénocarcinome pulmonaire, carcinome épidermoïde pulmonaire, carcinome séreux ovarien, carcinome endométrioïde utérin) [Martinez]. Cette signature génique était capable de discriminer les groupes de bon et mauvais pronostic dans 11 types de cancers différents. La valeur pronostique isolée de LRP1 évaluée par le Hazard Ratio était variable d'un type de cancer à l'autre, mais sans données précises dans l'article. Les résultats de cette étude sont présentés dans la figure 21 ci-dessous extraite de l'article.

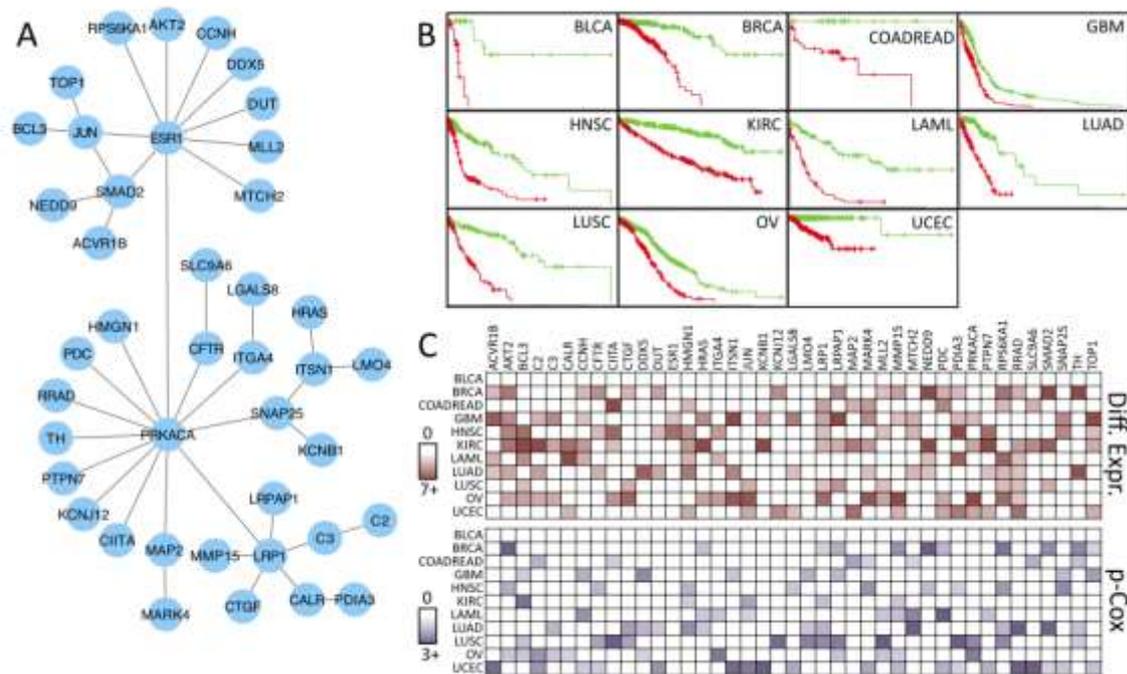


Figure 21 : Présentation du panel de biomarqueurs multi-réseau d'association clinique (multi-NCA) identifié dans l'étude de Martinez-Lesdema E et al. [Martinez].

Le panel **A** montre les gènes et le réseau identifié. La plupart des gènes étaient connectés par PRKACA, ESR1, LRP1, SMAD2 et JUN. Le panel **B** montre la valeur prédictive pour la survie du biomarqueur multi-NCA (fractionnement de l'indice pronostique par la médiane) dans les différents types de cancer. Le panel **C** représente l'expression différentielle codée par couleur des gènes entre les groupes à risque. Un rouge plus foncé indique une plus grande différence significative. Les échelles sont exprimée en $-\log_{10}$ du p du test t. Seules les valeurs $p < 0,01$ sont mises en surbrillance. Un violet plus foncé indique un Hazard Ratio plus significatif dans le modèle Cox. Les échelles sont exprimée en $-\log_{10}$ de la valeur Z de p . Seules les valeurs $p < 0,05$ sont mises en surbrillance.

3.5 Thérapeutiques anti-cancéreuses utilisant ou ciblant LRP1

Actuellement, aucune stratégie thérapeutique ciblant directement LRP1 n'a été développée. Seules des stratégies thérapeutiques utilisant LRP1 comme un récepteur cargo pour transporter des agents de chimiothérapie au travers de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ont été développées. En effet, il a été démontré que LRP1 est capable de médier une transcytose bidirectionnelle au travers de la BHE de la protéine bêta-amyloïde dont l'accumulation dans le tissu encéphalique est impliqué dans la maladie d'Alzheimer [Pflanzner].

Cette capacité de LRP1 à médier le transport de molécules au travers de la BHE est donc un outil précieux et attendu pour délivrer des agents de chimiothérapies auxquels la BHE était jusqu'alors imperméable. Selon ce principe, une molécule nommée ANG1005 ou GRN1005 a été développée. ANG1005 se compose de trois molécules de paclitaxel conjuguées par des liaisons ester à un peptide de 19 aminoacides l'Angiopep-2. Ce nouvel agent chimique traverse la BHE via une transcytose médiée par LRP1 [Bertrand] comme présenté dans la figure 22 ci-dessous. Ce peptide Angiopep-2 qui est dérivé du domaine de Kunitz, un ligand connu de LRP1, présente une importante capacité de transcytose au travers de la BHE *in vitro* [Demeule]. Cette stratégie a montré son efficacité *in vivo* [Regina].

ANG1005/GRN1005 a été testée en phase I chez des patients atteints de gliomes de grade II à IV évolutifs sous traitement [Drappatz] et chez des patients souffrant de métastases cérébrales de différents types de cancers (ORL, mélanome, sein, poumon,...) [Kurzrock]. Ces études ont donné des résultats prometteurs avec une bonne tolérance et une réponse thérapeutique (stabilité ou une diminution des lésions) chez 1/3 à la moitié des patients [Drappatz, Kurzrock].

selon les critères RECIST 1.1 (diminution de la taille des lésions en imagerie) [Eisenhauer]. Plus de la moitié des patients avaient des effets secondaires. Le plus fréquent était la neutropénie fébrile chez 3/16 patients.

La molécule a été récemment modifiée en conjugant ANG1005 à un peptide de pénétration intracellulaire nommé TAT. Ce complexe ANG-TAT améliore la perméabilité intratumorale [Li 2016]. Une autre étude a utilisé le système Angiopep2-LRP1 pour délivrer des nanotubes de carbone chimiquement fonctionnalisés dans le cerveau des souris [Kafa]. Ces 2 modèles récents utilisant le couple Angiopep2-LRP1 n'ont pas encore été testés cliniquement.

4. LRP1 et cancers du côlon

Le rôle de LRP1 dans les cancers du côlon a été très peu étudié. Seules 3 études ont évaluées son expression dans des échantillons d'adénocarcinome colique et de muqueuse colique saine [Toquet, Obermeyer, Sakamoto]. Les études immunohistochimiques ont montrées que dans les muqueuses coliques saines, LRP1 était exprimé par les cellules épithéliales dans tous les cas ($n=25$). Une expression de LRP1 dans les cellules de la lamina propria a aussi été notée, notamment dans les myofibroblastes (co-expression LRP1/actine musculaire lisse) [Toquet]. Dans les adénocarcinomes, 2 études immunohistochimiques ont évalué l'expression de LRP1. Dans ces 2 études, un profil d'expression de LRP1 similaire a été décrit, à savoir une forte expression de LRP1 dans les cellules du stroma et une faible expression dans les cellules adénocarcinomateuses [Obermeyer, Toquet]. En revanche, la description de l'expression et des proportions de cas exprimant ou n'exprimant pas LRP1 dans les cellules tumorales étaient différents d'une étude à l'autre. Dans une étude, LRP1 était exprimé dans 7/25 cas (28%) comparés à la muqueuse saine appariée et une perte complète d'expression était observée dans 4 cas (16%) [Toquet]. Dans une autre étude, seuls 6/50 cas (12%) montraient une expression diffuse de LRP1 dans les cellules tumorales. Dans cette étude, il a été noté que dans 11/50 cas (22%), l'expression de LRP1 était inhomogène avec une expression présente au front d'invasion et absente au centre de la tumeur [Obermeyer].

Concernant l'expression génique de LRP1, seules 2 études ont décrit son profil d'expression dans les tissus coliques tumoraux [Obermeyer, Sakamoto]. Un faible nombre de cas ont été examinés dans ces études et le choix des tissus tumoraux (pourcentage de cellules tumorales et de nécrose) ainsi que leur qualité n'étaient pas détaillés. Dans l'une de ces 2 études, le niveau d'expression de l'ARNm de LRP1 était sous le seuil de détection dans 8/10 cas [Obermeyer]. Dans la seconde étude, l'expression de LRP1 était diminuée dans les échantillons tumoraux comparés aux échantillons sains dans 2/20 cas seulement. Une surexpression était observée dans 12/20 cas et une expression équivalente dans 6/20 cas [Sakamoto].

Ces études, ont évaluées des associations d'expression entre LRP1 et certains de ces ligands. Il a été observé une association statistique entre la forte expression de LRP1 et l'expression de uPA [Obermeyer], de Midkine (un facteur de croissance) et de RAP [Sakamoto]. Une co-

expression de LRP1 et de la Calréticuline (une chaperone impliquée dans le métabolisme calcique) a été décrite dans les muqueuses coliques saines [Toquet]. Ainsi dans les muqueuses coliques saines comme dans les adénocarcinomes, LRP1 interagit avec de nombreux ligands. La forte expression de LRP1, peu fréquente dans les adénocarcinomes coliques, serait associée avec une expression accrue de facteurs de croissance et de protéase extracellulaire. Le rôle pro ou anti-tumoral de LRP1 dans les cancers du côlon semble donc difficile à établir. D'un côté LRP1 est très fréquemment sous-exprimé dans les cancers par rapport aux muqueuses saines. La perte d'expression semble donc être un avantage pour la cellule tumorale et LRP1 serait donc plus un anti-oncogène. D'un autre côté, la forte expression de LRP1 dans les cellules tumorales est associée à une forte expression de facteurs de croissances et de protéases, ce qui confère un avantage pour la croissance, la survie et la migration de la cellule tumorale et donc conférerai à LRP1 un rôle d'oncogène. Cependant, très peu de ligands de LRP1 ont été étudiés, de plus isolément, sans tenir compte des complexes moléculaires associés, comme le complexe entre uPA et son inhibiteur PA-I. Les conséquences cellulaires de l'expression/la sous-expression de LRP1 dans les cancers colorectaux restent donc à définir.

L'association entre l'expression de LRP1 dans les adénocarcinomes et des caractéristiques cliniques ont été recherchées dans 2 études. Dans l'une d'elle, il a été observé que la perte d'expression immunohistochimique de LRP1 survenait dans des adénocarcinomes de stades plus avancés (stades III versus stade I et II de l'UICC) [Obermeyer]. Dans l'autre, aucune association avec des caractéristiques cliniques ou morphologiques n'a été observée [Toquet]. Seulement les caractéristiques en question, en dehors du sous-type mucineux d'adénocarcinome, n'étaient pas décrites. Le profil moléculaire des adénocarcinomes n'était pas décrit dans ces 2 études. La valeur pronostique de LRP1 n'a à ce jour jamais été évaluée dans les cancers colorectaux.

But du travail

Comme nous venons de le présenter ci-dessus, LRP1 est un récepteur multifonctionnel qui occupe un rôle central dans les rapports entre la cellule et son micro-environnement et dans de nombreuses voies de signalisation. De part ces multiples fonctions, LRP1 joue un rôle important dans la progression du cancer. En raison de sa multifonctionnalité, son rôle n'est pas toujours évident à appréhender et il varie d'un type de cancer à l'autre.

Dans plusieurs types de carcinomes non gynécologiques, l'expression de LRP1 diminue dans les cellules tumorales et augmente dans les cellules du stroma. Cette variation d'expression différentielle entre le stroma et les cellules malignes semble favoriser la dissémination du cancer. Le rôle pronostic de la baisse d'expression de LRP1 a été avéré dans les adénocarcinomes pulmonaires et les carcinomes hépatocellulaires. Dans le cancer du côlon, l'expression de LRP1 étudiée sur un petit nombre de cas semble également être diminuée dans les cellules tumorales et augmentée dans les cellules du stroma. Les associations cliniques et la valeur pronostique de ces modifications d'expression de LRP1 dans les cancers du côlon n'ont jamais été étudiées. De plus, les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de LRP1 dans les cancers du côlon ne sont à ce jour pas connus.

Le but de ce travail est de décrire l'expression de LRP1 dans les tissus coliques sains et adénocarcinomateux dans une cohorte de patients et de déterminer les paramètres clinico-pathologiques et moléculaires associés à cette expression ainsi que sa valeur pronostique.

La première partie de ce travail (manuscrits 1 et 2) consiste en une validation méthodologique de certaines techniques qui seront utilisées dans la partie principale du travail.

La seconde partie (manuscrit 3) est l'étude de l'expression de LRP1 dans les cancers coliques ainsi que l'évaluation des paramètres clinico-pathologiques et moléculaires associés à l'expression de LRP1 et la détermination de sa valeur pronostique. Dans ce travail nous étudierons également certains mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de LRP1 dans les cancers du côlon.

Seconde partie :

Résultats

Manuscrit 1

BRAFV600E Gene Mutation in Colonic Adenocarcinomas. Immunohistochemical Detection Using Tissue Microarray and Clinicopathologic Characteristics: An 86 Case Series.

Boulagnon C, Dudez O, Beaudoux O, Dalstein V, Kianmanesh R, Bouché O, Diebold MD. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2016;24(2):88-96.

Contexte scientifique

La recherche de mutation du gène *BRAF* est réalisée en pratique courante dans plusieurs indications dont la principale est diagnostique dans les cas de cancer colorectal (CCR) microsatellite instable (MSI). Dans cette situation, la mutation *BRAFV600E* permet de distinguer les CCR sporadiques (MSI *BRAF* mutés) des CCR potentiellement héréditaires entrant dans le cadre du syndrome de Lynch. La mutation *BRAFV600E* est présente dans 40 à 60% des CCR MSI sporadique et n'est pas retrouvée dans les CCR liés au syndrome de Lynch [Boissière-Michot, Domingo, Roth]. Le fait d'avoir un statut *BRAF* muté exclu donc le syndrome de Lynch. En revanche si *BRAF* n'est pas muté, le CCR peut être sporadique ou héréditaire. Dans ce cas des analyses complémentaires peuvent être réalisées comme la recherche du phénotype hyperméthylateur (CIMP) ou la recherche de méthylation du promoteur du gène *MLH1*. Cependant, ces analyses de méthylations ne sont demandées qu'en seconde intention car (1) toutes les plateformes de biologie moléculaire française ne disposent pas de la technique, (2) cette technique nécessite idéalement des prélèvements frais congelés pour limiter le nombre de faux négatifs (10% environ) sur prélèvements paraffinés [Boissière-Michot, Roth, Tournier]. Ces contraintes limitent donc sa recherche en pratique courante.

L'intérêt de la recherche de mutation *BRAFV600E* pour la prédiction de la réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR est actuellement controversé [Dietel, Garcia-Alfonso, Rowland]. Cependant, plusieurs essais thérapeutiques ciblant cette protéine mutée ou visant spécifiquement les CCR *BRAF* mutés sont en cours [Jones]. La recherche de mutation *BRAF* peut donc être réalisée en vue de l'inclusion de patient en protocoles thérapeutiques. De plus dans les CCR métastatiques, la présence d'une mutation *BRAF* est un facteur indépendant de mauvais pronostic [Chen KH, Shen].

Plusieurs techniques de biologie moléculaire sont disponibles pour déterminer le statut *BRAFV600E*. Récemment, un immunomarquage spécifique de la protéine *BRAFV600E* mutée a été développé. Cet anticorps utilisé en immunohistochimie semble performant pour *screener* le statut *BRAFV600E* dans les CCR [Boissière-Michot, Roth].

Dans le cadre de notre travail nous avons évalué la faisabilité et la performance de cet immunomarquage sur des échantillons de CCR inclus dans des blocs de paraffine multi-tissulaires : les *Tissue MicroArray* (TMA).

Principaux résultats

L'immunomarquage (IHC) anti-BRAFV600E utilisant l'anticorps BRAFV600E clone VE1 a été étudié sur 86 cas d'adénocarcinome coliques dont le profil moléculaire de *BRAF*, *KRAS*, MSI ainsi que les caractéristiques cliniques et pathologiques était connus.

Vingt et un patients (24%) avaient des tumeurs BRAFV600E mutées et 65 avaient des tumeurs BRAF sauvage (76%). L'IHC a classé 22 cas comme positifs, 60 négatifs et 4 ont été considérés comme douteux en raison d'un marquage équivoque. Parmi les cas sans marquage équivoque, 7 cas présentaient un marquage inhomogène avec dans 3 cas une variation importante d'intensité entre les spots avec des zones négatives et positives. Après IHC sur la coupe tissulaire complète des 4 cas équivoques et des 7 cas avec marquage hétérogène un classement définitif a été obtenu pour 8 de ces 11 cas. L'hétérogénéité de marquage persistait dans 1/7 cas et la coloration équivoque dans 2/4 cas.

La comparaison entre l'IHC sur TMA seul et les résultats de PCR en temps réel TaqMan ont montré une concordance parfaite pour tous les cas BRAFV600E négatifs et pour 20/22 cas positifs. La sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 95,2% et 92,3%. Le score kappa entre IHC et PCR en temps réel était de 0,92 (excellent). Les cas faussement positifs présentaient soit une hétérogénéité de marquage tumoral soit un marquage artéfactuel du mucus dans une composante à cellule en bague à chaton. L'IHC utilisant la section entière des cas avec marquage hétérogène ou équivoque a amélioré la sensibilité et la spécificité à 100% et 95,4% respectivement.

L'accord inter-observateur était excellent: score kappa 0,83 [0,81-0,84].

Les CCR BRAF mutés étaient significativement plus fréquent chez la femme, chez des patients plus âgés, dans les cancers de localisation droite. Les adénocarcinomes mutés BRAFV600E présentaient des caractéristiques histologiques distinctes à savoir une moins bonne différenciation, une composante mucineuse ou festonnée plus fréquente et un stroma plus souvent inflammatoire.

Conclusion

L'immunomarquage spécifique de la mutation BRAFV600E peut être utilisé sur TMA dans le cadre de la recherche médicale pour évaluer simultanément et à moindre coût le statut BRAFV600E de nombreux CCR. Pour les cas avec immunomarquage équivoque ou hétérogène d'un spot à l'autre, une confrontation sur coupe tissulaire complète est nécessaire. À l'avenir, des techniques de référence moléculaire telles que le séquençage pourraient être réservées aux cas douteux persistants. Les adénocarcinomes coliques BRAFV600E mutés ont des caractéristiques cliniques et histopathologiques distinctes avec une morphologie festonnée fréquente. La connaissance de ces caractéristiques pathologiques peut aider le pathologiste à sélectionner les CCR pour tester la mutation BRAF.

***BRAF*^{V600E} Gene Mutation in Colonic Adenocarcinomas. Immunohistochemical Detection Using Tissue Microarray and Clinicopathologic Characteristics: An 86 Case Series**

Camille Boulagnon, MD,*† Oriane Dudez, BSc,* Olivia Beaudoux, MD,‡§
Véronique Dalstein, Pharm.D, PhD,§|| Reza Kianmanesh, MD, PhD,¶||
Olivier Bouché, MD, PhD,## and Marie-Danièle Diebold, MD*†

Abstract: The detection of *BRAF*^{V600E} mutation in colorectal cancer has several clinical applications: enabling the discrimination between sporadic and Lynch syndrome-related colorectal carcinoma, and providing warning of a poorer prognosis. Few immunohistochemical studies using whole-tissue tumor section staining have recently been performed on colorectal cancer. The aim of this study was to evaluate the detection of *BRAF*^{V600E} mutation by immunohistochemistry (IHC) on tissue microarray (TMA). IHC was performed with the *BRAF*^{V600E}-specific antibody using TMA on a retrospective series of 86 colonic adenocarcinomas with known *BRAF*^{V600E} status. IHC using *BRAF*^{V600E}-specific antibody allowed to detect 20/21 *BRAF*^{V600E} mutated colonic adenocarcinomas and 60/65 *BRAF* wild-type cases. The staining was equivocal because of equivocal staining in 4 cases and heterogeneity in 3 cases. When compared with TaqMan real-time PCR, the sensitivity and specificity were 95.2% and 92.3%, respectively. Comparison with the whole section immunostaining improved sensitivity to 100% and specificity to 95.4%. Furthermore, in this study we found that *BRAF*^{V600E} mutated colonic adenocarcinoma were significantly more frequent in women, older patients, and right-sided. Moreover, morphologic features significantly associated with *BRAF*^{V600E} mutation were: serrated adenocarcinoma subtype, adenocarcinomas with a mucinous component, high histologic grade, pushing margins, stromal inflammation. *BRAF*^{V600E}-specific antibody can be used on TMA to screen *BRAF*-mutated colorectal carcinomas. Cases with equivocal or heterogenous staining must be compared with whole section staining. Moreover, *BRAF*^{V600E} mutated colonic carcinomas have distinct clinical and histopathologic features.

Key Words: colon cancer, *BRAF*^{V600E} mutation, immunohistochemistry, VE1, tissue microarray

(*Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2016;24:88–96)

B*RAF* gene is commonly mutated in a variety of cancers. The *BRAF* gene codes for the serine/threonine kinase BRAF protein, which is an activator of the mitogen-activated protein kinase pathway. The mitogen-activated protein kinase pathway is a key regulatory pathway for cell growth, proliferation, and apoptosis. More than 95% of *BRAF*-mutated cases carry the V600E point mutation, which results in constitutive tyrosine kinase activity. This mutation is present in approximately 15% of all colorectal carcinomas (CRC) and is closely associated with CpG island methylator phenotype (CIMP-high) and high-level DNA microsatellite instability (MSI-H) phenotype because of *hMLH1* gene silencing by hypermethylation of its promoter.^{1–9} *BRAF* mutations are virtually absent in MSI-H hereditary CRC; on the contrary, the prevalence of *BRAF* mutations is estimated to be significantly higher with a frequency of up to 60% in sporadic MSI-H colorectal cancer.¹⁰ Accordingly, the implementation of *BRAF* mutation analysis in Lynch syndrome diagnosis has been suggested for the exclusion of patients from germline mismatch repair gene mutation analysis.¹¹ CRC with *BRAF* mutation seems to have a peculiar morphology with serrated or mucinous pattern more frequently found than in *BRAF* wild-type CRC. *BRAF* mutation is an early event in the serrated pathway and has been proved to be an independent marker of poor prognosis, whatever the MSI/microsatellite stable (MSS) status.^{12–17}

Several methods have been used to detect *BRAF* mutation in CRC: sequencing, real-time PCR, pyrosequencing, melting curve analysis, TaqMan allelic discrimination... Each method has its own sensitivity, specificity, cost, and turnaround time.^{18,19} Recently, the detection of the V600E mutation with immunohistochemistry (IHC) using the *BRAF*^{V600E} mutation-specific antibody, clone VE1 has been shown to be feasible in different types of cancer including colorectal cancer and precursor lesions.^{18–25} *BRAF*^{V600E} mutation-specific antibody does not cross react with other types of *BRAF*-mutated proteins.^{18,21} Results vary among

Received for publication April 4, 2014; accepted October 2, 2014.

From the *Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Universitaire de Reims; †Laboratoire Pol Bouin, Service de Biologie Moléculaire; ‡Service de Chirurgie Digestive; §Service d'Hépatogastro-Entérologie et Cancérologie Digestive, Centre Hospitalier Universitaire de Reims; †UMR CNRS/URCA N°7369, Faculté de Médecine de Reims; ‡Laboratoire de Biologie Oncologique, Institut Jean Godinot; and §Plateforme de Génétique Moléculaire des Cancers de Champagne Ardenne, Reims, France.

The authors declare no conflict of interest.

Reprints: Camille Boulagnon, MD, Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Avenue du Général Koenig, Reims Cedex 51092, France (e-mail: camille.boulagnon@gmail.com).

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

the 6 recently published studies using VE1 antibody as *BRAF^{V600E}* marker in CRC.^{19–24} In half of them (3/6) the correlation between IHC and molecular techniques was perfect.^{21,22,24} IHC was performed on whole tumoral tissue sections in all but one studies¹⁹ and the immunostaining was mentioned as almost always uniform in all cases.

Therefore, it seemed interesting to test this immunostaining on tissue microarray (TMA) that allows analyses of multiple tumors on the same slide sparing money and time. Thus TMA technology is an interesting tool for retrospective studies requiring screening *BRAF^{V600E}* mutational status in large number of cases.

The aim of our study was to assess the feasibility and performance of *BRAF^{V600E}* mutation diagnosis by IHC on TMA in a retrospective series of sporadic colonic cancers previously genotyped for *BRAF^{V600E}*, *KRAS* mutation, and MSI status.

In parallel, the clinical and pathologic characteristics of *BRAF^{V600E}* mutated tumors were compared with those of *BRAF^{V600E}* wild-type tumors.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Eighty-six colonic adenocarcinoma cases with previously established *BRAF^{V600E}* mutation status diagnosed between 2006 and 2012 were retrieved from the Pathology Department of the Academic Hospital of Reims (France). Determination of the *BRAF^{V600E}* mutation status had been prescribed because either of MSI (with loss of hMLH1 and/or PMS2 immunohistochemical expression), to discriminate sporadic MSI from Lynch syndrome or before introducing anti-EGFR therapy in advanced stages of CRC. Patients with Lynch syndrome CRC were excluded from the current study. All cases underwent surgical treatment in the Digestive Surgery Department of the Academic Hospital of Reims. Clinical data were obtained from the patient records.

Histology

All colonic adenocarcinomas were classified and subtyped according to The World Health Organization (WHO) criteria outlined in 2010¹ and staged according to the International Union Against Cancer 2009 guidelines.²⁶ Histologic tumor differentiation was assessed according to the WHO criteria.¹ All slides were retrieved from the archives of the Department of Pathology of the Academic Hospital of Reims and were reviewed and classified by 2 pathologists (C.B. and M.D.-D.). For each case, 3 to 15 samples were available with a mean of 6 samples per tumor. Different growth patterns were assessed and semi-quantified in all cases including mucinous, serrated, solid, micropapillary, tubulopapillary, cribriform, comedo, and signet-ring cell types. Adenocarcinomas with >50% of mucinous component were classified as mucinous carcinomas and adenocarcinomas with >50% of signet-ring cell component as signet-ring cell type adenocarcinoma according to the WHO criteria. Furthermore, histologic characteristics of serrated adenocarcinomas according to

Tuppurainen et al⁴ were: serrated architecture, abundant eosinophilic cytoplasm, well-preserved nuclear polarity, discernible nuclei with nuclear envelope condensation, and necrosis <10% were also searched. Adenocarcinomas showing these architectural and cytologic characteristics even focal (≥10%), were classified as serrated adenocarcinoma. Adenocarcinomas without specific subtype pattern were classified as Not Otherwise Specified. The inflammatory component of the stroma was qualitatively evaluated. The type of tumor margins: pushing or infiltrative and the presence and histologic type of polyp remnants adjacent to the carcinoma were also assessed.

TMA Construction

For each tumor a total of 6 cores of 2 mm of diameter were obtained from the same original paraffin-embedded tumor block. Three cores were punched in the center part and 3 cores at the invasive front of the tumor to investigate whether there was a staining change depending on punch localization. Then, the cores were precisely arrayed into a recipient paraffin block using Tissue Arrayer MiniCore 3 (Excilone, Elancourt, France). The cores were spaced 3 mm apart and in each recipient TMA block 56 cores were inserted: 6 cores of 9 distinct mutated cases, 1 negative control and 1 positive control.

IHC

IHC was performed on 4-μm-thick TMA sections using: anti-*BRAF^{V600E}* (mouse monoclonal, clone VE1, 1:50; Abcys Eurobio, Courtaboeuf, France) following the manufacturer instruction; anti-hMLH1 (clone G168-15, 1:25; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ); anti-hMSH2 (clone FE11, 1:100; Invitrogen, Paisley, UK); anti-hMSH6 (clone 44, 1:250; BD Biosciences); and anti-PMS2 (clone EPR3647, RTU; Ventana Medical System, Tucson, AZ) antibodies.

Immunostaining was performed with the BenchMark XT automated slide stainer (Ventana Medical System). For VE1 immunolabelling, after deparaffinization, the TMA section was incubated with the Cell Conditioner 1 (EDTA, pH 8.4) for 64 minutes, followed by preprimary peroxidase inhibition and incubation with 1:50 diluted VE1 antibody at 37°C for 32 minutes. Then, the staining reaction was performed by using the ultraView Universal DAB v3 Kit. The counterstain and postcounterstain comprised hematoxylin and bluing reagent.

Three observers (C.B., M.-D.D., O.D.) from the same laboratory evaluated the immunostaining. The first observer (C.B.) was considered to be trained for VE1 interpretation, the second observer (M.-D.D.) is an expert in digestive pathology but was not trained for VE1 interpretation, and the third observer was a pathology resident who was a beginner in IHC interpretation. At the time of the immunostaining interpretation, the pathologists were blinded to other pathologists' diagnoses and molecular biology results. For each tumor, results corresponded to the global analysis of all available cores. Staining was scored as positive, negative, equivocal, or

not available as previously described.²⁷ Immunostaining of adenocarcinoma cells was considered:

- Positive when the staining was cytoplasmic, diffuse with moderate to intense staining;
- Negative when there was no or faint cytoplasmic staining;
- Equivocal when the staining was weak or intermediate or heterogeneous positive and negative areas in the same core or across the cores;
- Not available in cases of absence of tumoral cell in the TMA core (Fig. 1).

In case of discrepancy between VE1 immunostaining and TaqMan results the immunostaining was performed a second time on the TMA and on the whole tumoral tissue section of the formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) donor block. *BRAF*^{V600E} TaqMan real-time PCR was also performed a second time. When discrepancy persisted with a VE1+/*BRAF* wild-type situation, the *BRAF* gene was analyzed by Sanger sequencing.

Molecular Analysis

Tumor DNA was extracted from FFPE tissues after macrodissection of the highest adenocarcinomatous cell density areas. Each sample analyzed contained at least 30% of tumor cells. DNA was extracted on Maxwell 16 Instruments automaton with Maxwell 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit (all products from Promega Corporation, Madison, WI).

BRAF^{V600E} mutation detection was assessed by allelic discrimination using TaqMan probes as previously described.²⁸ In brief, real-time PCR was performed in a final reaction volume of 20 μ L containing 10 μ L of TaqMan Universal PCR Master Mix, 4.5 μ L of nuclease-free water, 500 nmol/L primer and probe mix, and 5 μ L of DNA solution. PCR was performed in MicroAmp optical 96-well plates with optical adhesive covers. Amplification and detection were performed with an ABI prism 7500 sequence detection system (all products from Applied

Biosystems, Foster City, CA) using the following thermocycling conditions: 95°C/10 minutes and then (92°C/15 s, 60°C/1 min) for 40 cycles and analyzed with the 7500 version 2.0.1 software program.

KRAS gene mutation on codons 12 and 13 was searched by pyrosequencing analysis using the Pyromark Q96 kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) as previously described.²⁹

The MSI status was determined by multiplex PCR analysis of 5 mononucleotide markers (BAT25, BAT26, MONO27, NR21, NR24) and 2 pentanucleotide markers (PentaC and Penta D) using the MSI Analysis System kit, version 1.2 (Promega Corporation) as previously described.³⁰

Statistical Analysis

Interobserver agreement was evaluated by the κ statistics. The sensitivity was calculated as true positives/(true positive + false negative) and the specificity as true negatives/(true negative + false positive). Age was compared between groups using the Mann-Whitney/Wilcoxon test. Categorical variables were compared by Fisher exact test. *P* values <0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Epi Info statistical software version 3.5.4 (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA).

RESULTS

Immunostaining With VE1 *BRAF*^{V600E} Mutation Specific Antibody on TMA Results

Among the 516 adenocarcinoma cores, 468 (91%) were available for IHC interpretation and at least 3 TMA cores available for IHC interpretation in all the cases. The median duration of FFPE block storage was 4 years (1 to 7y).

Twenty-two cases were considered positive, 60 negative and 4 were considered equivocal because of equivocal staining. The immunostaining pattern: negative,

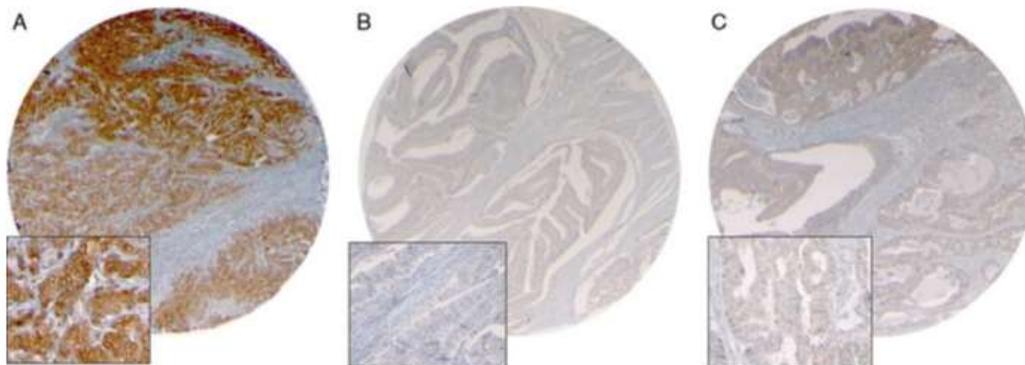


FIGURE 1. Different intensities and patterns of staining with BRAF mutation-specific VE1 antibody and scale of IHC interpretation (insets: $\times 2.5$ and $\times 20$): (A), unequivocal positive staining; (B) weak staining, considered negative; (C) intermediate equivocal staining, considered equivocal.

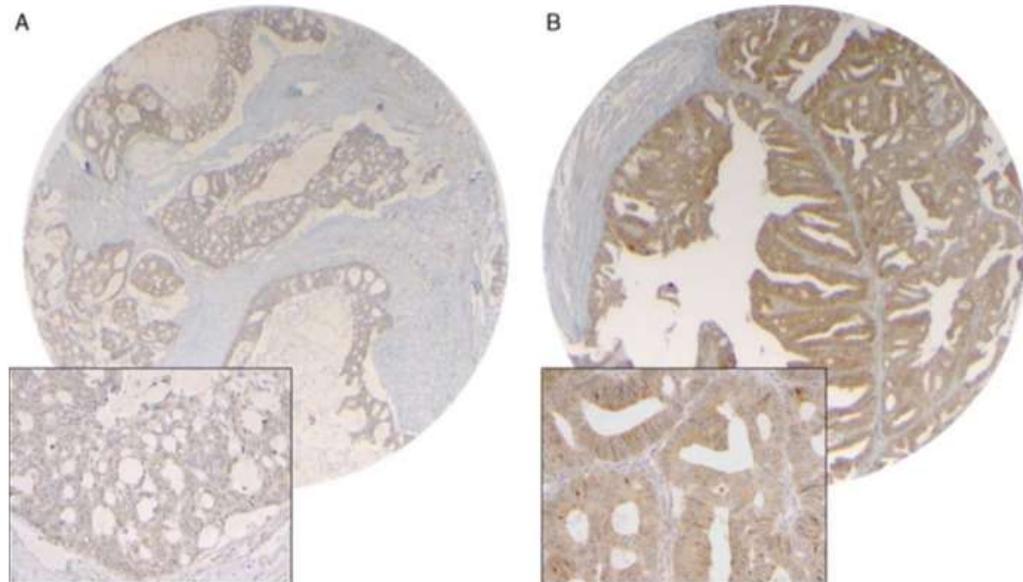


FIGURE 2. Example of heterogeneous staining across cores of the same tumor block (case #24), magnification: $\times 2.5$ and $\times 20$ insets: (A) faint staining in a cribriform area of the tumor, scored negative. B, Moderate staining in a tubulopapillary area of the same tumor, considered positive.

equivocal, or positive was diffuse and homogeneous in 79 cases. In the 7 heterogeneous cases 3 had significant staining intensity variation across cores from the same tumor block with negative and positive areas (Fig. 2). Two of these 3 cases were considered positive because positive areas predominated (4/6 cores in each case). The third case was considered negative because of the predominance of negativity (5/6 cores). In these cases, the staining pattern remained unchanged after multiple runs of IHC on TMA and donor blocks. In the 4 remaining heterogeneous cases a slightly lower intensity was observed on invasion front cores, which was ignored.

Nonspecific immunolabeling of adenocarcinoma cell nuclei or stromal cells was observed in 4 and 11 cases, respectively.

The 4 equivocal and 3 heterogeneous cases were compared with the whole tumoral tissue section immunostaining. After comparison, 3 cases remained doubtful because of a persistent heterogeneity in one of the 3 heterogeneous cases and because of persistent equivocal staining in 2 of the 4 equivocal cases. The persistent heterogeneous case was a mucinous adenocarcinoma. In this case, heterogeneity was partly related to a specific intracellular mucin immunolabelling. The median duration of storage of these equivocal case corresponding blocks was not different from the others. There was no difference of staining intensity levels between the TMA blocks. The heterogeneous or weak stained cases were distributed into different TMA blocks (Table 1).

The interobserver agreement was excellent: κ score 0.83 (0.81 to 0.84). The between observer discrepancies were due to equivocal cases that were more frequent for the 2 untrained observers. There was no positive/negative discrepancy.

Comparison of IHC and TaqMan Results

Comparison between IHC using TMA only and TaqMan real-time PCR results showed a perfect concordance for all VE1-negative and for 20/22 VE1-positive cases. The sensitivity and specificity were 95.2% and 92.3%, respectively. The κ score between IHC and TaqMan real-time PCR was 0.92 (excellent). The IHC TMA slide of the IHC+/TaqMan- cases were assessed a second time to understand discrepant results. These 2 cases were first considered positive despite significant staining heterogeneity because the vast majority of tumoral cells (> 80%) showed an unequivocal moderate staining. IHC on whole section was considered negative in one of these 2 cases and equivocal because of important staining heterogeneity in the second case.

Comparison between IHC using the whole section and TaqMan real-time PCR results improved the sensitivity and specificity to 100% and 95.4%, respectively. It has to be mentioned that all persistent equivocal cases corresponded to *BRAF* wild-type tumors.

Molecular results of the equivocal cases remained unchanged after the second TaqMan PCR analysis and *BRAF* gene sequencing.

TABLE 1. Details of BRAF^{V600E} Immunohistochemistry Staining Pattern in the Heterogeneous and Equivocal Cases

Cases	TMA	Years of Blocks Storage	IHC TMA Score	TMA IHC Pattern	IHC Whole Section Score	TaqMan Real-Time PCR	Sequencing
3	3	7	Negative	Heterogeneous faint staining	Negative	wt	
22	14	5	Positive	Heterogeneous moderate staining	Negative	wt	
24	8	5	Positive	Heterogeneous moderate staining	Doubtful (heterogenous)	wt	wt
45	10	4	Doubtful	Equivocal staining	Negative	wt	
55	2	3	Doubtful	Equivocal staining	Positive	V600E	
64	9	2	Doubtful	Equivocal staining	Doubtful (equivocal)	wt	wt
86	8	1	Doubtful	Equivocal staining	Doubtful (equivocal)	wt	wt

IHC indicates immunohistochemistry; TMA, tissue microarray; wt, wild-type.

Detailed results of the equivocal IHC cases are given in Table 1 and IHC/molecular results are given in Table 2.

Patient and Pathologic Characteristics

The 86 cases involved 47 men and 39 women with a mean age of 69 years (43 to 92 y). The tumor localization was proximal in 47 cases and distal in 39 cases.

Patient Characteristics and BRAF^{V600E} Mutation

Twenty-one patients (24%) had BRAF^{V600E} mutant tumors and 65 had BRAF wild-type tumors (76%). Fourteen of the 21 BRAF^{V600E} mutated cancers occurred in female patients. The proportion of female patient in this group was significantly higher than in the BRAF wild-type group (14/21, 68% vs. 25/65, 38%; $P = 0.02$).

Patients with BRAF^{V600E} mutated cancer were older than patients with BRAF wild-type tumor (mean age 75 vs. 67 y, $P = 0.005$).

Clinical follow-up was available in 74/86 patients. Advanced stages and metastases emergence during follow-up were more frequent in the BRAF^{V600E} wild-type group. Detailed clinicopathologic characteristics are summarized in Table 3.

Tumor Characteristics and BRAF^{V600E} Mutation

Colonic adenocarcinoma was more frequently right-sided in the BRAF^{V600E} mutated group (19/21 vs. 28/65; $P < 0.001$) and more frequently left-sided in the BRAF wild-type group (37/65 vs. 3/21).

Most of the tumors (50 cases) corresponded to well to moderately differentiated Not Otherwise Specified adenocarcinomas that were BRAF^{V600E} mutated in 4 cases

(3 MSS/1 MSI-H) and BRAF^{V600E} wild-type in the 46 remaining cases (34 KRAS mutated/MSS and 12 KRAS wild-type/MSS).

Among the histologic subtypes of adenocarcinomas 11 cases corresponded to serrated adenocarcinomas, 11 cases were mucinous carcinomas, 2 were comedo-type adenocarcinomas and 1 was a signet-ring cell adenocarcinoma.

BRAF^{V600E} mutated adenocarcinomas showed distinct histologic characteristics (Fig. 3).

The serrated adenocarcinoma subtype was significantly more frequent in the BRAF^{V600E} mutated group ($P = 0.02$). It has to be underlined that the serrated pattern was always focal.

BRAF^{V600E}-mutated adenocarcinomas were more frequently poorly differentiated ($P = 0.01$). A mucinous component (< 50% of tumor surface) was most frequently encountered in BRAF^{V600E} mutated adenocarcinomas but mucinous adenocarcinoma was not significantly more frequent in BRAF^{V600E} mutated group.

The signet-ring cell type and the 2 comedo-type adenocarcinomas were MSS/BRAF wild-type.

Stromal inflammation was more frequently encountered ($P = 0.01$) in BRAF^{V600E} mutated adenocarcinomas. The inflammatory infiltrate was most often rich in neutrophils. A predominant lymphocytic infiltrate was observed in 3 BRAF^{V600E} mutated adenocarcinomas.

Molecular Characteristics and BRAF^{V600E} Mutation Status

In the BRAF^{V600E} mutated group ($n = 21$):

- 16 cases (76%) were MSI-H with IHC loss of MLH1 and PMS2 expression and
- 5 were MSS.

TABLE 2. Comparison of BRAF^{V600E} Immunohistochemistry Using TMA and Whole Tissue Section and BRAF^{V600E} TaqMan PCR Results

	TMA +	TMA -	TMA Doubtful	WhS +	WhS -	WhS Doubtful
BRAF ^{V600E} mutated ($n = 21$)	20	0	1	21	0	0
BRAF ^{V600E} wild-type ($n = 65$)	2	60	3	0	62	3
	<i>heterogenous</i>		Equivocal			2 equivocal/1 heterogenous

TMA indicates tissue microarray; WhS, whole section.

TABLE 3. Comparison of Clinicopathologic, Histologic, and Molecular Features Between *BRAF^{V600E}* Wild-Type and Mutated Colonic Adenocarcinomas

	<i>BRAF</i> wt (n = 65)	<i>BRAF^{V600E}</i> (n = 21)	P
Sex (M/F)	40/25	7/14	0.02*
Mean age at cancer diagnosis (y)	67 (43-92)	75 (60-86)	0.005†
Tumor location (right/left)	28/37	19/3	< 0.001*
Stage			
I	3	2	0.008†
II	16	9	
III	19	8	
IV	27	2	
Vascular invasion	35	10	NS*
Perineural invasion	28	9	NS*
Metastasis emergence during follow-up	34 (57 available)	4 (17 available)	0.009*
Histologic grade (low/high)	53/12	11/10	0.01*
Mucinous adenocarcinoma	7	4	NS*
Serrated adenocarcinoma	5	6	0.02*
Remnants polyps			
Conventional adenoma	20	5	NS*
Serrated adenoma	4	0	
Tumor margin (pushing/infiltrative)	27/38	14/7	0.008*
Stromal inflammation > 10% of tumor surface	15	11	0.01*
Necrosis > 10% of tumor surface	7	5	NS*
Mucinous component > 10% of tumor surface	22	14	0.008*
IHC loss of PMS2 and MLH1 expression	4	16	< 0.001*
MSI-H	4	16	< 0.001*
KRAS mutated	44	0	< 0.001*

*Fisher exact test.

†Mann-Whitney test.

NS indicates not significant ($P > 0.05$).

In the *BRAF^{V600E}* wild-type group (n = 65):

- 43 cases (66%) were MSS/*KRAS* mutated;
- 18 (28%) were MSS/*KRAS* wild-type;
- 1 was MSI-H with IHC loss of MLH1 and PMS2 expression/*KRAS* mutated; and
- 3 were MSI-H with IHC loss of MLH1 and PMS2 expression/*KRAS* wild-type.

The proportion of MSI-H tumors in the *BRAF^{V600E}* mutated group was significantly higher than in the *BRAF* wild-type group ($P < 0.001$)

DISCUSSION

Detection of *BRAF^{V600E}* mutation in CRC using VE1 IHC has been recently reported in 6 studies.¹⁹⁻²⁴ Different reagents, immunostaining protocols, and scoring systems were used. IHC was performed on whole tumoral sections in all but one of these studies. In our study using TMA, IHC was equivocal because of weak staining in 4 cases. Comparison with the whole section immunostaining allowed to restore 2 of these 4 uninterpretable cases. The 2 remaining equivocal cases were found to be *BRAF^{V600E}* wild-type with TaqMan allelic discrimination and Sanger sequencing techniques.

No weak staining was observed in the studies using the mouse monoclonal hybridoma supernatant.^{20,21} In contrast, a weak staining was noticed in 3 of the 4 studies using the purified commercially available mouse monoclonal antibody (19/264, 12/52, and 2/14 cases, respectively) and was responsible of 3 false-negative cases in the second one.^{19,23,24}

In our study a staining heterogeneity across cores was significant in 3 cases only making their classification difficult and leading to false-positive IHC results in 2 cases. These 2 false-positive cases had 4/6 cores positivity. In other words, in these case only 60% of tumoral surface were stained with zonal distribution. This staining pattern persisted on whole section in only 1 case which showed a specific mucin staining (goblet cell). In the 6 previous studies the immunostaining was considered homogeneous in almost all cases. Capper et al²⁰ observed a loss of staining in electrocoagulated, necrotic, and preneoplastic areas of *BRAF^{V600E}* mutated CRC. In the study using TMA, no heterogeneity across 2 cores was reported.¹⁹ Two signet-ring cell adenocarcinomas among 68 CRC cases showed heterogenous positive pattern due to a specific mucin staining. These cases were considered negative. A slight unexplained heterogeneity was reported in 2 other studies in 11/49 and 4/14 positive cases, respectively,^{22,24} and in one of them a proportion of at least 70% of nonequivocal staining of tumoral cells was considered positive.²² Thus, if the 70% staining positivity cut-off had been applied in our series, no false-positive case would have been found. However, this cut-off of positivity may generate false negativity or positivity by using TMA techniques or small biopsies samples because sampling could select the negative or weak stained areas.

In our study 6 cores were used: 3 in the center part of the tumor and 3 at the invasive front. There was only a slight staining difference between center part and invasive

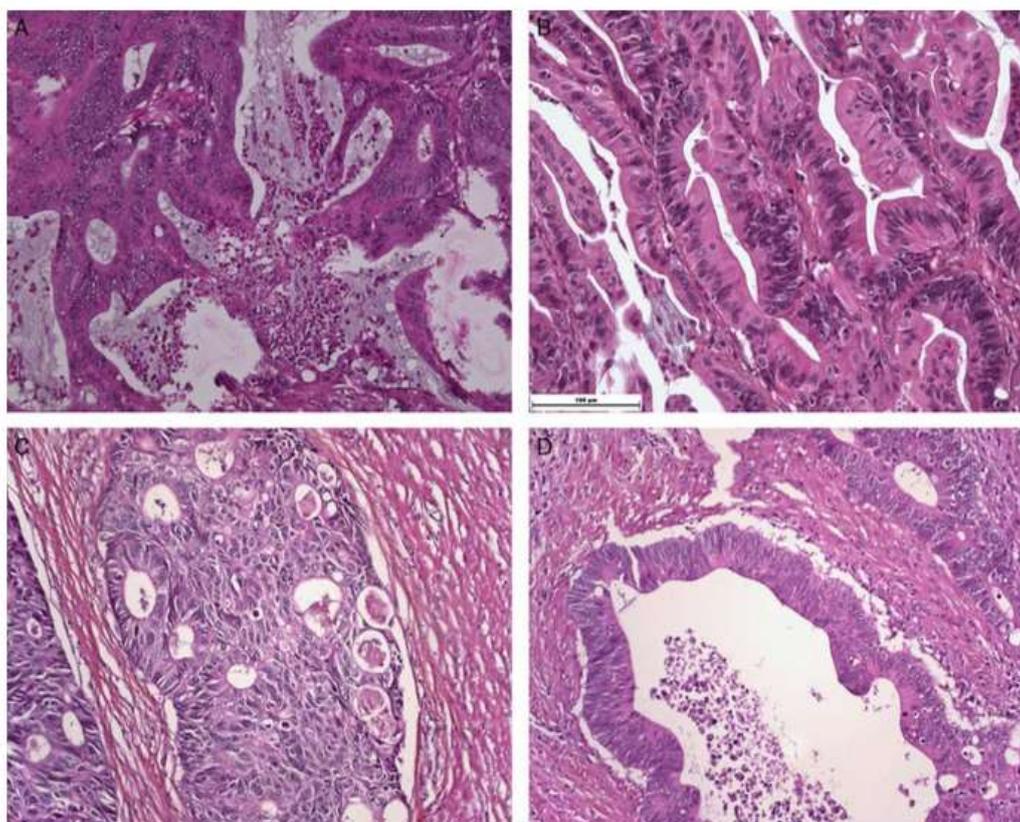


FIGURE 3. Morphologic characteristics of colonic adenocarcinomas according to $BRAF^{V600E}$ mutation status. A and B, Two cases of $BRAF^{V600E}$ -mutated adenocarcinoma classified as serrated adenocarcinomas, HPS stain (A: $\times 10$, B: $\times 40$). C and D, Two cases of $BRAF^{V600E}$ wild-type adenocarcinomas, HPS stain, magnification: $\times 20$. C, Cribriform pattern; (D) tubulous pattern with loss of nuclear polarity in both cases.

front of the tumor which did not change results. Heterogeneity across cores was problematic in only 2 cases among 86 (2.3%). Sensitivity and specificity results would not have changed if only replicates had been used. Thus in retrospective studies using BRAF VE1 antibody, < 6 cores may be sampled. A comprehensive study determined that for most studies at least 4 TMA cores are recommended.³¹

In our study when IHC using TMA results was compared with TaqMan real-time PCR, the κ score was 0.92 (excellent), and the rates of sensitivity and specificity were 95.2% and 92.3%, respectively. Comparison of the 4 equivocal and 3 heterogeneous cases with immunostaining on the whole section improved IHC/TaqMan concordance allowed to correct IHC results in 4/7 cases. Thus, sensitivity and specificity reached 100% and 95.4%, respectively. In 3 of the 6 previous studies, sensitivity and specificity were perfect.^{21,22,24} One study found only 1 discrepant result VE1+/ $BRAF$ wild-type of 91 cases.²⁰

Numerous weak-stained cases were responsible of poor sensitivity and specificity (71% and 74%, respectively) but the specificity increased to 100% if weak staining cases were considered negative in one other study.²⁵ Likewise in our study, if equivocal and heterogeneous TMA cases had been considered negative a perfect concordance between immunostaining in 2 steps and molecular biology could have been obtained.

$BRAF^{V600E}$ mutation detection by IHC using VE1 antibody was studied on TMA in other types of tumor. Applied to melanomas, 1 study of VE1 IHC using TMA technique with 3 punched cores noticed 7.2% of equivocal staining, leading to exclusion of these cases and allowing a perfect concordance between IHC and molecular techniques.¹⁸ Another study of the same group, reported 1 equivocal and 1 heterogeneous staining case of 67 cases.²⁷ The heterogeneous case was $BRAF^{V600E}$ mutated and showed in and among cores staining heterogeneity. In 1 study of VE1 IHC using TMA technique on serious

ovarian tumors with 6 punched cores the immunostaining was homogeneous across the different cores of the same case, but 3 of the 23 BRAF^{V600E} mutated cases had an in-core heterogeneous staining pattern.³² The reason of such heterogeneity was unknown.

In our study, the interobserver agreement was excellent with a κ score of 0.83. Discrepancies were due to equivocal cases more frequent for the 2 untrained observers. There was no positive/negative discrepancy. In 2 of the previously mentioned studies of VE1 immunostaining in CRC 2 to 3 observers analyzed the immunostaining with perfect interobserver concordance.^{20,24} The experience of VE1 immunostaining interpretation of the observers was not precised. One study of VE1 IHC using TMA technique performed on melanomas compared IHC results between 7 different observers from 3 different countries with different training experiences of VE1 immunostaining interpretation. The interobserver agreement was excellent with a κ score of 0.81.²⁷ Once again, discrepancies were due to the highest proportion of equivocal cases ranked by the pathologists untrained to VE1 immunolabelling interpretation.

The exact place of BRAF^{V600E} mutation detection by IHC in CRC is currently not defined. Given the fast turnaround time and lower cost, Colomba et al¹⁸ encouraged the use of IHC as the initial method for BRAF^{V600E} mutation screening in melanoma with molecular techniques reserved for cases with uninterpretable or negative IHC findings. IHC provides a good option for detecting mutational status in cases not amenable to molecular testing because of a too low quantity or proportion of tumor cells.^{19,21,24} The limit of IHC is the detection of the V600E mutation exclusively.^{18,20,21} However, the other types of BRAF mutation are rare in CRC.²¹

In our study, BRAF^{V600E} mutated colonic adenocarcinomas had peculiar clinicopathologic characteristics. BRAF^{V600E} mutation was significantly more frequent in women, in older patients, and tumors were more often localized in the right colon ($P < 0.05$) as observed in previous studies using either molecular test or VE1 antibody IHC.^{4-6,20,21}

Morphologic features associated with BRAF^{V600E} mutation were: serrated adenocarcinoma subtype, presence of a mucinous component > 10% of tumor surface, high histologic grade, pushing margins, and stromal inflammation ($P < 0.05$). This associated BRAF^{V600E} mutation morphologic characteristics had been highlighted in previous studies.^{4-6,20,23}

A recent experimental study in mice showed the key role of BRAF^{V600E} mutation in serrated pathway to CRC. All mice with overexpression of the V637 mutant BRAF protein, ortholog of the human V600E mutant BRAF protein developed intestinal and colonic dysplasia with a pattern resembling the neoplastic serrated lesion architecture in all mice which progressed to invasive carcinoma in 12% of cases.⁹

In conclusion, BRAF^{V600E} mutation-specific antibody VE1 can be used on TMA in retrospective series to screen BRAF-mutated CRC with a minimum of 4 cores for an optimal sensitivity and specificity. In our study unequivocal positive or negative stainings correlated

almost perfectly to BRAF^{V600E} molecular status. Cases with equivocal or heterogeneous staining benefited from comparison with the whole section immunolabeling, which improved sensitivity and specificity. In the future, molecular reference techniques, such as sequencing, should be reserved for the persisting equivocal cases.

REFERENCES

- Bae JM, Kim JM, Kim JH, et al. Differential clinicopathological features in microsatellite instability-positive colorectal cancers depending on CIMP status. *Virchows Arch*. 2011;459:55-63.
- Arends MJ. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013;21:97-102.
- Mäkinen MJ, George SM, Jernvall P, et al. Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma—prevalence, histological features, and prognosis. *J Pathol*. 2001;193:286-294.
- Tuppurainen K, Mäkinen JM, Junttila O, et al. Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non-serrated colorectal cancer. *J Pathol*. 2005;207:285-294.
- Mäkinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2007;50:131-150.
- Stefanius K, Ylitalo L, Tuomisto A, et al. Frequent mutations of KRAS in addition to BRAF in colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2011;58:679-692.
- García-Solano J, Conesa-Zamora P, Carbonell P, et al. Microsatellite pathologic score does not efficiently identify high microsatellite instability in colorectal serrated adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2013;44:759-765.
- Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular feature. *Histopathology*. 2007; 50:113-130.
- Rad R, Cadiñanos J, Rad L, et al. A genetic progression model of BRAF(V600E)-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention. *Cancer Cell*. 2013;24:15-29.
- Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, et al. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet*. 2012;49:151-157.
- Loughrey MB, Waring PM, Tan A, et al. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Fam Cancer*. 2007;6: 301-310.
- Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:5924-5930.
- Pakneshan S, Salajegheh A, Smith RA, et al. Clinicopathological relevance of BRAF mutations in human cancer. *Pathology*. 2013;45: 346-356.
- Phipps AI, Buchanan DD, Makar KW, et al. KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers. *Br J Cancer*. 2013;108:1757-1764.
- Eklöf V, Wikberg ML, Edin S, et al. The prognostic role of KRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2013;108:2153-2163.
- Xu Q, Xu AT, Zhu MM, et al. Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in patients with metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: a meta-analysis. *J Dig Dis*. 2013;14:409-416.
- Tran B, Kopetz S, Tie J, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2011;117: 4623-4632.
- Colomba E, Hélias-Rodzewicz Z, Von Deimling A, et al. Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing. *J Mol Diagn*. 2013;15:94-100.

19. Rössle M, Sigg M, Rüschoff JH, et al. Ultra-deep sequencing confirms immunohistochemistry as a highly sensitive and specific method for detecting BRAFV600E mutations in colorectal carcinoma. *Virchows Arch*. 2013;463:623–631.
20. Capper D, Voigt A, Bozukova G, et al. BRAF V600E-specific immunohistochemistry for the exclusion of Lynch syndrome in MSI-H colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2013;133:1624–1630.
21. Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch*. 2013;463:613–621.
22. Sinicrope FA, Smyrk TC, Tougeron D, et al. Mutation-specific antibody detects mutant BRAFV600E protein expression in human colon carcinomas. *Cancer*. 2013;119:2765–2770.
23. Adackapara CA, Sholl LM, Barletta JA, et al. Immunohistochemistry using the BRAF V600E mutation-specific monoclonal antibody VE1 is not a useful surrogate for genotyping in colorectal adenocarcinoma. *Histopathology*. 2013;63:187–193.
24. Affolter K, Samowitz W, Tripp S, et al. BRAF V600E mutation detection by immunohistochemistry in colorectal carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52:748–752.
25. Mesteri I, Bayer G, Meyer J, et al. Improved molecular classification of serrated lesions of the colon by immunohistochemical detection of BRAF V600E. *Mod Pathol*. 2014;27:135–144.
26. Dir, Sobin L, Gospodarowicz M, Chichester Wittekind C. Colon and Rectum. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7th edition. West Sussex: Blackwell Publishing Ltd; 2010:100–105.
27. Marin C, Beauchet A, Capper D, et al. Detection of BRAF p.V600E mutations in melanoma by immunohistochemistry has a good interobserver reproducibility. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138:71–75.
28. Benlloch S, Paya A, Alenda C, et al. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *J Mol Diagn*. 2006;8:540–543.
29. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn*. 2009;7:413–421.
30. Bacher JW, Flanagan LA, Smalley RL, et al. Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors. *Dis Markers*. 2004;20:237–250.
31. Goethals L, Perneel C, Debucquoy A, et al. A new approach to the validation of tissue microarrays. *J Pathol*. 2006;208:607–614.
32. Bösmüller H, Fischer A, Pham DL, et al. Detection of the BRAF V600E mutation in serous ovarian tumors: a comparative analysis of immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody and allele-specific PCR. *Hum Pathol*. 2013;44:329–335.

Manuscrit 2

Biobanking of Fresh-Frozen Human Adenocarcinomatous and Normal Côlon Tissues: Which Parameters Influence RNA Quality?

Galissier T, Schneider C, Nasri S, Kanagaratnam L, Fichel C, Coquelet C, Diebold MD, Kianmanesh R, Bellon G, Dedieu S, Marchal Bressenot A, **Boulagnon-Rombi C.**

PLoS One. 2016;11(4):e0154326.

Contexte scientifique

En dépit des progrès dans le dépistage, le diagnostic et le traitement, le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer en terme de fréquence et le quatrième cancer le plus mortel [Bosman 2014, Globocan 2012]. Actuellement, la classification TNM est la seule classification utilisée pour décider du traitement des patients et évaluer ces traitements dans des groupes de patients homogènes. Cependant, cette classification est très mauvaise pour la prédiction pronostique des patients avec un CCR de stade intermédiaire (II et III) [Cancer.org, SEER]. D'autres indicateurs pronostiques sont donc nécessaires pour guider le traitement de façon optimale. Parmi les altérations moléculaires décrites dans les CCR, l'instabilité des microsatellites (MSI) est le seul marqueur moléculaire pronostique qui est utilisé pour moduler la décision thérapeutique [TNCD1].

Les analyses d'expression génique différentielle entre la tumeur et le tissu normal ont contribué à une meilleure compréhension de l'interaction entre les gènes surexprimés ou sous-exprimés et les voies affectées dans la cancérogenèse colorectale. Ces analyses ont abouti à une foule de données d'expression d'ARN accessibles à tous sur des plateformes publiques utilisées pour identifier des signatures d'expression génique prédictives d'une réponse aux traitements ou d'un meilleur/moins bon pronostic ou d'un risque accru de récurrence [Dalerba]. Pour ces études utilisant l'ARN extrait des tissus frais congelés, il est important que l'ARN soit d'excellente qualité afin de ne pas fausser les résultats. En effet, l'ARN est rapidement dégradé dans les tissus. L'utilisation d'un ARN dégradé conduit à des résultats de quantification incorrects et peu reproductibles [Simeon-Dubach]. La qualité de l'ARN peut être évaluée par des indicateurs d'intégrité de l'ARN tels que l'index de qualité de l'ARN (RQI) [Denisov]. Ces indicateurs de qualité permettent une meilleure sélection des échantillons tissulaires pour les analyses d'expression génique. L'identification des paramètres qui pourraient influencer la qualité de l'ARN semble essentielle pour améliorer les procédures garantissant la meilleure qualité d'ARN de ces biospecimens.

Dans les cancers colorectaux, peu d'études ont évaluées la qualité de l'ARN des échantillons tissulaires sains et tumoraux. De plus, les paramètres qui pourraient influencer la qualité des ARN des tissus coliques ne sont pas connus. L'objectif de cette étude était de rechercher parmi les facteurs cliniques, histopathologiques et moléculaires ceux qui pourraient influencer la qualité de l'ARN des tissus de coliques sains et adénocarcinomateux appariés.

Principaux résultats

Le RQI a été évalué sur 241 échantillons frais congelés d'adénocarcinomes coliques et 115 muqueuses coliques saines appariées issus de notre Tumorothèque.

La qualité de l'ARN évaluée par le RQI était significativement meilleure dans les tissus adénocarcinomateux comparées aux tissus sains.

Dans les tissus coliques sains, parmi les paramètres étudiés : âge, sexe, site anatomique, type de chirurgie, approche chirurgicale, durée de l'ischémie froide, poids de l'échantillon, durée de stockage, aucun n'avait d'influence sur la qualité de l'ARN. L'examen histologique a confirmé que tous les échantillons étaient de la muqueuse colique normale sans contamination par du tissu adénocarcinomateux.

Dans les tissus adénocarcinomateux, la qualité de l'ARN était significativement meilleure dans les adénocarcinomes du côlon gauche que dans les adénocarcinomes du côlon droit, en cas de chirurgie ouverte par rapport à la chirurgie laparoscopique et en l'absence de survenue de complication post-opératoire comme un lâchage anatomique. De plus, les échantillons avec un ratio cellules malignes / cellules stromales élevé avaient des ARN de meilleure qualité, quelle que soit le type de cellules stromales. Les autres paramètres étudiés, notamment la durée d'ischémie froide, ainsi que l'expression immunohistochimique de marqueurs d'ischémie (HIF-1 α) ou d'apoptose (caspase 3 clivée), n'avaient pas d'influence sur la qualité de l'ARN des échantillons d'adénocarcinomes coliques.

Le contrôle histologique a révélé que 4 échantillons (1,7%) n'étaient pas adénocarcinomateux mais correspondaient à des reliquats adénomateux et que 15 échantillons (6,2%) étaient presque entièrement contaminés par du tissu sain. Ainsi, 7,9% des échantillons n'étaient pas appropriés pour les analyses moléculaires en raison d'un défaut d'échantillonnage. Si l'on se conforme aux critères exigés par The Cancer Genome Atlas (TCGA) (>60% des cellules malignes et >20% de nécrose), dans notre cohorte, seulement 59/241 cas (24,4%) pouvaient être considérés comme histologiquement appropriés pour les analyses moléculaires [TCGA].

Nous avons ensuite validé la capacité du RQI à évaluer la qualité de l'ARNm en confrontant les résultats de RQI avec le ratio 5'/3' de l'ARNm. Nous avons de plus confirmé que la qualité de l'ARN influençait les résultats de PCR quantitative des gènes de ménages qui permettent la normalisation des résultats d'expression génique. De ce fait la qualité de l'ARN influence les résultats de quantification d'expression génique.

Conclusion

La qualité de l'ARN des adénocarcinomes coliques semble être influencée par certains paramètres cliniques et chirurgicaux, contrairement aux tissus coliques normaux sans que l'on puisse en expliquer la raison. Ces paramètres ne sont pas contrôlables par les pathologistes qui prélèvent les échantillons destinés aux biobanques.

Le contrôle microscopique des échantillons tumoraux avant analyse moléculaire est indispensable afin, d'une part de s'assurer que le tissu analysé est bien tumoral, et d'autre part qu'il contient suffisamment de cellules tumorale pour réellement refléter l'expression génique des cellules tumorales.

RESEARCH ARTICLE

Biobanking of Fresh-Frozen Human Adenocarcinomatous and Normal Colon Tissues: Which Parameters Influence RNA Quality?

Thibaut Galissier¹, Christophe Schneider^{2,3}, Saviz Nasri⁴, Lukshe Kanagaratnam⁵, Caroline Fichel⁶, Christelle Coquelet⁴, Marie-Danièle Diebold^{1,2,4,6}, Reza Kianmanesh⁷, Georges Bellon^{2,8}, Stéphane Dedieu^{2,3}, Aude Marchal Bressenot^{1,6}, Camille Boulagnon-Rombi^{1,2,6*}



CrossMark
click for updates

1 Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Universitaire, Reims, France, **2** CNRS UMR 7369, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, MEDyC, Reims, France, **3** Laboratoire SiRMA, Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Reims, France, **4** Tumorothèque de Champagne Ardenne, Reims, France, **5** Unité d'Aide Méthodologique, Centre Hospitalier Universitaire, Reims, France, **6** Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR Médecine, Reims, France, **7** Service de Chirurgie Digestive, Centre Hospitalier Universitaire, Reims, France, **8** Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire, Reims, France

* camille.boulagnon@gmail.com

OPEN ACCESS

Citation: Galissier T, Schneider C, Nasri S, Kanagaratnam L, Fichel C, Coquelet C, et al. (2016) Biobanking of Fresh-Frozen Human Adenocarcinomatous and Normal Colon Tissues: Which Parameters Influence RNA Quality? PLoS ONE 11(4): e0154326. doi:10.1371/journal.pone.0154326

Editor: Francisco X. Real, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), SPAIN

Received: December 7, 2015

Accepted: April 12, 2016

Published: April 28, 2016

Copyright: © 2016 Galissier et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by: 1. Ligue Nationale Contre le Cancer Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est, Appel d'Offre 2014. Grant Number 001N.2015 (SD), Website: http://www.liguecancer-cd68.fr/CCIR_GE.html; 2. Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Appel d'Offre Local 2014. Grant Number AU14-03 (CB-R), Website: https://www.chu-reims.fr/la_recherche.html. The funders had no role in study

Abstract

Medical research projects become increasingly dependent on biobanked tissue of high quality because the reliability of gene expression is affected by the quality of extracted RNA. Hence, the present study aimed to determine if clinical, surgical, histological, and molecular parameters influence RNA quality of normal and tumoral frozen colonic tissues. RNA Quality Index (RQI) was evaluated on 241 adenocarcinomas and 115 matched normal frozen colon tissues collected between October 2006 and December 2012. RQI results were compared to patients' age and sex, tumor site, kind of surgery, anastomosis failure, adenocarcinoma type and grade, tumor cell percentage, necrosis extent, HIF-1 α and cleaved caspase-3 immunohistochemistry, and *BRAF*, *KRAS* and microsatellites status. The RQI was significantly higher in colon cancer tissue than in matched normal tissue. RQI from left-sided colonic cancers was significantly higher than RQI from right-sided cancers. The RNA quality was not affected by ischemia and storage duration. According to histological control, 7.9% of the samples were unsatisfactory because of inadequate sampling. Biobanked tumoral tissues with RQI ≥ 5 had lower malignant cells to stromal cells ratio than samples with RQI < 5 ($p < 0.05$). Cellularity, necrosis extent and mucinous component did not influence RQI results. Cleaved caspase-3 and HIF-1 α immunolabelling were not correlated to RQI. *BRAF*, *KRAS* and microsatellites molecular status did not influence RNA quality. Multivariate analysis revealed that the tumor location, the surgical approach (laparoscopy versus open colectomy) and the occurrence of anastomotic leakage were the only parameters influencing significantly RQI results of tumor samples. We failed to identify parameter influencing RQI of normal colon samples. These data suggest that RNA quality

design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

of colonic adenocarcinoma biospecimens is determined by clinical and surgical parameters. More attention should be paid during the biobanking procedure of right-sided colon cancer or laparoscopic colectomy specimen. Histological quality control remains essential to control sampling accuracy.

Introduction

Despite advances in screening, diagnosis, and treatment, colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and the fourth-leading cause of cancer death worldwide [1,2]. Pathological staging is the only prognostic classification used in clinical practice to select patients for adjuvant chemotherapy [3]. However, the histoclinical parameters apprehend only poorly the heterogeneity of disease and are insufficient for recurrence and prognostic prediction in an individual patient [4]. Genetic and genomic analyses of colorectal adenocarcinomas uncovered a number of germline and somatic key mutations that drive tumorigenesis at a molecular level along the tumor progression [5–7]. Among the molecular markers that have been extensively investigated for CRC characterization and prognosis, microsatellite instability (MSI) is the only marker that was reproducibly found to be a significant prognostic factor in CRC [8,9]. Molecular research on CRC aims to identify markers involved in tumor progression, leading to a better understanding of the carcinogenesis process, discovering new prognostic markers and novel therapeutic targets. The gene expression profiling analysis with microarray technology shows great potential in cancer research and medical oncology, mapping simultaneously the expression of thousands of genes in a single tumor sample and giving a measurement of articulated genes expression patterns [10,11]. This type of study requires high quality biospecimens. Thus, fresh-frozen tissue is the favored biospecimen because it produces a high yield and high quality of nucleic acids compared to formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue biospecimen in which nucleic acids are fragmented [12,13]. Moreover validated protocols for genomic and expression profiles studies on FFPE material are not yet available [14,15].

A human tissue Biobank is a biorepository that accepts, processes, stores and distributes biospecimens. It associates data for use in research and clinical care [16]. Biobanks can provide researchers a reliable and organized source of human tissue for RNA-based analysis. RNA integrity is of utmost importance when applications involve RNA quantification for gene expression studies such as RT-PCR and cDNA microarray. RNA is highly susceptible to degradation, thus careful and standardized handling procedure to preserve RNA quality of the biospecimens is needed in tissue bank [17,18]. RNA integrity indicators such as the RNA quality index (RQI) are commonly used in Biobanks as an objective and reproducible RNA quality control [17,19]. The RQI score is similar to another widely used RNA quality indicator: the RNA Integrity Number (RIN) [20–22]. The RQI and RIN are numerical representation of electrophoretic measurements of the whole RNA integrity. These numerical scales are comprised between the most degraded RNA score: 1 and the most intact RNA score: 10. In several studies, RNA with a RQI/RIN <5 were considered as not reliable for further analyses, whereas gene expression analysis needs imperatively RNA with a RQI/RIN >7 [18,22]. Using degraded RNA leads to incorrect and hardly reproducible quantification results, both in microarray experiments and real-time PCR. Lack of reproducibility in various studies raises concern about variation in quality of tissues used for such studies [23,24].

In recent years, considerable attention was given to the influence of preanalytic effects on biospecimen quality. The preanalytical phase summarizes all procedures at various stages–

from tissue sampling to gene expression analysis—that may potentially affect the quality of the sample hence the experimental results and their reproducibility [23,25–28]. As a consequence it is now recommended that researchers using biospecimens ensure that key preanalytical variables (BRISQ Tier 1 items) from the Biospecimen Reporting for Improved Study Quality (BRISQ) guidelines are available [23,27]. Knowledge of these key variables can improve reproducibility and homogeneity of studies using biospecimens. However, the real impact of some parameters on RNA quality such as: the kind of surgery, cold ischemia duration, storage temperature and duration, is actually unknown or controversial.

Histological control of stored tissue is also a crucial step prior to embarking on time-consuming, labor-intensive, and costly projects. Approximately 10% of the frozen samples are unsuitable for a molecular analysis mainly because of tissue sampling inadequacy (no tumor or insufficient quantity of malignant cells) [29]. According to the literature, the most important parameters controlled by the histological analyses are tumor cells amount and necrosis extent [28,29]. However, the relationship between histological parameters such as tumor type, malignant/stromal cells percentage, type of stromal cells, necrosis extent and the RNA quality remains unknown. Moreover, immunohistochemical markers candidates to be related to RNA quality are not yet studied.

According to the literature, RNA integrity from gastrointestinal tract tissues and particularly colonic tissue is of significantly lower quality compared to other organs [17,26]. Therefore identification of parameters that could influence RNA quality seems essential to improve procedures ensuring the best RNA quality of such biospecimens.

The aim of this study was to search among clinical, histopathological, and molecular factors those influencing RNA quality of adenocarcinomatous and matched normal colon tissues.

Materials and Methods

Population studied

The study was conducted on tumoral and non tumoral colonic tissues sampled on colectomies received at the Pathology Department of Reims University Hospital (France) for histological diagnosis from October 2006 to December 2012 and stored in the Tumorothèque de Champagne Ardenne Biobank. The patients had not been treated with chemotherapy or radiotherapy before surgery. The study was performed in accordance with the ethical standards laid down in the Declaration of Helsinki. Written patients' consent for biobanking and biospecimen use was obtained in all cases. Approval had been obtained from the Tissue Bank Management Board (Autorization number DC-2008-374) for the study.

Clinical data and preanalytical variables including age at surgery, sex, tumor site, cold ischemia time, and *KRAS*, *BRAF*, MSI molecular status were obtained from the Tumorothèque de Champagne Ardenne Biobank database and the patients' medical records. Tissue cold ischemia time referred to the time from tissue excision to snap-freezing [27].

A total of 241 colonic adenocarcinoma tissue samples and 115 matched normal colonic mucosa samples were available for the study. The patients were 106 females (44%) and 135 males (56%). The mean age at time of resection was 70 years \pm 11 and median 71 years [43–90 years]. The adenocarcinoma was located in the right colon in 104 cases and in the left colon in 137 cases. Population data are summarized in Table 1.

Tissue Banking Process. At the time of the surgical resection, the specimens were transported at room temperature to the Pathology Department, where time of arrival was recorded. Colonic tumor tissue samples (TT) and matched normal colon tissues (NT) were collected as quickly as possible. A sample was excised from the tumor with a scalpel blade and then divided into two halves: one for biobanking and one for formalin fixation and mirror histological

Table 1. Clinical, pathological and molecular available data.

Variables	n	n (%) or mean \pm SD
Sex	241	
female		106 (44.0)
male		135 (56.0)
Age (years)	241	70.1 \pm 11.2
Location	241	
right		104 (43.2)
left		137 (56.8)
Kind of surgery	239	
Right hemicolectomy		104 (43.5)
Transverse colectomy		10 (4.2)
Left colectomy		35 (14.6)
Sigmoidectomy		29 (12.2)
High anterior resection		55 (23)
Total colectomy		6 (2.5)
Surgical approach	222	
Laparoscopic colectomy		10 (4.5%)
Open colectomy		212 (95.5%)
Anastomotic leakage	240	
Yes		16 (6.7%)
No		224 (93.3%)
Surgery duration (minutes)	16	132.5 \pm 82.01
Ischemia duration (minutes)	181	70.2 \pm 50.9
Tumor grade	237	
1		20 (8.4)
2		201 (84.8)
3		16 (6.8)
MSI status	141	
MSS		119 (84.40)
MSI		22 (15.60)
BRAF	94	
wt		79 (84.0)
mutated		15 (16.0)
KRAS	90	
wt		53 (58.9)
mutated		37 (41.1)

MSI: Microsatellite instable, MSS: Microsatellite stable, wt: wild type.

The tumor grade was established according to the WHO (1) independently to MSI status (1 = well; 2 = moderately; 3 = poorly).

doi:10.1371/journal.pone.0154326.t001

control [30–32]. The same process was realized on normal colonic mucosa distant from the tumor. Immediately after removal, tumor and normal tissue samples were stored in labeled cryovials, snap-frozen in liquid nitrogen, and then transferred to an ultra low-temperature refrigerator (-80°C) for storage. The tumor and normal tissue mirror control specimens were formalin fixed and paraffin-embedded (FFPE) and then underwent routine histopathological processing. Corresponding slides and paraffin blocks were stored at room temperature.

Histopathology

Hematoxylin-phloxine-saffron (HPS) slides were performed on 4- μ m-thick tissue sections of all the NT and TT FFPE mirror blocks. Histological evaluations were performed by two pathologists (T.G. and C.B-R.) blinded to the RQI results. In case of discrepancies a consensus diagnosis was reached. The adenocarcinoma subtypes, and grade were evaluated according to The World Health Organization (WHO) criteria [1]. The following criteria were evaluated on TT samples: the ratio of malignant to stromal cells, the cellularity, the necrosis extent, the presence and percentage of ulceration, the presence and percentage of mucinous component and the contamination by normal residual tissue. Among the stromal component, the percentages of stromal inflammatory cells, endothelial cells and fibroblasts were separately assessed. The percentages were calculated as the ratio of each stromal cell type to all stromal cells.

The TT cellularity was a semi-quantitative evaluation of the global cellular density of the whole sample: malignant and non-malignant cells, scored as follow: 0 = low, 1 = moderate and 2: high. Examples are given in Fig 1.

Immunohistochemistry

We aimed to evaluate if immunohistochemical expression of apoptosis or ischemia markers (cleaved caspase 3 and HIF-1 α respectively) were correlated to RNA quality. Thus, these markers could be used on mirror samples as a quality control. Immunostaining was performed on 4- μ m-thick sections with anti-Cleaved Caspase-3 (rabbit polyclonal, 1:600 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), and anti-Human HIF-1 α (mouse monoclonal, clone 54/HIF-1 α , 1:100 BD biosciences, San Jose, CA, USA) primary antibodies on the BenchMark XT (Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA) automated staining instrument. Briefly, after deparaffinization, the tissue sections were incubated with the Cell Conditioner 1 (EDTA, pH 8.4) for 64 min, followed by pre-primary peroxidase inhibition and incubation with the primary antibody at 37° for 32 min. Then, the staining reaction was performed by using the ultraView Universal DAB v3 Kit (Ventana Medical System). The counterstain and post-counterstain comprised Haematoxylin and bluing reagent.

Cleaved caspase 3 and HIF-1 α immunohistochemistry were assessed separately by determination of the percentages of positive tumor cells and stromal cells. The percentages of stromal or tumor cells were calculated as the number of positive stromal or tumor cell divided by the number of total stromal or tumor cells respectively.

RNA extraction

The frozen sample was weighted just before RNA extraction process. RNA extraction and purification was performed on the whole frozen tissue sample after 24 to 48 hours homogenization and lysis. The Maxwell® 16 LEV simply RNA tissue kit (Promega, Madison, USA), a paramagnetic bead-based RNA purification, with enzymatic DNA elimination, was used according to the manufacturer's instructions on the Promega's robotics platform: the Maxwell® 16 Research Instrument (Promega). RNA was eluted in a volume of 50 μ L. The concentration of total RNA (ng/ μ L) was determined by using a Picodrop uL spectrophotometer (Picodrop, Hinxton, United Kingdom).

Determination of RNA quality

RNA quality index (RQI) was determined using the Experion™ automated electrophoresis system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), a microfluidics-based system electrophoresis, according to the manufacturer protocol. The RQI software algorithm allows for the classification of total RNA, based on a numbering system from 1 to 10 (1 being the most degraded and

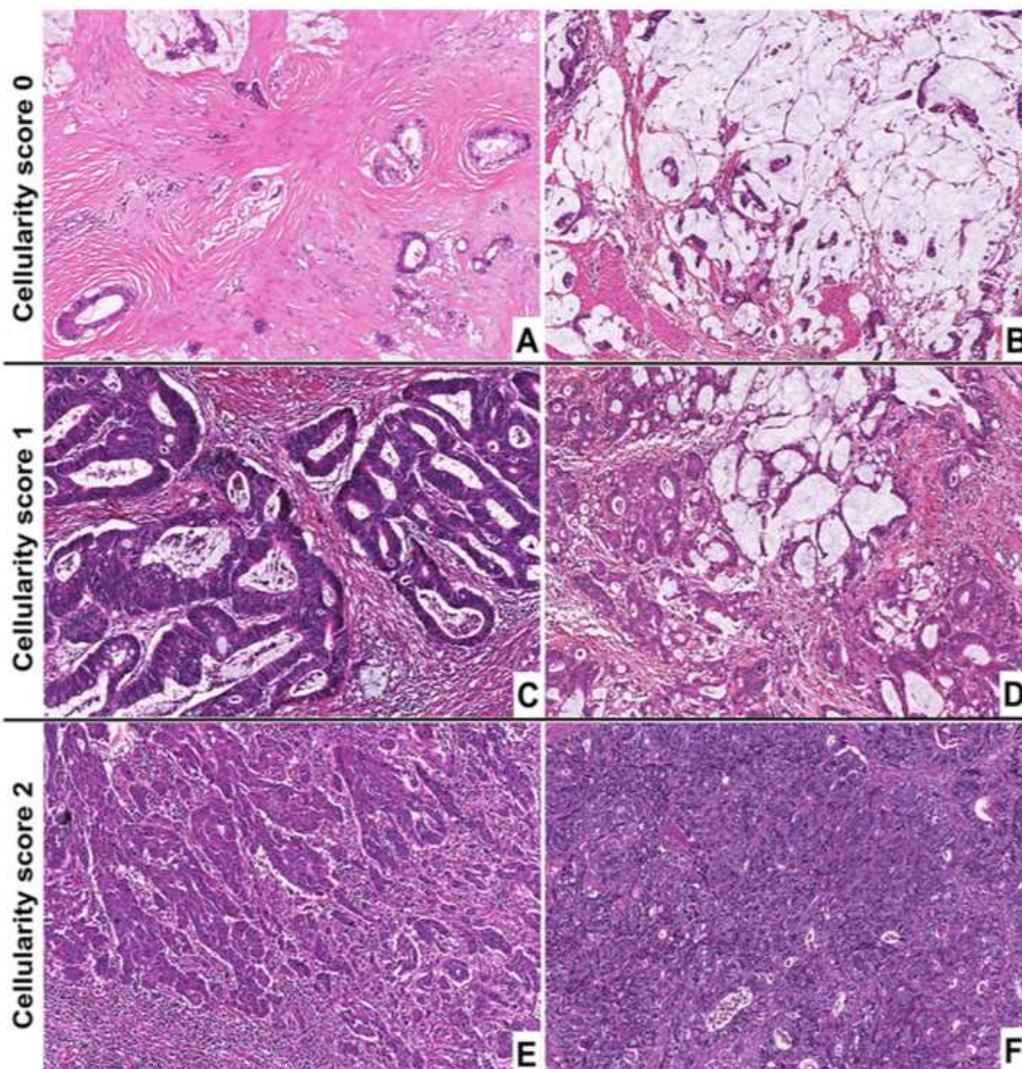


Fig 1. Illustration of the cellularity score, (Hematein-Phloxin-Saffron, x10). A-B. Cellularity score 0 in two adenocarcinomas with low cell density. **C-D:** Cellularity score 1 in two adenocarcinomas with moderate cell density. **E-F:** Cellularity score 2 in two adenocarcinomas with high cell density.

doi:10.1371/journal.pone.0154326.g001

10 being the most intact). The RQI calculations take into account 3 electrophoregram regions: the 28S, the 18S and the pre-18S regions [20]. The RQI results are similar to the RNA Integrity Number results, another microfluidics-based system electrophoresis that analyses RNA integrity [20,21].

RQI values were classified as “of sufficient quality” ($RQI \geq 5$) or as “inadequate for further analyses” ($RQI < 5$) according to the literature [17,19,30,31].

5'3' mRNA ratio integrity assay

The principle of this qPCR-based assay is based on the fact that anchored oligo-dT primed reverse transcription proceeds from the 3' poly-A tail to the 5' start, being interrupted if mRNA

is fragmented due to degradation. Two qPCR assays targeting either the 3' end or the 5' start of 2 commonly used housekeeping genes: TATA-Binding Protein (*TBP*) and Beta-2-microglobulin (*B2M*) were evaluated. Total RNA (250 ng) was reverse-transcribed using VERSO cDNA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions using oligodT primers. Primers were designed according to human sequences encoding for *TBP* and *B2M*. The sequences of the pairs of primers used were: 3'*TBP* (5'-CAGCGTGACTGTGA GTTGCT-3' and 5'-AACTGTGGTTCATGGGGAAA-3'), 5'*TBP* (5'-CGGCTGTTTAA CTTCGCTTC-3' and 5'-CTGAATAGGCTGTGGGGTCA-3'), 3'*B2M* (5'-TGCTTAGAA TTTGGGGGAAA-3' and 5'-CCAGATTAACCACAACCATGC-3'), 5'*B2M* (5'-TATCCA GCGTACTCCAAAGA-3' and 5'-GACAAGTCTGAATGCTCCAC-3'). 5' and 3' Ct values were determined and the difference in Ct value between both assays was calculated and defined as the 5'3' dCt ratio. The 5'3' dCt is inversely correlated to RNA quality. All primers were synthesized by Eurogentec (Eurogentec, Liège, Belgium). Real-time PCR was performed using an Absolute SYBR Green Rox mix (Thermo Fisher Scientific), on a CFX 96 real time PCR detection system (Bio-Rad). PCR conditions were 15 min at 95°C, followed by 40 cycles each consisting of 15 s at 95°C (denaturation) and 1 min at 60°C (annealing/extension). The specificity of PCR amplification was checked using a heat dissociation curve from 65°C to 95°C following the final cycle. The cycle threshold (Ct) values were recorded with Bio-Rad CFX Manager™ 3.0 software (Bio-Rad).

Molecular analysis

Tumor DNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues after macrodissection of a preselected area with the highest adenocarcinomatous cells density. Each sample analyzed contained at least 30% of tumor cells. DNA was extracted on Maxwell® 16 Instruments automaton after tumor macrodissection with Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit (all products from Promega Corporation, Madison, USA).

BRAF^{V600E} mutation detection was assessed by allelic discrimination using TaqMan probes as previously described [32]. *KRAS* gene mutations on codons 12 and 13 were searched by pyrosequencing analysis using the Pyromark Q96 kit (Quiagen GmbH, Hilden, Germany) as previously described [32]. The MSI status was determined by Multiplex PCR analysis of 5 mononucleotidic markers (BAT25, BAT26, MONO27, NR21, NR24) and 2 pentanucleotidic markers (PentaC and Penta D) using the MSI Analysis System kit, Version 1.2 (Promega Corporation, Madison, USA) as previously described [32].

Statistical Analysis

Non tumoral and tumoral colon tissues RQI were compared by paired T-test. Quantitative variables were compared between RQI ≥ 5 and RQI < 5 groups using the Student test. Indeed, RNA with RQI < 5 were considered as not reliable for further analyses such as microarray analyses and qRT-PCR of long amplicons (> 200 bp) whereas RNA with a RQI at least > 5 is suitable for such analyses [17,19,30,31]. Qualitative variables were compared by Fisher's exact test or Khi-2 test, as appropriate. We used a linear regression technique for cycle threshold evaluation compared to RQI values. Multivariable analysis by logistic regression with backward elimination steps was performed including all variables that had a p value < 0.20 by univariate analysis. Statistical analyses were performed with SAS version 8.2 (SAS institute Inc, Cary, North California). For all tests, $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results

Comparison between non tumoral and tumoral colon tissue RQI

The RQI was successfully determined in all the 241 TT samples and 115 NT samples. The RNA was considered as “of sufficient quality” (RQI ≥ 5) in 56 of the 115 NT samples (48.7%) and 188 of the 241 TT samples (78%). The mean RQI of the NT tissue sample was 4.8 ± 2 and median 4.25 [1.9–8.8]. The RQI was significantly higher ($p < 0.0001$) in TT samples with a mean of 6.5 ± 1.9 and median of 7.3 [1.9–10]. RQI values were 1.7 higher in TT than in paired NT samples.

Parameters influencing RQI of non tumoral colon tissues

There was no significant difference with the clinical parameters: age, sex and anatomical site between the RQI < 5 and ≥ 5 groups. The kind of surgery, the surgical approach, the cold ischemia duration, the sample weight, and the storage duration were not statistically different between the two groups. Surgery duration was available in only 9 cases. Spearman’s correlation coefficient ρ between RQI values and surgery duration was 0.36 (weak). Histological examination confirmed that all samples were normal colonic mucosa without any contamination by adenoma or adenocarcinoma tissue. There was no statistically significant difference of cleaved caspase 3 and HIF-1 α immunohistochemical expression between the 2 groups. These results are summarized in Table 2.

Parameters influencing RQI of tumoral colon tissues

Results of clinical, histological and molecular parameters association with RQI are summarized in Table 3.

Table 2. Parameters associated with RNA quality in non tumoral colonic tissue.

	n	RQI < 5n (%) or mean \pm SD	RQI ≥ 5 n (%) or mean \pm SD	p-value
Sex n (%)	115			
female		25/59 (42.4)	28/56 (50)	0.41 ‡
male		34/59 (57.6)	28/56 (50)	
Age mean (years)	115	68.5 \pm 9.8	68.1 \pm 12	0.81 †
Location n (%)	115			
Right		29/59 (49.2)	22/56 (39.3)	0.29 ‡
left		30/59 (50.8)	34/56 (60.7)	
Surgical approach	106			
Laparoscopic colectomy		2/3 (3.6)	1/3 (2)	
Open colectomy		53/103 (96.4)	50/103 (98)	0.62 ‡
Anastomotic leakage (Yes/Total)	114	7/59 (11.9)	3/55 (5.4)	0.32 ‡
Cold ischemia duration (minutes)	89	67.8 \pm 53.9	60 \pm 48.1	0.48 †
Storage duration (years)	115	6.2 \pm 1.9	6.9 \pm 1.8	0.06 †
NT weight mean (grams)	113	0.16 \pm 0.08	0.17 \pm 0.07	0.63 †
NT caspase mean (%)	113	0.5 \pm 1	0.6 \pm 1.5	0.73 †
NT HIF-1α mean (%)	113	2 \pm 6	3 \pm 8	0.34 †

NT: normal tissue, RQI: RNA Quality Index, SD: Standard Deviation

‡: K χ 2 test

†: T-test

‡: Fisher’s exact test.

doi:10.1371/journal.pone.0154326.t002

Table 3. Parameters associated with RNA quality in tumoral tissue.

	n	RQI < 5n (%) or mean ±SD	RQI ≥ 5n (%) or mean ±SD	p-value
Sex	241			0.14 ‡
female		28/53 (52.8)	78/188 (41.5)	
male		25/53 (47.2)	110/188 (58.5)	
Age (years)	241	70.7 ±9.9	70 ±11.6	0.68 †
Location	241			0.01 † *
right		31/53 (58.5)	73/188 (38.8)	
left		22/53 (41.5)	115/188 (61.2)	
Surgical approach	222			0.01 † *
Laparoscopic colectomy		6 (12)	4 (2.3)	
Open colectomy		44 (88)	168 (97.7)	
Anastomotic leakage (Yes/Total)	240	6/53 (11.3)	10/187 (5.3)	0.13 †
Cold ischemia duration (minutes)	181	59.9 ±44.4	73.6 ±52.5	0.12 †
Storage duration (years)	241	5.8 ±1.9	5.9 ±1.8	0.76 †
Sample weight (grams)	216	0.18 ±0.12	0.19 ±0.07	0.53 †
Type	237			0.23 ‡
Non mucinous adenocarcinoma		42/52 (80.8)	162/185 (87.6)	
Mucinous adenocarcinoma		10/52 (19.2)	23/185 (12.4)	
Mucinous component percentage	233	7.2 ±20.8	6.3 ±20.1	0.77 †
Grade	237			0.09 †
1		3/52 (5.8)	17/185 (9.2)	
2		42/52 (80.8)	159/185 (85.9)	
3		7/52 (13.4)	9/185 (4.9)	
Ulceration	237			0.06 ‡
absent		50/52 (96)	161/185 (87)	
present		2/52 (4)	24/185 (13)	
Ulceration percentage	233	3.2 ±8.2	3.5 ±8.1	0.77 †
Cellularity	237			0.2 ‡
0		16/52 (30.8)	38/185 (20.6)	
1		21/52 (40.4)	104/185 (56.2)	
2		15/52 (28.8)	43/185 (23.2)	
Malignant/stromal cells (%)	237	44.2 /55.8	35.5 /64.5	0.02 † *
Necrosis (%)	237	5.1 ±13.9	3.6 ±9	0.44 †
Caspase (%)	235			
Tumor cells		4.7 ±4.1	3.6 ±3.5	0.07 †
Stromal cells		0.2 ±0.5	0.1 ±0.6	0.71 †
TT HIF-1 α (%)	235			
Tumor cells		8.5 ±12.3	9.8 ±13.9	0.55 †
Stromal cells		7.9 ±17.4	4.6 ±9.7	0.20 †
MSI	141			0.78 †
MSS		25/30 (83.3)	94/111 (84.7)	
MSI		5/30 (16.7)	17/111 (15.3)	
BRAF	94			0.33 †
wt		17/22 (77.3)	62/72 (86.1)	
mutated		5/22 (22.7)	10/72 (13.9)	
KRAS	90			0.49 ‡
wt		11/21 (52.4)	42/69 (60.9)	

(Continued)

Table 3. (Continued)

	n	RQI < 5n (%) or mean ±SD	RQI ≥ 5n (%) or mean ±SD	p-value
mutated		10/21 (47.6)	27/69 (39.1)	

‡: KHi2 test

†: T-test

‡: Fisher's exact test

SD: Standard Deviation, TT: tumoral tissue, wt: wild type

* Significant p-value.

Cellularity was evaluated semi-quantitatively for NT and TT as follow: 0 = low; 1 = moderate; 2 = high. The tumor grade was established according to the WHO (1) independently to MSI status (1 = well; 2 = moderately; 3 = poorly).

doi:10.1371/journal.pone.0154326.t003

Clinical and surgical parameters. There was no significant difference with the clinical parameters: age and sex between the RQI <5 and ≥5 groups. RQI values were significantly ($p = 0.05$) higher in left-sided colon adenocarcinomas (mean 6.7 ± 1.8 ; median 7.3 [1.9–10]) than in right-sided colon adenocarcinomas (mean 6.2 ± 2 ; median 7 [1.9–9.2]). Significantly more left-sided TT samples had a RQI ≥5 (115/137, 83.9%) than right-sided TT (73/104, 70.2%) ($p = 0.01$). The surgical approach but not the type of surgery influenced RQI. The RQI results were lower in laparoscopic colectomy specimens than in open colectomy specimens. Moreover, RQI results were lower in case of anastomotic leakage. Surgery duration was available in only 16 cases. Spearman's correlation coefficient ρ between RQI values and surgery duration was 0.27 (weak).

Multivariate analyses using all the potential influencing variables with $p < 0.20$, revealed that 3 clinical/surgical parameters significantly influence RQI results: the tumor location, the surgical approach (open versus laparoscopic colectomy) and the occurrence of anastomosis leakage. Results of the multivariate analyses are summarized in Table 4.

Preanalytical parameters. The mean cold ischemia time was 70.2 ± 50.9 minutes and median 60 minutes [5–325]. The cold ischemia time was not statistically different between the RQI <5 (59.9 minutes ± 44.4) and RQI ≥5 groups (73.6 minutes ± 52.5). As in normal tissue, neither the sample weight, nor the storage duration was statistically different between the two groups.

Histological and molecular parameters. Adenocarcinoma not otherwise specified was the most common adenocarcinoma type ($n = 206$), followed by mucinous adenocarcinoma ($n = 25$), serrated adenocarcinoma ($n = 5$), and micropapillary adenocarcinoma ($n = 1$).

RQI results were not influenced by adenocarcinoma subtype or by the presence or percentage of a mucinous component. There was no statistically significant difference between RQI <5 and ≥5 groups for tumor grade, cellularity, ulceration and necrosis. Malignant to stromal cells ratio had an influence on RQI value. Indeed, samples with RQI ≥5 had a superior stromal cell

Table 4. Parameters associated with RNA quality in tumoral tissue on multivariate analysis.

Variables	Odds ratio (95% CI)
TT cellularity 1 vs. 0	0.83 (0.20–3.45)
TT cellularity 2 vs. 0	0.24 (0.05–1.07)
Tumor location left vs. right	7.90 (2.41–25.87) *
Open versus laparoscopic colectomy	16.73 (2.78–100.69) *
Anastomotic leakage	0.03 (0.005–0.24) *

TT: tumoral tissue, NT: normal tissue, CI: Confidence Interval.

* statistically significant.

doi:10.1371/journal.pone.0154326.t004

proportion (mean of +8.7%; $p < 0.05$). However, RQI was not influenced by the percentage of stromal inflammatory cells ($p = 0.95$), endothelial cells ($p = 0.41$) and fibroblasts ($p = 0.86$). There was no statistically significant difference in MSI, *BRAF* and *KRAS* status between the two RQI groups.

Histological control revealed that 4 samples (1.7%) were not adenocarcinomatous but adenomatous remnants. In 15 cases (6.2%), non-tumoral colonic tissue involved almost the entire sample with less than 5% of tumoral tissue. Thus, at least 7.9% of the samples were not appropriate for molecular analyses because of tissue sampling inadequacy. The percentage of malignant cells was $>60\%$ in 66 cases (27.3%). Among these cases, necrosis involved $>20\%$ of the sample surface in 7 cases. In total, only 59 cases among 241 (24.4%) were considered histologically appropriate for molecular analyses after histological control according to the Cancer Genome Atlas criteria (TCGA) [33].

Immunohistochemical expression of HIF-1 α and cleaved caspase 3 in stromal and tumor cells did not reveal significant difference between the RQI <5 and ≥ 5 groups.

5'3' ratio mRNA integrity assay and RQI values. To demonstrate the accuracy of RQI, 12 RNA samples with various RQI between 2.4 and 9.3 were subjected to 5'3' ratio mRNA integrity assay and qPCR analysed for *TBP* and *B2M* genes. We found a clear increase in the 5'3' dCt ratio correlated with the RNA integrity comparatively to the high quality RNA samples. These results are presented in Fig 2 and in S1 Fig. Moreover, we calculated 3'/5' ratio using the mean 3' relative expression value in optimal-quality samples (a 1 ratio indicated a non degraded RNA). For RNA with RQI >5 we found a mean 2.89 3'/5' ratio for *B2M* and 1.36 for *TBP*. These ratios were 5.01 and 3.18 for RNA with RQI <5 for *B2M* and *TBP* respectively. They were in accordance with the quality criteria proposed by Die et al [34]. Indeed values near or below the limit of 2.73 for a 1100pb distance between 5' and 3' amplicons (1482pb for *TBP* in our experiments) and 1,36 for 700pb (813pb for *B2M* in our experiments) characterise cDNA as reliable for gene expression studies.

Discussion

Clinical studies and medical research projects become more and more dependent on human tissue of high quality collected in Biobanks [35]. Knowledge of parameters influencing the

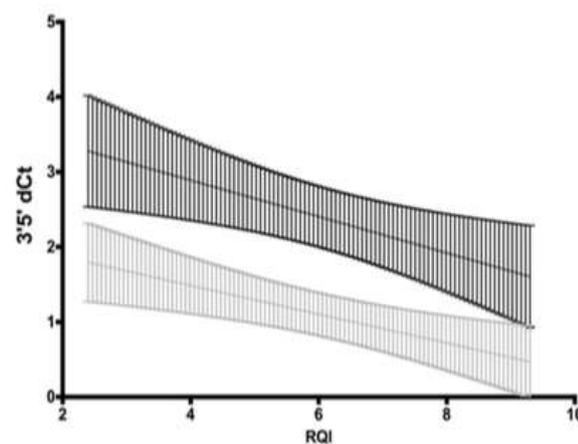


Fig 2. 3'5' dCt ratio of 2 housekeeping genes versus RNA RQI values. 3'5' dCt RT-qPCR ratio of *TBP* (black) and *B2M* (gray) housekeeping gene measured in adenocarcinomatous samples. The ratio is inversely correlated to the RNA integrity assessed by the RQI.

doi:10.1371/journal.pone.0154326.g002

RNA integrity of colonic biospecimens is a necessary prerequisite to improve the quality of biospecimens and, by extension, the molecular results. In the present study we evaluated the influence of different clinical, histological, and molecular parameters on the RQI results.

RNA degradation depends on tissue type [17]. Frozen samples from the gastrointestinal tract, especially pancreatic, gastric and colorectal samples, have lower RNA quality when compared to samples from other organ sites such as breast, tonsil, kidney, prostate, etc. [17,26]. Within the colonic samples, we found, as in previous studies, that RNA quality was higher in tumor tissues than in normal mucosa whatever the localization [36,37]. In our study, the location of the tumor was the 1 of the 3 parameters that significantly influenced RQI values on multivariate analysis. The influence of the location of colonic adenocarcinoma on RNA quality had not been described before. The difference in enzymatic environment and colonic bacteria flora between right and left colon might partly explain these results [38]. Previously, it was shown that the RNA from human and rat mucosal tissue of the proximal small intestine degrades much faster than the RNA of distal small intestine, caecum or colon with rectum [38]. This suggests a possible impact of enzymatic and bacterial environment on RNA quality within the intestinal tract. However, in our study RQI from right and left normal colonic mucosa were not statistically different. Thus, this right/left RQI difference is specific to the tumor. It is well known that right colonic adenocarcinomas have distinct molecular characteristics with more frequent microsatellite instability and *BRAF* mutation compared to left colonic adenocarcinomas [1]. In our study, *BRAF* and MSI status did not significantly influence RQI results. Thus, the right/left RQI difference in tumor tissue is not related to these genotypes.

In addition to the tumor location, in our study the type of surgical approach and the occurrence of post-surgery complications such as anastomosis leakage significantly influenced RQI results of tumor samples only on multivariate analysis. In our study, RNA quality of the tumor samples was lower when a laparoscopic colectomy was performed or when an anastomotic leakage occurred. We are the first to describe such relation between RNA quality and surgical approach or suture failure.

In one previous study, the RNA transcript of several genes decreased in case of laparoscopic colectomy compared to open colectomy [39]. In other studies, mRNA expression of some protease such as metalloproteinase 2 and 9 and urokinase-type plasminogen activator increased in colon carcinoma cell lines when submitted to CO₂ concentration corresponding to laparoscopy conditions [40,41]. This increase of protease transcription related to high CO₂ concentration cannot explain the decrease of RNA quality in tumor tissue. However, the CO₂ pneumoperitoneum induces changes in gene expression of colonic tumor cells.

Anastomotic leakage is a rare but very severe complication of colon cancer surgery. Male patients, elderly patients, patients with comorbidity, patients with previous abdominal surgery, with pre-operative or intra-operative septic condition, with post-operative blood transfusion and patients who underwent right hemicolectomy are at higher risk of anastomosis leakage after colectomy [42–44]. The reason for the lower quality of tumor RNA in case of post-surgery anastomotic leakage remains unexplained but could be related to patients' medical condition and to tumor location.

Despite rigorous tissue banking process, only 82.2% of frozen colonic tumoral samples had a RQI ≥ 5 , and 57.3% had a RQI ≥ 7 , whereas 94% had a RIN ≥ 7 in one previous study [36]. This difference might partly be explained by some preanalytical factors such as warm ischemia, surgical procedure, transport procedure, tissue manipulation, sampling or RNA extraction procedure. In our study, the sample weight had no impact on RQI. To our knowledge, this parameter had not been evaluated before.

As in previous studies [19,24,36,45], we found that storage duration of colonic biospecimens did not impact on RNA quality.

Our results showed that RNA quality was not significantly affected by cold ischemia time. These results are consistent with previous results on colonic biospecimens. In one study RNA integrity did not show decrease with cold ischemia for up to 4 hours [36]. Another study on fresh normal colon tissue left at room temperature, or kept on ice, or in saline or in RNAlater during 0.5, 1, 3, 6 and 16 h showed that RNA integrity remained stable under all conditions tested for up to 6–16 h [18]. Similar results were found on other organs such as pancreas [24] or tonsil [18]. In contrast, several other studies reported a progressive deterioration in RNA integrity on colonic tumor samples with increasing cold ischemia time up to 2h [46,47].

Although RNA degradation measurement is an objective evaluation of RNA quality, the direct effect of RNA degradation on gene expression levels must also be considered. In fact, the variations of housekeeping genes Ct with RQI are problematic because the accuracy of the results obtained by quantitative RT-PCR strongly depends on accurate transcript normalization using stably expressed housekeeping genes [48]. In our study, we observed that 5'3'dCt ratios of 2 commonly used housekeeping genes (*TBP* and *B2M*) were inversely proportional to RQI and 3'/5' ratios indicated that oligodT priming cDNA are suitable for gene studies if RNA RQI is over 5. Thus, for RT-qPCR studies using colon cancer tissues, samples with high quality RNA (RQI >5) should preferably be used. Gene expression profiling studies on colorectal cancer showed that mRNA expression changes with handling time [36, 49] or RNA quality [31] concerned only few mRNA and would not be expected to play a major role in gene expression-based tumor stratification [37]. The genes that show the strongest effect due to RNA degradation were those with short mRNA and probe position near the 5' end. It was concluded that degraded RNA from tumor samples could be still used to perform gene expression analyses [31]. Moreover, the impact of variation in RNA quality on estimate of gene expression levels can be corrected [50].

Histomorphological control of the biobanked specimens is crucial to ensure that the biospecimens were properly sampled. In our study, almost 8% of the tumoral biospecimens did not concern tumor tissue but the surrounding adenomatous or normal tissues. Similar results were found in previous studies where 10% to 25% of the frozen samples were unsuitable for a molecular analysis because of tissue sampling inadequacy [29,46].

Histological evaluation of the biospecimens also aims to estimate the malignant cell percentage. The suitable threshold of malignant cells percentage for gene expression analyses on colonic samples is actually unknown. However, in most studies and particularly in TGCA studies samples with more than 60% of neoplastic cells were used to ensure that the gene expression results reflect the tumor cell results and not the stromal cells results [11,28,34,36,46,51,52]. In our study, only 27.3% of the cases had neoplastic cells content >60% and thus considered as appropriate for molecular analyses according to the literature [12]. In other studies, 64.3 to 90% of the samples fulfilled this criterion [31,46,52]. This significant difference between studies may be explained by the lack of reproducibility of cell percentage estimation between pathologists [53]. The ratio of malignant cells nuclei to all other nuclei in the tissue is the only criterion that should be assessed for tumor cells percentage estimation [12]. Centralizing histological analysis may help to reduce the variability in malignant cell percentage and other histological criteria evaluation [28].

Regarding the influence of tumor cell percentage on RNA quality, we found better RQI in samples with lower malignant/stromal cell ratio. These results could be explained by the role of stromal cells to maintain a kind of homeostasis to prevent RNA degradation.

Another histological parameter usually evaluated on biospecimens is the necrosis extent. The maximal necrosis extend threshold is 20% in TGCA studies [12,28,33]. However, in our study as in other studies necrosis extent had no significant influence on RNA quality [12]. Because the necrosis extent estimation is not yet standardized and had no demonstrated impact

on RNA quality, its importance on biospecimens quality evaluation should be reconsidered. Moreover the type of necrosis (coagulative or inflammatory) seems to be more important to specify [12].

In our study, the adenocarcinoma subtype, the cellularity and the presence of a mucinous component did not significantly influence RNA quality. In the study of Kap et al. a low cellularity of tumor sample was correlated with lower RIN results [19]. However, as necrosis extent evaluation, this morphological criterion is not well defined and is difficult to evaluate reproducibly.

Morphological control can be performed by 3 different techniques: 1/ on frozen tissue itself, 2/ on imprint cytology slide and 3/ on mirror slide. These 3 techniques have their own advantages and disadvantages [29]. The mirror image control consists in sampling a tissue close to the frozen sample and to perform a conventional histological analysis. This technique gives a very good morphological aspect of the tissue allowing immunohistochemical studies; however it analyses the tissue next to the frozen sample and not the frozen tissue itself. The correlation of frozen tissue/mirror tissue histology has been reported to be excellent [54,55].

We were the first to evaluate the relationship between ischemia and apoptosis marker (HIF-1 α and cleaved caspase 3 respectively) immunohistochemical expression and RNA integrity. Our results showed no statistical difference in HIF-1 α and cleaved caspase 3 immunohistochemical expression between RQI <5 and \geq 5 groups. Thus, these 2 immunolabelling cannot be used as RNA quality indicator on mirror samples. In previous studies, variation of HIF-1 α gene expression and immunoreactive score with ischemia duration was controversial [49,56]. This lack of expected association between HIF-1 α immunoreactive score and ischemia time could be explained by oncogene activation of HIF-1 α in cancer [56,57].

In conclusion, we found that RNA quality is lower in normal colonic tissue compared to malignant colonic tissue, whatever the location. In colonic tumor samples only, RNA quality is influenced by some clinical and surgical parameters such as tumor location, type of surgical approach and the occurrence of suture failure. Further investigations are needed to explain these observations.

In our study, RNA quality has no relationship with preanalytical, morphological or molecular parameters.

For the meantime, these results suggest that tumor sampling and interpretation of molecular results should be performed more carefully for tumor tissue from laparoscopic colectomy specimens and right-sided tumors.

Supporting Information

S1 Fig. 3' and 5'B2M housekeeping gene amplification compared to RQI. 3' and 5'B2M housekeeping gene amplification by PCR in exponential phase (21 cycles) using 3' and 5'B2M primers respectively after oligodT primed reverse transcription (top panel) and quantification by densitometry of the 3'5' ratio (%3'5') according to the RQI of RNA (lower panel). RNA with a 9.1 RQI was used as positive control. mRNA integrity is definitively correlated to RQI level, and RQI<5 is not suitable for RT-qPCR analysis.

(TIFF)

Acknowledgments

The authors want to thank the Plateforme Régionale de Biologie Innovante for their technical assistance. The authors thank Mr. Guillaume Galissier for writing assistance.

Author Contributions

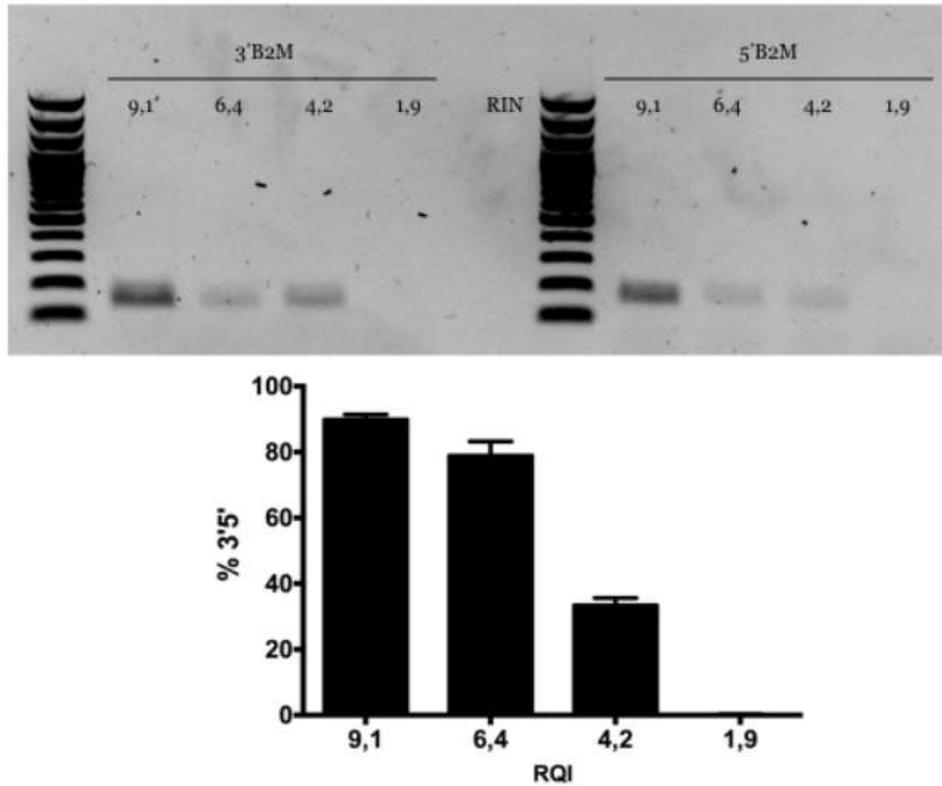
Conceived and designed the experiments: CS M-DD SD AMB CB-R. Performed the experiments: TG CS SN CF CC CB-R. Analyzed the data: TG CS LK CB-R. Contributed reagents/materials/analysis tools: RK GB SD. Wrote the paper: TG CS M-DD CB-R.

References

1. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, Ilyas M, Morreau H, Nakamura S-I et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: WHO classification of tumours of the digestive system. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND eds. Lyon, France: IARC Press; 2010. pp.132–146.
2. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50:7–33. PMID: 10735013
3. Colon and Rectum. In: TNM Classification of Malignant Tumours, 7th edition. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C eds. Chichester, West Sussex: Blackwell Publishing Ltd; 2010. pp.100–105.
4. Billaud M. L'hétérogénéité intratumorale—Un obstacle darwinien à la médecine personnalisée? *Med Sci (Paris)* 2012; 28:1116–1119.
5. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759–767. PMID: 2188735
6. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 768:101–110. PMID: 8526339
7. Sillars-Hardebol AH, Carvalho B, de Wit M, Postma C, Delis-van Diemen PM, Mongera S, et al. Identification of key genes for carcinogenic pathways associated with colorectal adenoma-to-carcinoma progression. *Tumour Biol* 2010; 31:89–96. doi: 10.1007/s13277-009-0012-1 PMID: 20358421
8. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23:609–618. PMID: 15659508
9. Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29:1261–1270. doi: 10.1200/JCO.2010.30.1366 PMID: 21383284
10. Nannini M, Pantaleo MA, Maleddu A, Astolfi A, Formica S, Biasco G. Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: results and perspectives. *Cancer Treat Rev* 2009; 35:201–209. doi: 10.1016/j.ctrv.2008.10.006 PMID: 19081199
11. Bertucci F, Salas S, Eysteris S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 2004; 23:1377–1391. PMID: 14973550
12. Shabihkhani M, Lucey GM, Wei B, Mareninov S, Lou JJ, Vinters HV, et al. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clin Biochem* 2014; 47:258–266. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.01.002 PMID: 24424103
13. Hedegaard J, Thorsen K, Lund MK, Hein AM, Hamilton-Dutoit SJ, Vang S, et al. Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue. *PLoS One* 2014; 9:e98187. doi: 10.1371/journal.pone.0098187 PMID: 24878701
14. Greytak SR, Engel KB, Bass BP, Moore HM. Accuracy of Molecular Data Generated with FFPE Biospecimens: Lessons from the Literature. *Cancer Res* 2015; 75:1541–1547. doi: 10.1158/0008-5472.CCR-14-2378 PMID: 25836717
15. Kashofer K, Viertler C, Pichler M, Zatloukal K. Quality control of RNA preservation and extraction from paraffin-embedded tissue: implications for RT-PCR and microarray analysis. *PLoS One* 2013; 8:e70714. doi: 10.1371/journal.pone.0070714 PMID: 23936242
16. De Souza YG, Greenspan JS. Biobanking past, present and future: responsibilities and benefits. *AIDS Lond Engl* 2013; 27:303–312.
17. Viana CR, Neto CS, Kerr LM, Palmero EI, Marques MM, Colaiacovo T, et al. The interference of cold ischemia time in the quality of total RNA from frozen tumor samples. *Cell Tissue Bank* 2013; 14:167–173. doi: 10.1007/s10561-012-9313-5 PMID: 22562477
18. Micke P, Ohshima M, Tahmasebpour S, Ren ZP, Ostman A, Pontén F, et al. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Lab Invest* 2006; 86:202–211. PMID: 16402036
19. Kap M, Oomen M, Arshad S, de Jong B, Riegman P. Fit for purpose frozen tissue collections by RNA integrity number-based quality control assurance at the Erasmus MC tissue bank. *Biopreserv Biobank* 2014; 12:81–90. doi: 10.1089/bio.2013.0051 PMID: 24749874

20. Denisov V, Strong W, Walder M, Gingrich J, Wintz H. Development and Validation of RQI: An RNA Quality Indicator for the Experion™ Automated Electrophoresis System. Available: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/BULLETIN_5761B.pdf
21. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006; 7:3. PMID: 16448564
22. Strand C, Enell J, Hedenfalk I, Fernö M. RNA quality in frozen breast cancer samples and the influence on gene expression analysis—a comparison of three evaluation methods using microcapillary electrophoresis traces. *BMC Mol Biol* 2007; 8:38. PMID: 17519006
23. Simeon-Dubach D, Burt AD, Hall PA. Quality really matters: the need to improve specimen quality in biomedical research. *J Pathol* 2012; 228:431–3. doi: 10.1002/path.4117 PMID: 23023660
24. Rudloff U, Bhanot U, Gerald W, Klimstra DS, Jarnagin WR, Brennan MF et al. Biobanking of human pancreas cancer tissue: impact of ex-vivo procurement times on RNA quality. *Ann Surg Oncol* 2010; 17:2229–36. doi: 10.1245/s10434-010-0959-6 PMID: 20162455
25. Narayanan S. The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. *Am J Clin Pathol* 2000; 113:429–452. PMID: 10705825
26. Zeugner S, Mayr T, Zietz C, Aust DE, Baretton GB. RNA quality in fresh-frozen gastrointestinal tumor specimens—experiences from the tumor and healthy tissue bank TU Dresden. *Recent Results Cancer Res* 2015; 199:85–93. doi: 10.1007/978-3-319-13957-9_9 PMID: 25636432
27. Moore HM, Kelly A, McShane LM, Vaught J. Biospecimen Reporting for improved study quality (BRISQ). *Transfusion* 2013; 53(7):e1. doi: 10.1111/trf.12281 PMID: 23844646
28. Diaz Z, Aguilar-Mahecha A, Paquet ER, Basik M, Orain M, Camlioglu E, et al. Next-generation biobanking of metastases to enable multidimensional molecular profiling in personalized medicine. *Mod Pathol* 2013; 26:1413–1424. doi: 10.1038/modpathol.2013.81 PMID: 23743930
29. Boudou-Rouquette P, Touibi N, Boëlle P-Y, Tiret E, Fléjou JF, Wendum D. Imprint cytology in tumor tissue bank quality control: an efficient method to evaluate tumor necrosis and to detect samples without tumor cells. *Virchows Arch* 2010; 456:443–447. doi: 10.1007/s00428-010-0889-5 PMID: 20191289
30. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett*. 2008; 28:1601–13. PMID: 16900335
31. Opitz L, Salinas-Riester G, Grade M, Jung K, Jo P, Emons G, et al. Impact of RNA degradation on gene expression profiling. *BMC Med Genomics* 2010; 3:36. doi: 10.1186/1755-8794-3-36 PMID: 20696062
32. Boulagnon C, Dudez O, Beaudoux O, Dalstein V, Kianmanesh R, Bouché O, et al. BRAFV600E Gene Mutation in Colonic Adenocarcinomas. Immunohistochemical Detection Using Tissue Microarray and Clinicopathologic Characteristics: An 86 Case Series. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2016; 24(2):88–96. doi: 10.1097/PAI.0000000000000157 PMID: 25710585
33. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487:330–337. doi: 10.1038/nature11252 PMID: 22810696
34. Die JV, Obrero Á, González-Verdejo CI, Román B. Characterization of the 3':5' ratio for reliable determination of RNA quality. *Anal Biochem* 2011; 419(2):336–8. doi: 10.1016/j.ab.2011.08.012 PMID: 21889484
35. Brimo F, Aprikian A, Latour M, Têtu B, Doueik A, Scarlata E, et al. Strategies for biochemical and pathologic quality assurance in a large multi-institutional biorepository; The experience of the PROCURE Quebec Prostate Cancer Biobank. *Biopreserv Biobank* 2013; 11:285–290. PMID: 24194978
36. Bao W-G, Zhang X, Zhang J-G, Zhou WJ, Bi TN, Wang JC, et al. Biobanking of fresh-frozen human colon tissues: impact of tissue ex-vivo ischemia times and storage periods on RNA quality. *Ann Surg Oncol* 2013; 20:1737–1744. doi: 10.1245/s10434-012-2440-1 PMID: 22711177
37. Musella V, Verderio P, Reid JF, Pizzamiglio S, Gariboldi M, Callari M, et al. Effects of warm ischemic time on gene expression profiling in colorectal cancer tissues and normal mucosa. *PLoS One* 2013; 8(1):e53406. doi: 10.1371/journal.pone.0053406 PMID: 23308215
38. Heumüller-Klug S, Sticht C, Kaiser K, Wink E, Hagl C, Wessel L, et al. Degradation of intestinal mRNA: a matter of treatment. *World J Gastroenterol* 2015; 21:3499–3508. doi: 10.3748/wjg.v21.i12.3499 PMID: 25834314
39. Bono A, Bianchi P, Locatelli A, Calleri A, Quarna J, Antoniotti P, et al. Angiogenic cells, macroparticles and RNA transcripts in laparoscopic vs open surgery for colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2010; 10(7):682–5. PMID: 20676027
40. Obata S, Goi T, Nakazawa T, Kimura Y, Katayama K, Yamaguchi A. Changes in CO₂ concentration increase the invasive ability of colon cancer cells. *Anticancer Res* 2013; 33(5):1881–5. PMID: 23645734

41. Krause P, Bobisch NS, Thelen P, Koehler K, Koenig S, Becker H, et al. The plasminogen activator inhibitor system in colon cancer cell lines is influenced by the CO₂ pneumoperitoneum. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26(1):37–43. doi: 10.1007/s00384-010-1062-y PMID: 20931209
42. Marra F, Steffen T, Kalak R, Warschkow R, Tarantino I, Lange J, et al. Anastomotic leakage as a risk factor for the long-term outcome after curative resection of colon cancer. *Eur J Surg Oncol* 2009; 35(10):1060–4. doi: 10.1016/j.ejso.2009.02.011 PMID: 19303243
43. Lipska MA, Bissett IP, Parry BR, Merrie AE. Anastomotic leakage after lower gastrointestinal anastomosis: men are at a higher risk. *ANZ J Surg* 2006; 76(7):579–85. PMID: 16813622
44. Bakker IS, Grossmann I, Henneman D, Havenga K, Wiggers T. Risk factors for anastomotic leakage and leak-related mortality after colonic cancer surgery in a nationwide audit. *Br J Surg* 2014; 101(4):424–32. doi: 10.1002/bjs.9395 PMID: 24536013
45. Auer H, Mobley JA, Ayers LW, Bowen J, Chuaqui RF, Johnson LA, et al. The effects of frozen tissue storage conditions on the integrity of RNA and protein. *Biotech Histochem* 2014; 89:518–528. doi: 10.3109/10520295.2014.904927 PMID: 24799092
46. Hong SH, Baek HA, Jang KY, Chung MJ, Moon WS, Kang MJ, et al. Effects of delay in the snap freezing of colorectal cancer tissues on the quality of DNA and RNA. *J Korean Soc Coloproctol* 2010; 26:316–323. doi: 10.3393/jksc.2010.26.5.316 PMID: 21152133
47. Bray SE, Paulin FEM, Fong SC, Baker L, Carey FA, Levison DA, et al. Gene expression in colorectal neoplasia: modifications induced by tissue ischaemic time and tissue handling protocol. *Histopathology* 2010; 56:240–250. doi: 10.1111/j.1365-2559.2009.03470.x PMID: 20102403
48. Ho-Pun-Cheung A, Cellier D, Lopez-Crapez E. [Considerations for normalisation of RT-qPCR in oncology]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2008; 66:121–129.
49. Spruessel A, Steimann G, Jung M, Lee SA, Carr T, Fentz AK, et al. Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *Biotechniques* 2004; 36:1030–1037. PMID: 15211754
50. Gallego Romero I, Pai AA, Tung J, Gilad Y. RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. *BMC Biol* 2014; 12:42. doi: 10.1186/1741-7007-12-42 PMID: 24885439
51. Andreasson A, Kiss NB, Juhlén CC, Höög A. Long-term storage of endocrine tissues at –80°C does not adversely affect RNA quality or overall histomorphology. *Biopreserv Biobank* 2013; 11:366–370. PMID: 24475321
52. Sandusky GE, Teheny KH, Esterman M, Hanson J, Williams SD. Quality control of human tissues—experience from the Indiana University Cancer Center-Lilly Research Labs human tissue bank. *Cell Tissue Bank* 2007; 8:287–295. PMID: 17387635
53. Smits AJ, Kummer JA, de Bruin PC, Bol M, van den Tweel JG, Seldenrijk KA et al. The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate. *Mod Pathol* 2014; 27:168–174. doi: 10.1038/modpathol.2013.134 PMID: 23887293
54. Brimo F, Sircar K, Chevalier S, Saad F, Lacombe L, Tétu B, et al. Banking of fresh-frozen prostate tissue using the alternate mirror image protocol: methods, validation, and impact on the pathological prognostic parameters in radical prostatectomy. *Cell Tissue Bank* 2012; 13:631–638. doi: 10.1007/s10561-011-9284-y PMID: 22200970
55. Sircar K, Gaboury L, Ouadi L, Mecteau M, Scarlata E, Saad F, et al. Isolation of human prostatic epithelial plasma membranes for proteomics using mirror image tissue banking of radical prostatectomy specimens. *Clin Cancer Res* 2006; 12:4178–4184. PMID: 16857789
56. Havelund BM, Olsen DA, Andersen RF, Spindler KL, Brandslund I, Jakobsen A, et al. The influence of tissue ischemia on biomarker expression in colorectal cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2013; 21:298–307. doi: 10.1097/PAI.0b013e31826f4475 PMID: 23060299
57. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000; 157:411–421. PMID: 10934146



S1 Fig. 3' and 5'B2M housekeeping gene amplification compared to RQI.

3' and 5'B2M housekeeping gene amplification by PCR in exponential phase (21 cycles) using 3' and 5'B2M primers respectively after oligodT primed reverse transcription (top panel) and quantification by densitometry of the 3'5' ratio (%3'5') according to the RQI of RNA (lower panel). RNA with a 9.1 RQI was used as positive control. mRNA integrity is definitively correlated to RQI level, and RQI<5 is not suitable for RT-qPCR analysis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154326.s001>

(TIFF)

Manuscrit 3

LRP1 expression in colon cancer predict clinical outcome

Boulagnon-Rombi C, Schneider C, Leandri C, Jeanne A, Grybek V, Marchal Bressenot A, Barbe C, Marquet B, Nasri S, Coquelet C, Fichel C, Bouland N, Bonnomet A, Kianmanesh R, Lebre A-S, Bouche O, Diebold M-D, Bellon G, Dedieu S.

Submitted 2017 May 11 Oncotarget. Manuscript number #031924

Contexte scientifique

Le cancer colorectal (CCR) est un problème de santé publique majeur en France et dans le monde. Le CCR est le troisième cancer le plus fréquent et le quatrième cancer pour la mortalité. La classification TNM est la seule classification utilisée pour décider du traitement des patients et évaluer ces traitements dans des groupes de patients homogènes. Cependant, à stade égal, tous les patients n'ont pas le même pronostic. Actuellement, les CCR ont relativement peu de biomarqueurs pronostiques et prédictifs. Les marqueurs moléculaires utilisés en pratique courante sont l'instabilité des microsatellites (MSI), le statut *RAS* et la mutation *BRAFV600E*. Le statut mutationnel *RAS* est utilisé pour guider les décisions thérapeutiques chez les patients atteints de CCR métastatiques. L'instabilité des microsatellites et le statut mutationnel *BRAF* sont des indicateurs pronostiques utiles à la décision thérapeutique. Cependant, ces paramètres sont encore insuffisants pour la prédiction pronostique au niveau individuel. Par conséquent, d'autres biomarqueurs qui permettent de mieux stratifier les groupes de pronostic des patients pour améliorer les stratégies thérapeutiques sont nécessaires.

LRP1 (*low density lipoprotein-receptor related protein 1*), est un récepteur d'endocytose membranaire ubiquitaire multifonctionnel qui appartient à la famille des récepteurs LDL. Ce récepteur est impliqué dans la régulation de la protéolyse matricielle et dans la modulation de certaines voies de signalisation. De nombreuses études ont suggérées que LRP1 avait un rôle important dans la régulation de la croissance et de la progression tumorale. Cependant, le rôle de LRP1 varie d'un type de tumeur à l'autre. Son rôle dans les cancers a majoritairement été étudié *in vitro* ou *in vivo*. Peu d'études cliniques ont évalué son rôle pronostique dans des cohortes de patients mais ont tout de même permis de confirmer son rôle pronostique, notamment dans les cancers du poumon ou du foie. L'expression de LRP1 a très peu été étudiée dans les cancers du côlon et uniquement sur de très petites séries de cas. L'impact clinique et pronostique de l'expression de LRP1 dans les cancers coliques et son association à un profil moléculaire ou morphologique particulier n'a pas encore été étudié à ce jour. De plus, les mécanismes génétiques et épigénétiques impliqués dans la régulation de l'expression de LRP1 dans les cancers du côlon ne sont à ce jour pas connus.

Le but de ce travail est de décrire l'expression de LRP1 dans les tissus coliques sains et adénocarcinomateux dans une cohorte de patient et de déterminer les paramètres clinico-pathologiques et moléculaires associés à cette expression ainsi que sa valeur pronostique.

Principaux résultats

L'étude de l'expression de l'ARNm et immunohistochimique de LRP1 déterminée dans des échantillons d'adénocarcinome et de muqueuse colique appariés, ainsi que dans les cellules stromales et tumorales obtenues après microdissection laser a montré que LRP1 était sous exprimé dans les cellules d'adénocarcinome colique par rapport à la muqueuse saine et par rapport aux cellules stromales. Le score d'expression immunohistochimique de LRP1 dans les cellules tumorales était corrélé à l'expression de l'ARNm de LRP1 dans les cellules tumorales obtenues après microdissection mais pas à l'expression de l'ARNm dans les échantillons tumoraux complets non microdisséqués.

Dans les adénocarcinomes coliques de notre cohorte ($n=307$) et de la cohorte du TCGA ($n=212$), la faible expression immunohistochimique dans les cellules malignes et la faible expression de l'ARNm de LRP1 dans les échantillons tumoraux étaient fortement associées à une localisation colique droite, la présence d'une mutation BRAFV600E et au phénotype hyperméthylateur (CIMP-H). Des associations moins fortes (analyse univariée seulement) ont été observées entre la faible expression immunohistochimique dans les cellules malignes et la faible expression de l'ARNm de LRP1 dans les échantillons tumoraux et la présence d'une instabilité des microsatellite (MSI-H) et la perte d'expression du marqueur de différenciation intestinale CDX2.

Dans notre cohorte, la faible expression immunohistochimique de LRP1 dans les cellules tumorales était prédictive d'une survie globale réduite, particulièrement en cas de CCR métastatique. L'utilisation de la thérapie ciblée anti-VEGF (bevacizumab) chez les patients en stade métastatique n'apportait pas de bénéfice en terme de survie en cas de faible expression immunohistochimique de LRP1 dans les cellules tumorales.

La présence d'une mutation dans le gène *LRP1* observée dans 6% des cas de la cohorte du TCGA était associée à une diminution de l'expression de l'ARNm de LRP1. Les mutations de *LRP1* était plus fréquente dans les cancers MSI-H, *BRAF* mutés et CIMP-H. Dans cette cohorte, comme dans la nôtre, le niveau de méthylation du gène LRP1 était très faible et n'était pas corrélé aux niveaux d'expression de l'ARNm de LRP1. Dans notre cohorte, le niveau de méthylation globale du génome évalué par le pourcentage de méthylation de LINE1 n'était pas non plus corrélé au niveau d'expression de l'ARNm de LRP1.

L'expression du micro-ARN miR-205 tendait à stimuler l'expression de l'ARNm de LRP1.

Conclusion

LRP1 est sous exprimé dans les cellules malignes comparé aux cellules du stroma tumoral et aux cellules coliques saines. Cette baisse d'expression est associée à un profil clinico-pathologique et moléculaire particulier du cancer et à un un mauvais pronostic particulièrement en cas de cancer au stade métastatique.

La baisse d'expression de LRP1 est en partie expliquée par la présence de mutation du gène *LRP1* survenant plus fréquemment dans le sous-type hypermuté de cancer colique.

Les modifications épigénétiques comme la méthylation et la régulation par le micro-ARN n'influencent pas l'expression de LRP1 de façon significative.

Research Paper: Pathology

Title:

LRP1 expression in colon cancer predicts clinical outcome

Authors:

Boulagnon-Rombi C (1,2), Schneider C (2,3), Leandri C (4), Jeanne A (3,5), Grybek V (6), Marchal Bressenot A (2), Barbe C (7), Marquet B (1), Nasri S (8), Coquelet C (8), Fichel C (1), Bouland N (1), Bonnomet A (9), Kianmanesh R (10), Lebre A-S (6), Bouche O (4), Diebold M-D (1,2), Bellon G (2,11), Dedieu S (2,3).

Affiliations:

(1) Laboratoire de Biopathologie, Centre Hospitalier Universitaire et Faculté de Médecine, Reims, France ; (2) CNRS UMR 7369, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, MEDyC, Reims, France ; (3) Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus Moulin de la Housse, Reims, France ; (4) Service de Gastro-entérologie et Cancérologie Digestive, Centre Hospitalier Universitaire, Reims, France ; (5) SATT Nord, Lille, France ; (6) Laboratoire de Génétique, Centre Hospitalier Universitaire, Reims, France ; (7) Unité d'Aide Méthodologique, Centre Hospitalier Universitaire, Reims, France ; (8) CRB Tumorothèque de Champagne-Ardenne, Reims, France ; (9) Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France ; (10) Service de Chirurgie Digestive, Centre Hospitalier Universitaire, Reims, France ; (11) Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire, Reims, France.

Contact information:

Dr. Camille Boulagnon-Rombi
Department of Biopathology
Academic Hospital,
45, rue du Général Koenig,
51100 Reims, France
Tel: +33.(0)326.78.43.00 ; Fax: +33.(0)326.78.43.11
Mail: camille.boulagnon@gmail.com

Keywords: Colorectal cancer, LRP1, miR-205, BRAF, microsatellite instability

6 Figures

5 Tables

Abstract

LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1), a multifunctional endocytic receptor, has recently been identified as a hub within a biomarker network for multi-cancer clinical outcome prediction. As its role in colon cancer has not yet been characterized, we here investigate the relationship between LRP1 and outcome.

Materials and Methods: *LRP1* mRNA expression was determined in colon adenocarcinoma and paired colon mucosa samples, as well as in stromal and tumor cells obtained after laser capture microdissection. Clinical potential was further investigated by immunohistochemistry in a population-based colon cancer series (n = 307). *LRP1* methylation, mutation and miR-205 expression were evaluated and compared with LRP1 expression levels.

Results: *LRP1* mRNA levels were significantly lower in colon adenocarcinoma cells compared with colon mucosa and stromal cells. Low LRP1 immunohistochemical expression in adenocarcinomas was associated with higher age, right-sided tumor, loss of CDX2 expression, Annexin A10 expression, CIMP-H, MSI-H and *BRAFV600E* mutation. Low LRP1 expression correlated with poor clinical outcome, especially in stage IV patients. While LRP1 expression was downregulated by *LRP1* mutation and low miR-205 expression, *LRP1* promoter was never methylated.

Conclusion: Loss of LRP1 expression is associated with worse colon cancer outcomes. Mechanistically, *LRP1* mutation and miRNA regulation modulate LRP1 expression.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer diagnosed worldwide in men and the second in women. Despite advances in screening, diagnosis and management of the disease, it remains the fourth cancer in terms of mortality. Metastatic disease ultimately occurs in approximately 50-70% of patients presenting colorectal cancer [1-3]. UICC staging is the only prognostic classification used in clinical practice to select patients for adjuvant chemotherapy [4]. Currently, CRC has relatively few established biomarkers to predict patient outcome. Molecular markers include microsatellite instability (MSI), *RAS* and *BRAF* mutation. *RAS* and *BRAF* mutation status are used to guide therapeutic decisions in metastatic CRC patients. CRC with *RAS* or *BRAF* mutations are unlikely to respond to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody therapy [5-7]. Patients with nonhereditary MSI tumors have better prognosis than those with microsatellite stable (MSS) tumors [1,2,8-10], and MSI is currently implemented in clinical guidelines as a prognostic biomarker, especially in stage II CRC patients [11]. However, these histomolecular parameters hardly apprehend the disease heterogeneity and are insufficient for recurrence and prognostic prediction in an individual patient. Therefore, robust biomarkers that can stratify patient prognosis groups and improve treatment strategies are urgently needed.

The low-density lipoprotein receptor (LDLR)-related protein-1 (LRP1), a member of LDLR family, is a large multifunctional endocytic cell surface receptor, which is ubiquitously expressed [12,13]. This large transmembrane receptor recognizes numerous ligands, therefore regulating a wide range of biological functions. It both acts as a signaling and clearance receptor. The biological activity of LRP1 was initially characterized as a clearance receptor for chylomicron remnants and complexes of α_2 -macroglobulin with proteinases [14]. Subsequent work has revealed that this receptor regulates the cell ability to respond to growth factors, to interact with extracellular matrix, as well as to respond to perturbations that occur within the microenvironment [15-18]. Numerous studies have suggested a role for LRP1 in regulation of tumor growth and progression. LRP1 has recently been identified as a hub within a biomarker network for multi-cancer clinical outcome prediction [19]. However, the role of LRP1 varies from one tumor type to another. Indeed, several studies have reported that low expression of LRP1 was closely related to advanced tumor stages and poor survival in several solid tumors, such as hepatocellular carcinoma [20], lung adenocarcinoma [21] melanoma [22] and Wilms tumors [23]. On the contrary, high LRP1 expression was related to advanced tumor stages in endometrial carcinoma [24], breast cancer [25] and prostate carcinomas [26]. Using *in vitro* models, it has been demonstrated that LRP1 neutralization could abrogate cell motility in both tumor and non-tumor cells, and this despite an increase in pericellular proteolytic activities of several extracellular proteases such as MMP2 (Matrix Metalloproteinase 2), MMP9 and uPA (urokinase Plasminogen Activator) [20,27]. On the other hand, LRP1 silencing prevents spread of glioblastoma cells [28]. Therefore, LRP1 influence on tumor cell migration and invasion likely depends on the tumor cell type and the specific extracellular proteins involved in these processes [29].

In CRC, little is known about LRP1 and its putative function. Previous studies on few colon adenocarcinomas samples showed a frequent loss of LRP1 immunohistochemical expression in adenocarcinomatous cells [30,31]. To further expand our knowledge on the relevance of considering LRP1 expression in colon cancer, we analyzed LRP1 expression level and distribution in a series of 307 colon cancers with follow-up data. We then determined whether LRP1 expression is linked to clinical characteristics and outcomes while analyzing the role of miRNA expression, *LRP1* mutation and methylation in LRP1 expression profile.

Results

Patients and clinicopathological features

In total, 307 patients were included in our study. The population comprised 174 (57%) men and 133 (43%) women, whose mean age was 71 years (\pm 11 years). Tumors were right-sided in 136 cases (44%) and left-sided in 171 cases (56%). Follow-up data were available for all except 12 patients. The mean follow-up time was 43 months (\pm 32 months). Clinicopathological features of the cohort are detailed in Table 1.

LRP1 is lower expressed in adenocarcinomas cells compared with normal colon mucosa and stromal cells

LRP1 mRNA expression analyses by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) on 192 adenocarcinoma samples and 105 colon samples with RQI values ≥ 5 showed a 4.8-fold decrease in *LRP1* expression within tumor samples when compared with normal colon samples (Figure 1A and B). *LRP1* was overexpressed when compared with paired normal colon samples in only 9/85 adenocarcinoma cases (10,6% ; data not shown).

To distinguish *LRP1* mRNA expression of malignant and stromal cells, LCM were performed on available fresh frozen samples of 32 colon adenocarcinomas. LCM analyses revealed that *LRP1* mRNA expression was 5.1-fold lower in adenocarcinoma cells than in stromal cells (Figure 1C and D).

To describe *LRP1* distribution in colon tissues, immunohistochemical (IHC) analyses were performed on paired normal colon mucosa samples ($n=117$) and colon adenocarcinomas ($n=307$). In colon mucosa, epithelial cells expressed *LRP1* in 86% cases (101/117). In the majority (85/101) of these cases, *LRP1* expression was limited to surface epithelium (Figure 1E). Some fibroblasts of the lamina propria expressed *LRP1* (Figure 1F). In adenocarcinoma, *LRP1* was expressed in malignant cells in 244/307 (79%) of the cases. The mean IHC tumor score was 6.22 ± 3.62 . In these adenocarcinoma samples, stromal fibroblasts expressed *LRP1* in all cases (Figures 1G-J). The mean IHC stroma score was 10.82 ± 2.44 . *LRP1* was never found expressed in stromal lymphocytes (Figure 1I). Immunohistochemical expression of *LRP1* was inversely correlated in malignant and stromal cells ($p=0.0003$; $R^2=0.04$). We didn't find a difference of IHC scores between the center and the invasive front of the adenocarcinomas for both tumor and stromal cells.

Tumor IHC scores were not correlated with *LRP1* mRNA expression levels of whole adenocarcinoma samples ($p = 0.10$; $R^2 = 0.02$) (Figure 1K) but were correlated with *LRP1* mRNA expression in tumor cells obtained after LCM ($p = 0.003$; $R^2 = 0.28$) (Figure 1L).

Furthermore, IHC analyses performed on 14 conventional adenomas (8 low-grade, 6 high-grade) revealed that *LRP1* IHC score was significantly higher in adenomas cells when compared with adenocarcinomas cells (data not shown), and this whatever the grade.

Adenocarcinomas with low LRP1 immunohistochemical expression have a distinct clinicopathological and molecular phenotype

Relationship between clinico-pathological and molecular parameters with LRP1 immunohistochemical score in malignant and stromal cells were evaluated in our cohort. As detailed in Table 2, colon adenocarcinomas with low tumor IHC score were associated on univariate analyses with female gender, higher age, right location, high differentiation grade, mucinous type, Annexin A10 expression, loss of CDX2 expression, MSI-H status, *BRAFV600E* mutation, absence of *KRAS* mutation and CIMP-H. On multivariate analyses low LRP1 IHC score in tumor cells was associated with right location ($p=0.0004$), MSI-H ($p=0.01$) and *BRAFV600E* mutation ($p=0.009$). Moreover IHC results on tumor cells were confirmed at the mRNA level by qRT-PCR for age ($p=0.01$), *BRAFV600E* mutation ($p=0.05$) and CIMP-H phenotype ($p<0.001$) (Figure 2 A-C).

Furthermore, low LRP1 stromal IHC score was associated on univariate analyses with younger age, UICC stage and mucinous type as detailed in Table 3. On multivariate analysis, low LRP1 stromal IHC score was associated with younger age only.

Thus, LRP1 IHC score on tumor cells was associated with peculiar clinicopathological and molecular characteristics. Despite an inverse correlation between tumor and stromal cells IHC scores, these peculiar characteristics were not found in stromal cells.

To confirm our results in an independent patients cohort, associations between *LRP1* mRNA expression levels and available clinical and molecular characteristics were studied in the TCGA cohort ($n=212$) [41]. As in our cohort, in the TCGA cohort *LRP1* mRNA expression levels were significantly lower in cases with right tumor location ($p=0.0003$), MSI-H ($p<0.0001$), *BRAF* mutation ($p=0.0015$) CIMP-H ($p<0.0001$) and low *CDX2* expression ($p<0.0001$) (Figure 2D-H). In this cohort, LRP1 mRNA expression levels were not associated with patients' gender, AnnexinA10 (*ANXA10*) expression and *KRAS* mutation.

In conclusion, low LRP1 expression is strongly associated with right tumor location, MSI-H, *BRAF* mutation and CIMP-H. These characteristics are those of the serrated subtype of colon adenocarcinoma. However, LRP1 expression levels were found correlated with expression of the serrated pathway marker, AnnexinA10, in our cohort only and exclusively on univariate analysis.

Low LRP1 immunohistochemical expression in tumor cells correlates with poor overall survival

We subsequently analyzed the relation between LRP1 expression and prognosis. As detailed in table 4, univariate analysis in our cohort revealed that age, metastatic status, histological grade, vascular invasion, perineural invasion and CDX2 expression were predictors of overall survival (OS). Low LRP1 IHC score in tumor cells (score ≤ 4) was predictor of poor OS ($p=0.003$) (Figure 3A and Table 4). Multivariate analyses practically confirmed the value of LRP1 IHC score in tumor cells as a prognosis indicator of OS ($p=0.09$).

Metastatic status, vascular invasion and *KRAS* mutation were the only independent predictors of event free survival (EFS) in our cohort (Table 4, Figure 3B).

In our cohort, *LRP1* mRNA expression levels were not correlated with OS and EFS (Table 4).

Stage specific analyses revealed that LRP1 expression was not a survival predictor of both OS and EFS in UICC stage II and III patients (data not shown). Furthermore, as detailed in table 5, in metastatic patients (stage IV, $n=76$), low LRP1 IHC score in malignant cells was an independent predictor of poor OS on univariate ($p=0.004$, Figure 3C) and multivariate ($p=0.03$) analyses.

Low LRP1 IHC score in malignant cells was predictor of progression free survival (PFS) on univariate analyses only (Table 5, Figure 3D).

Among stage IV patients from our cohort with available information on medical treatment, 48 received 5 Fluorouracil based chemotherapies (LV5FU2, 9; FOLFOX, 14; FOLFIRI, 24; FOLFIXIRI, 1). The most frequently used targeted therapy was the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) inhibitor bevacizumab (37/76), followed by the (Epidermal Growth Factor Receptor) EGFR inhibitors cetuximab (10/76) and panitumumab (7/76). In patients treated with bevacizumab ($n=37$), low LRP1 IHC score in tumor cells was associated with shorter OS (Figure 3E). However, low LRP1 IHC tumor score was not predictor for progression free survival (PFS) in these patients (Figure 3F).

To confirm our results, we performed survival analyses in the SieberSmith cohort ($n=286$) from the R2 database [42, 43]. Unexpectedly, in this cohort high *LRP1* mRNA expression was a poor prognostic predictor for EFS ($p=0.0006$) in the entire cohort (Figure 4A). Stage specific analyses in this cohort revealed that LRP1 was an indicator of EFS in stage III patients only (Figure 4B-D). In this patients group ($n=75$), high LRP1 expression was associated with shorter EFS ($p=0.006$). OS data were not available for this patient cohort.

Despite LRP1 IHC and mRNA survival analyses apparent conflicting results, LRP1 expression was found to be a strong prognosis indicator. IHC analyses allowed to distinguish LRP1 expression between malignant and stromal cells. In our cohort, LRP1 IHC score in malignant cells was a strong prognosis indicator for OS especially in stage IV patients, whereas LRP1 IHC score in stromal cells was an indicator of PFS in stage IV patients only.

Analyses of LRP1 expression regulation by mutation, methylation and micro-RNA

In order to explain the decrease of LRP1 expression in malignant cells, we analyzed genetic and epigenetic modifications that could be involved in *LRP1* expression regulation. First, mutation analysis of the TCGA cohort dataset [41] revealed *LRP1* gene mutation was rare (6%; 12/212) without hotspot mutation site (Figure 5A). Then, *LRP1* mutation was strongly associated with female gender ($p<0.0001$), right tumor location ($p=0.04$), MSI-H ($p<0.0001$) and CIMP-H status ($p=0.0006$) (Figure 5B). Besides, *LRP1* mRNA expression was lower expressed in the *LRP1* mutated group compared with *LRP1* wild type group ($p=0.003$) (Figure 5C). Hence, although infrequent, *LRP1* mutations could influence *LRP1* mRNA expression.

Due to the low rate of *LRP1* mutation, other phenomenon, such as epigenetic modifications may probably have been involved in *LRP1* expression regulation. To explore *LRP1* gene epigenetic modifications we analyzed both intronic and promoter methylation on available fresh frozen samples of 64 adenocarcinomas and 39 normal colon mucosa. Surprisingly, in all these samples *LRP1* promoter or intronic methylation levels were very low. Moreover, LRP1 mRNA expression levels and LRP1 IHC score in tumor cells were neither correlated with LRP1 intronic or promoter levels nor with global methylation evaluated by *LINE1* methylation levels (Figure 5D-F).

Available LRP1 methylation analyses from the TCGA cohort ($n=212$) [41] confirm the low level of *LRP1* gene methylation (Figure 5G). In this cohort, no correlation between *LRP1* mRNA expression and *LRP1* methylation levels were found ($p=0.08$).

Thus, *LRP1* methylation seems to be not involved in *LRP1* expression regulation.

To evaluate miRNA role, two of the most important miRNA implicated in *LRP1* expression regulation, miR-205 and miR-338-5p, were assessed on available fresh frozen samples of 49 adenocarcinomas and 29 paired normal colon mucosa. In these samples, miR-205 and miR-338-5p were significantly higher expressed in adenocarcinomas than in normal colon (Figure 6A and B). Moreover, linear regression analyses revealed that miR-205 tended to stimulate *LRP1* mRNA expression ($p=0.06$; $R^2=0.10$) (Figure 6C) but was not correlated with LRP1 IHC score in tumor cells (Figure 6D). However, there was no correlation between *LRP1* mRNA level or IHC score in tumor cells and miR-338-5p expression (Figure 6E and F).

Discussion

LRP1 has been attributed a role in cancer. Such multifunctional endocytic receptor has both endocytic and signaling activities. LRP1 expression levels are often dysregulated in cancer, but LRP1 role varies from one tumor type to another. In CRC, however the role and impact of LRP1 expression were unknown.

In this report, we made several important and previously unrecognized discoveries regarding the role of LRP1 in colon cancer. First, qRT-PCR, LCM and IHC analyses revealed that LRP1 was significantly lower expressed in adenocarcinoma cells than in normal mucosa and stromal cells. Second, analyses in two independent patient cohorts revealed that low expression of LRP1 correlated with right tumor location and peculiar molecular profile. Third, low LRP1 IHC score in tumor cells was associated with poor OS in non-metastatic colon cancer patients, and was an important prognostic and predictive factor in metastatic patients. Finally, we found that LRP1 expression could be partly regulated by *LRP1* mutation and miR-205 expression.

In our cohort of patients, LRP1 was lower expressed, both at mRNA and protein levels, in adenocarcinomas compared with normal colon mucosa and in malignant cells compared with stromal cells. In colon mucosa, we observed that LRP1 expression was restricted to surface epithelium which is the most differentiated part of the epithelium. As previously described, some cells of the lamina propria, especially myofibroblasts [30, 31], expressed LRP1. In adenocarcinomas, IHC and LCM analyses highlighted the differential expression of LRP1 between tumor and stromal cells. This loss of LRP1 expression in tumor cells and strong expression in stromal fibroblast was previously described in small cohort of CCR [30,31] and in other types of cancer such as pancreatic ductal adenocarcinoma [44] and lung adenocarcinoma [21]. These previous studies showed that this differential expression between tumor and stromal cells seems to play a role in tumor aggressivity. In pancreatic carcinomas, high stromal expression of LRP1 was correlated with a decreased activation of caspase 3 in tumor cells and increased level of SNAIL, a transcription factor promoting epithelial–mesenchymal transition and migration [44]. In CRC, high stromal expression of LRP1 was correlated with high u-PA expression in stromal cells [30]. In hepatocellular carcinoma and Wills tumor cells, the diminished expression of LRP1 in tumor cells correlated with increased levels of MMP9 probably due to the LRP1 mediated endocytosis loss [20, 23]. Thus, the differential expression of LRP1 between tumor and stromal cells might confer survival and spreading benefits for tumor cell in some tumor types including CRC.

The loss of LRP1 expression in tumor cells is partly explained by the mutation of *LRP1* gene. Indeed, we observed a loss of LRP1 immunohistochemical expression in 21% of the cases in

our cohort and mutation *LRP1* gene occurred in 6% of the TCGA cohort cases only. These *LRP1* mutated cases shared the same clinical and molecular profile as those with low LRP1 IHC score in tumor cells and low LRP1 mRNA expression: right location, MSI-H and CIMP-H. This molecular pattern corresponds to the hypermutated type of the TCGA molecular type of CRC [41]. Hypermutated-CRC had a higher mutation rate than non-hypermutated CRC [41], this being mainly due to mismatch repair system deficiency related to *MLH1* methylation. Thus, in this molecular subgroup of CRC, loss of LRP1 expression can be favored by *LRP1* gene mutation. Furthermore, hypermutated-CRC are also known as having frequent gene hypermethylation. Due to the abundance of CpG islands in *LRP1* gene promoter and frequent hypermethylation of *LRP1B*, another member of the LRP family, in various cancer types [45,46], it could be possible that *LRP1* gene methylation might regulate its expression. However, in our cohort as in the TCGA cohort, the methylation level of both intronic and promoter region of *LRP1* was very low, suggesting that epigenetic regulation by methylation was not involved in the regulation of *LRP1* expression.

We therefore investigated the role of microRNAs (miRNAs) regulation on LRP1 expression. Previous studies on vascular smooth muscle cells, glioma and lung carcinoma cells showed that expression of LRP1 was negatively regulated by a miR-205 [37, 38]. This reduced expression of LRP1 by miR-205 led to decreased tumor cell migration [37]. In colon cancer, miR-205 expression findings are conflicting. In one study [47], miR-205 was highly expressed in colon cancer than in paired normal colon. Another study found inverse results [48]. These studies also found conflicting results regarding the role of miR-205 in cell proliferation regulation [47,48]. Moreover, contrary to previous studies, we found that miR-205 tended to regulate LRP1 expression positively. Thus, miR-205 seems to regulate LRP1 expression in colon cancer but its precise role needs to be clarified.

In colon cancer, the low expression of LRP1 in tumor cells was strongly associated with right tumor location, poor differentiation, *BRAF* mutation, MSI-H and CIMP-H status in our cohort and in an independent CRC cohort. These molecular findings correspond to the hypermutated subtype of the TCGA classification [41] and the MSI-immune subtype according to the Consensus Molecular Subtype consortium [49]. These subtypes were found in several studies to be associated with serrated pathway and to have a poor prognosis, particularly after relapse [49-52]. In our cohort, low LRP1 IHC score in tumor cells was associated with poor OS particularly in metastatic (stage IV) patients. Inverse results were found in the SieberSmith cohort, in which LRP1 expression was assessed by qRT-PCR. In this cohort, low *LRP1* mRNA expression was related to better EFS. However, mRNA expression reflects combined stromal and tumor cells expression. Nonetheless, our LCM analyses showed first that LRP1 was overexpressed in stromal cells when compared with tumor cells and second that LRP1 mRNA expression in tumor cells obtained by LCM were correlated to LRP1 IHC score on tumor cells. Thus, LRP1 mRNA expression levels on whole tumor samples could reflect stromal cell expression more than tumor cell expression. Thus, *LRP1* mRNA expression results of the SieberSmith cohort cannot be completely superimposed to our IHC findings. In addition, the IHC score on tumor cells can be easily and routinely performed on formalin-fixed and paraffin embedded CRC tissue contrary to mRNA analyses, which requires high quality fresh frozen tissue. Thus, from a practical point of view, LRP1 IHC score assessed in malignant cells seems to be more informative for clinical outcome than global mRNA expression.

To date, the biologic agents that have been proven as having clinical benefits in metastatic CRC mainly target VEGF and EGFR. In particular, bevacizumab targeting VEGF and cetuximab or panitumumab targeting EGFR have demonstrated significant survival benefits in

combination with cytotoxic chemotherapy in the first-line, second-line, or salvage setting. However, recent retrospective analyses have shown that *KRAS* or *NRAS* mutations were negative predictive markers for anti-EGFR therapy [53]. The mechanisms of action of anti-VEGF are too diversified, and apart from tumor location, no predictive factor has yet been validated [54,55]. The role of *KRAS* or *NRAS* mutation for bevacizumab therapy efficiency prediction has not been defined yet [56]. In our study, in metastatic patients low LRP1 IHC score in tumor cells was an indicator of poor OS and PFS. Low LRP1 IHC score in tumor cells was also predictor of shorter OS in patients treated with bevacizumab. Thus, LRP1 immunolabelling might be a potential biomarker for bevacizumab efficiency in metastatic colon cancer patients. However, these results in metastatic patients are limited by the small number of metastatic patients treated with bevacizumab in our cohort ($n=37$) and the lack of *NRAS* status data. Nevertheless, due to our promising results, the potential predictive role of LRP1 IHC for bevacizumab benefit in metastatic CRC patient needs to be studied in larger and prospective cohorts.

In summary, in this study we showed that low LRP1 IHC expression in malignant colon adenocarcinoma cells is a strong prognosis predictor, especially in metastatic patients, in which it predicts a shorter OS in patients treated by anti-VEGF therapies. The lower expression of LRP1 in malignant cells is partly explained by *LRP1* gene mutation through the hypermutator type of CRC. Furthermore, microRNA, and particularly miR-205 seem to be partly involved in LRP1 expression regulation in colon adenocarcinoma.

Materials and Methods

Patients

The study was conducted on adult patients who underwent surgery for sporadic colon cancer in the Digestive Surgery Department of the Academic Hospital of Reims between September 2006 and December 2012. Patients with rectal cancer were excluded. All patients had given their consent for biospecimen use. The study was performed in accordance with the ethical standards laid down in the Declaration of Helsinki. Written patients' consent for biospecimen use was obtained in all cases. Approval for the study was previously obtained from the local Institutional Review Board and the Tissue Bank Management Board. Study design was published on clinicaltrials.gov web site in May 2016 (#NCT02788669).

Clinical data including age at the time of surgery, sex, performance status, surgical circumstances (tumour perforation, occlusion), tumor localization, synchronous or metachronous metastases, tumor recurrence, treatment, death and pathological and molecular data including adenocarcinoma type, grade and pTNM stage were collected. Mismatched repair (MMR) status of tumors was performed by immunohistochemistry with anti MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 proteins on tissue micro arrays, completed when necessary by microsatellite instability analysis, as already reported [32]. Mutations within exon 2 of *KRAS* and of the codon 600 of *BRAF* were detected as previously described [32]. Follow-up data were obtained from oncologist or attending physicians.

Pathology

All colon adenocarcinomas were classified and subtyped according to The World Health Organization criteria [1] and staged according to the International Union Against Cancer 2009 guidelines [4]. All slides were retrieved from the archives of the Department of Pathology of the Academic Hospital of Reims and were reviewed and classified by two pathologists (CB-R and MDD). Tumor budding was assessed on Hematoxylin-Eosin-Saffron slides as previously described [33].

Immunohistochemistry

All tissue samples were analyzed *via* tissue microarrays. For each tumor, 3 cores were punched in the central part and 3 cores at the invasive front of the tumor from the same original formalin-fixed paraffin-embedded tumor block. The cores were precisely arrayed into a recipient paraffin block using the MiniCore Tissue Arrayer (Excilone, Elancourt, France). Sections of 4- μ m thickness were cut and mounted on SuperFrost Plus Gold adhesive slides (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Immunohistochemistry using anti-LRP-1 α -chain (1/1000, mouse, clone 8G1, Merck, Darmstadt, Germany), and control isotype mouse IgGs (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), was performed using Novolink Polymer Detection System (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) after heat-induced epitope retrieval in citrate pH 6 buffer (95°C, 40 min) and overnight antibody incubation at 4°C.

Staining intensity (SI) was graded by two pathologists (CB-R, AMB) as 0 (negative), 1 (weak), 2 (moderate) and 3 (strong). The percentage of positive cells (PPC), was graded as follows: 0 (< 5%), 1 (5-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) and 4 (76-100%). In case of discrepancies a consensus diagnosis was reached. Then, an immunostaining score was generated independently for malignant and stromal cells of each case by multiplying SI and PPC. The median score was used to distinguish low (0-4) and high (6-12) LRP1 expression levels for adenocarcinomatous cells.

Additionally, immunohistochemistry for the intestinal differentiation marker CDX2 [34] (RTU, rabbit monoclonal, clone EPR2764Y, Zytomed System, Berlin, Germany) and the marker of serrated subtype of adenocarcinoma Annexin A10 [35] (1/400, rabbit polyclonal, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) were performed with the BenchMark XT automated slide stainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Antibody retrieval was performed with Cell Conditioner 1 (EDTA, pH 8.4) incubation for 64 minutes, followed by preprimary peroxidase inhibition, and incubation with the corresponding antibody at 37°C for 32 minutes. UltraView Universal DAB v3 Kit (Ventana Medical Systems) was used for staining reaction. For all immunohistochemistry, the counterstain used was hematoxylin. Staining was rated binarily as either positive or negative for these 2 markers by the same pathologists. All tumors in which the tumor cells completely lacked immunostaining were scored as negative. Cases were rated as positive when the tumor cells were unequivocally stained in the nucleus.

LRP1 mRNA analyses

mRNA analyses were performed on fresh frozen colon adenocarcinoma and normal colon tissues sampled on colectomies received at the Pathology Department of Reims University Hospital (France) and stored in the Champagne Ardenne Biobank as previously described [36]. Total RNAs were isolated and purified with Maxwell® 16 LEV simply RNA tissue kit (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions on the Promega's robotics platform Maxwell® 16 Research Instrument (Promega, Madison, USA). The concentration of total RNA (ng/μL) was determined by a Picodrop uL spectrophotometer (Picodrop, Hinxton, United Kingdom).

RNA quality index (RQI) was determined using the Experion™ automated electrophoresis system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer protocol. Only RNA with RQI values ≥ 5 were used for further analyses.

RNA were reverse-transcribed using VERSO cDNA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions using random hexamer primers. Real-time PCR was performed using an Absolute SYBR Green Rox mix (Thermo Fisher Scientific), on a CFX 96 real time PCR detection system (Bio-Rad). *RS18* and *RPL32* were used for *LRP1* expression normalization. The sequences of the pairs of primers used were: *LRP1* (5' – AGA AGT AGC AGG ACC AGA GGG – 3' and 3' – TCA GTA CCC AGG CAG TTA TGC - 5'), *RS18* (5'- GCA GAA TCC ACG CCA GTA CAA -3' and 3' – GCC AGT GGT CTT GGT GTG CT – 5') and *RPL32* (5' – CAT TGG TTA TGG AAG CAA CAA A - 3' and 3' – TTC TTG GAG GAA ACA TTG TGA G - 5'). All primers were synthesized by Eurogentec (Eurogentec, Liège, Belgium). PCR conditions were set as 15 min at 95°C, followed by 40 cycles each consisting of 15 s at 95°C (denaturation) and 1 min at 60°C (annealing/extension). The specificity of PCR amplification was checked using a heat dissociation curve from 65°C to 95°C following the final cycle. The cycle threshold (Ct) values were recorded with Bio-Rad CFX Manager™ 3.0 software (Bio-Rad).

Laser capture microdissection

Fresh frozen colon adenocarcinoma specimens were cut into 12 µm serial sections and mounted on PALM membrane slides (Zeiss, Oberkochen, Germany). The slides were immediately stained with cresyl violet from the LCM staining kit (Thermo Fischer Scientific) and laser capture microdissection (LCM) was performed immediately thereafter. Adenocarcinomatous and stromal areas were selected during the LCM procedure by a pathologist (CB-R). Laser capture microdissection was performed with the PALM MicroBeam instrument (Zeiss). At least 5 mm² of tumor tissue or stromal tissue were collected from each sample. This required from nine to twelve 12 µm sections.

RNAs from tumor and stromal microdissected tissues were isolated and purified with the RNeasy micro kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured using NanoDrop system (Thermo Fisher Scientific). RT-PCR analyses were performed as detailed above.

miRNA analyses

miRNA were extracted from fresh frozen colon adenocarcinoma and normal colon tissues using miRNeasy mini kit (Qiagen) according to manufacturer's instruction. RNA concentrations were measured using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). cDNA was synthesized using miScript II RT Kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions.

Expression of miR-205 and miR-338-5p was determined by real time PCR using an Absolute SYBR Green Rox mix (Thermo Fisher Scientific), on a CFX 96 real time PCR detection system (Bio-Rad) and normalized using U6 small nuclear RNA. miR-205 is known to down-regulate *LRPI* expression [37, 38]. miR-338-5p is not implicated in *LRPI* expression regulation and was used as control as previously described [38]. All primers were purchased as 10x miScript Primer Assay (Qiagen). PCR conditions were 15 min at 95°C, followed by 40 cycles each consisting of 15 s at 95°C (denaturation), 30 s at 55°C (annealing) and 30 s at 70°C (extension). The specificity of PCR amplification was checked using a heat dissociation curve from 65°C to 95°C following the final cycle. The cycle threshold (Ct) values were recorded with Bio-Rad CFX Manager™ 3.0 software (Bio-Rad).

Methylation analyses

All methylation analyses were performed on DNA extracted from fresh frozen tissues with the QIAamp DNA microkit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Bisulfite conversion was performed with the EZ DNA Methylation gold kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) following manufacturer's instructions.

The CpG island methylator phenotype (No CIMP, CIMP-Low and CIMP-High) was determined by Methylation Sensitive High Resolution Melting for 5 markers (*MLH1*, *CDKN2A*, *MINT1*, *MINT2*, and *MINT31*) on the LightCycler 480 II High Resolution Melting instrument (Roche, Pleasanton, CA, USA). All primers were synthesized by Eurogentec (Eurogentec). No-CIMP status was defined as no methylated locus, CIMP-Low status as one to three methylated loci, and CIMP-High status as four or five methylated loci as previously described [39].

LINE-1 methylation analyses were performed by pyrosequencing analysis using the Pyromark Q96MA instrument (Qiagen) as previously described [40]. The average *LINE-1* methylation level was calculated as the mean of the proportions of C (%) at the 3 CpG sites analyzed and this indicated the level of methylation of *LINE-1* elements.

LRP1 methylation analyses were performed by pyrosequencing using the Pyromark Q96MA instrument (Qiagen). Promoter and intronic region of *LRP1* were amplified from bisulfited DNA using commercially available primers (Hs_LRP1_01_PM for intronic region, Hs_LRP1_02_PM for promoter region, Qiagen) for PCR amplification and pyrosequencing. PCR amplifications were performed using PyroMark PCR kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Methylated and unmethylated converted and unmethylated unconverted controls from the EpiTect PCR Control DNA Set (Qiagen) were used for each experiment. Each experiment was performed in duplicate.

Data mining and bioinformatic analyses

Mutation and expression data from the colorectal carcinoma dataset of the The Cancer Genome Atlas (TCGA; <https://tcga-data.nci.nih.gov>) [41] were analyzed using cBioportal for Cancer Genomics (<http://cbioportal.org>) web resources [42, 43].

Publicly available SieberSmith gene expression dataset was obtained from R2 microarray analysis and visualization platform (<http://r2.amc.nl>), and used for survival analyses. Cut-off value for separating high and low *LRP1* expression groups was determined by the online algorithm.

Statistical and survival analyses

Data are here described using mean and standard deviation for quantitative variables and number and percentage for qualitative variables. Factors associated with mRNA and immunohistochemical expression of LRP1 were studied using univariate analysis (Chi² test, Fisher's exact test, Student's *t* test, linear regression or Wilcoxon test, as appropriate) and multivariate analysis (linear regression with stepwise selection, with an exit threshold of 0.10 and factors significant at $p=0.10$ included). Overall and event-free survivals were studied. The survival curves were established by the Kaplan-Meier method. For each analysis, prognostic factors were identified by univariate analysis using log rank tests and by multivariate analysis using a Cox proportional hazard model. Factors significant at the 0.10 level in univariate analysis were included in a stepwise regression multivariate analysis with entry and removal limits set at 0.10. Statistical analyses were performed with SAS version 9.4 (SAS institute Inc, Cary, North California). For all tests, $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Abbreviations

CIMP-H: High CpG Island Methylator phenotype; CRC: Colorectal Carcinoma; EGFR: Epidermal Endothelial Growth Factor; IHC: Immunohistochemistry; LCM: Laser capture microdissection; MSI-H: High Microsatellite instability; MSS: Microsatellite stable; TCGA: The Cancer Genome Atlas; UICC: Union Internationale contre le cancer; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

Author Contributions

Conception or design of the work: CBR, CS, OB, MDD, GB, SD

Data collection: CBR, CL, SN, CC, CF, NB

Data analysis and interpretation: CBR, CS, AJ, VG, AMB, CB, BM, AB, ASL

Drafting the article: CBR, CS, AJ, VG, CB

Critical revision of the article: CS, AJ, AMB, MDD, SD

Final approval of the version to be published: AMB, MDD, RK, ASL, OB, GB, SD

Acknowledgments

We thank Mrs Arlette Thomachot for her valuable editing assistance.

We thank Doctors Benjamin Tournier and Caroline Chapusot from the Pathology Department of the University Hospital of Dijon, France for their help in methylation analyses. We thank the Image Core Facility (PICT) of the University of Reims Champagne Ardenne and the Regional Plateform of Innovative Biology (PRBI) for their excellent technical assistance.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no further financial or other conflicts of interest in relation to this research and its publication.

Funding

This study was funded by grants from:

1. Ligue Nationale Contre le Cancer Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est, Appel d'Offre 2014 et 2015. Grant Numbers 61/2014/KM/ML/Recherche and 2015/KM/NM/PFRS/232 (SD).

2. Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Appel d'Offre Local 2014 et 2015. Grant Numbers AU14-03 and AOL 2015-11 (CB-R).

3. Centre National de Recherche Scientifique.

All these study sponsors have no roles in the study design, in the collection, analysis, and interpretation of data.

References

1. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, Ilyas M, Morreau H, Nakamura S-I, « Quirke P, Riboli E, Sobin LH, authors. Carcinoma of the colon and rectum. In: WHO classification of tumours of the digestive system. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND eds. Lyon, France: IARC Press; 2010. pp.132–146.
2. Stewart BW, Wild CP. World cancer report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization; 2014.
3. Ronnekleiv-Kelly SM, Burkhart RA, Pawlik TM. Molecular markers of prognosis and therapeutic targets in metastatic colorectal cancer. *Surg Oncol*. 2016;25(3):190-9.
4. Colon and Rectum. In: TNM Classification of Malignant Tumours, 7th edition. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C eds. Chichester, West Sussex: Blackwell Publishing Ltd; 2010. pp.100–105.
5. Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(5): 1745–55.
6. Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 149014.
7. Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, Richman S, Chambers P, Seymour M, Kerr D, Gray R, Quirke P. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:1261-70.
8. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2005;23:609–18.
9. Bertagnolli MM, Redston M, Compton CC, Niedzwiecki D, Mayer RJ, Goldberg RM, Colacchio TA, Saltz LB, Warren RS. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomal location 18q: prospective evaluation of biomarkers for stages II and III colon cancer--a study of CALGB 9581 and 89803. *J Clin Oncol*. 2011;29(23):3153-62.
10. Gray RG, Quirke P, Handley K, Lopatin M, Magill L, Baehner FL, Beaumont C, Clark-Langone KM, Yoshizawa CN, Lee M, Watson D, Shak S, Kerr DJ. Validation study of a quantitative multigene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for assessment of recurrence risk in patients with stage II colon cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(35):4611-9.
11. Duffy MJ, Lamerz R, Haglund C, Nicolini A, Kalousova M, Holubec L, Sturgeon C. Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers (EGTM) 2014 guidelines update. *Int J Cancer*. 2014;134:2513–22.
12. Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev*. 2008;88(3):887-918.

13. Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest.* 2001;108(6):779–84.
14. Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS. Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem.* 1990;265(29): 17401–4.
15. Van Gool B, Dedieu S, Emonard H, Roebroek AJ. The Matricellular Receptor LRP1 Forms an Interface for Signaling and Endocytosis in Modulation of the Extracellular Tumor Environment. *Front Pharmacol.* 2015;6:271.
16. Gonias SL, Campana WM. LDL receptor-related protein-1: a regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer, and injury to the nervous system. *Am J Pathol.* 2014;184(1):18-27.
17. Xing P, Liao Z, Ren Z, Zhao J, Song F, Wang G, Chen K, Yang J. Roles of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in tumors. *Chin J Cancer.* 2016;35:6.
18. Langlois B, Emonard H, Martiny L, Dedieu S. [Multiple involvements of LRP-1 receptor in tumor progression]. *Pathol Biol (Paris).* 2009;57(7-8):548-54.
19. Martinez-Ledesma E, Verhaak RG, Treviño V. Identification of a multi-cancer gene expression biomarker for cancer clinical outcomes using a network-based algorithm. *Sci Rep.* 2015;5:11966.
20. Huang XY, Shi GM, Devbhandari RP, Ke AW, Wang Y, Wang XY, Wang Z, Shi YH, Xiao YS, Ding ZB, Dai Z, Xu Y, Jia WP, et al. Low level of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 predicts an unfavorable prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *PLoS One.* 2012;7(3):e32775.
21. Meng H, Chen G, Zhang X, Wang Z, Thomas DG, Giordano TJ, Beer DG, Wang MM. Stromal LRP1 in lung adenocarcinoma predicts clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2011;17(8):2426-33.
22. de Vries TJ, Verheijen JH, de Bart AC, Weidle UH, Ruiter DJ, van Muijen GN. Decreased expression of both the low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha(2)-macroglobulin receptor and its receptor-associated protein in late stages of cutaneous melanocytic tumor progression. *Cancer Res.* 1996;56(6):1432-9.
23. Desrosiers RR, Rivard ME, Grundy PE, Annabi B. Decrease in LDL receptor-related protein expression and function correlates with advanced stages of Wilms tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2006 ;46(1): 40–9.
24. Catasús L, Llorente-Cortés V, Cuatrecasas M, Pons C, Espinosa I, Prat J. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) is associated with highgrade, advanced stage and p53 and p16 alterations in endometrial carcinomas. *Histopathology.* 2011;59(3):567-71.
25. Catasús L, Gallardo A, Llorente-Cortés V, Escuin D, Muñoz J, Tibau A, Peiro G, Barnadas A, Lerma E. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is associated with

proliferation and invasiveness in Her-2/neu and triple-negative breast carcinomas. *Hum Pathol.* 2011;42(11):1581-88.

26. McGarvey T, Hussain MM, Stearns ME. In situ hybridization studies of alpha 2-macroglobulin receptor and receptor-associated protein in human prostate carcinoma. *Prostate.* 1996;28(5):311-17.

27. Dedieu S, Langlois B, Devy J, Sid B, Henriot P, Sartelet H, Bellon G, Emonard H, Martiny L. LRP-1 silencing prevents malignant cell invasion despite increased pericellular proteolytic activities. *Mol Cell Biol.* 2008;28(9):2980-95.

28. Song H, Li Y, Lee J, Schwartz AL, Bu G. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9. *Cancer Res.* 2009;69(3):879-86.

29. Li Y, Reynolds RC. LRP1: A Tumor and Metastasis Promoter or Suppressor? *Biochem Pharmacol* 2012 ;1:e121.

30. Obermeyer K, Krueger S, Peters B, Falkenberg B, Roessner A, Röcken C. The expression of low density lipoprotein receptor-related protein in colorectal carcinoma. *Oncol Rep.* 2007;17(2):361-7.

31. Toquet C, Jarry A, Bou-Hanna C, Bach K, Denis MG, Mosnier JF, Laboisie CL. Altered Calreticulin expression in human colon cancer: maintenance of Calreticulin expression is associated with mucinous differentiation. *Oncol Rep.* 2007;17(5):1101-7.

32. Boulagnon C, Duzde O, Beaudoux O, Dalstein V, Kianmanesh R, Bouché O, Diebold MD. BRAFV600E Gene Mutation in Colonic Adenocarcinomas. Immunohistochemical Detection Using Tissue Microarray and Clinicopathologic Characteristics: An 86 Case Series. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(2):88–96.

33. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, O'Donoghue D, Sheahan K. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(1):134-41.

34. Saad RS, Ghorab Z, Khalifa MA, Xu M. CDX2 as a marker for intestinal differentiation: Its utility and limitations. *World J Gastrointest Surg.* 2011; 3(11): 159–66.

35. Sajanti SA, Väyrynen JP, Sirniö P, Klintrup K, Mäkelä J, Tuomisto A, Mäkinen MJ. Annexin A10 is a marker for the serrated pathway of colorectal carcinoma. *Virchows Arch.* 2015;466(1):5-12.

36. Galissier T, Schneider C, Nasri S, Kanagaratnam L, Fichel C, Coquelet C, Diebold MD, Kianmanesh R, Bellon G, Dedieu S, Marchal Bressenot A, Boulagnon-Rombi C. Biobanking of Fresh-Frozen Human Adenocarcinomatous and Normal Colon Tissues: Which Parameters Influence RNA Quality? *PLoS One.* 2016;11(4):e0154326.

37. Song H, Bu G. MicroRNA-205 inhibits tumor cell migration through down-regulating the expression of the LDL receptor-related protein 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;388(2):400-5.

38. Chan CY, Chan YC, Cheuk BL, Cheng SW. Clearance of matrix metalloproteinase-9 is dependent on low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression downregulated by microRNA-205 in human abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2017;65(2):509-20.
39. Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, de la Vega MF, Martin L, Roignot P, Rat P, Bouvier AM, Laurent-Puig P, Faivre J, Chapusot C, Piard F. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. *Cancer Res.* 2008;68(20):8541-6.
40. Tournier B, Chapusot C, Courcet E, Martin L, Lepage C, Faivre J, Piard F. Why do results conflict regarding the prognostic value of the methylation status in colon cancers? The role of the preservation method. *BMC Cancer.* 2012;12:12.
41. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487(7407):330-7.
42. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):pl11.
43. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross B, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne C, Heuer M, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg A, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov.* 2012 ;2(5); 401–4.
44. Leca J, Martinez S, Lac S, Nigri J, Secq V, Rubis M, Bressy C, Sergé A, Lavaut MN, Dusetti N, Loncle C, Roques J, Pietrasz D, et al. Cancer-associated fibroblast-derived annexin A6+ extracellular vesicles support pancreatic cancer aggressiveness. *J Clin Invest.* 2016;126(11):4140-56.
45. Lu YJ, Wu CS, Li HP, Liu HP, Lu CY, Leu YW, Wang CS, Chen LC, Lin KH, Chang YS. Aberrant methylation impairs low density lipoprotein receptor-related protein 1B tumor suppressor function in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010;49(5):412-24.
46. Sonoda I, Imoto I, Inoue J, Shibata T, Shimada Y, Chin K, Imamura M, Amagasa T, Gray JW, Hirohashi S, Inazawa J. Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) expression by genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2004;64(11):3741-7.
47. Eyking A, Reis H, Frank M, Gerken G, Schmid KW, Cario E. MiR-205 and MiR-373 Are Associated with Aggressive Human Mucinous Colorectal Cancer. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156871.
48. Nguyen-Vu T, Wang J, Mesmar F, Mukhopadhyay S, Saxena A, McCollum CW, Gustafsson JA, Bondesson M, Williams C. Estrogen receptor beta reduces colon cancer metastasis through a novel miR-205-PROX1 mechanism. *Oncotarget.* 2016;7(27):42159-71.

49. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Sonesson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015 ;21(11):1350–6.
50. Bae JM, Kim JH, Kang GH. Molecular subtypes of colorectal cancer and their clinicopathologic features, with an emphasis on the serrated neoplasia pathway. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(5):406-12.
51. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, Burnett-Hartman AN, Weisenberger DJ, Laird PW, Sinicrope FA, Rosty C, Buchanan DD, Potter JD, Newcomb PA. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology.* 2015;148(1):77-87.
52. Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2016;469(2):125-34.
53. Ohhara Y, Fukuda N, Takeuchi S, Honma R, Shimizu Y, Kinoshita I, Dosaka-Akita H. Role of targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2016;8(9):642-55.
54. Stintzing S, Stremtzer S, Sebio A, Lenz HJ. Predictive and prognostic markers in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): personalized medicine at work. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2015;29(1):43-60.
55. He WZ, Liao FX, Jiang C, Kong PF, Yin CX, Yang Q, Qiu HJ, Zhang B, Xia LP. Primary Tumor Location as a Predictive Factor for First-line Bevacizumab Effectiveness in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *J Cancer.* 2017;8(3):388-394.
56. Zhou M, Yu P, Qu J, Chen Y, Zhou Y, Fu L, Zhang J. Efficacy of Bevacizumab in the First-Line Treatment of Patients with RAS Mutations Metastatic Colorectal Cancer: a Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem.* 2016;40(1-2):361-9.

Figure legends

Figure 1. LRP1 expression in colon cancer cells compared to normal colon and stromal cells.

(A) qRT-PCR expression levels of *LRP1* mRNA in colon adenocarcinoma fresh frozen samples compared with normal colon mucosa fresh frozen samples. Values are shown as dCt normalized with RLPL32 (B) Comparative quantification analysis of *LRP1* mRNA expression levels in tumor samples compared with paired normal colon mucosa samples. Values are shown as ddCt fold induction (C) qRT-PCR expression levels of *LRP1* mRNA in adenocarcinoma cells compared with stroma cells after laser capture microdissection (LCM). Values are shown as dCt normalized with RLPL32 (D) Comparative quantification analysis of *LRP1* mRNA expression levels in tumor cells compared with stroma cells after LCM. Values are shown as ddCt fold induction.

**** $P < 0.0001$, Mann Whitney test.

(E-J) Representative microphotograph of LRP1 immunohistochemistry on colon mucosa (E-F) and colon adenocarcinoma (G-J). (E) LRP1 expression in surface epithelium (arrows) in normal colon mucosa (x5 magnification). (F) LRP1 expression in fibroblasts of the lamina propria (arrows) in normal colon mucosa (x10 magnification). Loss of LRP1 expression in malignant cells of a moderately differentiated adenocarcinoma (G) and a mucinous adenocarcinoma (H) (x20 magnification). (I) Loss of LRP1 expression in malignant cells (asterisk) and stromal lymphocytes (arrows) of a poorly differentiated adenocarcinoma (x30 magnification). (J) LRP1 expression in malignant and stromal cells of a moderately differentiated adenocarcinoma (x20 magnification).

(K) Linear regression analysis of *LRP1* mRNA expression levels evaluated by qRT-PCR on complete fresh frozen adenocarcinoma sample against LRP1 IHC score of tumor cells obtained by multiplying staining intensity (0 to 3) and percentage of positive cells (0 to 4) (L) Linear regression analysis of *LRP1* mRNA expression of tumor cells against LRP1 IHC score of tumor cells obtained by multiplying staining intensity (0 to 3) and percentage of positive cells (0 to 4) after LCM.

Figure 2. Correlation of LRP1 mRNA levels with clinical and molecular findings.

Left panel: *LRP1* mRNA levels analyses by qRT-PCR (dCt normalized with RPL32) on fresh frozen colon adenocarcinoma samples from our cohort compared with age (A), BRAFV600E mutation (B) and CpG island methylator phenotype (CIMP-H) (C).

Right panel: Correlation analysis of *LRP1* mRNA expression levels extracted from the colorectal cancer of the TCGA cohort by using cBioportal for Cancer Genomics (<http://cbioportal.org>) web resources with sided adenocarcinomas (D), BRAF mutation (E), CIMP status (F), MSI status (G), and *CDX2* mRNA expression (H).

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$, Mann-Whitney test.

Abbreviation: H, high; L, Low; MSI, microsatellite instability; MSS, Microsatellite stability; CIMP, CpG island methylator phenotype.

Figure 3. Survival analysis in colon cancer patients from our cohort compared with LRP1 immunohistochemical expression in tumor cells.

Kaplan-Meier Curves of overall survival and event or progression free-survival probability for low (red line) and high (blue line) LRP1 immunohistochemical (IHC) score in adenocarcinoma cells whatever the tumor stage (A-B), in stage IV (metastatic) patients (C-D) and in stage IV patients treated with bevacizumab (E-F).

IHC score were evaluated by multiplying staining intensity (0 to 3) and percentage of positive malignant cells (0 to 4) obtained with LRP1 8G1 immunolabelling. Median IHC score was used to separate low (score 0 to 4) and high (score 6 to 12) LRP1 IHC score. All *p* values were calculated by the log-rank algorithm.

Figure 4. Event-free survival analyses in an independant cohort.

Publicly available SieberSmith gene expression dataset was obtained from R2 microarray analysis and visualization platform (<http://r2.amc.nl>), and used for survival analyses. Event-free survival Kaplan-Meier curves for *LRP1* mRNA expression in all stages (A), in stage II (B) and in stage III patients (C). (D) Progression-free survival Kaplan-Meier Curves for *LRP1* mRNA expression in stage IV patients. All *p* values were calculated by the log-rank algorithm.

Figure 5. Analysis of LRP1 expression regulation by LRP1 gene mutation or methylation.

(A) Somatic mutation data from the complete length of *LRP1* gene obtained from colorectal cancer of the TCGA cohort by using cBioportal for Cancer Genomics (<http://cbioportal.org>) web resources. Colored boxes present on the *LRP1* gene representation correspond to exons encoding functional domains of LRP1. Green domain, low-density lipoprotein receptor domains; blue, low-density lipoprotein receptor repeats; yellow, coagulation factor Xa inhibitory site; orange, domain of unknown function; red, calcium-binding EGF domain; violet, complement C1r-like EGF-like. (B) Graphical representation of association of *LRP1* mutational status with clinical and molecular tracks and *LRP1* mRNA expression. (C) *LRP1* mRNA expression levels comparison between *LRP1* mutated and *LRP1* wild type colorectal cancer. ****P*=0.003, Mann Whitney test.

Linear regression analyses between *LRP1* mRNA expression levels and promoter methylation (D), intronic methylation (E), global DNA methylation levels approximated by *LINE1* (F) in our cohort. (G) Correlation of *LRP1* mRNA expression levels and *LRP1* promoter methylation in data extracted from the TCGA cohort by using cBioportal for Cancer Genomics (<http://cbioportal.org>) web resources.

Figure 6. Comparison of miR-205 and miR-338-5p expression with LRP1 expression.

Analyses of miR-205 (A) and miR-338-5p (B) expression by qRT-PCR in fresh frozen colon cancer adenocarcinoma compared with normal colon mucosa from our cohort (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, Mann-Whitney test). Linear regression analysis of *LRP1* mRNA expression levels evaluated by qRT-PCR on complete fresh frozen adenocarcinoma sample against miR-205 (C) and miR-338-5p (E) expression. Linear regression analysis of miR-205 (D) and miR-338-5p (F) expression against LRP1 immunohistochemical (IHC) score of tumor cells. IHC score was assessed by multiplying staining intensity (0 to 3) and percentage of positive tumor cells (0 to 4) with LRP1 8G1 immunolabelling.

Table 1. Clinicopathological features of the cohort

Clinical/pathological features	No. available (%)
Gender	
Male	174 (57)
Female	133 (43)
Mean age [range]	71 years [41-91 years]
UICC stage	
Stage I	35 (11)
Stage II	117 (38)
Stage III	79 (26)
Stage IV	76 (25)
Tumor location	
Left colon	171 (56)
Right colon	136 (44)
Occlusion	
Yes	35 (11)
No	274 (89)
Tumor perforation	
Yes	20 (6)
No	289 (94)
Margin status	
R0	275 (91)
R+	27 (9)
Differentiation grade	
Grade 1-2	258 (84)
Grade 3	49 (16)
<i>KRAS</i> status	
Wild type	101 (68)
Mutant	48 (32)
<i>BRAF</i> status	
Wild type	260 (86)
Mutant	44 (14)
Microsatellite status	
MSS	266 (87)
MSI	40 (13)
CIMP status	
No CIMP	22 (34)
CIMP-Low	35 (55)
CIMP-High	7 (11)

Table 2. Clinicopathological characteristics associated with low LRP1 immunohistochemical expression in adenocarcinomatous cells

	n	Mean tumor score	LRP1	p univariate	p multivariate
Sex	307			0.0006 ‡	n.s
Male	174	5.64 ± 4.01			
Female	133	4.03 ± 4.03			
Age	307			0.0009 ‡	0.09
≤ 71 years	140	5.78 ± 4.2			
> 71 years	167	4.24 ± 3.89			
Tumor location	307			<0.0001 ‡	0.0004
Right	136	3.34 ± 3.60			
Left	171	6.22 ± 4.02			
UICC stage	304			0.20 †	NA
Stage I	35	6.2 ± 3.53			
Stage II	115	5.07 ± 4.37			
Stage III	79	4.76 ± 4.12			
Stage IV	75	4.45 ± 3.79			
Vascular invasion	300			0.30 ‡	NA
Yes	129	4.71 ± 4.1			
No	171	5.2 ± 4.07			
Perineural invasion	300			0.51 ‡	NA
Yes	87	4.75 ± 3.97			
No	213	5.09 ± 4.14			
Budding score	286			0.49 ‡	NA
High	14	4.21 ± 4.28			
Low	272	4.99 ± 4.08			
Differentiation grade	307			<0.0001 ‡	n.s
Grade 1-2	258	5.44 ± 4.03			
Grade 3	49	2.35 ± 3.39			
CDX2	303			0.0003 ‡	n.s
Positive	278	5.19 ± 3.98			
Negative	25	2.16 ± 4.19			
Mucinous type	287			0.004 ‡	n.s
Yes	19	2.37 ± 3.58			
No	268	5.14 ± 4.06			
Annexin A10	305			<0.0001 ‡	n.s
Positive	39	1.90 ± 3.31			
Negative	266	5.41 ± 4.01			
KRAS status	149			0.003 ‡	n.s
Wild type	101	3.35 ± 3.72			
Mutant	48	5.31 ± 3.82			
BRAF status	303			<0.0001 ‡	0.009
Wild type	259	5.5 ± 3.93			
Mutant	44	1.29 ± 2.69			
Microsatellite status	305			<0.0001 ‡	0.01
MSS	265	5.52 ± 3.96			
MSI	40	1.1 ± 2.47			
CIMP status	62			0.02 †	NA
No CIMP	23	5.09 ± 3.94			
CIMP-Low	32	3.75 ± 4.54			
CIMP-High	7	0 ± 0			

NA : Not adopted ; n.s : not significant; ‡ T test † Linear regression

Table 3. Clinicopathological characteristics associated with LRP1 immunohistochemical expression in stromal cells

	n	Mean LRP1 stromal score	p univariate	p multivariate
Sex	307		0.20 ‡	NA
Male	174	10.80 ± 2.37		
Female	133	11.14 ± 2.22		
Age	307		0.03 ‡	0.004
≤ 71 years	140	10.63 ± 2.63		
> 71 years	167	11.22 ± 1.96		
Tumor location	307		0.53 ‡	NA
Right	136	11.04 ± 2.20		
Left	171	10.88 ± 2.39		
UICC stage	304		0.02 †	n.s
Stage I	35	9.94 ± 3.07		
Stage II	115	11.16 ± 2.11		
Stage III	79	11.30 ± 1.75		
Stage IV	75	10.85 ± 2.44		
Vascular invasion	300		0.24 ‡	NA
Yes	129	11.12 ± 2.08		
No	171	10.81 ± 2.47		
Perineural invasion	300		0.61 ‡	NA
Yes	87	10.84 ± 2.31		
No	213	10.99 ± 2.32		
Budding score	286		0.41 ‡	NA
High	14	10.21 ± 3.24		
Low	272	10.96 ± 2.27		
Differentiation grade	307		0.17 ‡	NA
Grade 1-2	258	10.83 ± 2.47		
Grade 3	49	11.51 ± 1.41		
CDX2	303		0.32 ‡	NA
Positive	278	10.36 ± 3.07		
Negative	25	10.99 ± 2.24		
Mucinous type	287		0.003 ‡	n.s
Yes	19	11.68 ± 0.94		
No	268	10.87 ± 2.38		
Annexin A10	305		0.81 ‡	NA
Positive	39	11.02 ± 2.03		
Negative	266	10.93 ± 2.36		
KRAS status	149		0.11 ‡	NA
Wild type	101	11.22 ± 2.06		
Mutant	48	10.60 ± 2.39		
BRAF status	303		0.89 ‡	NA
Wild type	259	10.97 ± 2.32		
Mutant	44	11.02 ± 2.10		
Microsatellite status	305		0.81 ‡	NA
MSS	265	10.93 ± 2.34		
MSI	40	11.02 ± 2.18		
CIMP status	62		0.36 †	NA
No CIMP	23	10.61 ± 3.00		
CIMP-Low	32	11.28 ± 1.59		
CIMP-High	7	10.00 ± 3.46		

NA : Not adopted ; n.s : not significant; ‡ T test † Linear regression

Table 4. Univariate and multivariate analyses of factors associated with overall and event free survival in our entire cohort of 307 patients.

Variables	Overall Survival				Event Free Survival			
	Univariate <i>p</i> value	HR	95%CI	Multivariate <i>p</i> value	Univariate <i>p</i> value	HR	95%CI	Multivariate <i>p</i> value
Age	0.005	1.03	1.01 – 1.05	0.0004	0.37			N.A
Metastasis (M0 vs. M+)	<0.0001	2.10	1.40 – 3.13	<0.0001	<0.0001	1.57	1.01 – 2.45	0.04
Margin status (R0 vs. R+)	<0.0001	1.87	1.13 – 3.11	0.02	<0.0001			n.s
Vascular invasion (yes vs. no)	<0.0001	1.56	1.10 – 2.23	0.01	<0.0001	1.89	1.17 – 3.02	0.008
Perineural invasion (yes vs. no)	0.002			n.s	<0.0001			n.s
Differentiation grade (3 vs. 1-2)	0.003			n.s	0.003			n.s
CDX2 IHC expression (yes vs. no)	0.0005	1.59	0.93 – 2.72	0.09	0.11			N.A
KRAS mutation (yes vs. no)	0.22			N.A	0.003	1.62	1.06 – 2.49	0.03
LRP1 IHC tumor score (low vs. high)	0.003	1.35	0.95 – 1.93	0.09	0.46			N.A
LRP1 IHC stroma score (low vs. high)	0.42			N.A	0.92			N.A
LRP1 mRNA	0.12			N.A	0.59			N.A

n.s: not significant; N.A: Not adopted; HR: Hazard ratio. Results were adjusted on T and N.

Table 5. Univariate and multivariate analyses of factors associated with overall and progression survival in 76 UICC stage IV patients.

Variables	Overall Survival				Progression Free Survival			
	Univariate <i>p</i> value	HR	Multivariate 95%CI	Multivariate <i>p</i> value	Univariate <i>p</i> value	HR	Multivariate 95%CI	Multivariate <i>p</i> value
Age	0.05	1.03	1.00 – 1.05	0.04	0.52			N.A
Tumor location (right vs. left)	0.01			n.s	0.01			n.s
Occlusion (yes vs. no)	0.003	1.96	1.40 – 3.69	0.04	0.006			n.s
Tumor perforation (yes vs. no)	0.10	2.23	1.02 – 4.86	0.04	0.07			n.s
Differentiation grade (3 vs. 1-2)	0.0002	2.18	1.07 – 4.17	0.03	<0.0001	3.45	1.73 – 6.88	0.0004
LRP1 IHC tumor score (high vs. low)	0.004	0.55	0.32 – 0.96	0.03	0.05			n.s
LRP1 IHC stroma score (high vs. low)	0.11			N.A	0.03	2.58	1.35 – 4.94	0.004
LRP1 mRNA	0.12			N.A	0.22			N.A

n.s: not significant; N.A: Not adopted; HR: Hazard ratio. Results were adjusted on T and N

Figure 1: LRP1 expression in colon cancer cells compared to normal colon and stromal cells.

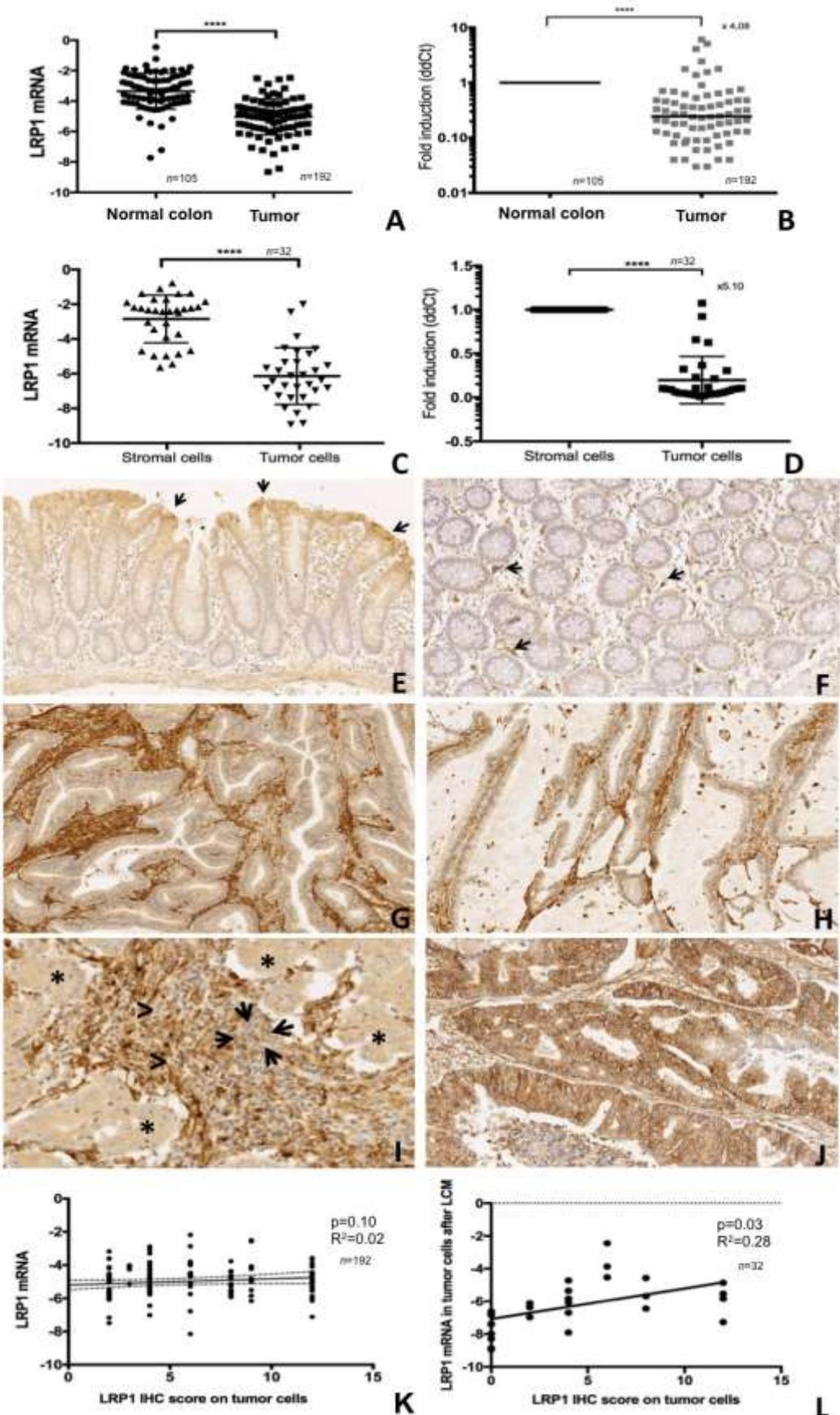


Figure 2: Correlation of LRP1 mRNA levels with clinical and molecular findings.

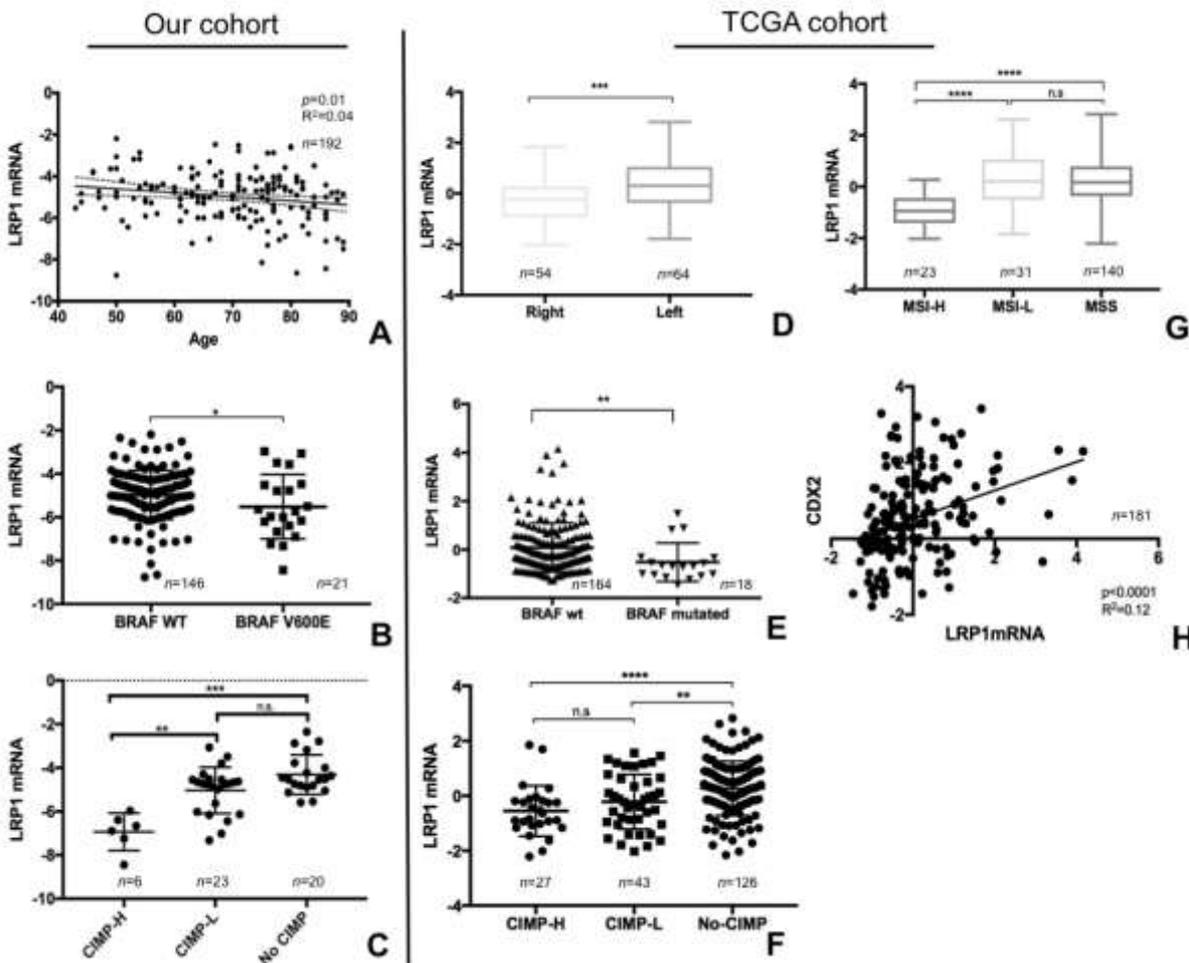


Figure 3: Survival analysis in colon cancer patients from our cohort compared with LRP1 immunohistochemical expression in tumor cells.

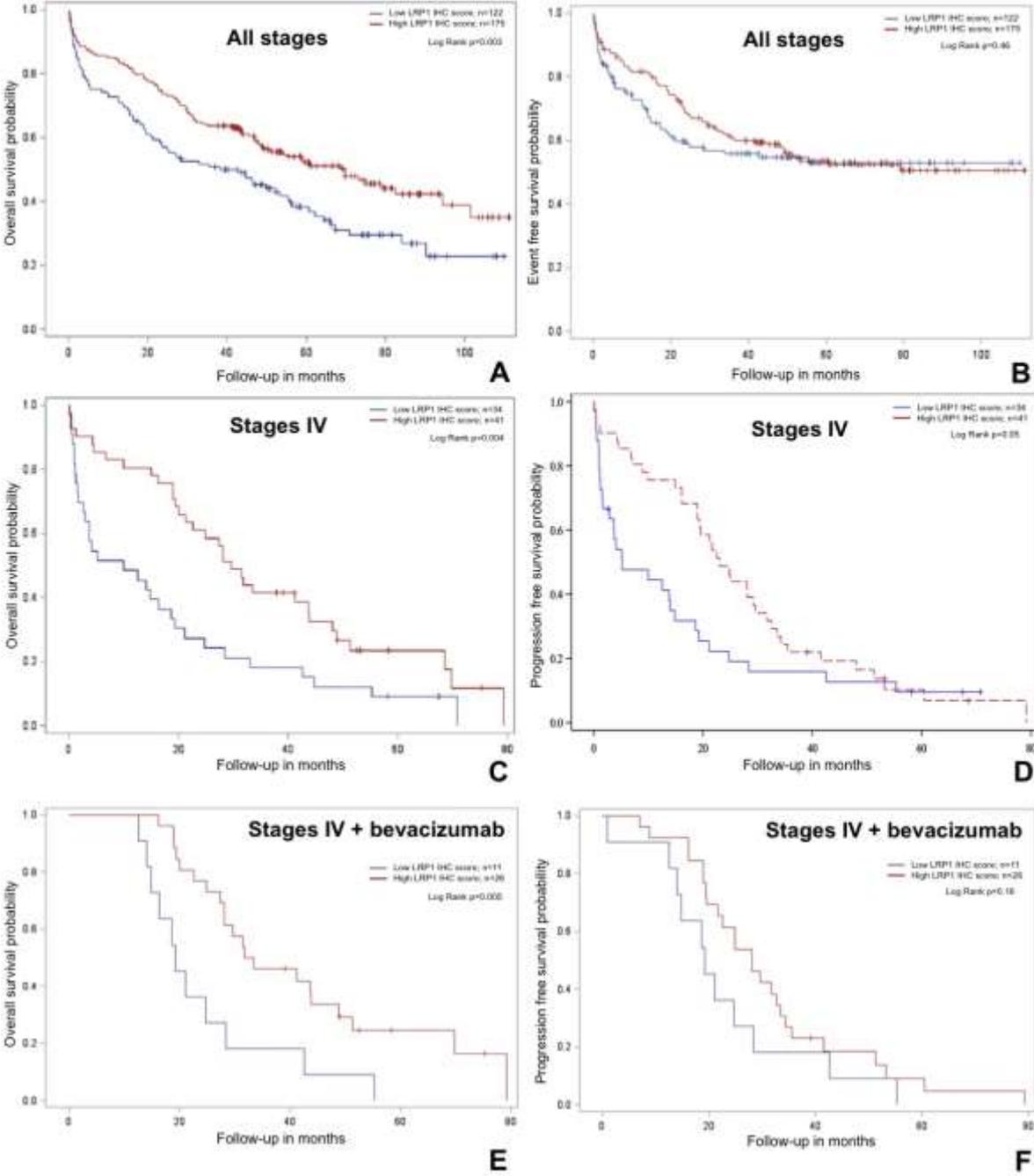


Figure 4: Event-free survival analyses in an independant cohort.

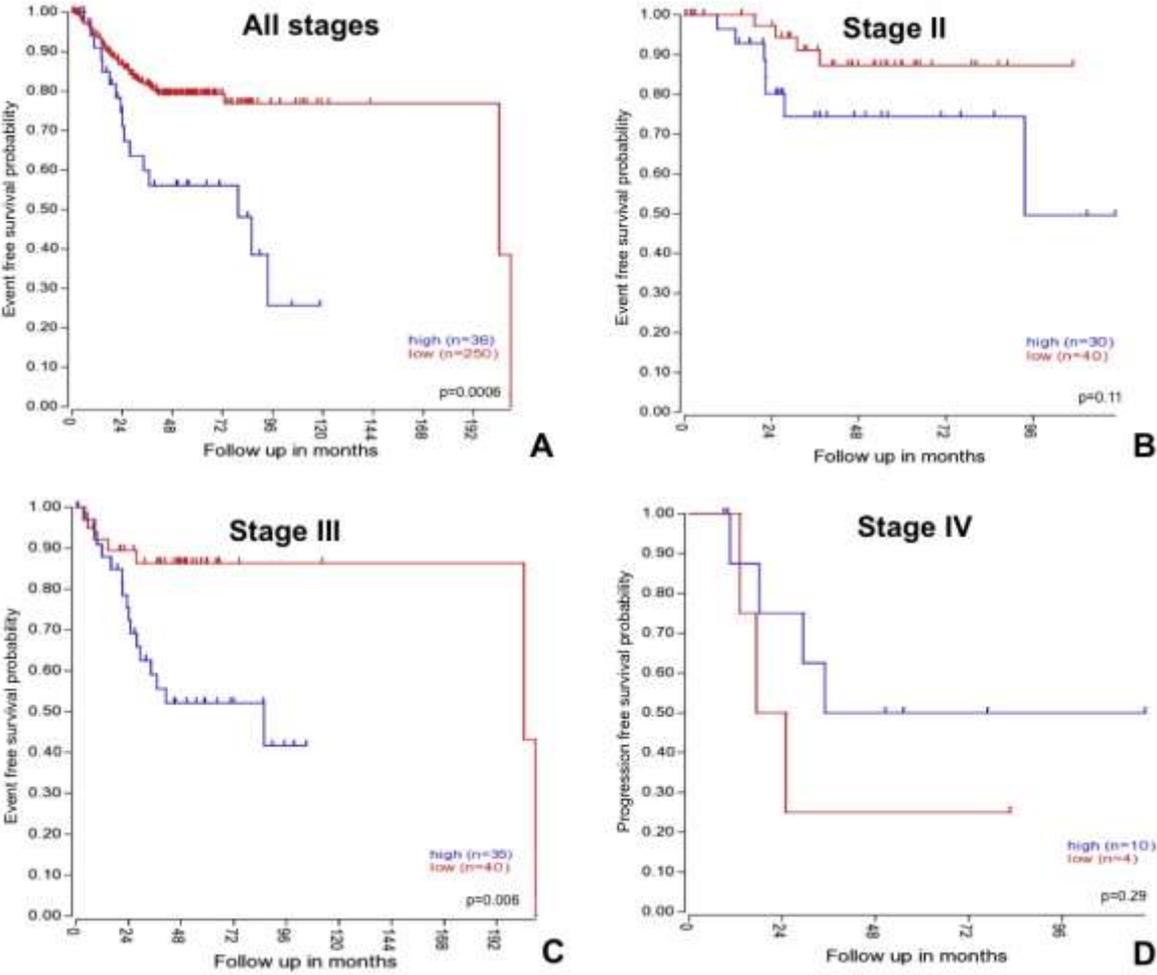


Figure 5: Analysis of LRP1 expression regulation by *LRP1* gene mutation or methylation.

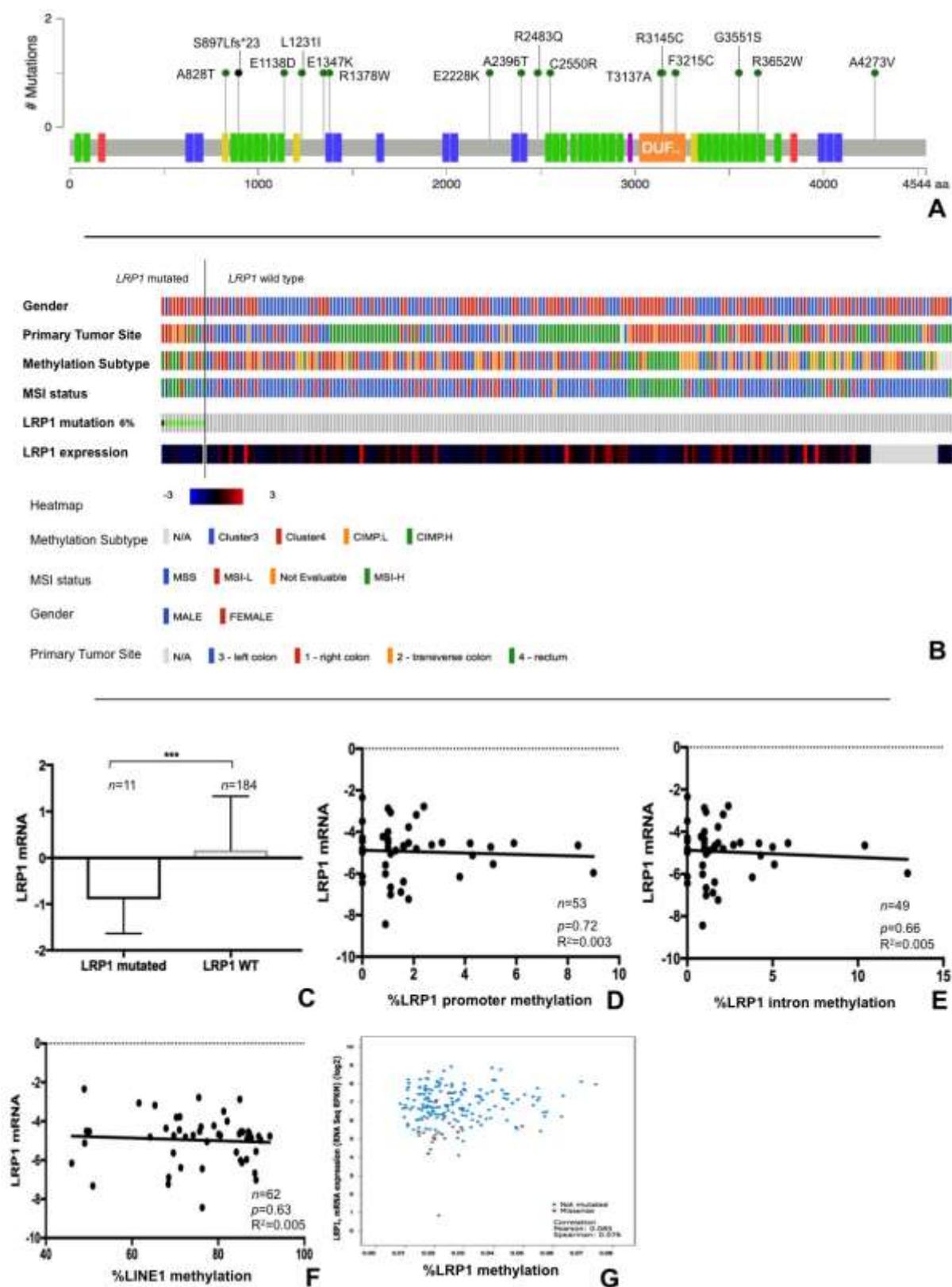
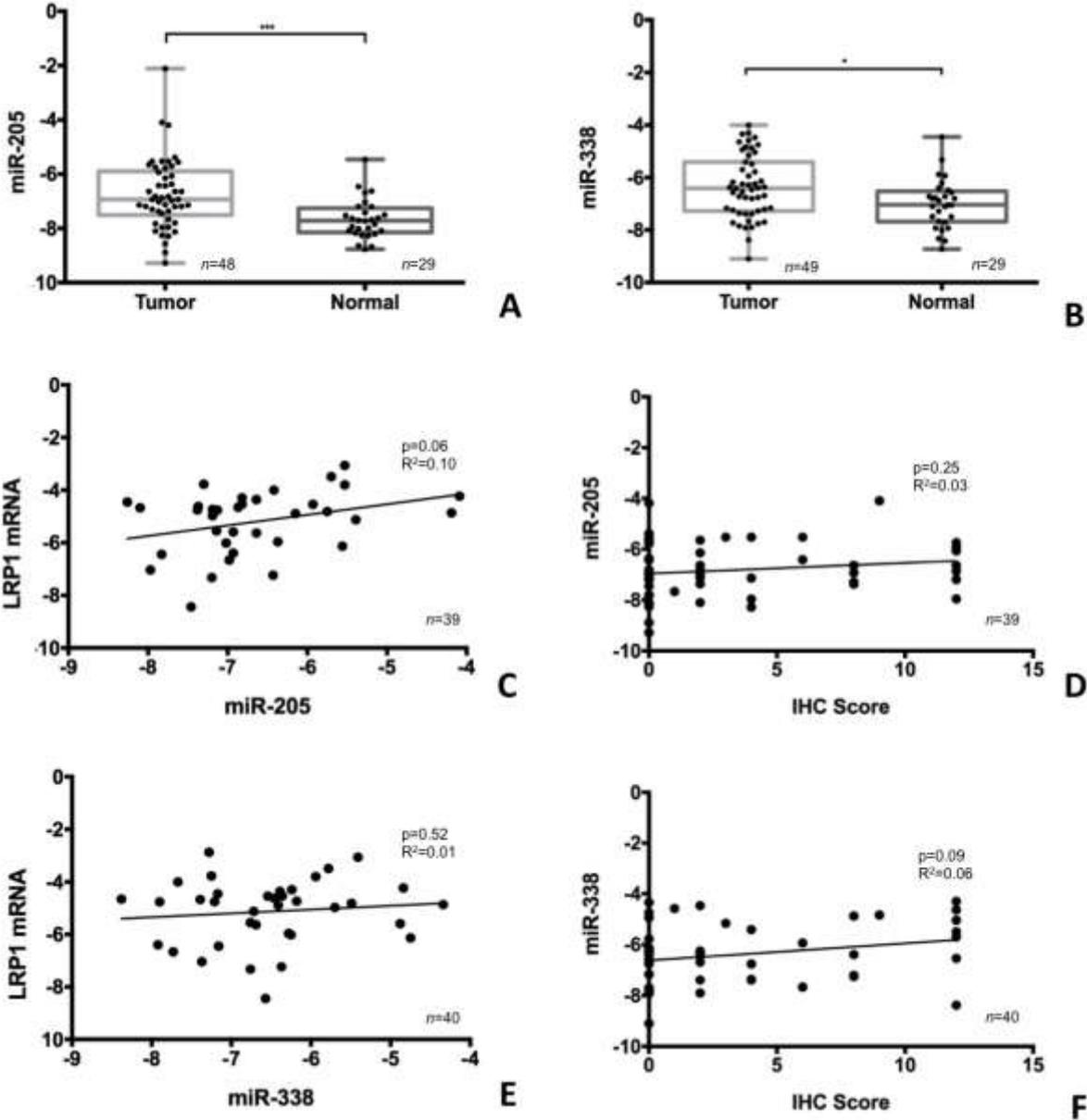


Figure 6: Comparison of miR-205 and miR-338-5p expression with LRP1 expression.



Discussion et perspectives

Le cancer colorectal est comme nous l'avons décrit ci-avant un problème de santé publique majeur car il s'agit d'un cancer fréquent et avec un taux de morbi-mortalité élevé. Le système de classification pronostique actuel, le stade TNM, utilisé pour la décision thérapeutique et l'évaluation standardisée des traitements n'est pas un système performant car des patients de même stade ont des pronostiques très différents. Peu de biomarqueurs sont actuellement utilisés pour augmenter la précision de la prédiction pronostique ou prédire la réponse aux traitements. Ces marqueurs sont toutefois insuffisants pour la prédiction pronostique à l'échelon individuel. C'est pour cela que depuis de nombreuses années la recherche dans le domaine des cancers colorectaux vise à trouver de nouveaux marqueurs pronostiques ou théranostiques afin de mieux personnaliser la prise en charge du patient.

LRP1 est un récepteur multifonctionnel qui occupe un rôle central dans les rapports entre la cellule et son micro-environnement et dans de nombreuses voies de signalisation. De part ces multiples fonctions, LRP1 joue un rôle important dans la progression du cancer. Cependant, en raison de sa multifonctionnalité, son rôle n'est pas toujours évident à appréhender et il varie d'un type de cancer à l'autre.

Dans le cancer du côlon, l'expression de LRP1 étudiée sur un petit nombre de cas semble être diminuée dans les cellules tumorales et augmentée dans les cellules du stroma. Cette baisse d'expression de LRP1 dans les cellules malignes était associée à l'augmentation de l'expression de la protéase uPA suggérant que la baisse d'expression de LRP1 dans les cellules malignes favorise l'invasion tumorale [Obermeyer]. Cependant, les associations cliniques et la valeur pronostique de cette baisse d'expression de LRP1 dans les cancers du côlon n'ont jamais été étudiées. De plus, les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de LRP1 dans les cancers du côlon ne sont à ce jour pas connus.

Ce travail de thèse s'est inscrit dans une démarche translationnelle afin de décrire l'expression de LRP1 dans les tissus coliques sains et adénocarcinomeux dans une cohorte de patients et de déterminer les paramètres clinico-pathologiques et moléculaires associés à cette expression ainsi que sa valeur pronostique.

Partie méthodologique du travail de thèse : synthèse et perspectives

La première partie de ce travail (manuscrits 1 et 2) a consisté en une validation méthodologique de certaines techniques qui ont été utilisées dans la partie principale du travail.

Cette partie méthodologique a, dans un premier temps, permis de valider la détermination du statut BRAFV600E par l'immunomarquage anti-BRAFV600E sur TMA. Ce premier temps du travail nous a permis de caractériser le statut BRAFV600E dans notre cohorte de patients.

La deuxième étude méthodologique de ce travail de thèse, nous a permis de montrer l'importance du contrôle qualité des échantillons de cancer colique avant analyse d'expression génique. Ce contrôle permet d'une part de s'assurer que les échantillons tumoraux coliques intéressent réellement l'adénocarcinome et d'autre part de s'assurer que l'ARN n'est pas dégradé. Dans ce travail, nous avons également montré que les facteurs qui influencent la qualité de l'ARN issus des tissus d'adénocarcinomes coliques sont cliniques et chirurgicaux et ne peuvent donc pas être contrôlés lors de la procédure de prélèvement ou de stockage de l'échantillon tumoral. Nous n'avons pas mis en évidence de marqueurs qui permettraient de prédire efficacement la qualité de l'ARN d'un échantillon d'adénocarcinome colique. Il apparaît donc que le contrôle de la qualité de l'échantillon en lui-même est irremplaçable. Le contrôle microscopique des échantillons d'adénocarcinomes coliques frais-congelés peut être réalisé sur un prélèvement miroir, c'est à dire un prélèvement fixé adjacent à l'échantillon frais-congelé ou sur le prélèvement congelé lui-même au risque d'entraîner une légère décongélation du prélèvement lors du contrôle microscopique et donc une dégradation de l'ARN. Nous réalisons actuellement un travail complémentaire sur le contrôle microscopique des échantillons tumoraux coliques frais-congelés stockés dans les biobanques. Ce travail complémentaire vise à formuler des recommandations quand au contrôle microscopique des échantillons d'adénocarcinome coliques frais-congelés afin de s'assurer de la qualité de l'échantillon étudié et de sa représentativité tout en préservant la qualité de l'ARN.

Partie principale du travail de thèse : discussion et perspective

1. Expression de LRP1 dans les tissus coliques sains et adénocarcinomateux

La seconde partie (manuscrit 3) portait sur l'étude de l'expression de LRP1 dans les cancers coliques ainsi que l'évaluation des paramètres clinico-pathologiques et moléculaires associés à l'expression de LRP1 et la détermination de sa valeur pronostique. Dans ce travail nous avons également étudié certains mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de LRP1 dans les cancers du côlon.

Cette partie principale de ce travail de thèse nous a permis de décrire l'expression génique et immunohistochimique de LRP1 dans les tissus coliques sains et adénocarcinomateux dans une cohorte de patients assez large et bien caractérisée. A cette fin, nous avons établi un score immuno-histochimique simple qui nous a permis de quantifier l'expression de LRP1 dans les cellules malignes et dans les cellules stromales de façon indépendante. L'étude immunohistochimique et l'étude de l'expression de l'ARNm par qRT-PCR après microdissection laser ont montré que l'expression de LRP1 était nettement diminuée dans les cellules malignes comparées aux cellules stromales et aux cellules de la muqueuse colique saine. Cette plus faible expression de LRP1 dans les cellules malignes coliques comparées aux cellules stromales et de la muqueuse colique avait déjà été décrite auparavant, mais uniquement par technique immunohistochimique et dans un très petit nombre de cas [Toquet, Obermeyer]. Notre étude portant sur un nombre plus important de cas et utilisant plusieurs techniques de quantification de l'expression de LRP1 (qRT-PCR avec ou sans microdissection préalable, score immunohistochimique) a permis de montrer les limites de l'évaluation de l'expression de l'ARNm de LRP1 sur les échantillons tumoraux complets non microdisséqués. En effet, nous avons observé que le score d'expression immuno-histochimique de LRP1 des cellules malignes était corrélé à l'expression de l'ARNm de LRP1 dans les cellules malignes après microdissection alors qu'aucune corrélation n'était observée dans les échantillons tumoraux non microdisséqués, méthode jusqu'alors utilisée.

Notre étude de l'expression de LRP1 a permis d'autre part de préciser la distribution de LRP1 dans la muqueuse colique. Nous avons en effet observé que l'expression de LRP1 dans les cellules épithéliales coliques était le plus souvent limitée à l'épithélium de surface, c'est à dire la partie de l'épithélium qui ne se renouvelle plus et qui est la plus différenciée. Cette association suggère une relation entre l'expression de LRP1 et la différenciation et une relation inverse entre l'expression de LRP1 et la prolifération.

2. Expression de LRP1 dans les adénocarcinomes coliques : association clinico-pathologiques et moléculaires, et valeur pronostique

La faible expression immunohistochimique et génique de LRP1 était fortement associée dans notre cohorte ainsi que dans une cohorte indépendante (cohorte du TCGA) à la localisation droite du cancer, à la présence d'une mutation *BRAF* et à un phénotype hyperméthylateur (CIMP-H) de l'adénocarcinome. Une association moins forte, car présente uniquement en analyse univariée, a été observées dans notre cohorte ainsi que dans la cohorte du TCGA entre la faible expression de LRP1 et la présence d'une instabilité des microsatellite (MSI-H) et la perte d'expression du marqueur de différenciation intestinale CDX2. Cette association entre la baisse d'expression de LRP1 et la perte d'expression du marqueur de différenciation intestinale CDX2, est un argument de plus pour la relation entre l'expression de LRP1 et la différenciation évoquée ci-dessus. Cependant cette relation n'est pour l'instant qu'une supposition et reste à démontrer.

Tous les éléments associés à la diminution de l'expression de LRP1 dans les cellules malignes que nous avons évalués sont, en dehors de l'instabilité des microsatellites des indicateurs reconnus de mauvais pronostique.

Dans ce travail de thèse, nous n'avons pas évalué les effets de la perte d'expression de LRP1 sur le comportement des cellules d'adénocarcinome colique ou de la forte expression de LRP1 dans les fibroblastes du stroma. Des études précédentes réalisées sur des patients atteints de carcinomes hépatocellulaires [Huang], d'adénocarcinomes prostatiques [Gilardoni] et de tumeurs de Wilms [Desrosiers], ont montré que la baisse d'expression de LRP1 dans les cellules tumorales était corrélée à une augmentation de l'expression de la MMP9. Cette baisse d'expression de LRP1 dans les cellules tumorales semble donc stimuler la protéolyse matricielle autour de la cellule tumorale et avoir un rôle pro-tumoral. Cette augmentation de la protéolyse est utile aux processus d'invasion et de migration tumorale. Plusieurs études en culture cellulaires ont confirmé ces données et ont également montré que la perte d'expression de LRP1 était de plus associée à la surexpression d'uPA et à une activation de certaines voies de signalisation [Amos, de Vries, Sid, Webb]. Cependant, d'autres études ont montré que la perte d'expression de LRP1 avait des effets anti-tumoraux en inhibant la migration cellulaire [Appert-Collin, Gopal, Le Cigne]. Les effets pro ou anti-tumoraux de LRP1 semblent donc dépendre du type cellulaire, des conditions étudiées et des conditions de culture. Dans les adénocarcinomes coliques, une seule étude a évaluée la relation entre l'expression de LRP1 et les protéases matricielle. Dans cette étude sur les cancers coliques, la

forte expression de LRP1 par les fibroblastes du stroma était associée à une forte expression de la protéase uPA [Obermeyer]. Cette observation associée aux données précédente de la littérature suggère donc que l'expression différentielle de LRP1 entre les cellules malignes et les fibroblastes du stroma entraîne une surexpression synergique d'enzymes protéolytiques ce qui favoriserait l'invasion tumorale.

De part ces données de la littérature montrant l'association de la faible expression de LRP1 dans les cellules malignes à des éléments de mauvais pronostic, nous nous attendions à ce que la perte d'expression de LRP1 dans les cellules malignes ou sa surexpression dans les cellules stromales soit associée à un mauvais pronostic.

Dans notre cohorte, la faible expression immunohistochimique de LRP1 dans les cellules tumorales s'est révélée être un marqueur pronostique péjoratif, notamment chez les patients au stade métastatique même traités par thérapie ciblée anti-VEGF (bevacizumab). La surexpression immunohistochimique de LRP1 par les cellules du stroma était un indicateur indépendant de progression tumorale chez les patients atteints de cancer colique métastatique.

Nos résultats semblent indiquer qu'un faible score (0-4) d'expression immunohistochimique de LRP1 dans les cellules tumorale serait un biomarqueur intéressant pour la prédiction pronostique et thérapeutique des cancers coliques métastatiques. Cependant, ces résultats doivent être confirmés par d'autres études pour plusieurs raisons : le faible effectif de patients métastatiques de notre cohorte, les renseignements incomplets concernant leurs traitements d'une part et en raison de la discordance entre les résultats immunohistochimiques et les analyses d'expression génique de notre cohorte et d'une cohorte indépendante d'autre part. Cependant, ces discordances peuvent s'expliquer. En effet, l'analyse immunohistochimique permet de distinguer l'expression de LRP1 propre aux cellules malignes de celle des cellules stromales ce que ne permet pas une analyse de l'ARNm issue du lysat tumoral complet. Comme nous l'avons décrit ci-dessus, les cellules stromales ont une expression de LRP1 bien plus élevée que les cellules malignes. D'où la surestimation possible de l'expression de LRP1 dans l'échantillon total, représentant la somme de LRP1 exprimé par les cellules malignes et les cellules stromales. Seule une étude en micro-dissection laser permet de distinguer l'expression génique de ces deux composantes cellulaires de la tumeur. De ce fait les discordances apparentes observées dans notre étude s'expliquent par le fait que c'est l'expression de LRP1 dans les cellules malignes qui est pronostique et non pas la somme d'expression cellules malignes + cellules stromales. La technique de microdissection laser est

une technique longue et coûteuse qui n'est pas utilisable en routine, contrairement à l'immunohistochimie qui est simple et rapide. C'est donc cette technique qui doit être privilégiée pour les études ultérieures.

3. Régulation de l'expression de LRP1 dans les adénocarcinomes coliques.

Les anomalies moléculaires (MSI-H, CIMP-H, *BRAF* muté) associées à la diminution de l'expression de LRP1 dans les cellules malignes caractérisent le type hypermuté de la classification moléculaire des CCR du TCGA. Ce type moléculaire est appelé ainsi en raison d'un taux de mutations dans de nombreux gènes plus important que dans les autres sous-types moléculaires de CCR. Effectivement, les analyses des données du TCGA nous ont permis d'observer que les mutations du gène *LRP1*, bien que rares, étaient plus fréquentes chez les patients avec des CCR MSI-H, CIMP-H ou *BRAF* mutés. De plus l'expression de l'ARNm de LRP1 était plus faible en cas de mutation du gène *LRP1*. Les mutations du gène expliquent donc en partie la baisse d'expression de LRP1 dans les CCR MSI-H.

En dépit d'une forte association entre la diminution de l'expression de LRP1 dans les cellules malignes et le phénotype hyperméthylateur CIMP, le promoteur du gène *LRP1* présentait un niveau de méthylation très faible dans notre cohorte et dans celle du TCGA. Donc, malgré l'association entre la baisse d'expression de LRP1 et le phénotype hyperméthylateur CIMP-H, les mécanismes épigénétiques de méthylation des gènes ne sont pas directement impliqués dans la régulation de l'expression de LRP1. Cette association s'explique de façon indirecte par la méthylation du promoteur du gène *MLH1* qui entraîne un déficit du système de réparation des mésappariements de l'ADN et donc l'apparition de mutations sur le gène *LRP1* (Figure 23).

Les mutations du gène *LRP1* sont rares (6%) en comparaison de la perte d'expression immunohistochimique de LRP1 dans les cellules tumorales (21% des cas). D'autres facteurs doivent donc être impliqués dans la régulation de l'expression de LRP1. Notre travail montre que le micro-ARN miR-205 pourrait intervenir dans la régulation de l'expression de LRP1. Cependant, de façon inattendue dans notre étude l'expression de miR-205, qui était décrit comme un inhibiteur de LRP1 dans les cellules de glioblastome et d'adénocarcinome

pulmonaire [Song], semble stimuler l'expression de LRP1 dans les cancers coliques. Les micro-ARN pourraient donc avoir un rôle dans la modulation de l'expression de LRP1.

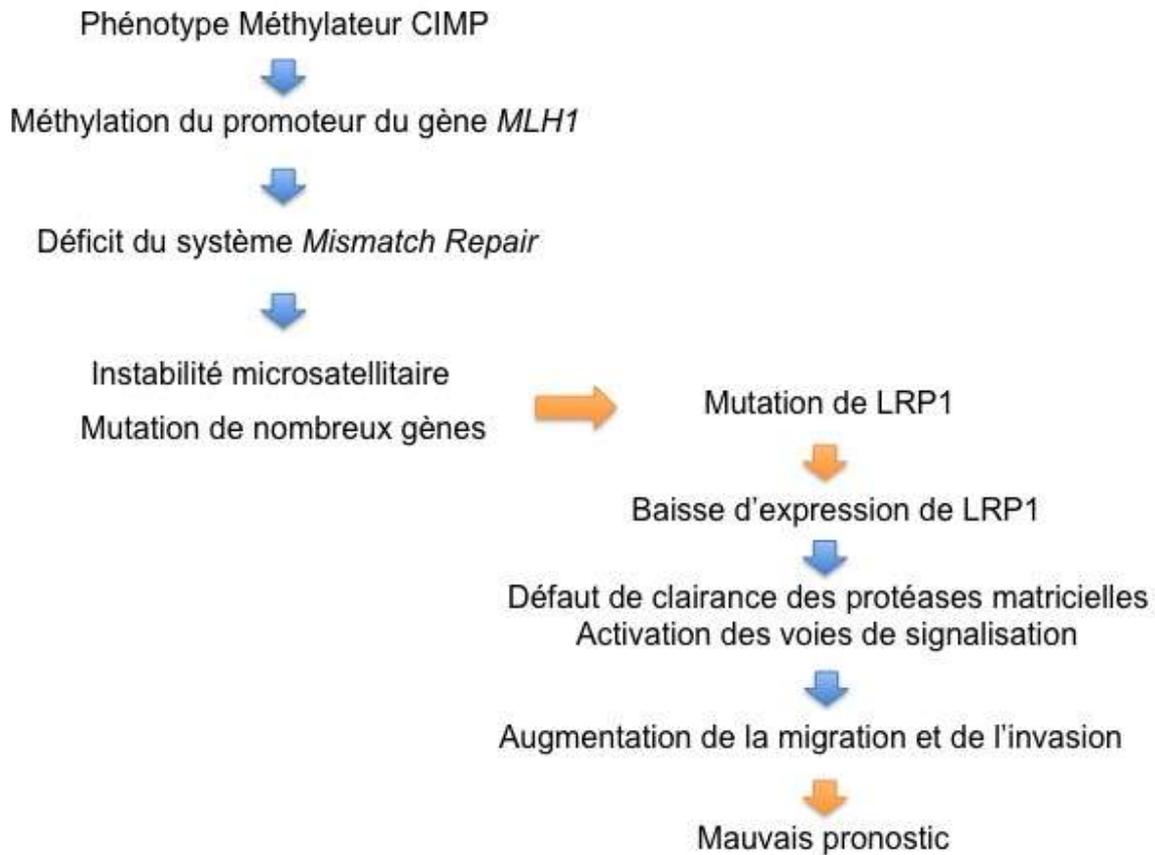


Figure 23 : Présentation schématique d'un mécanisme impliqué dans la baisse d'expression de LRP1 dans les cellules malignes et dans l'impact pronostique de cette baisse d'expression de LRP1 dans les cancers coliques.

Ce schéma de synthèse regroupant nos résultats (en orange) et les données de la littérature (en bleu) présente un mécanisme impliqué dans la baisse d'expression de LRP1 dans les cellules cancéreuses coliques et l'impact de cette baisse d'expression.

4. Perspectives

Ce travail a permis de préciser l'expression de LRP1 dans les tissus coliques sains et tumoraux, de décrire les paramètres clinico-pathologiques et moléculaires associés à l'expression de LRP1 et son impact pronostique. Il a également permis de compléter les connaissances sur les mécanismes de régulation de l'expression de LRP1. Enfin, ce travail a également permis de formuler des recommandations méthodologiques relatives à l'utilisation de l'ARNm des tissus tumoraux coliques pour les analyses d'expression génique.

Afin de compléter ce travail, il faudrait, en plus de l'étude clinique dans de plus larges cohortes proposée ci-avant, étudier dans des lignées de cellules tumorales coliques les effets de la suppression de l'expression de LRP1 et de la réexpression de LRP1 sur la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion. Ces études en cultures cellulaires pourraient permettre de mieux évaluer les effets de certains micro-ARN sur l'expression de LRP1. Elles permettraient aussi d'évaluer l'effet de l'expression ou de la perte d'expression de LRP1 sur l'activation de certaines voies de signalisation ou sur l'expression de certaines protéases.

De plus, une étude en co-culture avec des fibroblastes serait intéressante pour permettre d'évaluer l'influence de la surexpression de LRP1 dans les fibroblastes sur les cellules tumorales ou inversement l'influence de la perte d'expression de LRP1 dans les cellules malignes sur les fibroblastes du stroma. Ceci est d'autant plus intéressant qu'il a été montré dans des cellules de carcinome mammaire que les cellules malignes recrutaient les fibroblastes par une voie impliquant LRP1 [Derocq, Beaujouin].

Durant ce travail de thèse nous avons essayé sans succès de produire des lignées primaires de cellules cancéreuses coliques. Nous, avons ensuite évalué l'expression de LRP1 dans 7 lignées cellulaires de caractéristiques moléculaires différentes (CaCo2, HCT116, HT29, LS174T, RKO, SW480, SW1116) afin de choisir des lignées avec des niveaux d'expression différents de LRP1. Ces lignées présentaient bien des niveaux différents d'expression de LRP1 (Annexe 2), mais en dehors de HT29 et CaCo2, aucune ne migrerait avec la technique de *wound healing* couplée ou non à la vidéomicroscopie. Cette absence de migration excluait donc l'utilisation de ces cellules pour l'étude des effets de la perte ou la restauration de l'expression de LRP1. La transfection de mini-domaines fonctionnels de LRP1 (domaines CCR2 et CCR4) par électroporation dans les lignées CaCo2 et HT29 entraînait une mort cellulaire importante ce qui ne permettait plus l'étude de la migration par la technique de

wound healing. Nous avons dans la toute fin de cette thèse commencé à mettre au point l'étude de la migration verticale en 2D à travers un système *transwell*. Nos premiers résultats ont montré qu'en raison d'une très importante migration de certaines lignées cellulaires (HT29, HCT116) ce système pourrait permettre l'étude de la migration cellulaire même en cas de mort cellulaire importante liée à la transfection des mini-domaines de LRP1.

En raison des très nombreuses difficultés rencontrées lors de la mise au point de l'étude de la réexpression de LRP1 dans les lignées cancéreuses coliques, nous avons donc temporairement abandonné les études en culture cellulaire. Cependant, nous avons avancé dans la détermination d'une méthode d'étude de la migration cellulaire après transfection par les mini-domaines fonctionnels de LRP1.

Les études en culture cellulaire du rôle de LRP1 dans des lignées cancéreuses coliques seront poursuivies après cette thèse et font déjà l'objet d'un travail post-doctorat dans notre unité.

Bibliographie

Abe S, Kawai K, Ishihara S, Nozawa H, Hata K, Kiyomatsu T, et al. Prognostic impact of carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in stage IV colorectal cancer patients after R0 resection. *J Surg Res.* 2016;205(2):384-92.

AcSé Crizotinib. Disponible à l'URL : <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-la-recherche/Recherche-clinique/Le-programme-AcSe/AcSe-crizotinib>

Al-Shamsi HO, Jones J, Fahmawi Y, Dahbour I, Tabash A, Abdel-Wahab R, et al. Molecular spectrum of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *TP53*, and *APC* somatic gene mutations in Arab patients with colorectal cancer: determination of frequency and distribution pattern. *J Gastrointest Oncol.* 2016;7(6):882-902.

Amos S, Mut M, diPierro CG, Carpenter JE, Xiao A, Kohutek ZA, et al. Protein kinase C-alpha-mediated regulation of low-density lipoprotein receptor related protein and urokinase increases astrocytoma invasion. *Cancer Res.* 2007;67(21):10241-51.

Amri R, Bordeianou LG, Sylla P, Berger DL. Treatment delay in surgically-treated colon cancer: does it affect outcomes? *Ann Surg Oncol.* 2014;21(12):3909-16.

Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Chen XQ, et al. K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology.* 1997;112(4):1114-20.

ANSM. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Biomarqueurs. Disponible à l'URL : [http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Biomarqueurs/Biomarqueurs-et-produits-de-sante/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Biomarqueurs/Biomarqueurs-et-produits-de-sante/(offset)/0)

Aparicio T, Schischmanoff O, Poupardin C, Soufir N, Angelakov C, Barrat C, et al. Deficient mismatch repair phenotype is a prognostic factor for colorectal cancer in elderly patients. *Dig Liver Dis.* 2013;45(4):245-50.

Aparicio T, Schischmanoff O, Poupardin C, Mary F, Soufir N, Barrat C, et al. High prevalence of deficient mismatch repair phenotype and the V600E BRAF mutation in elderly patients with colorectal cancer. *J Geriatr Oncol.* 2014;5(4):384-8.

Appert-Collin A, Bennisroune A, Jeannesson P, Terryn C, Fuhrmann G, Morjani H, Dedieu S. Role of LRP-1 in cancer cell migration in 3-dimensional collagen matrix. *Cell Adh Migr.* 2016 ;27:1-11.

Araujo RL, Gönen M, Allen P, DeMatteo R, Kingham P, Jarnagin W, et al. Positive postoperative CEA is a strong predictor of recurrence for patients after resection for colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(9):3087-93.

Arifi S, Elmesbahi O, Amarti Riffi A. Primary signet ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Bull Cancer.* 2015;102(10):880-8.

Bakker IS, Grossmann I, Henneman D, Havenga K, Wiggers T. Risk factors for anastomotic leakage and leak-related mortality after colon cancer surgery in a nationwide audit. *Br J Surg.* 2014;101(4):424-32; discussion 432.

Balschun K, Haag J, Wenke AK, von Schönfels W, Schwarz NT, Röcken C. KRAS, NRAS, PIK3CA exon 20, and BRAF genotypes in synchronous and metachronous primary colorectal cancers diagnostic and therapeutic implications. *J Mol Diagn.* 2011;13(4):436-45.

Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, de la Vega MF, Martin L, Roignot P, et al. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. *Cancer Res.* 2008;68(20):8541-6.

Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity.* 2001;14(3):303-13.

Baum L, Dong ZY, Choy KW, Pang CP, Ng HK. Low density lipoprotein receptor related protein gene amplification and 766T polymorphism in astrocytomas. *Neurosci Lett.* 1998;256(1):5-8.

Beaujouin M, Prébois C, Derocq D, Laurent-Matha V, Masson O, Patingre S, et al. Procathepsin D interacts with the extracellular domain of the beta chain of LRP1 and promotes LRP1-dependent fibroblast outgrowth. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 19):3336-46.

Becher O, Barton KL, Halvorson KG, Mclendon RE. Pediatric high grade glioma and DIPG. In : *Molecular pathology of nervous system tumors.* Karajannis MA, Zagzag D eds. New-York USA : Springer-Verlag ; 2015. pp 95-104.

Bedenne L, Faivre J, Boutron MC, Piard F, Cauvin JM, Hillon P. Adenoma--carcinoma sequence or "de novo" carcinogenesis? A study of adenomatous remnants in a population-based series of large bowel cancers. *Cancer.* 1992;69(4):883-8.

Benedict M, Galvao Neto A, Zhang X. Interval colorectal carcinoma: An unsolved debate. *World J Gastroenterol.* 2015;21(45):12735-41.

Benes P, Jurajda M, Zaloudík J, Izakovicová-Hollá L, Vácha J. C766T low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) gene polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2003;5(3):R77-81.

Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol.* 2009;27(11):1814-21.

Bertrand Y, Currie JC, Poirier J, Demeule M, Abulrob A, Fatehi D, et al. Influence of glioma tumour microenvironment on the transport of ANG1005 via low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *Br J Cancer.* 2011;105(11):1697-707.

Bhangu A, Ali SM, Darzi A, Brown G, Tekkis P. Meta-analysis of survival based on resection margin status following surgery for recurrent rectal cancer. *Colorectal Dis.* 2012;14(12):1457-66.

Binder RJ, Srivastava PK. Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):6128-33.

Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Therapeutics*. 2001; 69:89–95.

Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(12):932-43.

Boissière-Michot F, Frugier H, Ho-Pun-Cheung A, Lopez-Crapez E, Duffour J, Bibeau F. Immunohistochemical staining for p16 and BRAFV600E is useful to distinguish between sporadic and hereditary (Lynch syndrome-related) microsatellite instable colorectal carcinomas. *Virchows Arch*. 2016;469(2):135-44.

Bollag G, Clapp DW, Shih S, Adler F, Zhang YY, Thompson P, et al. Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. *Nat Genet*. 1996;12(2):144-8.

Bosch SL, Teerenstra S, de Wilt JH, Cunningham C, Nagtegaal ID. Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions. *Endoscopy*. 2013;45(10):827-34.

Bosman FT, Hamilton SR, Lambert R. Colorectal Cancer. In : *World Cancer Report 2014*. Stewart BW and Wild CP eds. IARC press, Lyon 2014. pp : 393-403.

Boucher P, Liu P, Gotthardt M, Hiesberger T, Anderson RG, Herz J. Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low Density lipoprotein receptor-related protein in caveolae. *J Biol Chem*. 2002 May 3;277(18):15507-13.

Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science*. 2003;300(5617):329-32.

Boulagnon C, Dudez O, Beaudoux O, Dalstein V, Kianmanesh R, Bouché O, Diebold MD. BRAFV600E Gene Mutation in Colonic Adenocarcinomas. Immunohistochemical Detection Using Tissue Microarray and Clinicopathologic Characteristics: An 86 Case Series. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24(2):88-96.

Boulay JL, Mild G, Lowy A, Reuter J, Lagrange M, Terracciano L, et al. SMAD4 is a predictive marker for 5-fluorouracil-based chemotherapy in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2002;87(6):630-4. Erratum in: *Br J Cancer*. 2003;89(2):422.

Bouvier AM, Bouvier V, Léone N. Côlon, Rectum. In : *Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Etude à partir des registres des cancers du réseau Francim*. Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff AS, Bossard N eds. pp :30-33.

Braun MS, Richman SD, Quirke P, Daly C, Adlard JW, Elliott F, et al. Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: results from the UK MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol*. 2008;26(16):2690-8.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986;232(4746):34-47.

Brungs D, Aghmesheh M, de Souza P, Ng W, Chua W, Carolan M, et al. Sidedness is prognostic in locoregional colon cancer: an analysis of 9509 Australian patients. *BMC Cancer*. 2017;17(1):251.

Buache É, Rio MC. [The tumoral stroma, a breeding ground for cancer cells]. *Med Sci (Paris)*. 2014;30(4):385-90.

Cáceres LC, Bonacci GR, Sánchez MC, Chiabrando GA. Activated $\alpha(2)$ macroglobulin induces matrix metalloproteinase 9 expression by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 through MAPK-ERK1/2 and NF- κ B activation in macrophage-derived cell lines. *J Cell Biochem*. 2010;111(3):607-17.

Cam JA, Zerbinatti CV, Li Y, Bu G. Rapid endocytosis of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates cell surface distribution and processing of the beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem*. 2005;280(15):15464-70.

Cancer.net : Colorectal Cancer. Disponible à l'URL : <http://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer>

Cancer.org : Colorectal cancer. Disponible à l'URL : <https://www.cancer.org/cancer/côlon-rectal-cancer.html>

Cancer Research UK : Bowel Cancer. Disponible à l'URL : <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/bowel-cancer>

Carr NJ, Mahajan H, Tan KL, Hawkins NJ, Ward RL. Serrated and non-serrated polyps of the colorectum: their prevalence in an unselected case series and correlation of BRAF mutation analysis with the diagnosis of sessile serrated adenoma. *J Clin Pathol*. 2009;62(6):516-8.

Catasús L, Gallardo A, Llorente-Cortés V, Escuin D, Muñoz J, Tibau A, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is associated with proliferation and invasiveness in Her-2/neu and triple-negative breast carcinomas. *Hum Pathol*. 2011;42(11):1581-88.

Catasús L, Llorente-Cortés V, Cuatrecasas M, Pons C, Espinosa I, Prat J. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) is associated with highgrade, advanced stage and p53 and p16 alterations in endometrial carcinomas. *Histopathology*. 2011;59(3):567-71.

Chang SC, Lin PC, Lin JK, Lin CH, Yang SH, Liang WY, et al. Mutation Spectra of Common Cancer-Associated Genes in Different Phenotypes of Colorectal Carcinoma Without Distant Metastasis. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(3):849-55.

Chantrain C, DeClerck YA. Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Med Sci (Paris)*. 2002;18 :565-75.

Charbonnet P, Gervaz P, Andres A, Bucher P, Konrad B, Morel P. Results of emergency Hartmann's operation for obstructive or perforated left-sided colorectal cancer. *World J Surg Oncol.* 2008;6:90.

Cheetham S, Tang MJ, Mesak F, Kennecke H, Owen D and Tai IT. SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-aza-2'deoxyctidine to increase SPARC expression and improve therapy response. *Br J Cancer.* 2008 ;98(11): 1810-1819.

Chen WD, Han ZJ, Skoletsky J, Olson J, Sah J, Myeroff L, et al. Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(15):1124-32.

Chen S, Bu G, Takei Y, Sakamoto K, Ikematsu S, Muramatsu T, Kadomatsu K. Midkine and LDL-receptor-related protein 1 contribute to the anchorage-independent cell growth of cancer cells. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 22):4009-15.

Chen KH, Lin YL, Liao JY, Tsai JH, Tseng LH, Lin LI, et al. BRAF mutation may have different prognostic implications in early- and late-stage colorectal cancer. *Med Oncol.* 2016;33(5):39.

Christensen IJ, Br nner N, Dowell B, Davis G, Nielsen HJ, Newstead G, King D. Plasma TIMP-1 and CEA as Markers for Detection of Primary Colorectal Cancer: A Prospective Validation Study Including Symptomatic and Non-symptomatic Individuals. *Anticancer Res.* 2015;35(9):4935-41.

Chu CT, Pizzo SV. Receptor-mediated antigen delivery into macrophages. Complexing antigen to alpha 2-macroglobulin enhances presentation to T cells. *J Immunol.* 1993 Jan 1;150(1):48-58.

Chuang TY, Guo Y, Seki SM, Rosen AM, Johanson DM, Mandell JW, et al. LRP1 expression in microglia is protective during CNS autoimmunity. *Acta Neuropathol Commun.* 2016;4(1):68.

Chung NS, Wasan KM. Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004 ; 56(9):1315–34.

Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2009;20(7):1223-9.

Conese M, Nykjaer A, Petersen CM, Cremona O, Pardi R, Andreasen PA, et al. alpha-2 Macroglobulin receptor/Ldl receptor-related protein(Lrp)-dependent internalization of the urokinase receptor. *J Cell Biol.* 1995;131(6 Pt 1):1609-22.

Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, Coffee EM, Nishino M, Cogdill AP, et al. EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov.* 2012;2(3):227-35.

Corley DA, Jensen CD, Marks AR, Zhao WK, Lee JK, Doubeni CA, et al. Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer and death. *N Engl J Med.* 2014;370(14):1298-306.

Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(7):979-94.

Covarrubias R, Wilhelm AJ, Major AS. Specific deletion of LDL receptor-related protein on macrophages has skewed in vivo effects on cytokine production by invariant natural killer T cells. *PLoS One.* 2014;9(7):e102236.

Cress RD, Morris C, Ellison GL, Goodman MT. Secular changes in colorectal cancer incidence by subsite, stage at diagnosis, and race/ethnicity, 1992-2001. *Cancer.* 2006;107(5 Suppl):1142-52.

Dahlin AM, Henriksson ML, Van Guelpen B, Stenling R, Oberg A, Rutegård J, Palmqvist R. Colorectal cancer prognosis depends on T-cell infiltration and molecular characteristics of the tumor. *Mod Pathol.* 2011;24(5):671-82.

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 Côlon Cancer. *N Engl J Med.* 2016;374(3):211-22.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-54.

Dedieu S, Langlois B. LRP-1: a new modulator of cytoskeleton dynamics and adhesive complex turnover in cancer cells. *Cell Adh Migr.*;2(2):77-80.

Dedieu S, Langlois B, Devy J, Sid B, Henriët P, Sartelet H, et al. LRP-1 silencing prevents malignant cell invasion despite increased pericellular proteolytic activities. *Mol Cell Biol.* 2008;28(9):2980-95.

Demeule M, Currie JC, Bertrand Y, Ché C, Nguyen T, Régina A, et al. Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *J Neurochem.* 2008;106(4):1534-44.

Denisov V, Strong W, Walder M, Gringrich J, Wintz H. Development and validation of RQI: an RNA quality indicator for the experion automated electrophoresis system. Disponible à l'URL : <http://www.gene-quantification.com/Bio-Rad-bulletin-5761.pdf>

Desrosiers RR, Rivard ME, Grundy PE, Annabi B. Decrease in LDL receptor-related protein expression and function correlates with advanced stages of Wilms tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2006 ;46(1): 40–9.

de Kok JB, van Solinge WW, Ruers TJ, Roelofs RW, van Muijen GN, Willems JL, Swinkels DW. Detection of tumour DNA in serum of colorectal cancer patients. *Scand J Clin Lab Invest.* 1997;57(7):601-4.

de Vries TJ, Verheijen JH, de Bart AC, Weidle UH, Ruitter DJ, van Muijen GN. Decreased expression of both the low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha(2)-macroglobulin receptor and its receptor-associated protein in late stages of cutaneous melanocytic tumor progression. *Cancer Res.* 1996;56(6):1432-9.

Diebold MD, Samalin E, Merle C, Bouché O, Higuero T, Jolly D, et al. Colonic flat neoplasia: frequency and concordance between endoscopic appearance and histological diagnosis in a French prospective series. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(9):1795-800.

Dietel M, Jöhrens K, Laffert MV, Hummel M, Bläker H, Pfitzner BM, et al. A 2015 update on predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Ther*. 2015;22(9):417-30.

Ding Y, Xian X, Holland WL, Tsai S, Herz J. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Protects Against Hepatic Insulin Resistance and Hepatic Steatosis. *EBioMedicine*. 2016;7:135-45.

Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espin E, et al. BRAF- V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene*. 2005;24(24):3995-8.

Donoso M, Cancino J, Lee J, van Kerkhof P, Retamal C, Bu G, et al. Polarized traffic of LRP1 involves AP1B and SNX17 operating on Y-dependent sorting motifs in different pathways. *Mol Biol Cell*. 2009;20(1):481-97.

Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013;369(11):1023-34.

Drappatz J, Brenner A, Wong ET, Eichler A, Schiff D, Groves MD, et al. Phase I study of GRN1005 in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2013 Mar 15;19(6):1567-76.

Dreyer C, Raymond E, Faivre S. La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. *Cancéro dig*. 2009 ;1(3) :187-9.

Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis*. 1997;12(1):19-23.

Ebert MP, Tanzer M, Balluff B, Burgermeister E, Kretzschmar AK, Hughes DJ, et al. TFAP2E-DKK4 and chemoresistance in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2012 ;366(1): 44-53.

e-cancer. Les cancers en France. Edition 2014. Disponible à l'URL : <http://www.unicancer.fr/sites/default/files/Les%20cancers%20en%20France%20-%20Edition%202014%20-%20V5.pdf>

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-47.

El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, Bascoul-Mollevi C, Gillet B, Nouaille M, et al. Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin Cancer Res*. 2016;22(12):3067-77

- Emonard H, Th  ret L, Bennisroune AH, Dedieu S. Regulation of LRP-1 expression: make the point. *Pathol Biol (Paris)*. 2014;62(2):84-90.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259-69.
- Fagerberg L, Hallstr  m BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(2):397-406.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
- Fernandez-Castaneda A, Arandjelovic S, Stiles TL, Schlobach RK, Mowen KA, Gonias SL, Gaultier A. Identification of the low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein-1 interactome in central nervous system myelin suggests a role in the clearance of necrotic cell debris. *J Biol Chem*. 2013;288(7):4538-48.
- Fischer N, Haug M, Kwok WW, Kalbacher H, Wernet D, Dannecker GE, Holzer U. Involvement of CD91 and scavenger receptors in Hsp70-facilitated activation of human antigen-specific CD4+ memory T cells. *Eur J Immunol*. 2010;40(4):986-97.
- Frank PG, Pavlides S, Lisanti MP. Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis. *Cell Tissue Res*. 2009;335(1):41-7.
- Frattini M, Gallino G, Signoroni S, Balestra D, Lusa L, Battaglia L, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2008;263(2):170-81.
- Fujita K, Yamamoto H, Matsumoto T, Hirahashi M, Gushima M, Kishimoto J, et al. Sessile serrated adenoma with early neoplastic progression: a clinicopathologic and molecular study. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(2):295-304.
- Galissier T, Schneider C, Nasri S, Kanagaratnam L, Fichel C, Coquelet C, et al. Biobanking of Fresh-Frozen Human Adenocarcinomatous and Normal C  lon Tissues: Which Parameters Influence RNA Quality? *PLoS One*. 2016;11(4):e0154326.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pag  s C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
- Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol*. 2014;232(2):199-209.
- García-Alfonso P, García-Foncillas J, Salazar R, Pérez-Segura P, García-Carbonero R, Musul  n-Palet E, et al. Updated guidelines for biomarker testing in colorectal carcinoma: a national consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol*. 2015;17(4):264-73.

García-Solano J, Pérez-Guillermo M, Conesa-Zamora P, Acosta-Ortega J, Trujillo-Santos J, Cerezuela-Fuentes P, Mäkinen MJ. Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Hum Pathol*. 2010;41(10):1359-68.

Gaultier A, Arandjelovic S, Niessen S, Overton CD, Linton MF, Fazio S, et al. Regulation of tumor necrosis factor receptor-1 and the IKK-NF-kappaB pathway by LDL receptor-related protein explains the antiinflammatory activity of this receptor. *Blood*. 2008;111(11):5316-25.

Geraghty J, Butler P, Seaman H, Snowball J, Sarkar S, Blanks R, et al. Optimising faecal occult blood screening: retrospective analysis of NHS Bowel Cancer Screening data to improve the screening algorithm. *Br J Cancer*. 2014 ;111(11):2156-62.

Gilardoni MB, Remedi MM, Oviedo M, Dellavedova T, Sarría JP, Racca L, et al. Differential expression of Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP-1) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in prostate gland: From normal to malignant lesions. *Pathol Res Pract*. 2017;213(1):66-71.

Globocan 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Accessible à l'URL : http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal

Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature*. 1979;279(5715):679-85.

Gonias SL, Gaultier A, Jo M. Regulation of the urokinase receptor (uPAR) by LDL receptor-related protein-1 (LRP1). *Curr Pharm Des*. 2011;17(19):1962-9.

Gonias SL, Campana WM. LDL receptor-related protein-1: a regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer, and injury to the nervous system. *Am J Pathol*. 2014;184(1):18-27.

Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *Biomed Res Int*. 2015;2015:149014.

Gonzalo DH, Lai KK, Shadrach B, Goldblum JR, Bennett AE, Downs-Kelly E, et al. Gene expression profiling of serrated polyps identifies annexin A10 as a marker of a sessile serrated adenoma/polyp. *J Pathol*. 2013;230(4):420-9.

Grimsley PG, Quinn KA, Chesterman CN, Owensby DA. Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) expression varies among Hep G2 cell lines. *Thromb Res*. 1997;88(6):485-98.

Grosclaude P, Bossard N, Remontet L, Belot A, Arveux P, Bouvier AM, et al. *Survie des patients atteints de cancer en France : étude des registres du réseau Francim*. Paris : Springer-Verlag, 2007. 406p.

Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2000;342(2):69-77.

Guillou PJ, Quirke P, Thorpe H, Walker J, Jayne DG, Smith AM, et al. Short-term endpoints of conventional versus laparoscopic-assisted surgery in patients with colorectal cancer (MRC CLASICC trial): multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2005;365(9472):1718-26.

Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350-6.

Guttman M, Betts GN, Barnes H, Ghassemian M, van der Geer P, Komives EA. Interactions of the NPXY microdomains of the low density lipoprotein receptor-related protein 1. *Proteomics*. 2009;9(22):5016-28.

Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, Ilyas M, Morreau H, Nakamura S-I, et al. Carcinoma of the côlon and rectum. In: WHO classification of tumours of the digestive system. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND eds. Lyon, France: IARC Press; 2010. pp.132–146.

HAS (Haute Autorité de Santé). Protocole de surveillance post-polypectomie. Disponible à l'URL : https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-11/protocole-surveillance-polypectomie_v8.pdf

Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Côlon Rectum*. 1993;36(7):627-35.

He WZ, Liao FX, Jiang C, Kong PF, Yin CX, Yang Q, et al. Primary Tumor Location as a Predictive Factor for First-line Bevacizumab Effectiveness in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *J Cancer*. 2017;8(3):388-394.

Hendrickx DA, Koning N, Schuurman KG, van Strien ME, van Eden CG, Hamann J, Huitinga I. Selective upregulation of scavenger receptors in and around demyelinating areas in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013;72(2):106-18.

Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J*. 1988;7(13):4119-27.

Herz J, Clouthier DE, Hammer RE. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell*. 1992;71(3):411-21.

Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest*. 2001;108(6):779-84.

Herz J, Bock HH. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Ann Rev Biochem*. 2002;71:405-34.

Hogan J, Burke JP, Samaha G, Condon E, Waldron D, Faul P, Coffey JC. Overall survival is improved in mucinous adenocarcinoma of the côlon. *Int J Colorectal Dis*. 2014;29(5):563-9.

Hohenberger W, Reingruber B, Merkel S. Surgery for côlon cancer. *Scand J Surg*. 2003;92(1):45-52.

Holten-Andersen MN, Christensen IJ, Nielsen HJ, Stephens RW, Jensen V, Nielsen OH, et al. Total levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in plasma yield high diagnostic sensitivity and specificity in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8(1):156-64.

Huang XY, Shi GM, Devbhandari RP, Ke AW, Wang Y, Wang XY, et al. Low level of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 predicts an unfavorable prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *PLoS One.* 2012;7(3):e32775.

Hugen N, Verhoeven RH, Lemmens VE, van Aart CJ, Elferink MA, Radema SA, et al. Colorectal signet-ring cell carcinoma: benefit from adjuvant chemotherapy but a poor prognostic factor. *Int J Cancer.* 2015;136(2):333-9.

Hurlstone DP, Sanders DS, Lobo AJ, McAlindon ME, Cross SS. Indigo carmine-assisted high-magnification chromoscopic colonoscopy for the detection and characterisation of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis: a prospective evaluation. *Endoscopy* 2005; 37(12): 1186-92.

Hurlstone DP, Karajeh M, Cross SS, McAlindon ME, Brown S, Hunter MD, Sanders DS. The role of high-magnification-chromoscopic colonoscopy in hereditary nonpolyposis colorectal cancer screening: a prospective back-to-back endoscopic study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(10): 2167-73.

Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29:1261–70.

Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med.* 2014;371(2):187-8

Inamura K, Yamauchi M, Nishihara R, Kim SA, Mima K, Sukawa Y, et al. Prognostic significance and molecular features of signet-ring cell and mucinous components in colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(4):1226-35.

INCa : Institut National du Cancer. Le cancer du côlon. Disponible à l'URL : <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-côlon/Points-cles>

Ishihara S, Muro K, Sasaki K, Yasuda K, Otani K, Nishikawa T, et al. Impact of Primary Tumor Location on Postoperative Recurrence and Subsequent Prognosis in Nonmetastatic Colon Cancers: A Multicenter Retrospective Study Using a Propensity Score Analysis. *Ann Surg.* Epub : 2017 Mar 7.

Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(12):988-93.

Jeanet M, Tougeron D, Tachon G, Cortes U, Archambaut C, Fromont G, Karayan-Tapon L. High Intra- and Inter-Tumoral Heterogeneity of RAS Mutations in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12). pii: E2015.

Jensen JK, Dolmer K, Schar C, Gettins PG. Receptor-associated protein (RAP) has two high-affinity binding sites for the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP): consequences for the chaperone functions of RAP. *Biochem J.* 2009;421(2):273-82.

Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:535-62.

Jones JC, Grothey A. Understanding *BRAF*-Mutant Colorectal Cancer. *ASCO daily News* 2016. Disponible à l'URL : <https://am.asco.org/daily-news/understanding-braf-mutant-colorectal-cancer>

Juo YY, Johnston FM, Zhang DY, Juo HH, Wang H, Pappou EP, et al. Prognostic value of CpG island methylator phenotype among colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol.* 2014;25(12):2314-27.

Kafa H, Wang JT, Rubio N, Klippstein R, Costa PM, Hassan HA, et al. Translocation of LRP1 targeted carbon nanotubes of different diameters across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J Control Release.* 2016;225:217-29.

Kajihara I, Jinnin M, Harada M, Makino K, Honda N, Makino T, et al. miR-205 down-regulation promotes proliferation of dermatofibrosarcoma protuberans tumor cells by regulating LRP-1 and ERK phosphorylation. *Arch Dermatol Res.* 2014;306(4):367-74.

Kancha RK, Stearns ME, Hussain MM. Decreased expression of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in invasive cell clones derived from human prostate and breast tumor cells. *Oncol Res.* 1994;6(8):365-72.

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(17):1757-65.

Kennelly RP, Rogers AC, Winter DC; Abdominoperineal Excision Study Group. Multicentre study of circumferential margin positivity and outcomes following abdominoperineal excision for rectal cancer. *Br J Surg.* 2013;100(1):160-6.

Kiesslich R, Fritsch J, Holtmann M, Koehler HH, Stolte M, Kanzler S, et al. Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003; 124(4): 880-8.

Kinar Y, Akiva P, Choman E, Kariv R, Shalev V, Levin B, Narod SA, Goshen R. Performance analysis of a machine learning flagging system used to identify a group of individuals at a high risk for colorectal cancer. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171759.

Kim JH, Rhee YY, Kim KJ, Cho NY, Lee HS, Kang GH. Annexin A10 expression correlates with serrated pathway features in colorectal carcinoma with microsatellite instability. *APMIS.* 2014;122(12):1187-95.

Kim SH, Chang HJ, Kim DY, Park JW, Baek JY, Kim SY, et al. What Is the Ideal Tumor Regression Grading System in Rectal Cancer Patients after Preoperative Chemoradiotherapy? *Cancer Res Treat.* 2016;48(3):998-1009.

Kish T, Uppal P. Trifluridine/Tipiracil (Lonsurf) for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *P T.* 2016;41(5):314-25.

Klar J, Schuster J, Khan TN, Jameel M, Mäbert K, Forsberg L, et al. Whole exome sequencing identifies LRP1 as a pathogenic gene in autosomal recessive keratosis pilaris atrophicans. *J Med Genet.* 2015;52(9):599-606.

Knox RD, Luey N, Sioson L, Kedziora A, Clarkson A, Watson N, et al. Medullary colorectal carcinoma revisited: a clinical and pathological study of 102 cases. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(9):2988-96.

Knutson A, Lillhager P, Westin G. Identification of a CpG island in the human LRP-2 gene and analysis of its methylation status in parathyroid adenomas. *Biol Chem.* 2000;381(5-6):433-8.

Koelzer VH, Lugli A. The tumor border configuration of colorectal cancer as a histomorphological prognostic indicator. *Front Oncol.* 2014;4:29.

Koelzer VH, Zlobec I, Berger MD, Cathomas G, Dawson H, Dirschmid K, et al. Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Arch.* 2015;466(5):485-93.

Kohonen-Corish MR, Daniel JJ, Chan C, Lin BP, Kwun SY, Dent OF, et al. Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in stage C colon cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(10):2318-24.

Kopreski MS, Benko FA, Kwee C, Leitzel KE, Eskander E, Lipton A, Gocke CD. Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1997;76(10):1293-9.

Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Esser V, Brown MS. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(15):5810-4.

Kuhry E, Schwenk W, Gaupset R, Romild U, Bonjer J. Long-term outcome of laparoscopic surgery for colorectal cancer: a cochrane systematic review of randomised controlled trials. *Cancer Treat Rev.* 2008;34(6):498-504.

Kurzrock R, Gabrail N, Chandhasin C, Moulder S, Smith C, Brenner A, et al. Safety, pharmacokinetics, and activity of GRN1005, a novel conjugate of angiopep-2, a peptide facilitating brain penetration, and paclitaxel, in patients with advanced solid tumors. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(2):308-16.

Kütt H, Herz J, Stanley KK. Structure of the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) promoter. *Biochim Biophys Acta.* 1989;1009(3):229-36.

Langlois B, Emonard H, Martiny L, Dedieu S. [Multiple involvements of LRP-1 receptor in tumor progression]. *Pathol Biol (Paris).* 2009;57(7-8):548-54.

Lash RH, Genta RM, Schuler CM. Sessile serrated adenomas: prevalence of dysplasia and carcinoma in 2139 patients. *J Clin Pathol.* 2010;63(8):681-6.

Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509-20.

Leca J, Martinez S, Lac S, Nigri J, Secq V, Rubis M et al. Cancer-associated fibroblast-derived annexin A6+ extracellular vesicles support pancreatic cancer aggressiveness. *J Clin Invest*. 2016;126(11):4140-56.

Le Cigne A, Chièze L, Beaussart A, El-Kirat-Chatel S, Dufrêne YF, Dedieu S, et al. Analysis of the effect of LRP-1 silencing on the invasive potential of cancer cells by nanomechanical probing and adhesion force measurements using atomic force microscopy. *Nanoscale*. 2016;8(13):7144-54.

Lecomte T, Cellier C, Meatchi T, Barbier JP, Cugnenc PH, Jian R, et al. Chromoendoscopic colonoscopy for detecting preneoplastic lesions in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005; 3(9): 897-902.

Lee HJ, Eom DW, Kang GH, Han SH, Cheon GJ, Oh HS, et al. Colorectal micropapillary carcinomas are associated with poor prognosis and enriched in markers of stem cells. *Mod Pathol*. 2013;26(8):1123-31.

Lee TJ, Clifford GM, Rajasekhar P, Rutter MD, Kometa S, Ritchie MC, et al. High yield of colorectal neoplasia detected by colonoscopy following a positive faecal occult blood test in the NHS Bowel Cancer Screening Programme. *J Med Screen*. 2011;18(2):82-6.

Lee YC, Lee YL, Chuang JP, Lee JC. Differences in survival between colon and rectal cancer from SEER data. *PLoS One*. 2013;8(11):e78709.

Lei L, Zhang H, Zhang XB, Lonser R, Thompson K, Raza A. Consensus and conflict in invasive micropapillary carcinoma: a case report and review of the literature. *J Gastrointest Oncol*. 2016;7(Suppl 1):S55-61.

Levin B, Brooks D, Smith RA, Stone A. Emerging technologies in screening for colorectal cancer: CT colonography, immunochemical fecal occult blood tests, and stool screening using molecular markers. *CA Cancer J Clin*. 2003;53(1):44-55.

Li Y, Wood N, Grimsley P, Yellowlees D, Donnelly PK. In vitro invasiveness of human breast cancer cells is promoted by low density lipoprotein receptor-related protein. *Invasion Metastasis*. 1998-1999;18(5-6):240-51.

Li Y, Marzolo MP, van Kerkhof P, Strous GJ, Bu G. The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*. 2000;275(22):17187-94.

Li Y, Cam J, Bu G. Low-density lipoprotein receptor family: endocytosis and signal transduction. *Mol Neurobiol*. 2001;23(1):53-67.

Li Y, Reynolds RC. LRP1: A Tumor and Metastasis Promoter or Suppressor? *Biochem Pharmacol* 2012 ;1:e121

Li Y, Zheng X, Gong M, Zhang J. Delivery of a peptide-drug conjugate targeting the blood brain barrier improved the efficacy of paclitaxel against glioma. *Oncotarget*. 2016;7(48):79401-79407.

Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008;26(3):374-9.

Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev*. 2008;88(3):887-918.

Link A, Balaguer F, Shen Y, Nagasaka T, Lozano JJ, Boland CR, Goel A. Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(7):1766-74.

Lino-Silva LS, Salcedo-Hernández RA, Herrera-Gómez A, Padilla-Rosciano A, Ramírez-Jaramillo M, Herrera-Goepfert RE, Meneses-García A. Colonic cribriform carcinoma, a morphologic pattern associated with low survival. *Int J Surg Pathol*. 2015;23(1):13-9.

Liu W, Sun Y, Zhang L, Xing BC. Negative surgical margin improved long-term survival of colorectal cancer liver metastases after hepatic resection: a systematic review and meta-analysis. *Int J Colorectal Dis*. 2015;30(10):1365-73.

Llorente-Cortés V, Costales P, Bernués J, Camino-Lopez S, Badimon L. Sterol regulatory element-binding protein-2 negatively regulates low density lipoprotein receptor-related protein transcription. *J Mol Biol*. 2006;359(4):950-60.

Løberg M, Kalager M, Holme Ø, Hoff G, Adami HO, Bretthauer M. Long-term colorectal-cancer mortality after adenoma removal. *N Engl J Med*. 2014;371(9):799-807.

Lopez NE, Weiss AC, Robles J, Fanta P, Ramamoorthy SL. A systematic review of clinically available gene expression profiling assays for stage II colorectal cancer: initial steps toward genetic staging. *Am J Surg*. 2016;212(4):700-714.

Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, Gorlatova N, Migliorini MM, Loukinov D, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. *J Biol Chem*. 2002 May 3;277(18):15499-506.

Lu YJ, Wu CS, Li HP, Liu HP, Lu CY, Leu YW, et al. Aberrant methylation impairs low density lipoprotein receptor-related protein 1B tumor suppressor function in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49(5):412-24.

Lugli A. Results from the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) in Bern. 2016. Disponible à l'URL : https://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0ahUKEwjets_Yg7PTAhXMXhoKHS08DWcQFegg6MAM&url=http%3A%2F%2Fwww.viszerale.insel.ch%2Fde%2Fnewsletter-medien%2Freferate-berner-symp-

[16%2F%3Fno_cache%3D1%26cid%3D105949%26did%3D70440%26sechash%3D468a9770&usg=AFQjCNHt3ElmA8LE7xNiJSztC25VIHwbAg&sig2=g_-X7My51qvIKzBGQActPQ](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2670440/)

Maeda Y, Sadahiro S, Suzuki T, Haruki Y, Nakamura N. Significance of the mucinous component in the histopathological classification of colon cancer. *Surg Today*. 2016;46(3):303-8.

Mahley RW, Huang Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J Clin Invest*. 2007;117(1):94-8.

Mäkinen MJ, George SM, Jernvall P, Mäkelä J, Vihko P, Karttunen TJ. Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis. *J Pathol*. 2001;193(3):286-94.

Mäkinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2007;50(1):131-50.

Mantuano E, Jo M, Gonias SL, Campana WM. Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) regulates Rac1 and RhoA reciprocally to control Schwann cell adhesion and migration. *J Biol Chem*. 2010;285(19):14259-66.

Mantuano E, Brifault C, Lam MS, Azmoon P, Gilder AS, Gonias SL. LDL receptor-related protein-1 regulates NFκB and microRNA-155 in macrophages to control the inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(5):1369-74.

Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(25):2449-60.

Martinez-Ledesma E, Verhaak RG, Treviño V. Identification of a multi-cancer gene expression biomarker for cancer clinical outcomes using a network-based algorithm. *Sci Rep*. 2015;5:11966.

Masson O, Chavey C, Dray C, Meulle A, Daviaud D, Quilliot D, et al. LRP1 receptor controls adipogenesis and is up-regulated in human and mouse obese adipose tissue. *PLoS One*. 2009;4(10):e7422.

Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(25):2449-60.

May P, Reddy YK, Herz J. Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J Biol Chem*. 2002;277(21):18736-43.

May P, Woldt E, Matz RL, Boucher P. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Ann Med*. 2007;39(3):219-28.

Max N, Harbaum L, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Langner C. Tumour budding with and without admixed inflammation: two different sides of the same coin? *Br J Cancer*. 2016;114(4):368-71.

- McCawley N, Clancy C, O'Neill BD, Deasy J, McNamara DA, Burke JP. Mucinous Rectal Adenocarcinoma Is Associated with a Poor Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. 2016;59(12):1200-1208.
- McGarvey T, Hussain MM, Stearns ME. In situ hybridization studies of alpha 2-macroglobulin receptor and receptor-associated protein in human prostate carcinoma. *Prostate*. 1996;28(5):311-17.
- McGill SK, Kaltenbach T, Friedland S, Soetikno R. The learning curve for detection of non-polypoid (flat and depressed) colorectal neoplasms. *Gut*. 2015;64(1):184-5.
- Meng H, Chen G, Zhang X, Wang Z, Thomas DG, Giordano TJ, et al. Stromal LRP1 in lung adenocarcinoma predicts clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2011;17(8):2426-33.
- Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:16-25.
- Mlcochova J, Faltejskova-Vychytilova P, Ferracin M, Zagatti B, Radova L, Svoboda M, et al. MicroRNA expression profiling identifies *miR-31-5p/3p* as associated with time to progression in wild-type *RAS* metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Oncotarget* 2015;6(36): 38695-704.
- Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol*. 2011;29(6):610-8.
- Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res*. 1992;269(3):375-82.
- Montel V, Gaultier A, Lester RD, Campana WM, Gonias SL. The low-density lipoprotein receptor-related protein regulates cancer cell survival and metastasis development. *Cancer Res*. 2007;67(20):9817-24.
- Morson BC, Bussey HJR. Predisposing Causes of Intestinal Cancer. In : *Current Problems in Surgery, YearBook*. Medical Publishers, Chicago. 1970.
- Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2016;469(2):125-34.
- Myklebost O, Arheden K, Rogne S, Geurts van Kessel A, Mandahl N, Herz J, et al. The gene for the human putative apoE receptor is on chromosome 12 in the segment q13-14. *Genomics*. 1989;5(1):65-9.
- Nagtegaal ID, Knijn N, Hugen N, Marshall HC, Sugihara K, Tot T, et al. Tumor Deposits in Colorectal Cancer: Improving the Value of Modern Staging-A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Oncol*. 2017;35(10):1119-1127.

- Neels JG, van Den Berg BM, Lookene A, Olivecrona G, Pannekoek H, van Zonneveld AJ. The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. *J Biol Chem.* 1999;274(44):31305-11.
- Negru S, Papadopoulou E, Apeessos A, Stanculeanu DL, Ciuleanu E, Volovat C, et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in Greek and Romanian patients with colorectal cancer: a cohort study. *BMJ Open.* 2014;4(5):e004652.
- Neofytou K, Giakoustidis A, Neves MC, Morrison D, Giakoustidis D, Khan AZ, et al. Increased carcinoembryonic antigen (CEA) following neoadjuvant chemotherapy predicts poor prognosis in patients that undergo hepatectomy for liver-only colorectal metastases. *Langenbecks Arch Surg. Epub* : 2016 Apr 4.
- Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract.* 2009;205(12):858-62.
- Niedzwiecki D, Bertagnolli MM, Warren RS, Compton CC, Kemeny NE, Benson AB 3rd, et al. Documenting the natural history of patients with resected stage II adenocarcinoma of the colon after random assignment to adjuvant treatment with edrecolomab or observation: results from CALGB 9581. *J Clin Oncol.* 2011;29(23):3146-52.
- Nishihara R, Wu K, Lochhead P, Morikawa T, Liao X, Qian ZR, et al. Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy. *N Engl J Med.* 2013;369(12):1095-105.
- Nitsche U, Maak M, Schuster T, Künzli B, Langer R, Slotta-Huspenina J, Janssen KP, Friess H, Rosenberg R. Prediction of prognosis is not improved by the seventh and latest edition of the TNM classification for colorectal cancer in a single-center collective. *Ann Surg.* 2011 Nov;254(5):793-800; discussion 800-1.
- Obermeyer K, Krueger S, Peters B, Falkenberg B, Roessner A, Röcken C. The expression of low density lipoprotein receptor-related protein in colorectal carcinoma. *Oncol Rep.* 2007;17(2):361-7.
- Obermoeller-McCormick LM, Li Y, Osaka H, FitzGerald DJ, Schwartz AL, Bu G. Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 5):899-908.
- O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, et al. Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(12):1491-501.
- Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, Henson PM. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med.* 2001;194(6):781-95.

Okamura T, Shimada Y, Nogami H, Kameyama H, Kobayashi T, Kosugi S, et al. Tumor Budding Detection by Immunohistochemical Staining is Not Superior to Hematoxylin and Eosin Staining for Predicting Lymph Node Metastasis in pT1 Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum*. 2016;59(5):396-402.

Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982;5(6):649-55.

Orr AW, Pedraza CE, Pallero MA, Elzie CA, Goicoechea S, Strickland DK, Murphy-Ullrich JE. Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin coreceptor that signals focal adhesion disassembly. *J Cell Biol*. 2003;161(6):1179-89. Erratum in: *J Cell Biol*. 2003 Aug 4;162(3):521.

Orr AW, Elzie CA, Kucik DF, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 14):2917-27.

Overton CD, Yancey PG, Major AS, Linton MF, Fazio S. Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse. *Circ Res*. 2007;100(5):670-7.

Ozawa H, Kotake K, Hosaka M, Hirata A, Nakagawa Y, Fujita S, Sugihara K. Incorporation of serum carcinoembryonic antigen levels into the prognostic grouping system of colon cancer. *Int J Colorectal Dis*. Epub : 2017 Feb 9.

Pai RK, Chen Y, Jakubowski MA, Shadrach BL, Plesec TP, Pai RK. Colorectal carcinomas with submucosal invasion (pT1): analysis of histopathological and molecular factors predicting lymph node metastasis. *Mod Pathol*. 2017 Jan;30(1):113-122.

Palomba G, Doneddu V, Cossu A, Paliogiannis P, Manca A, Casula M, et al. Prognostic impact of KRAS, NRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal carcinomas: a population-based study. *J Transl Med*. 2016;14(1):292.

Passot G, You B, Boschetti G, Fontaine J, Isaac S, Decullier E, et al. Pathological response to neoadjuvant chemotherapy: a new prognosis tool for the curative management of peritoneal colorectal carcinomatosis. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(8):2608-14.

Pawaria S, Kropp LE, Binder RJ. Immunotherapy of tumors with α 2-macroglobulin-antigen complexes pre-formed in vivo. *PLoS One*. 2012;7(11):e50365.

PDQ Cancer Genetics Editorial Board. Genetics of Colorectal Cancer (PDQ®). Disponible à l'URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032767/>

Peeters M, Kafatos G, Taylor A, Gastanaga VM, Oliner KS, Hechmati G, et al. Prevalence of RAS mutations and individual variation patterns among patients with metastatic colorectal cancer: A pooled analysis of randomised controlled trials. *Eur J Cancer*. 2015;51(13):1704-13.

- Pencheva N, Tran H, Buss C, Huh D, Drobnjak M, Busam K, Tavazoie SF. Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis. *Cell*. 2012;151(5):1068-82.
- Perez-Carbonell L, Sinicrope FA, Alberts SR, Oberg AL, Balaguer F, Castells A, et al. MiR-320e is a novel prognostic biomarker in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;113(1):83-90.
- Perrot G, Langlois B, Devy J, Jeanne A, Verzeaux L, Almagro S, et al. LRP-1--CD44, a new cell surface complex regulating tumor cell adhesion. *Mol Cell Biol*. 2012;32(16):3293-307.
- Petrelli F, Pezzica E, Cabiddu M, Coinu A, Borgonovo K, Ghilardi M, et al. Tumour Budding and Survival in Stage II Colorectal Cancer: a Systematic Review and Pooled Analysis. *J Gastrointest Cancer*. 2015;46(3):212-8.
- Pflanzner T, Janko MC, André-Dohmen B, Reuss S, Weggen S, Roebroek AJ, et al. LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid- β across the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging*. 2011;32(12):2323.e1-11.
- Pietrantonio F, Oddo D, Gloghini A, Valtorta E, Berenato R, Barault L, et al. MET-Driven Resistance to Dual EGFR and BRAF Blockade May Be Overcome by Switching from EGFR to MET Inhibition in BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(9):963-71.
- Pires LA, Hegg R, Freitas FR, Tavares ER, Almeida CP, Baracat EC, Maranhão RC. Effect of neoadjuvant chemotherapy on low-density lipoprotein (LDL) receptor and LDL receptor-related protein 1 (LRP-1) receptor in locally advanced breast cancer. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(6):557-64.
- Potet F, Soullard J. Polyps of the rectum and colon. *Gut*. 1971;12(6):468-82.
- Primrose JN, Perera R, Gray A, Rose P, Fuller A, Corkhill A, et al. Effect of 3 to 5 years of scheduled CEA and CT follow-up to detect recurrence of colorectal cancer: the FACS randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;311(3):263-70.
- Pyo JS, Sohn JH, Kang G. Medullary carcinoma in the colorectum: a systematic review and meta-analysis. *Hum Pathol*. 2016 Jul;53:91-6.
- Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
- Quinn KA, Grimsley PG, Dai YP, Tapner M, Chesterman CN, Owensby DA. Soluble low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) circulates in human plasma. *J Biol Chem*. 1997;272(38):23946-51.
- Quinn KA, Pye VJ, Dai YP, Chesterman CN, Owensby DA. Characterization of the soluble form of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Exp Cell Res*. 1999;251(2):433-41.
- Rad R, Cadiñanos J, Rad L, Varela I, Strong A, Kriegl L, et al. A genetic progression model of Braf(V600E)-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention. *Cancer Cell*. 2013;24(1):15-29.

Radzimanowski J, Ravaud S, Schlesinger S, Koch J, Beyreuther K, Sinning I, Wild K. Crystal structure of the human Fe65-PTB1 domain. *J Biol Chem*. 2008;283(34):23113-20.

Reekmans SM, Pflanzner T, Gordts PL, Isbert S, Zimmermann P, Annaert W, et al. Inactivation of the proximal NPXY motif impairs early steps in LRP1 biosynthesis. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(1):135-45.

Régina A, Demeule M, Ché C, Lavallée I, Poirier J, Gabathuler R, et al. Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br J Pharmacol*. 2008; 155(2): 185–197.

Renaud F, Mariette C, Vincent A, Wacrenier A, Maunoury V, Leclerc J, et al. The serrated neoplasia pathway of colorectal tumors: Identification of MUC5AC hypomethylation as an early marker of polyps with malignant potential. *Int J Cancer*. 2016;138(6):1472-81.

Renfro LA, Goldberg RM, Grothey A, Sobrero A, Adams R, Seymour MT, et al. Clinical Calculator for Early Mortality in Metastatic Colorectal Cancer: An Analysis of Patients From 28 Clinical Trials in the Aide et Recherche en Cancérologie Digestive Database. *J Clin Oncol*. Epub : 2017 Apr 17

Ribeiro Gomes J, Belotto M, D'Alpino Peixoto R. The role of surgery for unusual sites of metastases from colorectal cancer: A review of the literature. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(1):15-19.

Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003;349:247–57.

Richman SD, Seymour MT, Chambers P, Elliott F, Daly CL, Meade AM, et al. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):5931-7.

Robert J. La voie des MAP Kinases. In : *Signalisation cellulaire et cancer*. Robert J ed. Paris, France : Springer-Verlag. 2011. pp : 46-58.

Rodig SJ, Shapiro GI. Crizotinib, a small-molecule dual inhibitor of the c-Met and ALK receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010;11(12):1477-90.

Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, García-Albéniz X, Maurel J, Batlle JF. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;109:9-19.

Roebroek AJ, Reekmans S, Lauwers A, Feyaerts N, Smeijers L, Hartmann D. Mutant Lrp1 knock-in mice generated by recombinase-mediated cassette exchange reveal differential importance of the NPXY motifs in the intracellular domain of LRP1 for normal fetal development. *Mol Cell Biol*. 2006;26(2):605-16.

Rogers AC, Winter DC, Heeney A, Gibbons D, Lugli A, Puppa G, Sheahan K. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016;115(7):831-40.

Rosty C, Williamson EJ, Clendenning M, Walters RJ, Win AK, Jenkins MA, et al. Should the grading of colorectal adenocarcinoma include microsatellite instability status? *Hum Pathol*. 2014;45(10):2077-84.

Roth RM, Hampel H, Arnold CA, Yearsley MM, Marsh WL, Frankel WL. A modified Lynch syndrome screening algorithm in colon cancer: BRAF immunohistochemistry is efficacious and cost beneficial. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(3):336-43.

Rowland A, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, Sorich MJ. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(12):1888-94.

Roy A, Coum A, Marinescu VD, Põlajeva J, Smits A, Nelander S, et al. Glioma-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulates the recruitment of LRP1 positive mast cells. *Oncotarget*. 2015;6(27):23647-61.

Rubbia-Brandt L, Giostra E, Brezault C, Roth AD, Andres A, Audard V, et al. Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by liver surgery. *Ann Oncol*. 2007;18(2):299-304.

Rutter MD, Saunders BP, Schofield G, Forbes A, Price AB, Talbot IC. Pancolonial indigo carmine dye spraying for the detection of dysplasia in ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53(2): 256-60.

Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem*. 1999;274(53):37685-92.

Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, et al. Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med*. 2007;13(9):1029-31.

Sajanti SA, Väyrynen JP, Sirniö P, Klintrup K, Mäkelä J, Tuomisto A, Mäkinen MJ. Annexin A10 is a marker for the serrated pathway of colorectal carcinoma. *Virchows Arch*. 2015;466(1):5-12.

Sakamoto K, Bu G, Chen S, Takei Y, Hibi K, Kodera Y, et al. Premature ligand-receptor interaction during biosynthesis limits the production of growth factor midkine and its receptor LDL receptor-related protein 1. *J Biol Chem*. 2011;286(10):8405-13.

Salicioni AM, Gaultier A, Brownlee C, Cheezum MK, Gonias SL. Low density lipoprotein receptor-related protein-1 promotes beta1 integrin maturation and transport to the cell surface. *J Biol Chem*. 2004;279(11):10005-12.

Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:3219–26.

Sarivalasis A, Amram ML, Dietrich PY. [Exemples of tumor markers and their clinical utility]. *Rev Med Suisse*. 2013 May 22;9(387):1102-7.

Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*. 2000;47(2):251-5.

Schoen RE, Pinsky PF, Weissfeld JL, Yokochi LA, Church T, Laiyemo AO, et al. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. *N Engl J Med*. 2012;366(25):2345-57.

Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, et al. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2014;32(21):2240-7.

SEER : Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer Stat Facts: C lon and Rectum Cancer. Disponible   l'URL : <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>

Selvais C, Gaide Chevonnay HP, Lemoine P, Dedieu S, Henri t P, Courtoy PJ, et al. Metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ectodomain decreases endocytic clearance of endometrial matrix metalloproteinase-2 and -9 at menstruation. *Endocrinology*. 2009 Aug;150(8):3792-9.

Selvais C, D'Auria L, Tyteca D, Perrot G, Lemoine P, Troeberg L, et al. Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function. *FASEB J*. 2011;25(8):2770-81.

Shen Y, Han X, Wang J, Wang S, Yang H, Lu SH, Shi Y. Prognostic impact of mutation profiling in patients with stage II and III colon cancer. *Sci Rep*. 2016;6:24310.

Sid B, Dedieu S, Delorme N, Sartelet H, Rath GM, Bellon G, Martiny L. Human thyroid carcinoma cell invasion is controlled by the low density lipoprotein receptor-related protein-mediated clearance of urokinase plasminogen activator. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(10):1729-40.

Simeon-Dubach D, Burt AD, Hall PA. Quality really matters: the need to improve specimen quality in biomedical research. *J Pathol*. 2012;228(4):431-3.

Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2011;103:863–75.

Shaukat A, Mongin SJ, Geisser MS, Lederle FA, Bond JH, Mandel JS, Church TR. Long-term mortality after screening for colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013;369(12):1106-14.

Shida Y, Fujimori T, Tanaka H, Fujimori Y, Kimura R, Ueda H, et al. Clinicopathological features of serrated adenocarcinoma defined by Mäkinen in dukes' B colorectal carcinoma. *Pathobiology*. 2012;79(4):169-74.

Shinkins B, Nicholson BD, Primrose J, Perera R, James T, Pugh S, Mant D. The diagnostic accuracy of a single CEA blood test in detecting colorectal cancer recurrence: Results from the FACS trial. *PLoS One*. 2017;12(3):e0171810.

Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RG, Barzi A, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. Epub : Mar 1 2017

Song H, Li Y, Lee J, Schwartz AL, Bu G. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9. *Cancer Res*. 2009;69(3):879-86.

Sonoda I, Imoto I, Inoue J, Shibata T, Shimada Y, Chin K, et al. Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) expression by genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2004;64(11):3741-7.

Staudt ND, Jo M, Hu J, Bristow JM, Pizzo DP, Gaultier A, et al. Myeloid cell receptor LRP1/CD91 regulates monocyte recruitment and angiogenesis in tumors. *Cancer Res*. 2013;73(13):3902-12.

Stiles TL, Dickendeshler TL, Gaultier A, Fernandez-Castaneda A, Mantuano E, Giger RJ, Gonias SL. LDL receptor-related protein-1 is a sialic-acid-independent receptor for myelin-associated glycoprotein that functions in neurite outgrowth inhibition by MAG and CNS myelin. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 1):209-20.

Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*. 2012;487(7408):500-4.

Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS. Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem*. 1990;265(29):17401-4.

Strickland DK, Gonias SL, Argraves WS. Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(2):66-74.

Suárez E, González L, Pérez-Mitchell C, Ortiz AP, Ramírez-Sola M, Acosta J, et al. Pathway Analysis using Gene-expression Profiles of HPV-positive and HPV-negative Oropharyngeal Cancer Patients in a Hispanic Population: Methodological Procedures. *P R Health Sci J*. 2016;35(1):3-8.

Takai T, Kanaoka S, Yoshida K, Hamaya Y, Ikuma M, Miura N, et al. Fecal cyclooxygenase 2 plus matrix metalloproteinase 7 mRNA assays as a marker for colorectal cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(6):1888-93

TCGA : The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer. *Nature*. 2012; 487(7407): 330–337.

Tejpar S, Bosman F, Delorenzi M, Fiocca R, Yan P, Klingbiel D, et al. Microsatellite instability (MSI) in stage II and III colon cancer treated with 5FU-LV or 5FU-LV and irinotecan (PETACC 3-EORTC 40993-SAKK 60/00 trial). *J Clin Oncol* 2009;27(15 suppl) :4001-4001

Tejpar S, Stintzing S, Ciardiello F, Tabernero J, Van Cutsem E, Beier F, et al. Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Retrospective Analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 Trials. *JAMA Oncol*. Epub : 2016 Oct 10.

Terrand J, Bruban V, Zhou L, Gong W, El Asmar Z, May P, et al. LRP1 controls intracellular cholesterol storage and fatty acid synthesis through modulation of Wnt signaling. *J Biol Chem*. 2009;284(1):381-8.

Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med*. 2014;20(4):430-5.

Timmermann B, Kerick M, Roehr C, Fischer A, Isau M, Boerno ST, et al. Somatic mutation profiles of MSI and MSS colorectal cancer identified by whole exome next generation sequencing and bioinformatics analysis. *PLoS One*. 2010;5(12):e15661.

Tiwari AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. *QJM*. 2016;109(3):151-8.

TNCD 1 : Thésaurus National de Cancérologie Digestive. Cancer du côlon non métastatique. Disponible à l'URL : <http://www.tncd.org>

TNCD 2 : Thésaurus National de Cancérologie Digestive. Cancer du côlon métastatique. Disponible à l'URL : <http://www.tncd.org>

TNCD3 : Thésaurus National de Cancérologie Digestive. Cancer du rectum. Disponible à l'URL : <http://www.tncd.org>

TNM : Côlon and Rectum. In: *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th edition. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C eds. Chichester, West Sussex: Blackwell Publishing Ltd; 2010. pp.100–105.

Tobian AA, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J Immunol*. 2004;172(9):5277-86.

Toquet C, Jarry A, Bou-Hanna C, Bach K, Denis MG, Mosnier JF, Labois CL. Altered Calreticulin expression in human colon cancer: maintenance of Calreticulin expression is associated with mucinous differentiation. *Oncol Rep*. 2007;17(5):1101-7.

Tournier B, Chapusot C, Courcet E, Martin L, Lepage C, Faivre J, Piard F. Why do results conflict regarding the prognostic value of the methylation status in colon cancers? The role of the preservation method. *BMC Cancer*. 2012;12:12.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(15):8681-6.

Tsai HL, Huang CW, Chen CW, Yeh YS, Ma CJ, Wang JY. Survival in Resected Stage II Colorectal Cancer Is Dependent on Tumor Depth, Vascular Invasion, Postoperative CEA Level, and The Number of Examined Lymph Nodes. *World J Surg*. 2016;40(4):1002-9.

Tsen F, Bhatia A, O'Brien K, Cheng CF, Chen M, Hay N, et al. Extracellular heat shock protein 90 signals through subdomain II and the NPVY motif of LRP-1 receptor to Akt1 and Akt2: a circuit essential for promoting skin cell migration in vitro and wound healing in vivo. *Mol Cell Biol*. 2013;33(24):4947-59.

Uen YH, Lu CY, Tsai HL, Yu FJ, Huang MY, Cheng TL, et al. Persistent presence of postoperative circulating tumor cells is a poor prognostic factor for patients with stage I-III colorectal cancer after curative resection. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(8):2120-8.

Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 2002;40(2):127-32.

Ulery PG, Beers J, Mikhailenko I, Tanzi RE, Rebeck GW, Hyman BT, Strickland DK. Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 2000;275(10):7410-5.

Ulery PG, Strickland DK. LRP in Alzheimer's disease: friend or foe? *J Clin Invest* 2000;106(9):1077-9.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(4):261-8.

Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol*. 2011;223(2):219-29.

Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffmann PR, Brown KK, Botto M, et al. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol*. 2002;169(7):3978-86.

Van Gool B, Dedieu S, Emonard H, Roebroek AJ. The Matricellular Receptor LRP1 Forms an Interface for Signaling and Endocytosis in Modulation of the Extracellular Tumor Environment. *Front Pharmacol*. 2015;6:271.

Van Leuven F, Cassiman JJ, Van Den Berghe H. Demonstration of an alpha2-macroglobulin receptor in human fibroblasts, absent in tumor-derived cell lines. *J Biol Chem*. 1979;254(12):5155-60.

Van Leuven F, Stas L, Hilliker C, Lorent K, Umans L, Serneels L, et al. Structure of the gene (LRP1) coding for the human alpha 2-macroglobulin receptor lipoprotein receptor-related protein. *Genomics*. 1994;24(1):78-89.

Van Leuven F, Thiry E, Lambrechts M, Stas L, Boon T, Bruynseels K, et al. Sequencing of the coding exons of the LRP1 and LDLR genes on individual DNA samples reveals novel mutations in both genes. *Atherosclerosis*. 2001;154(3):567-77.

Verberne CJ, Zhan Z, van den Heuvel ER, Oppers F, de Jong AM, Grossmann I, et al. Survival analysis of the CEAwatch multicentre clustered randomized trial. *Br J Surg*. Epub : 2017 Apr 4.

Verdú M, Román R, Calvo M, Rodón N, García B, González M, et al. Clinicopathological and molecular characterization of colorectal micropapillary carcinoma. *Mod Pathol*. 2011;24(5):729-38.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-32.

Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(7):489-99.

Waldron E, Heilig C, Schweitzer A, Nadella N, Jaeger S, Martin AM, et al. LRP1 modulates APP trafficking along early compartments of the secretory pathway. *Neurobiol Dis*. 2008;31(2):188-97.

Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(1):134-41.

Wang MJ, Ping J, Li Y, Holmqvist A, Adell G, Arbmán G, Zhang H, Zhou ZG, Sun XF. Prognostic Significance and Molecular Features of Colorectal Mucinous Adenocarcinomas: A Strobe-Compliant Study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(51):e2350.

Ward RL, Turner J, Williams R, Pekarsky B, Packham D, Velickovic M et al. Routine testing for mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer is justified. *J Pathol*. 2005;207(4):377-84.

Warschkow R, Tarantino I, Huttner FJ, Schmied BM, Guller U, Diener MK, Ulrich A. Predictive value of mucinous histology in colon cancer: a population-based, propensity score matched analysis. *Br J Cancer*. 2016;114(9):1027-32.

Wasan KM, Brocks DR, Lee SD, Sachs-Barrable K, Thornton SJ. Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(1):84-99.

Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2001;344(16):1196-206.

Weaver AM, McCabe M, Kim I, Allietta MM, Gonias SL. Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor-BB induce a stable increase in the activity of low density lipoprotein receptor-related protein in vascular smooth muscle cells by altering receptor distribution and recycling. *J Biol Chem*. 1996;271(40):24894-900.

Weaver AM, Hussaini IM, Mazar A, Henkin J, Gonias SL. Embryonic fibroblasts that are genetically deficient in low density lipoprotein receptor-related protein demonstrate increased activity of the urokinase receptor system and accelerated migration on vitronectin. *J Biol Chem*. 1997;272(22):14372-9.

Webb DJ, Nguyen DH, Gonias SL. Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 1):123-34.

Wilhelmsen M, Christensen IJ, Rasmussen L, Jørgensen LN, Madsen MR, Vilandt J et al. Detection of colorectal neoplasia: Combination of eight blood-based, cancer-associated protein biomarkers. *Int J Cancer*. 2017;140(6):1436-1446.

WHO International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001.

Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>

Willnow TE, Sheng Z, Ishibashi S, Herz J. Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science*. 1994;264(5164):1471-4.

Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ, Ho MN, Gottlieb L, Sternberg SS, et al. Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1993;328(13):901-6.

Woldt E, Matz RL, Terrand J, Mlih M, Gracia C, Foppolo S, et al. Differential signaling by adaptor molecules LRP1 and ShcA regulates adipogenesis by the insulin-like growth factor-1 receptor. *J Biol Chem*. 2011;286(19):16775-82.

Wong SK, Jalaludin BB, Morgan MJ, Berthelsen AS, Morgan A, Gatenby AH, Fulham SB. Tumor pathology and long-term survival in emergency colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2008;51(2):223-30.

Wu L, Gonias SL. The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts. *J Cell Biochem*. 2005;96(5):1021-33.

Xia X, Yang B, Zhai X, Liu X, Shen K, Wu Z, Cai J. Prognostic role of microRNA-21 in colorectal cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(11):e80426.

Xing P, Liao Z, Ren Z, Zhao J, Song F, Wang G, et al. Roles of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in tumors. *Chin J Cancer*. 2016;35:6.

- Xu J, Zhao J, Zhang R. Four_microRNAs_Signature for Survival Prognosis in Côlon Cancer using TCGA Data. *Sci Rep.* 2016;6:38306.
- Yamada N, Sugai T, Eizuka M, Tsuchida K, Sugimoto R, Mue Y et al. Tumor budding at the invasive front of colorectal cancer may not be associated with the epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol.* 2017;60:151-159.
- Yamamoto K, Santamaria S, Botkjaer KA, Dudhia J, Troeberg L, Itoh Y, et al. Inhibition of shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 reverses cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* Epub : 2017 Feb 24.
- Yamamoto M, Ikeda K, Ohshima K, Tsugu H, Kimura H, Tomonaga M. Expression and cellular localization of low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in human glioblastoma in vivo. *Brain Tumor Pathol.* 1998;15(1):23-30.
- Yancey PG, Blakemore J, Ding L, Fan D, Overton CD, Zhang Y, et al. Macrophage LRP-1 controls plaque cellularity by regulating efferocytosis and Akt activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(4):787-95.
- Yang J, Annala M, Ji P, Wang G, Zheng H, Codgell D, et al. Recurrent LRP1-SNRNP25 and KCNMB4-CCND3 fusion genes promote tumor cell motility in human osteosarcoma. *J Hematol Oncol.* 2014;7:76.
- Yang L, Liu CC, Zheng H, Kanekiyo T, Atagi Y, Jia L, et al. LRP1 modulates the microglial immune response via regulation of JNK and NF- B signaling pathways. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):304.
- Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest.* 2003;112(10):1533-40.
- Yiu AJ, Yiu CY. Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2016;36(3):1093-102.
- Zaanan A, Cuilliere-Dartigues P, Guilloux A, Parc Y, Louvet C, de Gramont A, et al. Impact of p53 expression and microsatellite in- stability on stage III côlon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann Oncol.* 2010;21:772–80.
- Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Hankey BF, et al. C olonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *N Engl J Med.* 2012;366(8):687-96.
- Zhang J, Zheng J, Yang Y, Lu J, Gao J, Lu T, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Chinese colorectal cancer patients: analysis of 1,110 cases. *Sci Rep.* 2015;5:18678.
- Zhang H, Links PH, Ngsee JK, Tran K, Cui Z, Ko KW, Yao Z. Localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 to caveolae in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin treatment. *J Biol Chem.* 2004;279(3):2221-30.

Zhu L, Giunzioni I, Tavori H, Covarrubias R, Ding L, Zhang Y, et al. Loss of Macrophage Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Confers Resistance to the Antiatherogenic Effects of Tumor Necrosis Factor- α Inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(8):1483-95.

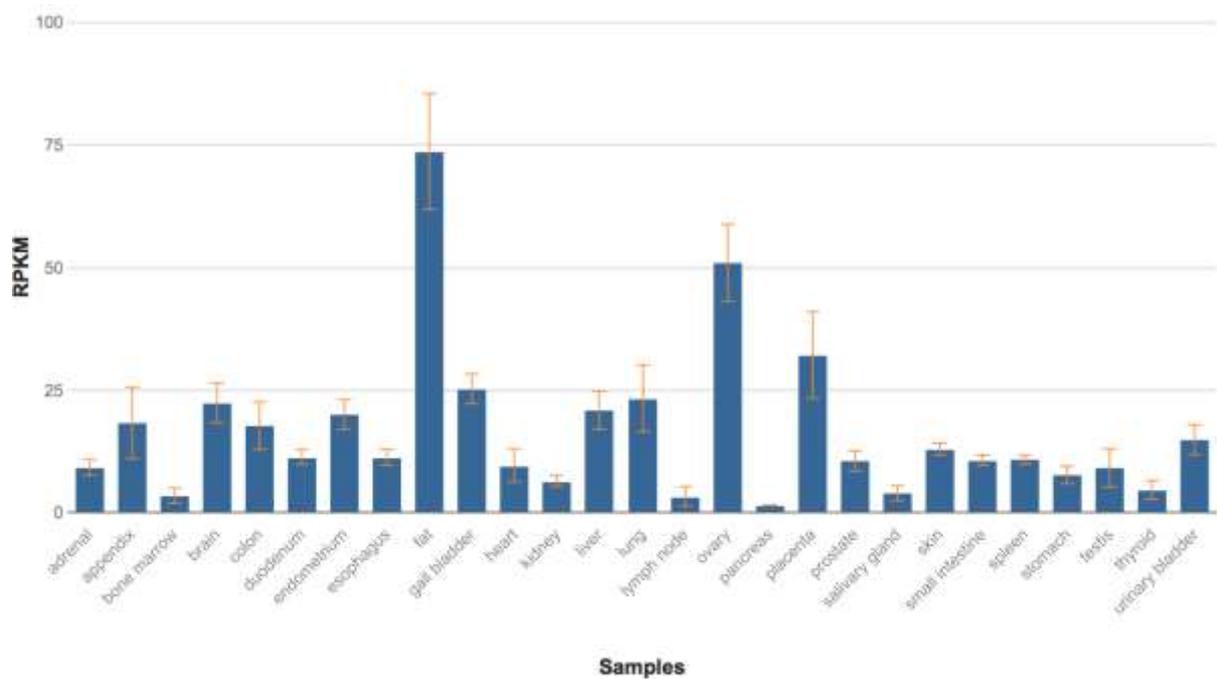
Zou H, Harrington J, Rego RL, Ahlquist DA. A novel method to capture methylated human DNA from stool: implications for colorectal cancer screening. *Clin Chem.* 2007;53(9):1646-51.

Zurhove K, Nakajima C, Herz J, Bock HH, May P. Gamma-secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1. *Sci Signal.* 2008;1(47):ra15.

Annexes

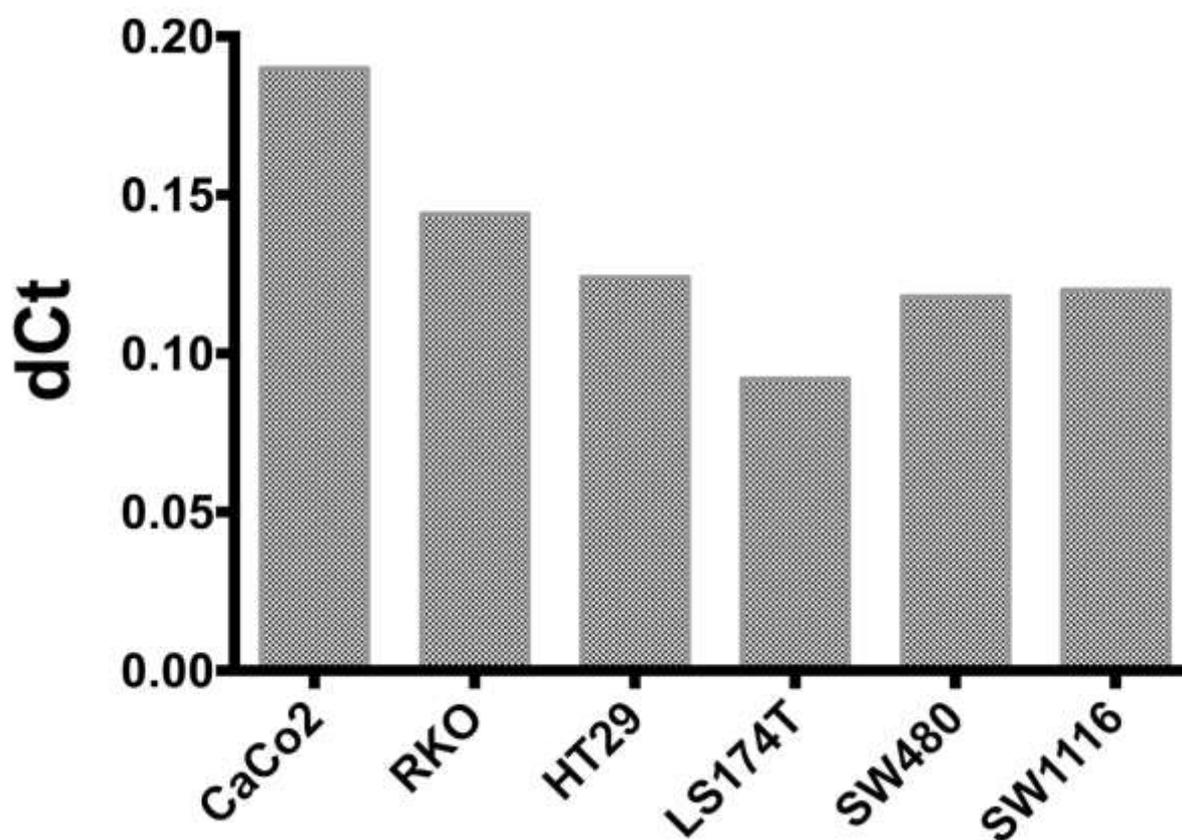
Annexe 1 : Profil d'expression génique de LRP1 dans les tissus sains.

Ci dessous une figure extraite des données de l'étude de Fagerberg et al. [Fagerberg] présentant les niveaux d'expression de l'ARNm de LRP1 dans différents tissus sains humains.



Annexe 2 : niveaux d'expression de l'ARNm de LRP1 dans les lignées cellulaires d'adénocarcinome colorectaux.

Cette figure extraite de nos résultats présente les niveaux d'expression de l'ARNm de LRP1 évalués par qRT-PCR en différence de nombre de cycles (dCt, *delta Cycle Threshold*) entre LRP1 et les gènes de ménage *RS18* et *RPL32* dans nos 7 lignées cellulaires.



ETUDE DU RECEPTEUR D'ENDOCYTOSE LRP1 DANS LES ADENOCARCINOMES COLIQUES : CARACTERISTIQUES CLINIQUES, PATHOLOGIQUES ET MOLECULAIRES ASSOCIEES ET VALEUR PRONOSTIQUE

LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1), un récepteur endocytaire multifonctionnel, a récemment été identifié comme pivot d'un réseau de biomarqueurs pour la prédiction pronostique de plusieurs types de cancers. Son rôle dans le cancer du côlon n'a pas été caractérisé. Notre travail porte sur l'étude de la relation entre expression de LRP1 et cancer du côlon. L'expression de l'ARNm LRP1 a été déterminée dans des échantillons d'adénocarcinome et de muqueuses coliques appariées, ainsi que dans les cellules stromales et tumorales obtenues après microdissection laser. Les associations clinicopathologiques et moléculaires ont été étudiées par immunohistochimie dans une série de cancer colique (n = 307). La présence de méthylation ou mutation du gène LRP1 et l'expression de miR-205 ont été évaluées et comparées aux niveaux d'expression de LRP1. L'ARNm de LRP1 est sous exprimé dans les cellules d'adénocarcinome colique par rapport à la muqueuse colique par rapport aux cellules stromales. La faible expression immunohistochimique de LRP1 dans les adénocarcinomes était associée à un âge plus élevé, à localisation droite, une perte d'expression de CDX2, une expression d'Annexine A10, un statut CIMP-H, MSI-H et BRAFV600E muté. Cette faible expression était associée à un mauvais pronostic, en particulier chez les patients de stade IV. Les mutations du gène LRP1 entraînaient une sous-expression de LRP1. L'expression était peu modifiée par miR-205. Le promoteur de LRP1 n'était jamais méthylé. La perte d'expression de LRP1 est associée à un profil clinico-pathologique et moléculaire particulier et à un mauvais pronostic dans les cancers du côlon.

Cancer colorectal, LRP1, BRAF, instabilité des microsatellites, miR-205

Study of endocytosis receptor LRP1 in colon adenocarcinomas: associated clinical, pathological and molecular characteristics and prognosis impact

LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1), a multifunctional endocytic receptor, has recently been identified as a hub in a biomarker network for multi-cancer clinical outcome prediction. Its role in colon cancer has not been characterized. Here, we investigate the relationship between LRP1 and colon cancer. LRP1 mRNA expression was determined in colon adenocarcinoma and paired colon mucosa samples, and in stromal and tumoral cells obtained after laser capture microdissection. The clinical potential was further investigated by immunohistochemistry in a population-based colon cancer series (n =307). LRP1 methylation, mutation and miR-205 expression were evaluated and compared to LRP1 expression levels. LRP1 mRNA levels are significantly decreased in colon adenocarcinoma cells compared to colon mucosa and stromal cells. Low LRP1 immunohistochemical expression in adenocarcinomas was associated with higher age, right-sided tumor, loss of CDX2 expression, Annexin A10 expression, CIMP-H, MSI-H and BRAFV600E mutation. Low LRP1 expression correlates with poor clinical outcome, especially in stage IV patients. LRP1 expression was downregulated by LRP1 mutation. LRP1 expression was slightly modified by miR-205 expression. LRP1 promoter was never methylated. Loss of LRP1 expression is associated with peculiar clinocopathological and molecular characteristics and with worse colon cancer outcomes.

Colorectal cancer, LRP1, BRAF, microsatellite instability, miR-205

Discipline : MEDECINE

Université de Reims Champagne-Ardenne

MEDYC - UMR CNRS 7369

51 rue Cognacq-Jay 51096 Reims Cedex

