

Table des matières

| | |
|---|----|
| Liste des abréviations | 12 |
| 1 Introduction..... | 14 |
| 1.1 Epidémiologie du cancer colorectal | 14 |
| 1.2 Cancer colorectal et instabilité microsatellite (MSI)..... | 15 |
| 1.2.1 Le système du « Mismatch Repair » | 15 |
| 1.2.1.1 Le MMR chez E.Coli | 16 |
| 1.2.1.2 Le MMR chez les mammifères | 17 |
| 1.2.2 Déficit du MMR et instabilité microsatellite | 19 |
| 1.2.2.1 Généralités | 19 |
| 1.2.2.2 Origine du déficit du système du « mismatch repair »..... | 21 |
| 1.2.2.3 Caractéristiques des tumeurs colorectales MSI | 23 |
| 1.2.2.4 Diagnostic de l'instabilité microsatellite | 25 |
| 1.3 Chimiothérapie dans les cancers colorectaux MSI : place du 5-Fluorouracile..... | 27 |
| 1.3.1 Pharmacologie du 5-FU : Rôle du MMR | 27 |
| 1.3.2 Conséquences du déficit en MMR sur la sensibilité au 5-FU..... | 28 |
| 1.3.3 HSP110 Δ E9 : nouveau marqueur prédictif de réponse au 5-FU dans les tumeurs MSI ? | 30 |
| 2 Objectifs de l'étude | 33 |
| 3 Matériels et méthodes..... | 34 |
| 3.1 Lignées cellulaires..... | 34 |
| 3.2 Patients..... | 34 |
| 3.2.1 Population 1 : Patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et traités par FOLFIRI-CETUX. | 34 |
| 3.2.2 Population 2 : Patients atteints d'un cancer colorectal MSI | 35 |
| 3.3 Analyses de l'ADN génomique | 36 |
| 3.3.1 Extraction et dosage des ADN génomiques. | 36 |
| 3.3.2 Recherche d'une instabilité microsatellite..... | 36 |
| 3.3.3 Recherche et caractérisation de délétions au niveau du microsatellite T17 d'HSP110..... | 37 |
| 3.3.3.1 PCR et analyse de fragment ciblant le microsatellite T17 | 37 |
| 3.3.3.2 Clonage..... | 37 |
| 3.3.3.3 Séquençage par la méthode de Sanger | 38 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.3.4 | Recherche de la mutation V600E du gène <i>BRAF</i> | 38 |
| 3.4 | Analyse de l'ARNm..... | 39 |
| 3.4.1 | Extraction et dosage des ARN..... | 39 |
| 3.4.2 | Reverse Transcription (RT)..... | 39 |
| 3.4.3 | PCR multiplex et analyse de fragments..... | 39 |
| 3.5 | Analyse des protéines..... | 40 |
| 3.5.1 | Extraction et dosage des protéines..... | 40 |
| 3.5.2 | Western Blot..... | 40 |
| 3.6 | Etude statistique..... | 41 |
| 4 | Résultats..... | 42 |
| 4.1 | Lignées cellulaires..... | 42 |
| 4.1.1 | Statut MSI des lignées cellulaires..... | 42 |
| 4.1.2 | T17 d'HSP110..... | 43 |
| 4.1.3 | Expression d' HSP110ΔE9..... | 43 |
| 4.2 | Etude du polymorphisme du T17 d'HSP110 dans le tissu sain..... | 44 |
| 4.3 | Etude d'HSP110 dans une population 86 patients traités par FOLFIRI-CETUX pour un CCR métastatique..... | 45 |
| 4.3.1 | Statut MSI des tumeurs..... | 45 |
| 4.3.2 | Comparaison des tumeurs MSI et MSS..... | 45 |
| 4.3.2.1 | Caractéristiques des deux populations..... | 45 |
| 4.3.2.2 | Etude du microsatellite T17 d'HSP110 et d'HSP110ΔE9 / HSP110..... | 46 |
| 4.3.2.3 | Etude de la réponse et de la survie à la chimiothérapie par FOLFIRICETUX..... | 47 |
| 4.4 | Etude d'HSP110 et HSP110ΔE9 chez 120 patients présentant une tumeur MSI..... | 50 |
| 4.4.1 | Instabilité microsatellite des tumeurs..... | 50 |
| 4.4.2 | Taille du microsatellite T17 d'HSP110 dans le tissu sain et la tumeur..... | 52 |
| 4.4.3 | Expression d'HSP110ΔE9 / HSP110..... | 54 |
| 4.4.4 | Influence d' HSP110ΔE9 / HSP110 sur la survie..... | 54 |
| 5 | Discussion..... | 56 |
| 5.1 | Structure et fonction du microsatellite T17 d'HSP110..... | 56 |
| 5.2 | Déficit du MMR et conséquences sur le microsatellite T17 d'HSP110..... | 57 |
| 5.3 | Délétion du T17 d'HSP110 et expression d'HSP110ΔE9..... | 63 |
| 5.4 | Instabilité microsatellite, survie et réponse à la chimiothérapie à base de 5-FU dans les cancers colorectaux métastatiques..... | 68 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.4.1 | Survie..... | 68 |
| 5.4.2 | Réponse à la chimiothérapie FOLFIRI-CETUX. | 70 |
| 5.5 | HSP110ΔE9 : marqueur pronostique et/ou prédictif ?..... | 75 |
| 6 | Conclusion et perspectives..... | 80 |
| | Bibliographie..... | 82 |
| | Liste des Tableaux..... | 90 |
| | Table des figures | 91 |
| | Annexes | 92 |

Liste des abréviations

| | |
|--------------------|---|
| 3'UTR | 3' UnTranslated Region |
| 5-FdUMP | fluorodéoxyuridine monophosphate |
| 5-FU | 5-Fluorouracile |
| 5-FUH ₂ | 5-fluorodihydrouracile |
| 5'-UTR | 5' UnTranslated Region |
| AA | Acide aminé |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| ADP | Adénosine di-phosphate |
| AMM | Autorisation de mise sur le marché |
| <i>APC</i> | Anaphase promoting complex |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ATM | Ataxia Telangiectasia Mutated |
| ATP | Adénosine tri-phosphate |
| BAX | Bcl-2-associated X protein |
| Bcl-2 | b-cell lymphoma-2 |
| <i>BRAF</i> | V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 |
| CCR | Cancer colorectal |
| CCRM | Cancer colorectal métastatique |
| CD | Cluster de différenciation |
| CDX | Caudal Type Homeobox |
| CFTR | Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator |
| CI 50 | Concentration inhibitrice 50 |
| CIMP | CpG Island methylator phenotype |
| CIN | Chromosomic instability |
| CK | Cytokératine |
| CPT11 | Irinotécan |
| DFNA5 | Deafness Autosomal Dominant 5 |
| DPD | dihydropyrimidine déhydrogénase |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |
| FdUTP | 5- fluorodeoxyuridine triphosphate |
| FUTP | 5-fluoro-uridine triphosphate |
| HER-2 | human epidermal growth factor receptor 2 |
| hMLH1 | human mutL homolog 1 |
| HNPCC | Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer |
| HR | Hazard ratio |
| HSP | Heat shock protein |
| HSP110 | Heat shock protein de 110kDa |
| HSP27 | Heat shock protein de 27kDa |
| HSP70 | Heat shock protein de 70kDa |
| HSP90 | Heat shock protein de 90kDa |
| IHC | Immunohistochimie |
| <i>KRAS</i> | Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog |

| | |
|--------------|---|
| MAP kinase | Mitogen-activated protein kinase |
| max | Maximum |
| miARN | Micro-ARN |
| min | Minimum |
| mL | Millilitre |
| MMR | Mismatch repair |
| MRE11 | Meiotic recombination 11 |
| MSH2 | MutS protein homolog 2 |
| MSH6 | MutS protein homolog 6 |
| MSI | Microsatellite instable |
| MSI-H | MSI-High |
| MSI-L | MSI-Low |
| MYB | V-Myb Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog |
| NBS1 | Nijmegen breakage syndrome protein 1 |
| NES | Nuclear exporting sequence |
| ng | Nanogramme |
| NLS | Nuclear localization site |
| OR | Odd ratio |
| <i>P53</i> | Tumor protein 53 |
| PARP | Poly (ADP-ribose) polymerase |
| pb | Paire de base |
| PBD | PBD |
| PCNA | proliferating cell nuclear antigen |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PI3K | Phosphoinositide 3-kinase |
| PMS2 | Postmeiotic segregation increased 2 |
| PTEN | Phosphatase and TENsin homolog |
| Py | Polypyrimidine tract ou séquence polypyrimidine |
| RB1CC1 | RB1 inducible coiled-coil 1 |
| RECIST | Response Evaluation Criteria In Solid Tumors |
| RFC | Replication factor C |
| RT | Reverse transcription |
| <i>SMAD4</i> | Mothers against decapentaplegic homolog 4 |
| SNP | Single nucleotide polymorphism |
| T | Thymidine |
| TGFβ-RII | Transforming growth factor beta receptor II |
| TS | Thymidilate synthase |
| UGT1A1 | UDP-glycosyltransferase 1 polypeptide A1 |

1 Introduction

1.1 Épidémiologie du cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR) est un problème de santé publique par sa forte incidence, mais aussi par sa gravité. Tous sexes confondus, le cancer colorectal se situe au troisième rang de l'ensemble des cancers en termes d'incidence, derrière le cancer du poumon et celui du sein.¹ On estime à 1,2 millions le nombre de nouveaux cas de cancers colorectaux par an dans le monde. On observe une variation du taux d'incidence entre les régions, avec une prédominance des nouveaux cas dans les pays développés. Les taux d'incidence les plus élevés sont retrouvés en Australie/Nouvelle Zélande, Europe de l'Ouest² et aux Etats-Unis,³ et les plus faibles en Afrique et en Asie du Sud Est. En France, l'incidence du cancer colorectal est élevée et a fortement augmenté depuis les années 80, probablement à cause d'une association de facteurs : vieillissement de la population, amélioration du dépistage, modifications du mode de vie. En 2011, on estimait à 40 500 le nombre de nouveaux de cas CCR, soit 12% des nouveaux cancers chez la femme et 10,4% chez l'homme.⁴ Comme au niveau mondial, on note une disparité de la répartition des cas de CCR sur le territoire français, avec une incidence plus élevée dans le nord et l'est que dans les régions du sud. Environ 600 000 décès imputables au cancer colorectal sont dénombrés tous les ans dans le monde, ce qui représente 8% de tous les décès par cancer, soit la quatrième cause la plus fréquente de décès par cancer. En France, le CCR est la deuxième cause de décès par cancer avec 18 000 décès par an, derrière le cancer du poumon (29 000) et devant le cancer du sein (11 500). Comme pour l'incidence, le taux de mortalité est variable en fonction des régions. Les pays d'Europe de l'est présentent les plus forts taux de mortalité liés au CCR, et les pays d'Afrique centrale les plus faibles. Contrairement à l'incidence, la mortalité liée au CCR est globalement en baisse, notamment en Europe, en Australie/Nouvelle Zélande et aux États-Unis. En France, le taux de mortalité standardisé est passé de 18,6/100 000 chez l'homme et 11,0/100 000 chez la femme à respectivement 13,8/100 000 et 8,2/100 000 en 20 ans. Cette tendance favorable résulte du dépistage de plus en plus précoce du CCR et de l'amélioration de la prise en charge thérapeutique et chirurgicale. Le pronostic du CCR est principalement lié au stade de la maladie lors du diagnostic : 90% de survie à 5 ans pour les cancers in-situ, mais seulement 10% pour les cancers diagnostiqués au stade métastatique.

1.2 Cancer colorectal et instabilité microsatellite (MSI)

Le CCR est une pathologie hétérogène aussi bien du point de vue de son histoire naturelle que des caractéristiques moléculaires ou histologiques de la tumeur. De manière générale, à l'échelle moléculaire, le CCR résulte de l'accumulation progressive d'altérations génétiques et/ou épigénétiques dans les cellules épithéliales coliques qui conduisent à la dérégulation des voies de signalisation influant sur le métabolisme cellulaire, la prolifération, la différenciation, la survie et l'apoptose cellulaire, et à la transformation de la muqueuse colique normale en un cancer invasif. Actuellement on considère qu'il existe trois voies moléculaires de l'oncogenèse colorectale : l'instabilité chromosomique, l'instabilité microsatellite et les anomalies de méthylation de l'ADN (phénotype « CpG Island methylator » ou CIMP).^{5, 6} Il semble que, quelle que soit l'origine de la carcinogénèse, les mêmes voies de signalisation cellulaire soient impliquées, avec l'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Entre 70 et 85% des CCR sont dus à une instabilité chromosomique, liée à un défaut de ségrégation des chromosomes et conduisant à l'accumulation d'anomalies de nombre (aneuploïdie) ou de structure des chromosomes. L'instabilité chromosomique est souvent responsable de la perte d'une copie de gènes suppresseurs de tumeurs, tels que *APC*, *P53* ou *SMAD4*, ou de l'activation d'oncogènes comme *K-ras*. L'instabilité microsatellite, qui sera détaillée plus en détail par la suite, est liée au déficit d'une ou plusieurs protéines d'un système de réparation de l'ADN le « DNA Mismatch Repair » (MMR). Ce déficit du MMR conduit à l'accumulation de mutations au niveau de séquences répétées et peut conduire au dysfonctionnement des voies régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et/ou de réparation de l'ADN. Enfin, le phénotype CIMP résulte d'une anomalie de la méthylation de l'ADN touchant principalement les cytosines des îlots CpG et entraînant l'inactivation transcriptionnelle de nombreux gènes, dont des gènes suppresseurs de tumeurs.^{7, 8} On notera que ces voies ne sont pas mutuellement exclusives, et que certaines tumeurs peuvent présenter les caractéristiques de plusieurs voies. C'est notamment le cas pour un certain nombre de tumeurs sporadiques qui, suite à l'hyperméthylation d'une protéine du MMR (hMLH1), présentent également un phénotype MSI.

1.2.1 Le système du « Mismatch Repair »

Lors de la réplication de l'ADN, l'intégrité du génome d'un individu doit absolument être maintenue. Or, en l'absence de tout mécanisme correctif, la fréquence des mésappariements

durant la synthèse de l'ADN est de une pour 10^1 à 10^2 paires de bases.⁹ Durant la réplication, les activités de relecture et de correction des ADN polymérase permettent de diminuer ce taux à une pour 10^7 à 10^8 paires de bases.⁹ La fidélité de réplication de l'ADN est également améliorée en post-répliatif grâce aux différents systèmes de réparation de l'ADN, et notamment au système du MMR. Au total, on estime que la fréquence des erreurs est d'une pour 10^9 à 10^{10} paires de bases au terme de la division cellulaire.

Le MMR est un système complexe, essentiel à la stabilité du génome. Il est principalement décrit pour son rôle dans la réparation post-répliatif des erreurs des ADN polymérase,¹⁰ mais il intervient également au niveau de la recombinaison méiotique¹¹, des phénomènes d'hypermuation somatique¹² et de commutation isotypique pour augmenter la diversité des immunoglobulines. On s'intéressera ici uniquement à sa fonction de reconnaissance et de réparation des erreurs des ADN polymérase. Cette fonction est ubiquitaire et extrêmement conservée des procaryotes aux eucaryotes.

1.2.1.1 Le MMR chez *E. Coli*

Chez les procaryotes, le système du MMR a principalement été décrit chez *E. coli*.¹⁰ Il s'organise autour de trois protéines MutS, MutL et MutH qui interagissent pour reconnaître et réparer les mésappariements de l'ADN. MutS, une ATPase agissant sous forme d'homodimère, est chargée de reconnaître les mésappariements le long des brins d'ADN et d'initier le processus de réparation. MutS possède deux domaines fonctionnels : un domaine C-terminal ATPasique impliqué dans la dimérisation et la liaison avec des cofacteurs tel que le β -clamp et MutL, et un domaine N-terminal de liaison aux mésappariements de l'ADN. La reconnaissance des mésappariements de l'ADN par MutS est facilitée par son interaction avec un complexe protéique mobile : le β -clamp. Il semblerait que MutS ait une affinité beaucoup plus faible, jusqu'à 1 500 fois inférieure, pour les brins d'ADN parfaitement appariés que pour ceux présentant des mésappariements. Par ailleurs, cette affinité dépend également de la nature de l'erreur et des séquences adjacentes. Par exemple, MutS possède une affinité beaucoup plus faible pour les erreurs de type C-C, que celles de type G-T. Chez *E. coli*, la distinction entre le brin matrice et le brin fils se fait grâce à la différence de méthylation des deux brins. En effet, chez les bactéries à GRAM négatif, le brin fils est transitoirement non méthylé ce qui permet son identification. Dans un second temps, MutS interagit avec MutL au niveau de leurs domaines C-terminaux. MutL est une ATPase de la famille GHKL, auxquelles appartiennent également les Heat Shock Protein 90 (HSP90) et la topo-isomérase II. Les

études de mutagenèse ont mis en avant le rôle essentiel de MutL dans la réparation de l'ADN, cependant ses fonctions sont mal définies. Il semble que MutL permette de faire la connexion entre la reconnaissance du mésappariement et sa correction. Son interaction avec MutS permet de stimuler l'activité endonucléase de MutH et l'arrimage de UvrD, une hélicase de type de II, sur l'ADN. MutH, une endonucléase de type II, effectue des coupures d'ADN au niveau des motifs GA*TC non méthylés à environ 1kb de l'erreur, indifféremment en 3' ou en 5'. L'excision du brin d'ADN néo synthétisé entre la coupure de MutH et le mésappariement est prise en charge par des exonucléases 3'→5' (ExoI et ExoX) ou 5'→3' (RecJ et ExoVII). Ces exonucléases nécessitent l'intervention de UvrD pour ouvrir les deux brins d'ADN. Les dernières étapes de la réparation font intervenir l'ADN polymérase III et une ligase et permettent la synthèse d'une nouvelle séquence d'ADN et sa liaison aux séquences adjacentes.

1.2.1.2 Le MMR chez les mammifères

Chez les eucaryotes, le système du MMR est plus complexe que chez *E. Coli*, mais néanmoins homologue (*Tableau 1*). Dans le cas particulier des mammifères, ce complexe de réparation de l'ADN s'articule autour de cinq protéines majeures : MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 et PMS2 qui interagissent entre elles pour reconnaître et réparer les mésappariements de l'ADN. Tout comme chez *E. coli*, la réparation est initiée par la reconnaissance du mésappariement par un complexe hétérodimérique d'homologues de MutS : les protéines MSH. On en dénombre 6 chez les eucaryotes, mais seules les protéines MSH2 à MSH6 sont retrouvées chez les mammifères, MSH1 n'étant présente que chez les levures. MSH2, MSH3, MSH6 sont des protéines ubiquitaires qui interviennent dans le système du MMR, tandis que MSH4 et MSH5 ne sont retrouvées que dans les organes reproducteurs et participent à la méiose. Les homologues de MutS sont des ATPase qui possèdent toutes une structure similaire. Au niveau de la partie C-terminale on retrouve une région hautement conservée d'environ 150 acides aminés (AA), appelée « Walker-A motif », impliquée dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Cette activité ATPase induit le changement de conformation du complexe MutS permettant la liaison (forme ADP-lié) ou non (forme ATP-lié) au mésappariement. Ensuite, on trouve, de la partie C-terminale à la partie N-terminale, un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de dimérisation, un site de liaison au mésappariement et un motif nécessaire à l'interaction avec le "proliferating cell nuclear antigen" (PCNA).

Les hétérodimères formés par les protéines MSH diffèrent par le type d'anomalies qu'ils reconnaissent.^{13, 14} MutS α , dimère de MSH2 et MSH6, intervient dans la reconnaissance des mésappariements « base-base » et des boucles d'insertion/délétion faisant un maximum de 1 à 2 nucléotides. MutS β , dimère de MSH2 et MSH3, répare les hétéroduplexes avec de plus grandes boucles d'insertion-délétion allant jusqu'à 16 nucléotides. Les spécificités d'action de MutS α et MutS β sont donc redondantes en ce qui concerne les petites boucles d'insertion/délétion. Cependant, il semble que MutS β soit plus sollicité pour les IDL de 2 bases que MutS α .¹⁵ Par ailleurs, il a été démontré que MutS α était présent en plus grande quantité, environ dix fois plus, dans les cellules que MutS β .¹⁶ La fixation du complexe MutS sur l'ADN et son changement de conformation permettent le recrutement des autres partenaires du MMR pour réaliser l'excision et la réparation de la séquence altérée. Les complexes MutS recrutent en premier lieu les protéines homologues de MutL, des ATPases de la famille GHKL. On en dénombre 4 qui agissent sous forme d'hétérodimères et jouent un rôle central dans la coordination des différentes étapes en aval. MutL α , dimère de MLH1 et PMS2, est un composé majeur du système MMR qui interagit à la fois avec MutS α et MutS β pour la réparation des différents mésappariements. Ce complexe possède une activité endonucléase, activée en présence notamment de MutS α et PCNA, qui permet la réalisation de coupures dans le brin d'ADN à la manière de MutH chez *E. coli*. MutL β , dont le rôle est actuellement inconnu chez l'homme, correspond à l'association de MLH1 et PMS1. MutL γ (MLH1-MLH3) agit en partenariat avec MutS β pour réparer une partie des boucles d'insertion-délétion et intervient également dans la recombinaison méiotique.

Chez les eucaryotes, les mécanismes moléculaires qui permettent de discriminer le brin néo synthétisé du brin parental ne sont pas entièrement élucidés chez les eucaryotes. Il semble néanmoins que, comme chez *E. coli*, la formation d'un complexe multi-protéique entre MutS et MutL, RFC et PCNA soit nécessaire. D'autre part, il semblerait que la présence d'incisions en 3' et 5' entre les fragments d'Okasaki sur le brin néo synthétisé participe également à la différenciation du brin matrice et du brin fils.¹⁰

Chez les mammifères, Exo1 est la seule exonucléase associée au système du MMR. Cette enzyme, malgré une spécificité unidirectionnelle, est impliquée dans la réparation du mésappariement aussi bien en 5' qu'en 3'. Lors d'une excision 5'→3', hEXO1 dégrade l'ADN depuis l'extrémité d'un fragment d'Okasaki jusqu'au mésappariement. Lors d'une excision en 3' → 5', l'action endonucléase de MutL α est indispensable. Une coupure est réalisée en amont du brin d'ADN de manière à permettre l'action de hEXO1. Une fois l'erreur excisée, la

dernière étape consiste en la resynthèse du brin d'ADN par la polymérase δ et sa ligation au reste du brin néo synthétisé par la ligase I.

1.2.2 Déficit du MMR et instabilité microsatellite

1.2.2.1 Généralités

Le système du MMR joue un rôle central dans l'élimination des erreurs générées lors de la réplication de l'ADN, de manière à maintenir l'intégrité du génome. L'inactivation du système MMR, qu'elle soit d'origine héréditaire ou sporadique, conduit par conséquent à une instabilité délétère du génome,¹⁷ à l'origine d'une prédisposition à développer des tumeurs. La perte de fonctionnalité de une ou plusieurs protéines du MMR engendre l'accumulation de mutations dans le génome, et notamment au niveau des microsatellites. C'est d'ailleurs entre autres par la recherche d'un phénotype « microsatellite instable » (MSI) que s'effectue le diagnostic de déficit en MMR. Les microsatellites sont la répétition de motifs de 1 à 5 nucléotides. Ils sont retrouvés en grand nombre sur l'ensemble du génome, dans des séquences codantes ou non. Les microsatellites sont des séquences très polymorphiques (taux de mutation par génération de 10^{-3} à 10^{-5}) à cause d'un phénomène de glissement des ADN polymérasés sur ces motifs répétés. Le rôle de ces séquences n'est pas entièrement élucidé. On a longtemps cru que seules celles présentes dans les séquences codantes étaient importantes, mais il semblerait que les microsatellites introniques aient également une fonction, notamment dans la modulation de l'expression de certains gènes.^{18, 19} Dans le cas d'un déficit en MMR, de nombreux gènes peuvent être impactés par les insertions/délétions au niveau des microsatellites dont notamment des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN, la régulation de la transcription, la transduction du signal et l'apoptose, favorisant la transformation cellulaire et le développement de cancers chez l'homme.^{20, 21} Le déficit en MMR, n'est pas en lui-même transformant, c'est l'accumulation de mutations qu'il engendre qui est à l'origine du processus tumoral. Les gènes pouvant être impactés par un déficit du système du MMR sont nombreux et une base de données, « SelTarBase », a été développée pour référencer toutes les mutations décrites au niveau de séquences microsatellitaires, mais aussi pour prédire les gènes à risque de mutation.²² Ce phénomène d'instabilité microsatellite a été décrit pour la première fois dans les années 90 par l'équipe de Perucho sur une population de cancers colorectaux.²³ On ne s'intéressera ici qu'aux CCR MSI, mais ce phénomène est également retrouvé dans d'autres tumeurs solides^{24, 25} et dans des pathologies hématologiques telles que les lymphomes.²⁶

| Protéines chez <i>E. coli</i> | Fonctions | Homologues humains | Fonctions |
|--------------------------------------|---|---|---|
| MutS | Liaison aux mésappariements | MSH2 - MSH6 (MutS α) | Reconnaissance des mésappariements "base-base" et des boucles d'insertion/délétion de 1-2 bases. |
| | | MSH2 - MSH3 (MutS β) | Reconnaissance des certains mésappariements "base-base" et des boucles d'insertion/délétion de > 2 bases. |
| MutL | Promoteur des différentes étapes du MMR | MLH1 – PMS2 (MutL α) | Coordination du processus depuis la reconnaissance du mésappariement jusqu'à sa réparation. Interaction avec MutS α et MutS β |
| | | MLH1– MLH2 (MutL β) | Fonction inconnue. |
| MutH | Création d'une coupure sur le brin non-méthylé au niveau d'un site GATC semi-méthylé. | Pas d'homologue | |
| B-clamp | Recrutement de MutS au niveau du mésappariement. Augmentation de l'efficacité de l'Adn polymérase III. | PCNA | Recrutement des protéines du MMR au niveau des mésappariements. Augmente la spécificité de liaison de MutS α . Participe à l'excision de l'erreur et à la synthèse du nouveau brin complémentaire. |
| ExoI et ExoX | Excision des ADN simple brin en 3' – 5' | EXO1 (Rth1) | Excision des ADN double brin |
| RecJ | Excision des ADN simple brin en 5' – 3' | Fonction exonucléase de l'ADN polymérase δ | Excision des ADN simple brin |
| ADN polymérase III | Resynthèse du brin d'ADN | ADN polymérase δ | Resynthèse du brin d'ADN |
| ADN ligase | Création d'une liaison covalente après réparation complète de l'ADN. | ADN ligase | Création d'une liaison covalente après réparation complète de l'ADN. |

Tableau 1 : Comparaison des protéines du « mismatch repair » (MMR) chez *E. coli* et l'homme : natures et fonctions.

1.2.2.2 Origine du déficit du système du « mismatch repair »

Dans les cancers colorectaux, 15% des tumeurs sont caractérisées par un déficit du système MMR, les autres résultants d'une instabilité chromosomique (CIN). Dans deux tiers des cas le déficit en une ou plusieurs protéines du MMR est d'origine sporadique. Seuls 5% des cancers colorectaux MSI correspondent à des syndromes de Lynch, c'est-à-dire des cancers d'origine héréditaire. Que le déficit du MMR soit d'origine sporadique ou héréditaire, il est toujours consécutif à l'inactivation bi-allélique d'un ou plusieurs gènes essentiels au fonctionnement de ce système de réparation de l'ADN.

Le syndrome de Lynch ou « Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer » (HNPCC) est une pathologie de transmission autosomique dominante liée à la mutation d'un gène codant pour une protéine du MMR. Les patients présentant un syndrome de Lynch sont caractérisés par une prédisposition à développer des tumeurs, et cela de manière précoce. Chez ces patients, c'est l'association d'une mutation héréditaire sur un allèle d'un gène du MMR, et de l'inactivation du second allèle par une mutation somatique qui est à l'origine d'une instabilité génétique favorisant la transformation cellulaire. Dans quasiment 90% des cas le déficit du MMR est lié à une mutation au niveau des gènes MLH1 ou MSH2. L'ensemble des variants des protéines du MMR est référencé par l'International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours Incorporated (<http://www.insight-group.org/>). En 2004, Peltomaki *et al*, recensaient 448 mutations différentes retrouvées chez 748 familles : MLH1 (50%), MSH2 (39%), and MSH6 (7%) et une plus faible incidence pour les mutations de PMS2 (5%).²⁷ Pour MLH1 et MSH2, des mutations ont été décrites pour l'ensemble des exons et des introns. Pour MSH6, il semblerait que les anomalies prédominent dans l'exon 4 et pour PMS2 dans l'exon 11. Dans tous les cas, la majorité des anomalies génétiques sont des insertions/délétions de plus ou moins longues séquences.²⁸ Les patients présentant un syndrome de Lynch ont un risque élevé de cancer colorectal (10% à 50 ans et 40% à 70 ans), mais aussi des cancers de l'endomètre, de l'estomac, de l'intestin grêle, des voies urinaires et des voies biliaires (*Tableau 2*). Lorsque des cancers viscéraux et tumeurs des glandes sébacées ou kératoacanthomes sont associés, il s'agit alors d'un cas particulier d'HNPCC, le syndrome de Muir-Torre.²⁹ Lorsque les cancers viscéraux sont associés à un glioblastome, on parle alors de syndrome de Turcot.³⁰ Le type de déficit en protéine du MMR à une influence sur la localisation des tumeurs et sur l'âge de diagnostic du premier cancer. Globalement, les risques sont plus faibles pour un déficit en MSH6 que pour ceux en MLH1 et MSH2, avec un risque se développer un cancer du spectre HNPCC à 70 ans de 59 % pour MLH1 et 57 % pour MSH2 contre 25 % pour MSH6³¹. Par

contre, on constate que le risque de développer un cancer de l'endomètre est plus important chez une patiente présentant une anomalie de MSH6 (environ 70%) que chez celles présentant une inactivation de MLH1 ou MSH2 (environ 45%). Par ailleurs, les données épidémiologiques du cancer colorectal mettent en évidence que les patients présentant un déficit de MSH2 ou MLH1 développent un cancer plus précocement que ceux ayant un déficit de MSH6, avec respectivement un âge moyen au diagnostic de 44,5 et 54 ans.

| Risque cumulatif avant 70 ans | Syndrome de Lynch | Population générale |
|-------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| Cancer du spectre HNPCC | Femme : 32 – 59% Homme : 41 – 70% | - |
| Cancer colorectal | Femme : 25 – 59% Homme : 28 – 75% | Femme : 3,5% Homme : 4,6% |
| Cancer de l'endomètre | 16 – 57% | 1,5% |
| Cancer de l'estomac | 2 – 13% | < 1% |
| Cancer de l'ovaire | 4 – 31% | 1,3% |
| Cancer des voies urinaires | 1 – 12% | < 1% |
| Cancer de l'intestin grêle | 4 – 7% | < 1% |
| Cancers des voies biliaires | 0,07 – 2% | - |

Tableau 2 : Risque cumulatif de cancers à 70 ans chez les patients atteints d'un syndrome de Lynch (données de l'étude ERISCAM³¹) et dans la population générale.

Les critères d'Amsterdam,³² lorsqu'ils sont tous réunis, permettent d'identifier les sujets à risque d'être atteint d'un syndrome de Lynch :

- Patient présentant un cancer colorectal ou du « spectre étroit » du syndrome HNPCC (endomètre, urothélium, intestin grêle) diagnostiqués chez au moins 3 apparentés ;
- Un individu atteint apparenté au premier degré aux 2 autres ;
- Atteinte d'au moins 2 générations successives ;
- Diagnostic à un âge inférieur à 50 ans chez au moins un des sujets atteints ;
- Exclusion du diagnostic de polypose adénomateuse.

Cependant, actuellement seule l'identification d'une mutation pathogène sur un des gènes du MMR permet de poser le diagnostic de certitude de syndrome de Lynch.

Les cancers colorectaux MSI d'origine sporadique sont beaucoup plus fréquents que les syndromes de Lynch. Dans plus de 90% des cas, le déficit en MMR est la conséquence d'une inactivation bi-allélique du promoteur du gène MHL1.³³ La partie N-terminale du promoteur de MLH1 est très riche en îlots CpG susceptibles d'être méthylés, et il a été montré que la

méthylation de ces îlots était corrélée à l'absence de synthèse de la protéine MLH1 et par conséquent l'absence du complexe MutLa indispensable au système du MMR. Contrairement aux cancers colorectaux MSI héréditaires, l'âge moyen de survenue des cancers colorectaux MSI sporadiques est plus tardif, aux environs de 70 ans. On constate aussi que les cancers MSI sporadiques sont plus fréquents chez la femme que chez l'homme. Enfin, on retrouve fréquemment dans les cas de cancers colorectaux sporadiques la mutation V600E du gène *BRAF*. Cette mutation est toujours absente des tumeurs MSI héréditaires, et constitue donc un critère d'exclusion pour le diagnostic des syndromes de Lynch.³⁴ Actuellement, les patients présentant un cancer colorectal MSI d'origine sporadique, ainsi que leur proche, ne font pas l'objet d'une surveillance particulière contrairement aux patients présentant un syndrome de Lynch. Cependant, une étude rétrospective a récemment mis en évidence que l'entourage des patients présentant un CCR MSI dû à une hyperméthylation du promoteur de MLH1 présenterait un risque plus important de CCR, mais aussi de cancers de l'estomac et des ovaires que la population générale.³⁵

1.2.2.3 Caractéristiques des tumeurs colorectales MSI

Les cancers colorectaux ayant un déficit en MMR présentent des caractéristiques différentes des tumeurs MSS (*Tableau 3*). Par contre, il semblerait que quel que soit l'origine du déficit en MMR, les caractéristiques cliniques, histopathologiques des tumeurs MSI soient similaires. Les différences de sensibilité aux molécules de chimiothérapie entre les tumeurs MSS et MSI sont parfois controversées et seront détaillées ultérieurement.

Les tumeurs MSI se développent le plus souvent au niveau du colon proximal,^{28, 29, 36, 37} c'est-à-dire dans la zone comprenant le caecum, le colon ascendant, l'angle colique droit et le colon transverse. Généralement il s'agit de tumeurs peu ou pas différenciées avec une composante mucineuse prédominante, c'est-à-dire avec au moins 10% de mucine extracellulaire.^{36, 38} Les carcinomes de types médullaires sont peu fréquents (1/1000) mais sont fortement associés au phénotype MSI. Il semble que les tumeurs MSI soit en générale plus grosses ($\geq T3$) que les tumeurs MSS. Par contre, on retrouve rarement des ganglions positifs ou des métastases au diagnostic chez les patients présentant une tumeur avec un déficit en MMR. Les marqueurs immunohistochimiques (IHC) les plus fréquemment utilisés dans les adénocarcinomes colorectaux sont les cytokératines 7 (CK7), 20 (CK20) et CDX2. La majorité des adénocarcinomes colorectaux présentent un profil d'immunohistochimie CK20 positif / CK7 négatif. Il semblerait qu'une diminution ou une absence d'expression de CK20 soit associée aux CCR MSI. CDX2, un marqueur de différenciation entérique, est quant à lui le plus

souvent négatif.³⁹ Enfin, la réponse immunitaire est plus importante au niveau des tumeurs MSI que des tumeurs MSS.⁴⁰ On observe généralement un infiltrat lymphocytaire abondant de nature cytotoxique avec un ratio CD8/CD3 élevé.⁴¹ On parle d'infiltrat lymphocytaire de type « maladie de Crohn ».

| | Instabilité microsatellite | Instabilité chromosomique |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Localisation | Colon proximal | Colon distal |
| Caractéristique chromosomique | Diploïde | Aneuploïde ou polyploïde |
| Différenciation | Absente ou faible | Importante |
| Composante mucineuse | Fréquente | Rare |
| Marqueurs IHC | CK 20 négatif CDX2 négatif | CK20 positif CDX2 positif |
| Réaction inflammatoire | De type maladie de Crohn | Infiltrat lymphocytaire peu fréquent |
| Taille de la tumeur | Souvent ≥ T3 | Plus petites |
| Invasivité | Souvent N0 et M0 au diagnostic | Souvent N+ et M+ au diagnostic |

Tableau 3: Différences entre les tumeurs présentant un phénotype microsatellite instable et celles présentant une instabilité chromosomique.

L'impact du déficit en MMR sur le pronostic des tumeurs colorectales a été étudié à plusieurs reprises. Malgré quelques résultats contradictoires, il semblerait que les patients avec une tumeur MSI présentent un meilleur pronostic que ceux avec une tumeur MSS. Dans leur étude Ribic *et al* ont analysé les données de survie de 570 patients avec un cancer colorectal de stade II ou III, dont 16,7% présentaient une instabilité microsatellite.⁴² Ils ont montré qu'il existait une relation entre le statut microsatellite et la survie, que les patients aient bénéficié ou non d'une chimiothérapie adjuvante. La survie sans progression à 5 ans était de environ 75% pour les patients avec une tumeur MSI, contre 64,1% pour ceux avec une tumeur MSS ($p = 0,04$). Pour un même stade au diagnostic, les données de survie globale montrent également un meilleur pronostic pour les patients présentant une tumeur MSI. En 2005, Popat *et al* ont colligé les données de 32 études, et confirment l'avantage pronostique du statut MSI des tumeurs, aussi bien concernant la survie globale que la survie sans progression.⁴³ Cependant, la majorité de ces études concernent des cancers coliques, et il semblerait que ces résultats soient à nuancer dans les cancers rectaux.⁴⁴

1.2.2.4 Diagnostic de l'instabilité microsatellite

Compte tenu du risque élevé de développer des cancers pour les patients atteints d'un syndrome de Lynch, l'identification des tumeurs présentant un déficit du MMR est un élément clé. La recherche d'instabilité microsatellite n'est pas effectuée chez tous les patients atteints d'un cancer colorectal, mais il existe des situations cliniques particulières, détaillées dans les critères de Bethesda⁴⁵ et le critère de Bethesda révisé,⁴⁶ où cette recherche est souhaitable (*Tableau 4*). En France, ces critères ont été élargis de manière à optimiser le diagnostic des CCR héréditaires. L'INCA recommande la recherche d'une instabilité microsatellite chez tous les patients présentant un CCR ou un cancer du spectre HNPCC diagnostiqué avant 60 ans, ou quel que soit l'âge s'il existe des antécédents familiaux.⁴⁷

Tableau 4 : Critères de Bethesda révisés⁴⁶

- CCR diagnostiqué à un âge inférieur à 50 ans.
- CCR diagnostiqué chez un individu avec antécédent personnel de CCR ou du spectre HNPCC, synchrone ou métachrone, quels que soient les âges au diagnostic.
- CCR avec caractéristiques anatomopathologiques évocatrices (faible degré de différenciation, architecture de type « médullaire», infiltration lymphocytaire dense du stroma tumoral) diagnostiqué à un âge inférieur à 60 ans.
- CCR diagnostiqué chez un individu ayant au moins un apparenté au premier degré atteint d'un cancer du spectre HNPCC diagnostiqué à un âge inférieur à 50 ans.
- CCR diagnostiqué chez un individu ayant au moins 2 apparentés au premier ou au deuxième degré atteint d'un cancer du spectre HNPCC quels que soient les âges au diagnostic.

Actuellement, deux techniques sont principalement utilisées pour le diagnostic d'un déficit en MMR : l'immunohistochimie (IHC) des protéines du MMR et/ou l'identification par biologie moléculaire du phénotype microsatellite instable. L'immunohistochimie, réalisée sur des prélèvements inclus en paraffine, recherche l'expression des principales protéines impliquées dans les déficits du MMR : MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2. Le profil d'expression des cellules tumorales est comparé à celui du tissu sain adjacent. L'IHC permet de déterminer de manière indirecte le statut MSI d'une tumeur, mais oriente également sur l'origine sporadique ou héréditaire du déficit du MMR (*Tableau 5*). On notera, que les déficits en MLH1 et MSH2 entraînent respectivement la perte secondaire d'expression des protéines PMS2 et MSH6, qui

ne sont plus protégées de la dégradation. L'identification des tumeurs MSI par des techniques de biologie moléculaire (PCR et analyse de fragment) repose sur la comparaison entre le tissu sain et la tumeur d'un panel de microsatellites monomorphiques dans la population générale. La nature du panel a évolué au cours du temps, mais actuellement, on recommande l'utilisation d'un panel de 5 microsatellites mononucléotidiques mis au point par l'équipe de Hamelin : BAT25, BAT26, NR21, NR24 et NR27.^{46,48} On considère comme MSI high (MSI-H) les tumeurs présentant plus de 30% de marqueurs instables et comme MSI low (MSI-L) celles présentant un marqueur instable. Les tumeurs MSS ne présentent d'instabilité sur aucun marqueur. Il existe une bonne concordance entre les résultats de l'immunohistochimie et ceux de l'analyse de fragment, cependant on recommande l'association des deux techniques pour éviter les faux négatifs. Par exemple, les déficits en MSH6 ne sont pas forcément détectés par les techniques de biologie moléculaire car ils n'induisent, la plupart du temps, qu'une faible instabilité microsatellite. D'autre part, les techniques d'IHC ne sont pas à même de détecter les mutations faux-sens qui sont à l'origine d'une perte de fonctionnalité de la protéine, sans forcément diminuer son expression.

| Expression en IHC | | | | Interprétation | Gène inactivé | Origine du déficit |
|-------------------|------|------|------|----------------|---------------|-----------------------------|
| MLH1 | MSH2 | MSH6 | PMS2 | | | |
| + | + | + | + | MSS | - | - |
| - | + | + | - | MSI | MLH1 | Sporadique ou héréditaire |
| + | - | - | + | MSI | MSH2 | Majoritairement héréditaire |
| + | + | - | + | MSI | MSH6 | Majoritairement héréditaire |
| + | + | + | - | MSI | PMS2 | Majoritairement héréditaire |

Tableau 5 : Profils d'expression des protéines du MMR en IHC et diagnostic d'instabilité microsatellite. + : Expression protéique en IHC. - : Absence d'expression protéique en IHC.

Une fois le diagnostic d'instabilité microsatellite posé, et grâce à l'orientation donnée par l'IHC, des investigations complémentaires doivent être réalisées pour déterminer le caractère sporadique ou héréditaire du déficit en MMR. Dans cette optique, la recherche de la mutation V600E du gène *BRAF* peut être réalisée, car sa présence constitue un critère d'exclusion pour le diagnostic de syndrome de Lynch. Pour les déficits en MLH1, on recherchera, en première intention, une hyper-méthylation du promoteur du gène caractéristique des tumeurs MSI sporadiques, compte tenu de sa fréquence. Puis si cette analyse se révèle négative, on effectuera le séquençage du gène. Dans les autres cas, on effectuera directement le séquençage du gène suspecté à la recherche d'une mutation.

1.3 Chimiothérapie dans les cancers colorectaux MSI : place du 5-Fluorouracile.

De manière générale, la prise en charge des cancers colorectaux repose sur une approche multidisciplinaire associant la chirurgie, la radiothérapie, et la chimiothérapie dont la pierre angulaire est le 5-FU. Cependant les tumeurs MSI nécessitent une prise en charge particulière, notamment en ce qui concerne la chimiothérapie. En effet, le système du MMR intervient dans la cytotoxicité d'un certain nombre de molécules anti-cancéreuses induisant des dommages de l'ADN : agents méthylants (temozolomide, procarbazine, dacarbazine et streptozotocine), anti-métabolites (6-thioguanine, 5-FU), agents alkylants (cisplatine, carboplatine). Un déficit en MMR peut donc être à l'origine de l'inefficacité de certaines chimiothérapies. Il est admis qu'un déficit du MMR est un facteur prédictif de non réponse à un certain nombre de molécules, dont notamment le cisplatine.⁴⁹ Mais pour certaines molécules, dont le 5-FU, les données sont plus controversées.

1.3.1 Pharmacologie du 5-FU : Rôle du MMR

Le 5-fluoro-uracile (5-FU) est un médicament anticancéreux développé dans les années 50 et appartenant à la classe des anti-métabolites. Il s'agit d'un analogue de base Pyrimidique : un uracile dont l'hydrogène en position 5 a été substitué par un atome de fluor, entraînant une modification de charge et de réactivité de la molécule. Le 5-FU agit sur les cellules cancéreuses selon 3 mécanismes : incorporation de fluoro-nucléotides dans l'ADN, dans l'ARN et inhibition de la thymidilate synthase (TS).

Après administration par voie parentérale, le 5-FU est rapidement catabolisé (Demi-vie \approx 6 min) à près de 80% par la dihydropyrimidine déhydrogénase (DPD)⁵⁰. Cette enzyme, retrouvée principalement dans les hépatocytes et les lymphocytes, réduit le 5-FU en un métabolite inactif 5-fluorodihydrouracile (5-FUH₂). La DPD est une enzyme soumise à un polymorphisme génétique et, à ce jour, 31 "Single Nucleotide Polymorphisms" (SNP) ont été rapportés, dont certains entraînent une diminution voire une absence d'activité de l'enzyme, à l'origine d'épisodes toxiques graves.⁵¹ La fréquence des homozygotes avec déficit enzymatique total est de 0,3 % et celle des hétérozygotes avec une activité réduite de la DPD est de 2 à 4 %, d'où l'intérêt du dépistage des patients à risques par une approche génotypique⁵² et une approche phénotypique.⁵³

Du fait de l'action de la DPD, seule une faible fraction du 5-FU est anabolisée en dérivés cytotoxiques. L'action du 5-FU nécessite une activation cellulaire par des phosphorylases et des kinases en métabolites actifs, suivant trois voies anaboliques (*Figure 2*). Le 5-FU est converti en fluorodéoxyuridine monophosphate (5-FdUMP) qui inhibe la thymidylate synthase (TS) en formant un complexe ternaire avec la N-méthylène-tétrahydrofolate (acide folinique). L'inhibition de la TS empêche la synthèse de thymidine à partir du dUMP et par conséquent la synthèse de l'ADN. On notera que l'augmentation des concentrations intracellulaires en 5-10 méthylène tétrahydrofolate par co-administration d'acide folinique permet de potentialiser la toxicité du 5-FU. Le 5-FU est également transformé en 5-fluorouridine triphosphate (FUTP) qui s'incorpore dans l'ARN et inhibe sa maturation,⁵⁴ et en 5-fluorodéoxyuridine triphosphate (FdUTP) qui s'incorpore dans l'ADN et inhibe son élongation.^{55,56} Il est admis que le mécanisme d'action principal du 5-FU est l'inhibition de la TS. Néanmoins, des études ont mis en évidence qu'au moins 10% de la toxicité cellulaire du 5-FU était liée à la reconnaissance par le système du MMR des adduits de 5-FU sur l'ADN.⁵⁷ Il semblerait que le FdUTP incorporé dans l'ADN induise une déformation de la double hélice d'ADN par une modification de charge, permettant ainsi sa reconnaissance par le système du MMR. La liaison du MMR aux adduits de 5-FU dans l'ADN serait plus importante que pour les mésappariements de type C – T. L'équipe de Carethers a mis en évidence que la toxicité MMR-dépendante du 5-FU dépendait principalement de MutS α ,⁵⁸ mais aussi de MutS β .⁵⁹ Ainsi, ils ont montré que la cytotoxicité du 5-FU était maximale dans les cellules disposant à la fois de complexes MutS α et MutS β , intermédiaire dans les cellules présentant un déficit de MutS β , et très faible dans celles avec un déficit de MutS α .

1.3.2 Conséquences du déficit en MMR sur la sensibilité au 5-FU

L'incorporation du FdUTP dans l'ADN et sa reconnaissance par le système du MMR ne constituent pas le mécanisme d'action principal du 5-FU, cependant de nombreuses études montrent qu'un déficit du MMR induisait une perte d'efficacité du 5-FU.

Les études *in vitro* montrent qu'un déficit du MMR est à l'origine d'une résistance des cellules cancéreuses au 5-FU. Meyers *et al* ont montré que la lignée cellulaire HCT116, qui présente un déficit du MMR par une mutation du gène MLH1, était environ 15 – 20 fois plus résistantes au 5-FU que les cellules HCT116 3-6, dans lesquelles un chromosome 3 normal contenant un gène MLH1 fonctionnel a été introduit.⁶⁰ Il a été également montré dans la lignée cellulaire SW48, que l'inactivation du gène MLH1 par hyperméthylation de son promoteur était également à l'origine d'une diminution de la sensibilité au 5-FU.⁶¹ Malgré la

redondance entre MutS α (MSH2 – MSH6) et MutS β (MSH2 – MSH3), un déficit en MSH3 est à l'origine d'une diminution de la sensibilité au 5-FU.⁶² Ainsi, quelle que soit l'origine du déficit du MMR, mutation ou inactivation épigénétique, déficit en MutS ou MutL, les cellules MSI sont moins sensibles au 5-FU que les cellules MSS.

In vivo, de nombreuses études ont examiné l'impact du statut microsatellite comme marqueur prédictif de réponse à une chimiothérapie à base de 5-FU.^{42, 63-66} En 2003, l'équipe de Gallinger a montré que l'administration d'une chimiothérapie adjuvante à base de 5-FU (5-FU + levamisole ou 5-FU + acide folinique) chez des patients présentant une tumeur colorectale MSS ou MSI-L était associée à une amélioration de la survie sans progression et de la survie globale. Par contre, chez les patients avec une tumeur MSI-H il n'y avait pas de différence en terme de survie que les patients aient bénéficié ou non d'une chimiothérapie adjuvante ($p = 0,80$).⁴² Ces résultats ont été confirmés par la même équipe dans une étude ultérieure avec, chez les patients présentant une tumeur colorectale de stade II, une diminution de la survie globale dans le groupe MSI traité par chirurgie et chimiothérapie adjuvante comparé au groupe contrôle traité uniquement par chirurgie.⁶⁶ L'effet d'une chimiothérapie par 5-FU a été étudié pour d'autres tumeurs présentant un déficit du MMR et des résultats similaires ont été retrouvés concernant la sensibilité au 5-FU. Dans une population de cancers gastriques, l'avantage pronostic du déficit en MMR n'a pas pu être démontré quel que soit le stade au diagnostic. Par contre, il a été mis en évidence que le 5-FU améliorait la survie des patients présentant une tumeur MSS/MSI-L de grade II ou III, ce qui n'était pas le cas en cas de tumeur MSI-H.⁶⁷ Certaines études présentent cependant des résultats plus nuancés sur l'impact du déficit en MMR sur la réponse au 5-FU, avec notamment des difficultés d'interprétation des résultats compte-tenu de la forte hétérogénéité des tumeurs MSI.⁶⁸ D'autre part, il semblerait que l'adjonction d'autres molécules de chimiothérapie telles que l'oxaliplatine ou l'irinotécan au 5-FU permettent de surmonter l'effet du déficit du MMR sur la réponse à la chimiothérapie.^{63,69, 70} On notera cependant, que la plupart des travaux ont étudié uniquement l'impact du déficit en MMR sur la réponse à la chimiothérapie à base de 5-FU, mais n'ont pas étudié chez ces patients d'autres déterminants comme notamment l'expression de la TS. Compte-tenu de ces résultats, le « National Comprehensive Network[®] » considère que le statut microsatellite instable de la tumeur est un des éléments d'information important à prendre en compte lorsqu'il s'agit de décider d'utiliser ou non une chimiothérapie adjuvante à base de 5-FU, notamment chez les patients présentant une tumeur de stade II.⁷¹ Par contre pour les patients avec un cancer de stade III ou métastatique, l'emploi du 5-FU reste recommandé.

1.3.3 HSP110ΔE9 : nouveau marqueur prédictif de réponse au 5-FU dans les tumeurs MSI ?

Les protéines de choc thermique ou « Heat Shock Protein » (HSP) constituent un système hautement conservé (plantes, procaryotes et eucaryotes) de protection cellulaire en réponse à des signaux de stress, d'où le terme de protéines chaperonnes. Les différents types d'HSP présentent de nombreuses homologues : elles sont abondantes, ubiquitaires et inductibles. Leur synthèse est induite par de nombreux signaux de stress dont l'hyperthermie mais aussi de nombreux signaux toxiques.⁷²

Les HSP sont classées en 6 familles en fonction de leur poids moléculaire : HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP47 et HSP-25-30. Parmi ces HSP, les protéines de 110 kDa constituent une famille majeure.^{73, 74} On trouve deux isoformes d'HSP110 : HSP110α (858 AA) qui est exprimé de manière constitutive et peut être induite par de nombreux signaux de stress, et HSP110β (814 AA) qui résulte de l'épissage alternatif de l'exon 12 d'HSP110α lors d'un choc thermique (*Figure 1*). Les deux protéines possèdent une structure similaire aux DnaK avec un domaine de liaison à l'ATP dans leur partie N-terminale (1 – 384 AA), un site actif ou « peptide binding domain » (PBD) (384 – 530 AA), des séquences d'importation et d'exportation du noyau « nuclear localization site » (NLS) et « nuclear exporting sequence » (NES) et une série d'hélice α dans la partie C-terminale. Les deux protéines sont exprimées à la fois dans le cytosol et dans le noyau. Les HSP110 jouent un rôle dans les phénomènes de thermotolérance en permettant de solubiliser les agrégats protéiques résultants des chocs thermiques.⁷⁵ Par ailleurs, elles interviennent également dans les mécanismes de protection cellulaire en interagissant avec d'autres protéines chaperonnes telles que HSP70 et HSC70. De nombreuses études ont notamment mis en évidence la surexpression des protéines de choc thermique dans de nombreux cancers,⁷⁶⁻⁷⁸ et notamment dans les cancers colorectaux.⁷⁹⁻⁸¹ Cette augmentation du taux d'expression des différentes HSP favoriserait la progression tumorale en promouvant la prolifération cellulaire et en inhibant les mécanismes de mort cellulaire.⁸² Dans le cas particulier d'HSP110, il semble qu'une surexpression de cette protéine soit un facteur pronostic, les taux les plus importants étant retrouvés dans les cancers colorectaux métastatiques.^{79, 80}

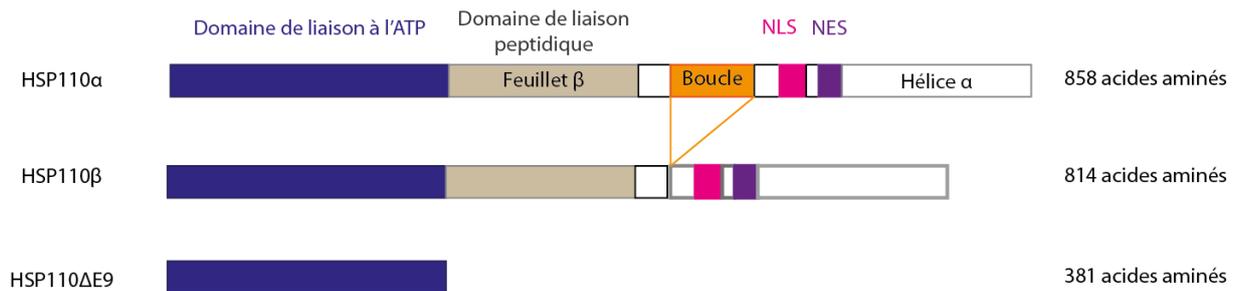


Figure 1 tirée de Dorard et al.⁸³: Structure des protéines HSP110 sauvages et mutée. On trouve deux isoformes de la protéine sauvage (HSP110α et HSP110β) dont on ne connaît pas les différences fonctionnelles. La protéine mutée HSP110ΔE9 conserve uniquement le domaine de liaison à l'ATP ici représenté en bleu, le site « Peptide binding site », les séquences d'exportations (NES) et de localisation nucléaire (NLS) ayant été excisées.

L'équipe d'Alex Duval a récemment identifié, dans une population de patients présentant une tumeur MSI de stade II ou III, une délétion au niveau d'un microsatellite de l'intron 8 (T17) situé à proximité d'un site d'épissage.⁸³ Présente dans toutes les tumeurs MSI, mais absente de toutes les tumeurs MSS, cette délétion dans une séquence non codante est à l'origine d'un phénomène d'épissage alternatif qui conduit à l'excision de l'exon 9 et l'obtention d'une protéine tronquée HSP110ΔE9. Ce variant tronqué d'HSP110 ne conserve que la partie N-terminale de la protéine, c'est-à-dire le domaine de liaison à l'ATP. Cette mutation a des conséquences multiples et contribue à une diminution des capacités de protection cellulaire. L'absence du site actif de la protéine entraîne la perte de la fonction chaperonne propre d'HSP110. La perte de la partie C-terminale de la protéine empêche également l'interaction entre HSP70 ou HSP27 avec HSP110 ce qui entraîne la perte d'une partie de leurs fonctions. Enfin, l'étude montre également que la protéine HSP110ΔE9 a la capacité d'inhiber l'activité de la protéine sauvage. L'étude a montré que le taux d'expression HSP110ΔE9 / HSP110 était hétérogène (0,4 – 479,2 %), et suggère que la taille de la délétion est à l'origine de cette disparité. L'équipe d'A. Duval suggèrent également que le ratio d'expression d'HSP110ΔE9 / HSP110 est un marqueur prédictif de réponse au 5-FU chez les patients présentant une tumeur MSI. Chez les patients MSI, les études ont montré l'inefficacité du 5-FU. Il semblerait également que, grâce à sa fonction chaperonne, HSP110 protège les cellules de la toxicité du 5-FU. Ainsi, ils postulent que l'inhibition d'HSP110 par HSP110ΔE9 permettrait de recouvrir une partie de la cytotoxicité du 5-FU (Figure 2). Ils ont ainsi défini une sous-population de patients (≈ 30%) qui exprime fortement HSP110ΔE9 (HSP110ΔE9 / HSP110 > 75%) et semble bénéficier d'une chimiothérapie par 5-FU.

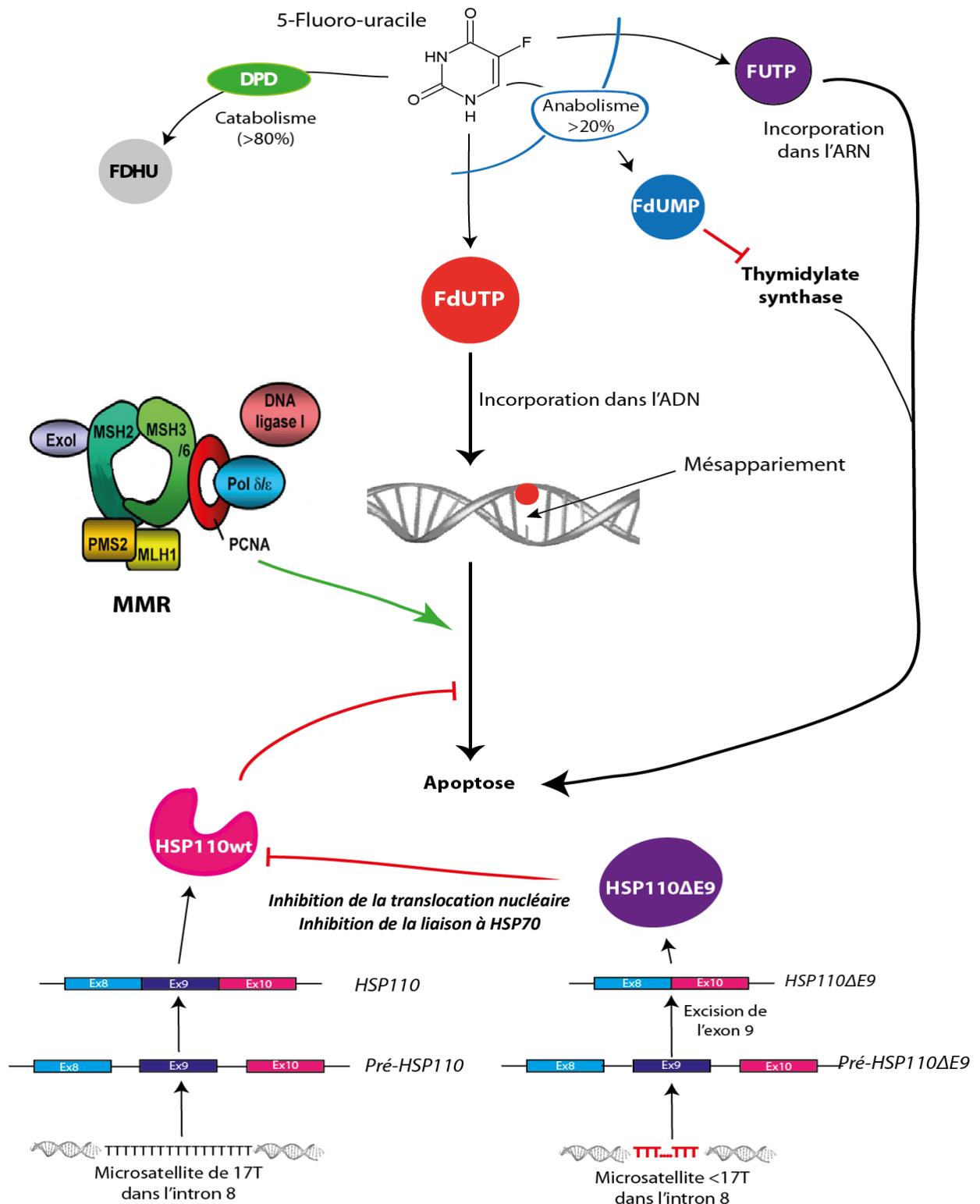


Figure 2 : Schéma simplifié de l'interaction entre MMR, HSP110 et HSP110ΔE9 dans le mécanisme d'action du 5-FU. Les flèches rouges représentent une inhibition, les vertes une stimulation. DPD : dihydropyrimidine déshydrogénase ; FUTP : 5-fluoro-uridine triphosphate ; FdUMP : 5-fluoro-désoxyuridine mono phosphate ; FdUTP : 5- fluorodeoxyuridine triphosphate, HSP110 : Heat Shock Protein 110 ; HSP110ΔE9 : variant tronqué d'HSP110, MMR : Mismatch repair.

2 Objectifs de l'étude

Les projets de recherche menés au laboratoire ont pour but d'identifier des marqueurs constitutionnels ou tumoraux en vue de limiter la toxicité des traitements et d'identifier les marqueurs pronostiques de l'évolution tumorale. L'équipe s'intéresse particulièrement aux facteurs prédictifs de la réponse au 5-FU dans le traitement du cancer colorectal, de manière à personnaliser le traitement des patients. Dans notre étude nous nous sommes intéressés aux relations entre instabilité microsatellite, la survie, réponse à la chimiothérapie à base de 5-FU et expression d'HSP110ΔE9, variant tronqué d'HSP110, récemment décrit comme possible marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie par 5-FU.⁸³ Les objectifs étaient (1) de vérifier l'impact pronostic et prédictif du phénotype MSI dans une population de patients avec CCRm et traités par FOLFIRI-CETUX, (2) de vérifier l'absence de polymorphisme du T17 d'HSP110 dans le tissu sain, (3) d'étudier la prévalence des délétions du T17 d'HSP110 et les facteurs modulant l'expression HSP110ΔE9 / HSP110 dans des CCR MSS et MSI, et (4) d'évaluer l'influence HSP110ΔE9 sur la survie et la réponse à la chimiothérapie.

3 Matériels et méthodes

3.1 Lignées cellulaires

Nous avons étudié la taille du microsatellite T17 d'HSP110 et de l'expression d'HSP110ΔE9 dans 5 lignées cellulaires de cancers colorectaux dont les caractéristiques sont détaillées dans le tableau ci-dessous. Les différentes techniques utilisées par la suite ont été mise au point à l'aide des extraits d'ADN, ARN et protéines de ces lignées cellulaires.

| Lignée | Statut microsatellite* | | | | | | Anomalie du MMR |
|--------|------------------------|-------|-------|--------|--------|---------|---------------------------------------|
| | Statut | BAT25 | BAT26 | D5S346 | D2S123 | D17S250 | |
| HCT116 | MSI-H | MSI | MSI | | MSS | MSI | Mutation de MLH1 |
| LS174T | MSI-L | MSI | MSI | MSS | MSS | MSS | Hyperméthylation du promoteur de MLH1 |
| SW48 | MSI-H | MSI | MSI | MSI | MSI | MSS | Hyperméthylation du promoteur de MLH1 |
| SW480 | MSS | MSS | MSS | MSS | MSS | MSS | Aucune |
| HT29 | MSS | MSS | MSS | MSS | MSS | MSS | Aucune |

Tableau 6 : Caractéristiques des lignées cellulaires issues de cancers colorectaux (seltarbase.org). * Le phénotype MSI des tumeurs a été déterminé à l'aide du panel de la conférence de Bethesda. MSI : instabilité microsatellite ; MSS : Stabilité microsatellite.

3.2 Patients

3.2.1 Population 1 : Patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et traités par FOLFIRI-CETUX.

Nous avons effectué une étude rétrospective chez 86 patients traités pour un cancer colorectal métastatique, en première ou deuxième ligne, par une chimiothérapie associant le 5-FU, l'irinotécan et le cétuximab, entre 2004 et 2012. Pour chaque patient, nous disposions de tissu tumoral, sous forme de lame fixées et paraffinées, et de tissu sain (tissu sain colique ou leucocytes). Nous disposions également des données anatomopathologiques (type de tumeur, grade histologique), biologiques (statut KRAS sauvage de la tumeur, recherche de mutations sur le gène de la DPD et de l'UGT1A1), et cliniques (posologies, schéma d'administration,

effets secondaires médicamenteux, réponse au traitement). Tous les patients ont signé un consentement autorisant la réalisation d'analyses génétiques sur leurs prélèvements.

| | | |
|--------------------------------|-----------------------|----------------|
| Âge moyen (min ; max) | | 62,7 (34 ; 81) |
| Sexe (%) | | |
| | <i>homme</i> | 60 (69,7) |
| | <i>femme</i> | 26 (30,3) |
| | <i>sexe ratio</i> | 0,43 |
| Tumeur primitive (%) | | |
| | <i>colon</i> | 50 (58,2) |
| | <i>rectum</i> | 34 (39,5) |
| | <i>Colon + rectum</i> | 2 (2,3) |
| Sites métastatiques (%) | | |
| | 1 | 33 (38,4) |
| | 2 | 37 (43) |
| | 3 | 14 (16,3) |
| | 4 | 1 (1,2) |
| | 5 | 1 (1,2) |

Tableau 7 : Caractéristiques de la population de patients présentant un CCRm et traités par l'association FOLFIRI-CETUX.

3.2.2 Population 2 : Patients atteints d'un cancer colorectal MSI

Nous avons également effectué l'étude de la taille du microsatellite T17 d'HSP110 et l'expression d'HSP110ΔE9 chez 121 patients présentant une tumeur colorectale et pour lesquels le diagnostic d'instabilité microsatellite avait été réalisé au sein du laboratoire selon la technique décrite ci-après. Pour chaque patient nous disposons de tissu tumoral, sous forme de lames fixées et paraffinées, et de tissu sain (tissu sain colique ou leucocytes).

| | | |
|------------------------------|-------------------|---------------------|
| Âge moyen (min ; max) | | 59, 6 ans (35 ; 89) |
| Sexe (%) | | |
| | <i>homme</i> | 57 (47) |
| | <i>femme</i> | 64 (53) |
| | <i>sexe ratio</i> | 1,12 |
| Tumeur primitive (%) | | |
| | <i>colon</i> | 118 (97,5) |
| | <i>rectum</i> | 3 (2,5) |

Tableau 8 : Caractéristiques de la population de patients présentant un cancer colorectal MSI.

3.3 Analyses de l'ADN génomique

3.3.1 Extraction et dosage des ADN génomiques.

L'extraction de l'ADN à partir des coupes d'anatomopathologie fixées et paraffinées (1 cm²) est effectuée manuellement à l'aide du kit NucleoSpin[®] FFPE DNA (Macherey-Nagel, Den, Allemagne) en suivant les recommandations du fabricant. L'extraction d'ADN à partir de culots de leucocytes ou de lignées cellulaires est réalisée grâce au système automatisé Maxwell[®] 16 (Promega, Madison, WI, USA). Le dosage de ces ADN est réalisé par une méthode utilisant un fluorophore s'intercalant dans les doubles brins d'ADN, à l'aide du kit QuantiFluor[®] (Promega) sur le QUBIT[®] (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). La concentration de chaque ADN a été ensuite ajustée à 2 ng/μL dans de l'eau nucléase free. Les ADN purs et dilués sont conservés à -20°C.

3.3.2 Recherche d'une instabilité microsatellite

La recherche d'une instabilité microsatellite a été réalisée à l'aide d'une PCR multiplex ciblant 5 marqueurs mono nucléotidiques (*Tableau 9*) comme le recommande la conférence de consensus de Bethesda ⁴⁶ puis d'une analyse de fragments des produits de PCR obtenus. La PCR multiplex a été réalisée grâce au kit MSI Analysis System[®] (Promega). Les cycles de PCR sont les suivants : 11 min à 95°C, puis 1 min à 96°C, puis 30 cycles avec 30 s à 94°C, 90 s à 58°C et 90 s à 70°C, enfin un dernier cycle de 45 min à 60°C. Les produits de PCR fluorescents obtenus sont dilués au 1/10 (V/V) dans un mélange contenant du formamide et un standard interne de taille (ILS 600[®]), puis séparés sur un ABI Prism[®] 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). L'analyse des différents fragments est effectuée à l'aide du logiciel Gene Mapper (Applied Biosystems). Pour chaque patient on compare le profil du tissu tumoral à celui du tissu sain et à un témoin MSS (ADN de cellules K562). Les échantillons avec deux marqueurs instables ou plus ont été considérés comme instables (MSI-H) tandis que les échantillons avec moins de 2 marqueurs instables ont été considérés comme stables. Les échantillons ne présentant d'instabilité sur aucun marqueur sont considérés comme MSS. Les marqueurs Penta-D et Penta-C sont des microsatellites qui permettent de vérifier que tissu sain et tumeur proviennent bien du même patient.

| <i>Marqueur</i> | <i>Référence GenBank[®]</i> | <i>Séquence du microsatellite</i> |
|-----------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| NR-21 | XM_033393 | (A) ₂₁ |
| BAT-25 | U41210 | (A) ₂₅ |
| BAT-26 | L04143 | (A) ₂₆ |
| NR-24 | X60152 | (A) ₂₄ |
| MONO-27 | AC007684 | (A) ₂₇ |
| Penta-C | AL138752 | (AAAAG) ₃₋₁₅ |
| Penta-D | AC000014 | (AAAAG) ₂₋₁₇ |

Tableau 9 : Liste des marqueurs microsatellites étudiés pour le diagnostic d'une instabilité microsatellite (données du fournisseur).

La recherche de l'expression des protéines MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 a été réalisée par le laboratoire d'anatomopathologie de l'ICO Paul Papin.

3.3.3 Recherche et caractérisation de délétions au niveau du microsatellite T17 d'HSP110.

3.3.3.1 PCR et analyse de fragment ciblant le microsatellite T17

Les amorces de PCR ont été conçues avec le logiciel ePrimer3 (5'-6FAM-TGGGAAGTGTTCATGTGCTC-3' et 5'-ACTGCATCTGTGACGGAAAATTC-3'). Le volume réactionnel de la réaction de PCR est de 50 µL avec en concentrations finales : 2,5 µM de MgCl₂, 0,4 mM de chaque amorce, 0,2 mM de dNTP, 1 µL d'ADN et une unité d'Ampli TAQ GOLD[®] DNA polymérase (Promega). La réaction de PCR comporte une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 2,5 min, et 35 cycles à 94°C pendant 30 s, puis 60°C pendant 30 s et 72°C pendant 1 min. On vérifie l'amplification des ADN par migration sur gel d'Agarose 2% ou grâce au système eGene. Les produits de PCR sont ensuite dilués dans de l'eau (1/20 à 1/300 V/V), puis séparés par électrophorèse capillaire sur le séquenceur ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems), en utilisant le LIZ600[®] (Promega) comme standard interne de taille. Les électrophorégrammes sont analysés grâce au logiciel Gene Mapper V4.0 (Applied Biosystems).

3.3.3.2 Clonage

Le clonage des produits de PCR, obtenus à partir de lignées cellulaires de cancers colorectaux (HCT116, LS174T, SW48, SW480 et HT29), est effectué à l'aide du vecteur pGEMT (Promega) dans des bactéries compétentes JM109 (Promega). Après culture bactérienne, les vecteurs sont purifiés à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep Kit[®] (Qiagen, Courtaboeuf,

France) en suivant les recommandations du fabricant. La concentration des solutions de vecteurs est évaluée à l'aide du kit QuantiFluor[®] (Promega) sur le QUBIT[®] (Invitrogen).

3.3.3.3 Séquençage par la méthode de Sanger

La PCR de séquence est effectuée à partir de 300 ng de vecteur purifié. Le volume réactionnel de la réaction de séquence est de 20 µL avec en concentration finale : Big Dye buffer 1X, Premix version 3.0 1X, 1,26 pg de pUC/M13 sequencing primer (Promega). Un premier cycle de 1 min à 95°C est nécessaire, puis 25 cycles avec 10 s à 96°C, 10 s à 50°C et 4 min à 60°C. Le produit de PCR obtenu avec la réaction de séquence est précipité avec 2 µL d'acétate de sodium 3M pH5,2 ; 2 µL d'EDTA 100 mM pH8 ; 1 µL de glycogène à 20 mg/mL. On effectue ensuite trois rinçages dans l'éthanol absolu et on récupère un extrait sec que l'on reprend dans 20 µL de formamide. Un séquençage des différents clones est ensuite réalisé sur le séquenceur ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystem). Les séquences sont analysées grâce au logiciel Sequencing analysis (Applied Biosystem).

3.3.4 Recherche de la mutation V600E du gène *BRAF*.

La recherche de la mutation V600E du gène *BRAF* est effectuée par PCR puis Pyroséquençage. Pour la PCR on utilise une amorce sens non biotinylée (5'-CCACAAAATGGATCCAGA-3') et une amorce anti-sens biotinylée (5'-TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG-3'). Le volume réactionnel de la PCR est de 50 µL avec 10 µL de tampon 5X, 5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTP (10 mM), 0,25 µL de TAQ polymérase, 31,75 µL d'eau, 1 µL de mélange d'amorce (10 µM) et 1 µL d'ADN à 100 ng/µL. Un premier cycle de 1 min à 94°C est nécessaire, puis 35 cycles avec 30 s à 94°C, 30 s à 57°C et 1 min à 72°C, et enfin 10 minutes à 72°C. Le Pyroséquençage est réalisé à l'aide d'un PyroMark[™]Q96 ID (Qiagen) avec les réactifs PyroMarkGold en suivant les recommandations du fournisseur. L'amorce de séquence utilisée est la suivante 5'-TGATTTTGGTCTAGCTACA-3'. Les pyrogrammes sont analysés à l'aide du logiciel fournis par Qiagen en comparant la séquence obtenue à la séquence sauvage de *BRAF* : GTGAAATCTCGA (Annexe 1).

3.4 Analyse de l'ARNm

3.4.1 Extraction et dosage des ARN

L'extraction de l'ARN à partir de tissus fixés et paraffinés (1 cm²) ou à partir de lignées cellulaires (> 10⁶ cellules) est effectuée manuellement à l'aide du kit High Pure miRNA[®] isolation kit (Roche, Pentzberg, Allemagne) en suivant les recommandations du fabricant. Pour les tissus fixés et paraffinés, une étape préalable de déparaffinage dans le xylène et de réhydratation dans l'éthanol a été réalisée. Après l'extraction on effectue un traitement avec une DNase. Les ARN sont ensuite dosés par une technique spectrophotométrique à 260 nm sur le Nanodrop[®] (Thermo scientific Courtaboeuf, France). Les ARN extraits sont conservés à -80°C.

3.4.2 Reverse Transcription (RT)

La réaction de RT est effectuée à partir de 600 ng d'ARN et se déroule en trois étapes. Premièrement, on ajoute 150 ng de Random Primers (Invitrogen) et 10 pmoles de chaque dNTP aux 10 µL d'ARN, on incube le mélange à 65°C pendant 5 min. Ensuite, on ajoute au mélange réactionnel 4 µL de First Strand Buffer 5X, 2 µL de DTT 0,1 M et 40 unités de RNaseOUT[®] (Invitrogen) et on incube 2 min à 37°C. Enfin, on ajoute 200 unités de M-MLV RT (Invitrogen) et on incube le mélange réactionnel à 25°C pendant 10 min, puis 50 min à 37°C et 15 min à 70°C. Les cDNA obtenus sont conservés à -20°C.

3.4.3 PCR multiplex et analyse de fragments

Pour évaluer l'importance de l'expression HSP110ΔE9 par rapport à HSP110 nous effectuons une PCR multiplex dans laquelle nous amplifions des fragments spécifiques du variant muté pour lequel l'exon 9 a été excisé (83 pb) et du variant sauvage pour lequel l'exon 9 est présent (72 pb et 193 pb), ainsi que de la β2-microglobuline (152 pb) comme contrôle interne. Les amorces ont été conçues à l'aide du logiciel *ePrimer3* : une amorce commune aux deux variants sur l'exon 8 d'HSP110 (5'-6FAM-ACA CTC AAT GCA GAT GAA GCA G-3'), une amorce sur l'exon 9 d'HSP110 (5'-CTA ACT TTA AAT GCC GGG GAA AG-3'), une amorce sur l'exon 10 d'HSP110 (5'-GGA GAA AGG AGC AGC ATG GTT-3'). Pour la β2microglobuline nous avons utilisé les amorces élaborées par l'équipe de Albitar et utilisées comme contrôle interne des RT-PCR en routine.⁸⁴ Le volume réactionnel de la réaction de PCR est de 50 µL avec en concentrations finales : 2,5 µM de MgCl₂, 0,4 mM de chaque

amorce, 0,2 mM de dNTP, 1 μ L d'ADN et une unité d'Ampli TAQ GOLD[®] DNA polymérase (Promega). La réaction de PCR comporte une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 2,5 min, et 35 cycles à 94°C pendant 30 s, puis 62°C pendant 30 s et 72°C pendant 1 min. On vérifie l'amplification des ADN par migration sur gel d'Agarose ou grâce au système eGene. Les produits de PCR sont ensuite dilués dans de l'eau (1/20 à 1/300 V/V), puis séparés par électrophorèse capillaire sur le séquenceur ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems), en utilisant le LIZ600[®] (Promega) comme standard interne de taille. Les électrophorégrammes sont analysés grâce au logiciel Gene Mapper (Applied Biosystems). Le rapport entre l'aire sous la courbe du pic d'HSP110 Δ E9 et celui d'HSP110 est calculé pour chaque échantillon et exprimé sous forme de ratio.

3.5 Analyse des protéines

3.5.1 Extraction et dosage des protéines

On extrait les protéines des lignées cellulaires HT29, HCT116 et LS174T par ajout de 100 μ L de tampon FASP (SDS 4%, TRIS 0,1M, pH7,6) au culot cellulaire. On effectue ensuite un cycle de congélation rapide à -80°C puis décongélation rapide à 37°C, puis deux cycles de 20 s de sonication. Après centrifugation à 14 000 \times g pendant 10 min à 4°C on récupère le surnageant protéique. Les extraits protéiques sont dosés par une méthode colorimétrique, à l'aide du kit BCA protein Assay (Thermo Scientific), sur le Nanodrop[®]. Les extraits protéiques sont conservés à -80°C.

3.5.2 Western Blot

A partir des extraits protéiques obtenus on effectue la recherche des protéines mutées et sauvages par la réalisation de Western Blot. On dépose 70 μ g d'extrait protéique dans un gel d'acrylamide à 8%, puis on laisse migrer pendant 30 min à 90 V puis 1h30 à 110 V. On effectue le transfert du gel sur une membrane de polyfluorure de vinylidène Immobilon[®] (Millipore, Billerica, MA, USA) pendant 54 min à 23 V. La membrane est ensuite rincée dans un mélange Tris Buffer Saline (TBS)/TWEEN 1% puis incubée dans une solution d'albumine bovine sérique à 5% pendant au moins une heure. On rince de nouveau la membrane dans le mélange TBS/TWEEN 1% puis on l'incube dans 15 mL de solution d'anticorps anti-HSP110 (ab24503, ABCAM), ciblant la partie N-terminale de la protéine, à 0,27 ng/mL pendant une nuit à 4°C. Après un rinçage dans du TBS/TWEEN 1%, on incube 45 min la membrane dans l'Ac secondaire dirigé contre les Ac de lapin (sc-2004). Les protéines de la membrane sont

révélées par ajout du substrat de la peroxydase (H_2O_2) et utilisation d'un système de chimiluminescence amélioré (ECL, Biorad, Hercules, CA, USA).

3.6 Etude statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant les logiciels SAS[®] et SPSS[®]. Les variables qualitatives ont été comparées à l'aide du test exact de Fisher, et les données continues ont été comparées par les tests de Wilcoxon ou de Kruskal Wallis en fonction du nombre de groupes. Les courbes de survie ont été calculées en mois en utilisant la méthode de Kaplan-Meier. Le test du log-Rank a été utilisé pour comparer la survie des patients. Pour les lignées cellulaires, les taux d'expression HSP110 Δ E9 / HSP110 ont été comparés 2 à 2 à l'aide de l'ajustement de Bonferroni. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

4 Résultats

4.1 Lignées cellulaires

4.1.1 Statut MSI des lignées cellulaires

Le phénotype MSI des 5 lignées cellulaires a été vérifié à l'aide du panel de 5 marqueurs mono-nucléotidiques suivant les dernières recommandations en vigueur, de la même manière que tous les patients de l'étude. Un marqueur est considéré comme stable lorsque les profils du témoin et du patient sont superposables, aux marqueurs PentaC et PentaD près. Quand un marqueur est instable on observe un dédoublement de la population de pics du microsatellite. Par cette technique on retrouve que les cellules HT29 et SW480 ne présente d'instabilité sur aucun des marqueurs et sont donc MSS, tandis que l'on retrouve une instabilité des 5 marqueurs pour les cellules HCT116 (*Figure 3*), LS174T et SW48. On considère donc que ces trois lignées sont MSI-H, alors que dans la littérature les cellules LS174T sont considérées comme MSI-L.

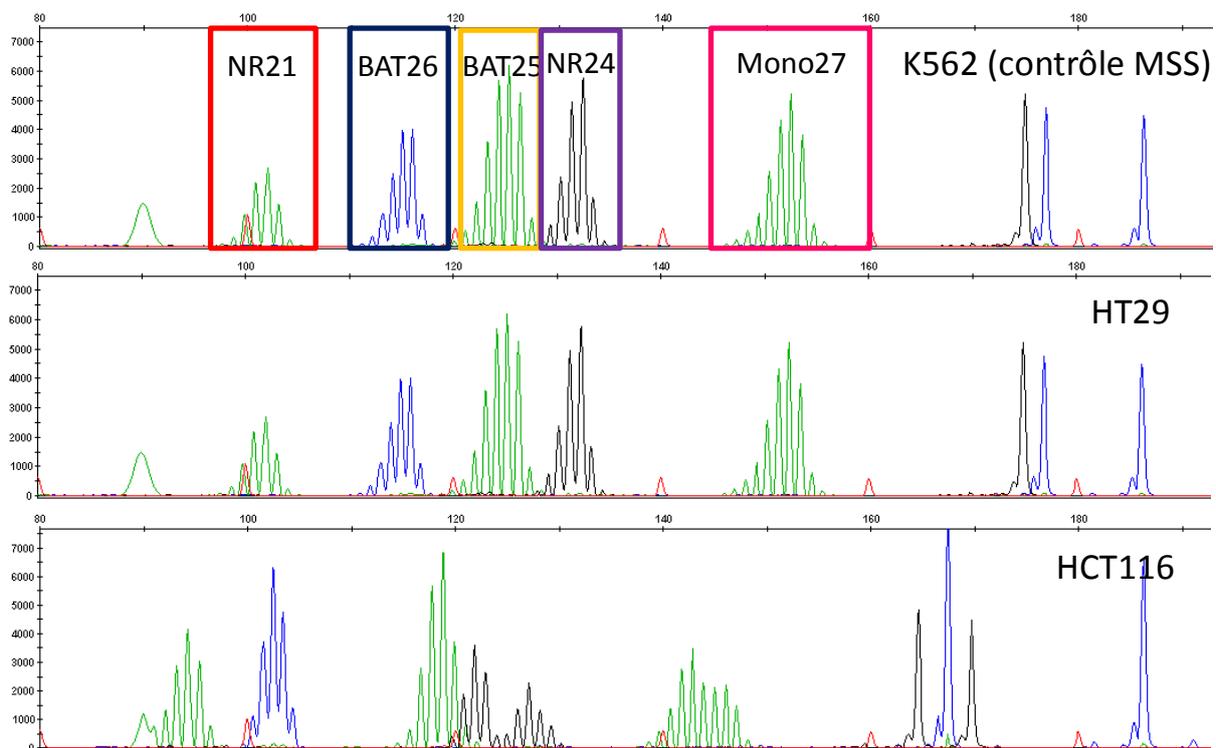


Figure 3 : Profils d'analyse de fragments obtenus avec le kit "MSI Analysis" (Promega®) des lignées cellulaires HT29 et HCT116. Pour les cellules HT29 (MSS) on observe un alignement des 5 marqueurs mononucléotidiques avec le contrôle MSS. Pour les cellules HCT116 (MSI) il existe un décalage de taille ou un dédoublement des 5 marqueurs par rapport au témoin.

4.1.2 T17 d'HSP110

La longueur de la répétition mono-nucléotidique T au sein de l'intron 8 d'*HSP110* (T17) a été déterminée par séquençage et analyse de fragment pour les cinq lignées cellulaires issues de cancers colorectaux. Ces lignées cellulaires ont ensuite été clonées et séquencées de manière à obtenir des contrôles de taille lors de l'étude des patients. Pour les deux lignées cellulaires MSS étudiées on retrouve une répétition de 17T (*Figure 4B*) en amont de l'exon 9. Les trois lignées cellulaires déficitaires dans le système du MMR présentent une délétion au niveau du microsatellite T17 de 3 à 6 pb (*Figure 4A*).

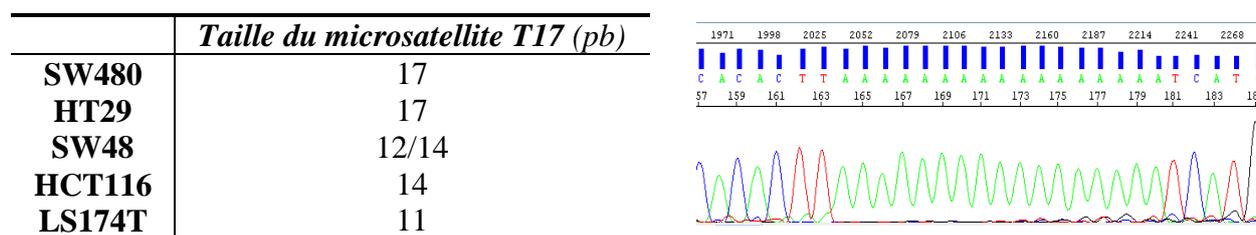


Figure 4 : Taille du microsatellite T17 dans 5 lignées de cancer colorectal. **A.** Tableau récapitulatif du nombre de répétitions de T au niveau du microsatellite T17 en fonction de la lignée cellulaire. **B.** Séquençage par la méthode de Sanger du microsatellite T17 dans la lignée SW480 (reverse), où l'on retrouve une répétition de 17 nucléotides identiques.

4.1.3 Expression d' HSP110ΔE9

La RT-PCR et l'analyse de fragments nous ont permis d'évaluer le taux d'expression HSP110ΔE9 / HSP110wt pour trois types cellulaires : les cellules HT29 qui ne présentent pas de délétion, les cellules HCT116 qui présentent une délétion de taille intermédiaire, et les cellules LS174T qui présentent la plus grande délétion au niveau du microsatellite T17 de l'intron 8. Pour les HCT116 et les LS174T on retrouve l'expression de l'ARN HSP110ΔE9 mais aussi, malgré la présence d'une délétion homozygote dans ces lignées, celui d'HSP110wt. Nous n'avons pas mis évidence d'ARN d'HSP110ΔE9 pour les cellules HT29. On constate qu'il existe une différence significative d'expression de la protéine tronquée par rapport à la protéine sauvage dans les trois lignées cellulaires (*Figure 5A*). Les cellules LS174T expriment majoritairement le variant tronqué d'HSP110, tandis que les cellules HCT116 ne l'expriment qu'en faible proportion. Cependant ces résultats ne nous permettent pas de mettre en évidence une corrélation entre taille de la délétion et le taux d'HSP110ΔE9 / HSP110.

Les Westerns blots réalisés à partir des extraits protéiques des lignées HT29, HCT116 et LS174T permettent de confirmer les résultats obtenus par RT-PCR et analyse de fragment

(Figure 5B). Pour chacune des lignées cellulaires on retrouve la présence d'une bande aux alentours de 100 kDa correspondant à la protéine sauvage, même si pour les cellules LS174T celle-ci est très faiblement exprimée. On retrouve la présence de la protéine tronquée (entre 50 et 70 kDa) uniquement pour les deux lignées cellulaires présentant une délétion au niveau du microsatellite T17. Ainsi les cellules LS174T, comme précédemment mis en évidence, expriment préférentiellement HSP110 Δ E9 par rapport au variant sauvage. Pour les cellules HCT116 le variant sauvage est retrouvé de manière plus importante que la protéine HSP110 Δ E9. Celle-ci n'est pas mise en évidence pour les cellules HT29.

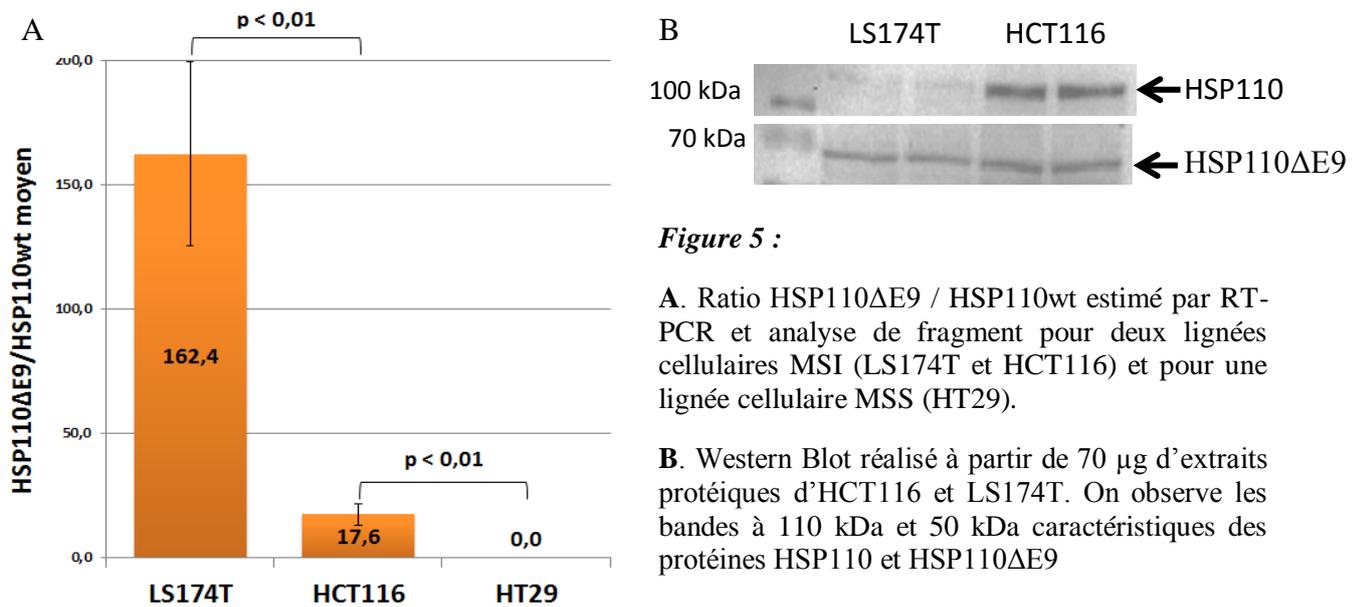


Figure 5 :

A. Ratio HSP110 Δ E9 / HSP110wt estimé par RT-PCR et analyse de fragment pour deux lignées cellulaires MSI (LS174T et HCT116) et pour une lignée cellulaire MSS (HT29).

B. Western Blot réalisé à partir de 70 μ g d'extraits protéiques d'HCT116 et LS174T. On observe les bandes à 110 kDa et 50 kDa caractéristiques des protéines HSP110 et HSP110 Δ E9

4.2 Etude du polymorphisme du T17 d'HSP110 dans le tissu sain.

Le nombre de répétitions de T du microsatellite T17 d'HSP110 a été déterminé au niveau de 200 échantillons de tissus sains (leucocytes ou tissu colique). Les données obtenues montrent que ce microsatellite est peu polymorphique, avec une variabilité d'une paire de base entre les différents échantillons. Par contre, contrairement aux données de l'article de Dorard *et al.*⁸³ une répétition de 17T n'est retrouvée que chez 56 patients (28%). Pour les 144 autres patients on observe une répétition de 16T.

4.3 Etude d'HSP110 dans une population 86 patients traités par FOLFIRI-CETUX pour un CCR métastatique.

4.3.1 Statut MSI des tumeurs.

Le statut MSI de la tumeur a pu être déterminé pour 78 patients, la mauvaise qualité des ADN des huit autres patients ne permettant pas l'amplification de plusieurs des 5 marqueurs microsatellites. Un phénotype MSS est retrouvé pour 72 tumeurs. Six patients (8,3%) présentent un phénotype MSI avec une instabilité retrouvée à la fois sur BAT25, BAT26, NR21, NR25 et MONO27. L'analyse immunohistochimique n'a pu être réalisée que pour un patient et met en évidence une perte d'expression de la protéine MLH1.

4.3.2 Comparaison des tumeurs MSI et MSS

4.3.2.1 Caractéristiques des deux populations.

Nous avons comparé les caractéristiques des patients présentant CCR MSI à ceux présentant un CCR MSS (*Tableau 10*). Il n'existe pas entre les deux groupes de différence de répartition en ce qui concerne le sexe des patients, par contre on constate que l'âge au diagnostic est plus élevé chez les patients présentant une tumeur MSI que ceux présentant une tumeur MSS, respectivement 72,5 et 62,2 ans. Dans un tiers des cas, les tumeurs MSS sont localisées au niveau du rectum, le reste correspondant à des tumeurs coliques. Pour les tumeurs MSI, plus de 80% sont situées au niveau colique. En ce qui concerne les métastases, on n'observe pas de différence de nombre de site ou de date de diagnostic entre les deux groupes. Par contre, les études de biologie moléculaire mettent en avant une différence de prévalence de la mutation *BRAF* V600E entre les deux groupes, avec 50% de tumeurs mutées chez les MSI, contre seulement 8,6% chez les MSS.

| | <i>MSS (N = 72)</i> | <i>MSI (N = 6)</i> | p Value |
|--|---------------------|--------------------|------------------|
| Sexe | | | 0,30 |
| <i>Homme</i> | 49 | 5 | |
| <i>Femme</i> | 23 | 1 | |
| Âge moyen (min ; max) | 62,2 (34 ; 81) | 72,5 (63 ; 80) | < 0,05 |
| Localisation de la tumeur primitive (%) | | | 0,20 |
| <i>Colon</i> | 45 (62,5) | 5 (83,3) | |
| <i>Rectum</i> | 25 (34,7) | 1 (17,7) | |
| <i>Colon + rectum</i> | 2 (2,8) | 0 | |
| Statut <i>BRAF</i> (n, %) | | | < 0,05 |
| <i>Sauvage</i> | 64 (91,4) | 3 (50) | |
| <i>Mutation V600E</i> | 6 (8,6) | 3 (50) | |

Tableau 10 : Tableau comparatif des caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des patients présentant une tumeur MSI ou MSS.

4.3.2.2 Etude du microsatellite T17 d'HSP110 et d'HSP110ΔE9 / HSP110.

La taille du T17 de l'intron 8 d'HSP110 a été évaluée à la fois sur l'ADN constitutionnel et l'ADN tumoral pour 85 patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Au niveau constitutionnel on retrouve une répétition de 16T chez 57 patients, et de 17T chez 28 patients. Les patients avec une tumeur MSS présentent le même nombre de répétitions de T au niveau constitutionnel et tumoral. Pour les 6 patients atteints d'un CCR MSI, 3 présentent 16 répétitions de T au niveau constitutionnel, et les 3 autres 17T. Pour l'ensemble de ces 6 patients, on observe systématiquement une délétion du T17 au niveau de la tumeur (*Figure 6*), de 1 à 7 pb (*Tableau 11*).

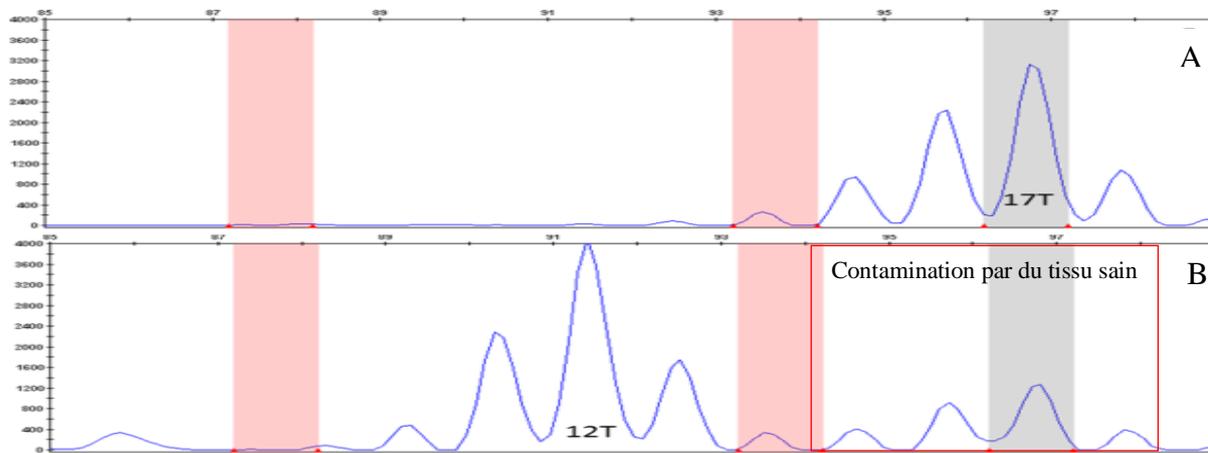


Figure 6 : Profil d'analyse de fragments de la PCR HSP110 au niveau du tissu sain (A) et du tissu tumoral (B) pour le patient MAJ. On retrouve 17 répétitions de T au niveau du tissu sain, mais seulement 12 au niveau de la tumeur chez ce patient présentant un déficit du MMR au niveau tumoral.

L'expression de l'ARN d'HSP110ΔE9 par rapport à HSP110 a été évaluée pour 4 des patients présentant une tumeur de phénotype MSI, le matériel tumoral n'étant pas disponible en quantité suffisante pour les deux autres patients. Nous avons également étudié l'expression des deux variants chez des patients avec une tumeur de phénotype MSS et possédant 16 ou 17 répétitions de T au niveau du microsatellite de l'intron 8 d'HSP110. Une correction du ratio a été effectuée en fonction du pourcentage de cellules tumorales présentes au niveau de la coupe anatomopathologique. Comme pour les HT29, on ne détecte pas la présence d'ARN d'HSP110ΔE9 chez les patients présentant une tumeur de phénotype MSS, quel que soit la taille du microsatellite T17. Celle-ci est par contre retrouvée chez les 4 patients dont la tumeur est MSI (*Tableau 11*). Il semblerait que l'expression d'HSP110ΔE9 ne soit pas liée à la taille

du T17 en elle-même, mais uniquement à la présence d'une délétion entre tissu sain et tumeur. Pour le patient FRN, qui présente 17T au niveau constitutionnel et 16T au niveau de sa tumeur, on retrouve l'expression HSP110ΔE9. Par contre, chez les patients RED et BAJ on ne retrouve pas l'expression de la protéine tronquée, malgré une répétition de 16T. Seul un des 4 patients MSI présente un taux HSP110ΔE9 / HSP110 supérieur à 75%. L'étude d'une éventuelle corrélation entre le taux HSP110ΔE9 / HSP110 et taille de la délétion du T17 n'a pu être réalisée compte tenu du faible effectif de patients testés.

| <i>Patient</i> | <i>Statut MSI</i> | <i>Taille du T17</i> | | <i>Taille de la délétion (pb)</i> | <i>HSP110ΔE9 / HSP110 (%)</i> |
|----------------|-------------------|----------------------|--------|-----------------------------------|-------------------------------|
| | | Tissu sain | Tumeur | | |
| FRN | MSI | 17 | 16 | 1 | 26 |
| PLH | MSI | 16 | 12 | 4 | Non réalisé |
| GUJ | MSI | 16 | 12 | 4 | Non réalisé |
| MAJ | MSI | 17 | 12 | 5 | 116 |
| MOJ | MSI | 16 | 11 | 5 | 33 |
| PAG | MSI | 17 | 10 | 7 | 21 |
| RED | MSS | 16 | 16 | 0 | 0 |
| BAJ | MSS | 16 | 16 | 0 | 0 |
| LUF | MSS | 17 | 17 | 0 | 0 |
| PAA | MSS | 17 | 17 | 0 | 0 |
| GUP | MSS | 17 | 17 | 0 | 0 |
| RID | MSS | 17 | 17 | 0 | 0 |

Tableau 11 : Tableau récapitulant pour chaque patient le statut MSI, le nombre de répétitions du microsatellite T17 de l'intron 8 d'HSP110 dans le tissu sain et tumoral, ainsi que du taux d'expression HSP110ΔE9 / HSP110.

4.3.2.3 Etude de la réponse et de la survie à la chimiothérapie par FOLFIRICETUX.

L'ensemble des 86 patients a reçu, en première ou deuxième ligne de chimiothérapie métastatique, l'association de 5-FU, Irinotécan et cétuximab. Les modalités d'administration sont détaillées par la suite. En ce qui concerne le cétuximab, aucun des patients ne présentait de mutation des codons 12,13 et 61 du gène KRAS. Le cétuximab est administré une fois tous les 15 jours en perfusions de 1 à 2 heures. Les posologies de cet anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur à l'EGF ont été ajustées uniquement selon la surface corporelle des

patients (400 mg/m² en dose de charge et 250 mg/m² pour les doses suivantes). Les posologies de 5-FU et d'irinotécan ont été ajustées en fonction de la surface corporelle des patients, mais aussi de l'étude de marqueurs prédictifs de toxicité : Ratio UH₂/U et polymorphisme de la DPD pour le 5-FU, statut du promoteur de l'UGT1A1 pour l'irinotécan (*Tableau 12*). Le 5-FU est administré en perfusion continue de 46 h (J1 et J2) et l'irinotécan en perfusion de 90 min à J1. Le traitement a été renouvelé tous les 15 jours en l'absence de progression de la tumeur ou de toxicité inacceptable.

| | <i>MSS (N = 72)</i> | <i>MSI (N = 6)</i> | <i>p Value</i> |
|---|----------------------------|-----------------------------|------------------|
| Ratio UH₂/U (min, max) | 11,0 ± 3,8 (4,9 ; 20,2) | 15,1 ± 4,2 (6,6 ; 17,8) | < 0,05 |
| Dihydropyrimidine déshydrogénase | | | 0,66 |
| <i>Présence d'une mutation</i> | 1 | 0 | |
| <i>Absence de mutation</i> | 70 | 6 | |
| <i>Mutations non recherchée</i> | 1 | 0 | |
| Statut du promoteur de l'UGT1A1 | | | < 0,05 |
| 6/6 | 38 | 0 | |
| 6/7 ou 7/7 | 33 | 6 | |
| Nombre de cycles avec trithérapie pleine dose (min, max) | 5,7 (0 ; 18) | 4,1 (0 ; 9) | 0,41 |
| 5-FU mg/cure/m² (min, max) | 2862 (1476,1 ; 5363,3) | 2882,3 (2275,7 ; 3338,1) | 0,69 |
| Irinotécan mg/cure/m² (min, max) | 188,1 (83,3 ; 454,8) | 141,8 (111,9 ; 174) | <0,05 |
| Cétuximab mg/cure/m² (min, max) | 446,9 (177,6 ; 581,4) | 441,4 (283 ; 503,7) | 0,53 |

Tableau 12 : Comparaison des marqueurs prédictifs de toxicité et des posologies des différentes molécules de chimiothérapie entre les patients présentant une tumeur MSI et ceux présentant une tumeur MSS.

La réponse a été évaluée à trois mois chez les 78 patients, et à 6 mois chez les 60 patients ayant reçu plus de 6 cycles de chimiothérapie (*Tableau 13*). Les patients présentant une réponse complète, une réponse partielle ou une maladie stable selon les critères RECIST,⁸⁵ sont considérés comme ayant une maladie contrôlée. La réponse n'est pas évaluable quand la chimiothérapie a été interrompue pour une autre cause que la progression de la maladie (toxicité, convenance personnelle, décès non imputable à la progression de la maladie). L'analyse statistique des réponses ne permet pas de mettre en évidence une différence

significative entre les deux groupes quel que soit le nombre de cures administrées ($p = 0,10$ à 6 cures, $p = 0,14$ à 12 cures). Au sein du groupe de patients MSI, nous n'avons pas pu évaluer l'impact du ratio HSP110ΔE9 / HSP110 sur la réponse à la chimiothérapie à cause du faible effectif.

| A. | Patients MSS (n = 72) | Patients MSI (n = 6) |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Maladie contrôlée (%) | 54 (75) | 4 (67,7) |
| Progression (%) | 10 (13,9) | 2 (33,3) |
| Non évaluable (%) | 8 (11,1) | 0 |

| B. | Patients MSS (n = 54) | Patients MSI (n = 6) |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Maladie contrôlée (%) | 14 (25,9) | 1 (17,7) |
| Progression (%) | 26 (48,2) | 2 (33,3) |
| Non évaluable (%) | 14 (25,9) | 3 (50) |

Tableau 13 : **A.** Réponse des patients à la chimiothérapie par FOLFIRI-cétuximab en fonction du statut MSI ou MSS de la tumeur à 3 mois. **B.** Réponse des patients à la chimiothérapie par FOLFIRI-cétuximab en fonction du statut MSI ou MSS de la tumeur à 6 mois. La réponse est considérée comme non-évaluable chez les patients n'ayant pas bénéficié des 6 ou 12 cures, quelle que soit la cause de l'arrêt.

Les données de survie globale et de survie sans progression ont été étudiées entre les populations MSI et MSS (*figure 6*). Compte tenu du faible nombre de patients présentant une tumeur de phénotype MSI, et donc présentant une délétion au niveau du microsatellite T17 de l'intron 8, nous n'avons pas pu évaluer l'impact de la taille de la délétion ou du ratio HSP110ΔE9 / HSP110 sur ces deux paramètres. La médiane de survie globale dans la population totale était de 20,5 mois. Pour les patients avec une tumeur de phénotype MSS la médiane de survie est de 24,37 mois, tandis que pour les patients avec une tumeur de phénotype MSI elle est de 8,56. Malgré cette différence apparente, le test de Log Rank ($p = 0,2264$) ne permet pas de mettre en évidence de différence significative entre les deux groupes, probablement à cause du faible effectif du second groupe. En ce qui concerne la survie sans progression, la médiane est de 9,2 mois pour la population totale de l'étude, de 9,86 mois pour les patients ne présentant pas de déficit du MMR au niveau de leur tumeur,

tandis qu'elle est de 6,6 mois pour les patients qui en présentent une. Le test de Log Rank ($p = 0,3783$) ne permet pas de mettre en évidence de différence significative entre les deux groupes.

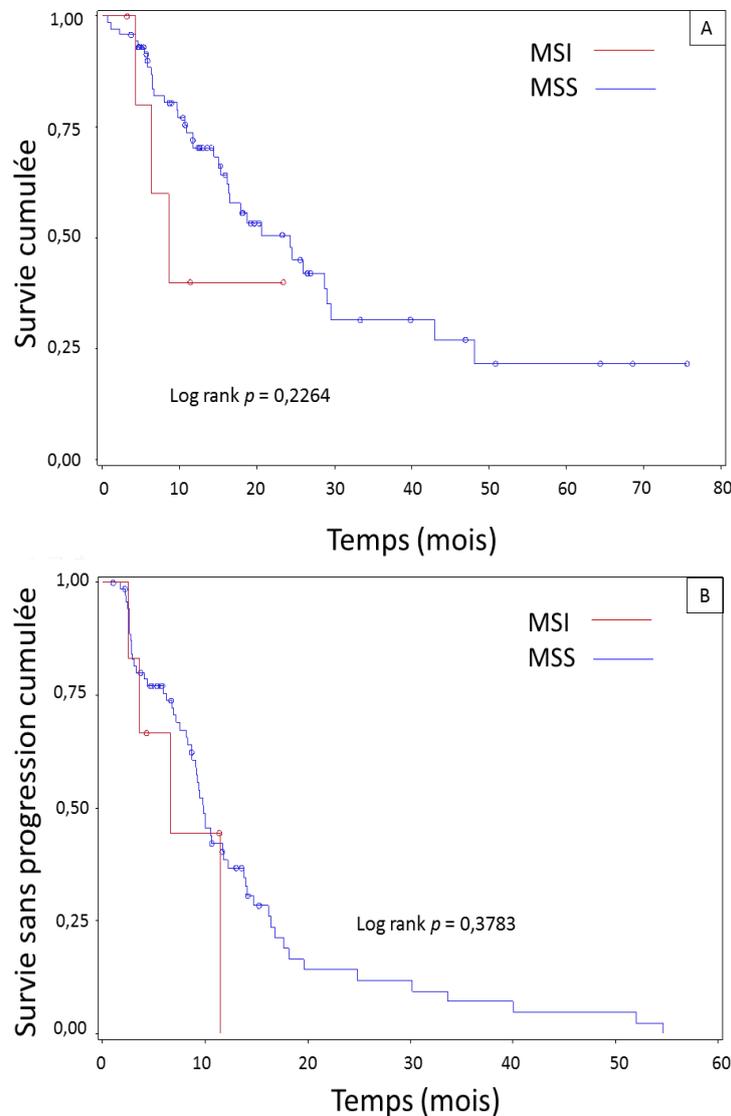


Figure 7 : Survie globale [A] et de survie sans progression [B] des patients en fonction du statut microsatellite de leur tumeur.

4.4 Etude d'HSP110 et HSP110ΔE9 chez 120 patients présentant une tumeur MSI.

4.4.1 Instabilité microsatellite des tumeurs

Le statut MSI des tumeurs a été déterminé pour les 120 patients par PCR multiplex et analyse de fragment. (Tableau 14). Quatre tumeurs présentent un phénotype MSI-L, avec trois tumeurs ne présentant d'instabilité que sur un marqueur et une tumeur instable pour deux microsatellites. On observe un phénotype MSI-H pour les autres tumeurs, avec 82,6% des

échantillons qui présentent une instabilité sur les 5 marqueurs. Pour confirmer les résultats de biologie moléculaire et orienter sur l'origine du déficit du MMR, l'analyse immunohistochimique de l'expression des protéines du MMR a pu être réalisée pour 94 tumeurs (Tableau 14). Les résultats ont été interprétés en suivant les données du Tableau 5. Dans 70% des cas on observe une perte d'expression de la protéine MLH1. La perte d'expression de MSH2 ou MSH6 est beaucoup moins fréquente, respectivement dans 13% et 10% des cas. La recherche de l'expression de PMS2 correspond à une recherche de deuxième intention, et n'a pas été réalisée pour tous les échantillons. Une perte d'expression isolée de PMS2 a été retrouvée pour 5 tumeurs. On notera que de manière inhabituelle on retrouve la perte conjointe des protéines MLH1 et MSH2 pour une tumeur. La recherche de la mutation V600E de *BRAF*, qui constitue un marqueur d'exclusion du diagnostic de syndrome de Lynch, a été réalisée pour toutes les tumeurs. On retrouve cette mutation pour 48 tumeurs. Des analyses complémentaires de génétique ont été réalisées pour 21 d'entre elles par des laboratoires spécialisés pour préciser le caractère héréditaire ou sporadique du déficit du MMR. Une hyperméthylation du promoteur de MLH1 est retrouvée pour 4 tumeurs et la mutation d'un gène du MMR pour 17 échantillons. Au total, en colligeant toutes ces données on observe que 49 tumeurs présentent un phénotype microsatellite instable de type sporadique, et 17 d'origine héréditaire. Des analyses complémentaires devraient être réalisées pour les 54 tumeurs restantes.

| | Perte d'expression des protéines du MMR. | | | | | Total |
|-----------------------|--|-----------|-----------|----------|---------------|-------|
| | MLH1 | MSH2 | MSH6 | PMS2 | Non déterminé | |
| 1 Marqueur instable | 2 | | | | 1 | 3 |
| 2 Marqueurs instables | 1 | | | | | 1 |
| 3 Marqueurs instables | | 1 | 1 | | | 2 |
| 4 Marqueurs instables | 6 | 2 | | 1 | 2 | 11 |
| 5 Marqueurs instables | 57 | 10 | 9 | 4 | 23 | 103 |
| Total | 66 | 14 | 10 | 5 | 26 | |

Tableau 14 : Résultats croisés de l'immunohistochimie des protéines du MMR et du nombre de marqueurs microsatellites instables.

4.4.2 Taille du microsatellite T17 d'HSP110 dans le tissu sain et la tumeur.

La taille du microsatellite T17 a été déterminée par PCR et analyse de fragment. Au niveau du tissu sain, on retrouve des résultats similaires à ceux obtenus dans la population de CCR métastatiques : 16 répétitions de T dans 75% des cas et 17 dans les 25% restant. Pour 114 patients, la taille du T17 d'HSP110 a été comparée entre le tissu sain et la tumeur. Contrairement aux données de la littérature et aux précédents résultats, nous n'avons pas retrouvé de délétion de ce microsatellite pour toutes les tumeurs MSI. En effet, pour 4 patients, le nombre de T est le même dans le 2 types de tissus. Pour les autres patients, on retrouve une délétion de 1 à 8 paires de bases entre le tissu sain et tumoral (*Figure 8*).

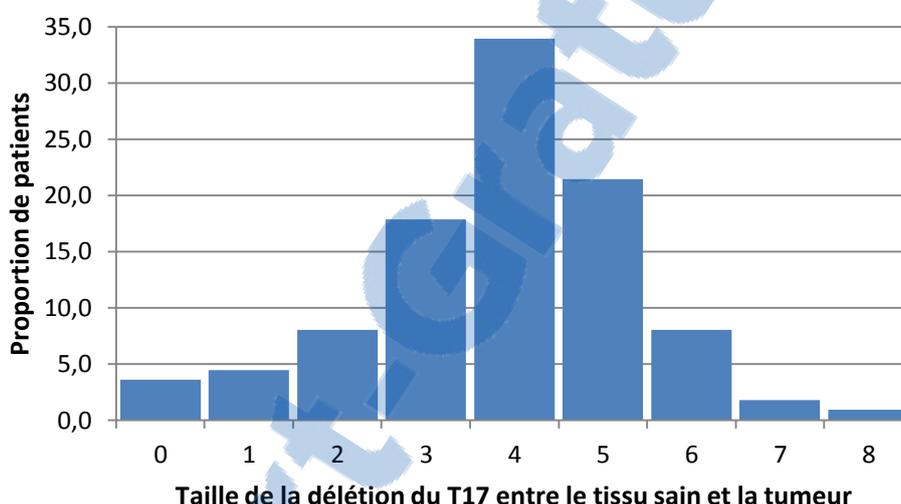


Figure 8 : Répartition des patients en fonction de la taille de la délétion du T17 dans la tumeur.

Nous avons étudié l'influence de plusieurs facteurs sur la taille de la délétion du T17 dans la tumeur. On observe une différence de répartition des tailles de délétion du microsatellite T17 en fonction de la protéine du MMR déficiente (*Figure 9*). La taille moyenne de la délétion n'est pas significativement différente entre les tumeurs présentant un déficit en MLH1, MSH2 et PMS2, respectivement 4 pb ; 3,92 pb et 4,50 pb. Par contre pour les patients présentant une tumeur MSI liée à l'absence d'expression de MSH6, la taille moyenne de la délétion est 2,63 pb ce qui est significativement différent des trois autres groupes ($p < 0,05$). L'influence de *BRAF* a été également étudiée, mais il n'existe pas de différence significative entre le groupe *BRAF* sauvage (délétion moyenne = 3,83 pb) et le groupe *BRAF* V600E (délétion moyenne = 3,85 pb). Nous n'observons pas non plus de différence en fonction du stade tumoral au diagnostic ($p = 0,31$) ou du nombre de marqueurs microsatellites instables.

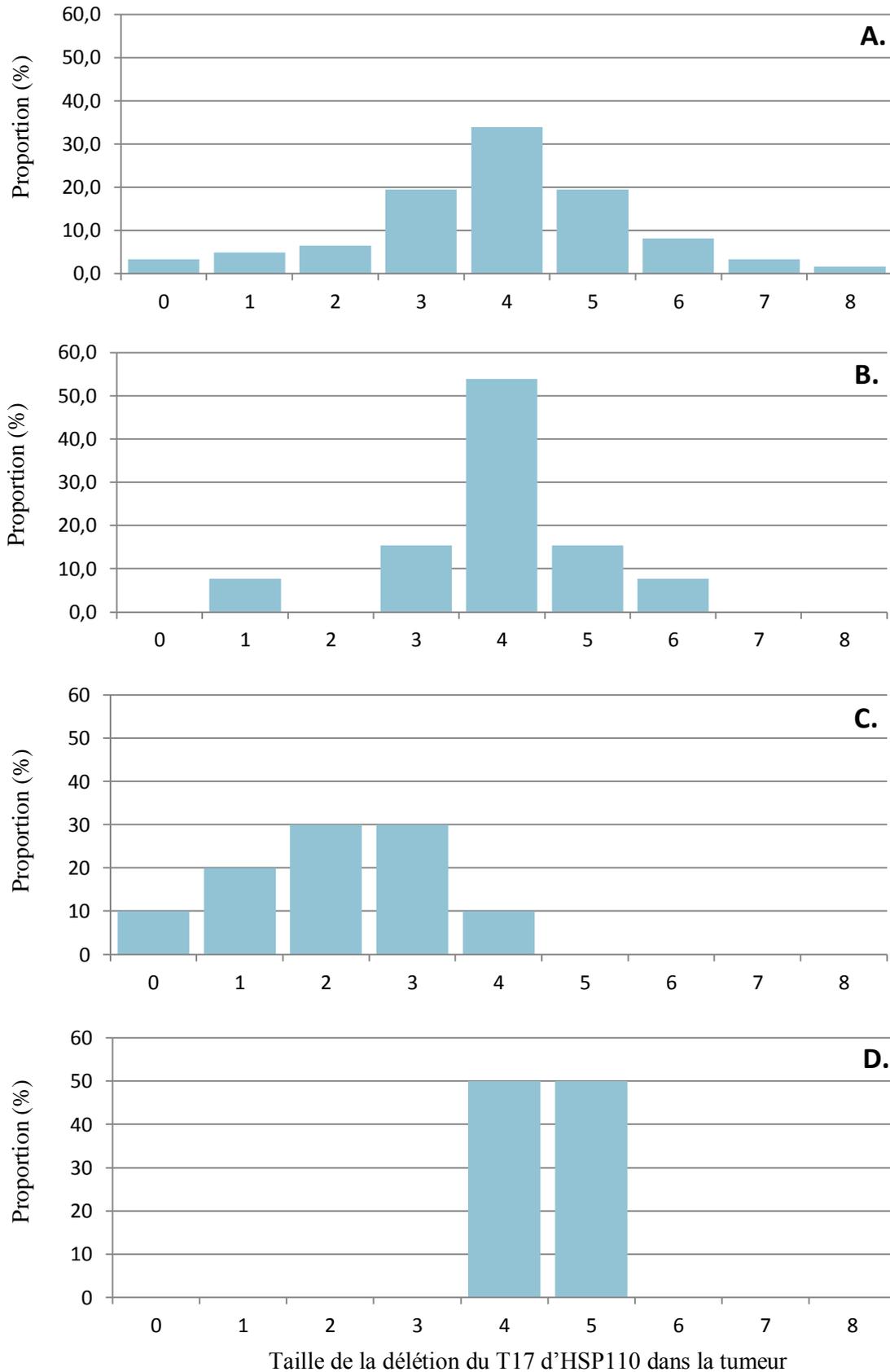


Figure 9 : Répartition des tailles des délétions du T17 d'HSP110 en fonction du type de déficit en protéine du MMR. **A.** Tumeurs déficitaires en MLH1. **B.** Tumeurs déficitaires en MSH2. **C.** Tumeurs déficitaires en MSH6. **D.** Tumeurs déficitaires en PMS2.

4.4.3 Expression d'HSP110ΔE9 / HSP110

Le taux d'expression d'HSP110ΔE9 / HSP110 a pu être évalué pour 54 tumeurs (Annexe 3). Pour les tumeurs ne présentant pas de délétion au niveau du microsatellite T17 on ne retrouve pas l'expression du variant tronqué. Par contre, on retrouve l'expression d'HSP110ΔE9 et d'HSP110 dans toutes les tumeurs présentant une délétion. Les taux d'HSP110ΔE9 / HSP110 observés sont compris entre 2,5 et 112% (Figure 10). On constate qu'il existe une corrélation entre la taille de la délétion et le taux d'HSP110ΔE9 / HSP110 (corrélation de Pearson, $p < 0,01$). Nous n'avons par contre pas pu évaluer l'influence du type de déficit du MMR, car la majorité des tumeurs testées présentaient un déficit de la protéine MLH1 (N = 44) et les autres groupes n'étaient pas (PMS2) ou peu représentés (N = 8 pour MSH2, N = 2 pour MSH6).

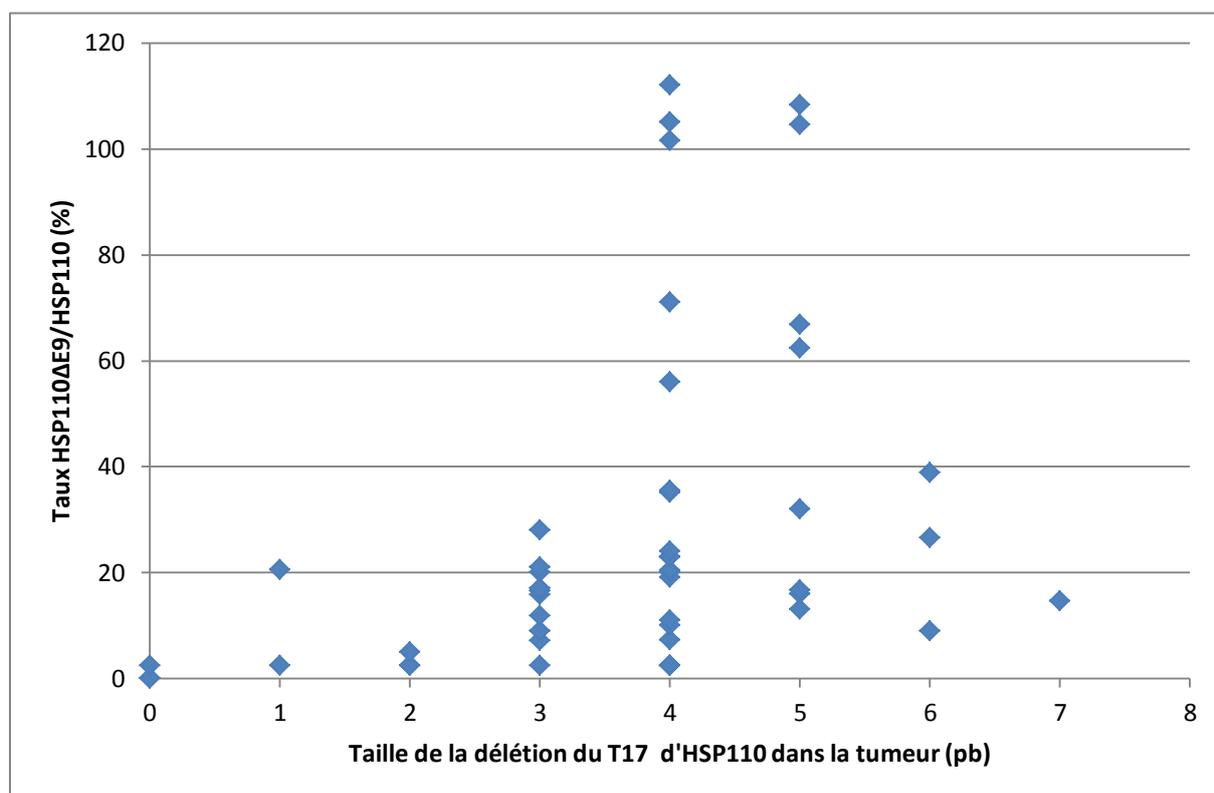


Figure 10 : Influence de la taille de la délétion du T17 sur l'expression du taux d'HSP110ΔE9 / HSP110.

4.4.4 Influence d' HSP110ΔE9 / HSP110 sur la survie

Les 120 patients MSI étudiés ont bénéficié de prises en charge différentes, notamment en ce qui concerne la chimiothérapie, car les patients ont été recrutés sur une période longue (1993 à 2012) et présentaient des maladies de stade variable au diagnostic. L'influence du taux



d'HSP110ΔE9 / HSP110 sur la réponse à la chimiothérapie à base de 5-FU n'a pas donc pu être évaluée. Nous avons précédemment montré que le taux d'HSP110ΔE9 / HSP110 était corrélé à la taille de la délétion du microsatellite T17, ainsi nous avons étudié l'influence de celle-ci sur la survie globale. Nous avons considéré deux groupes, l'un avec les tumeurs présentant une délétion du T17 inférieure ou égale à la médiane, c'est-à-dire 4 pb, et l'autre avec une délétion supérieure 4 pb (*Figure 11*). Les groupes sont homogènes en ce qui concerne le stade au diagnostic. Malgré une différence apparente au niveau du graphique, le test de Log Rank ($p = 0,07$) ne permet pas de mettre en évidence de différence significative en ce qui concerne la survie globale entre les deux groupes, probablement à cause du faible nombre d'évènements (3 décès dans chaque groupes).

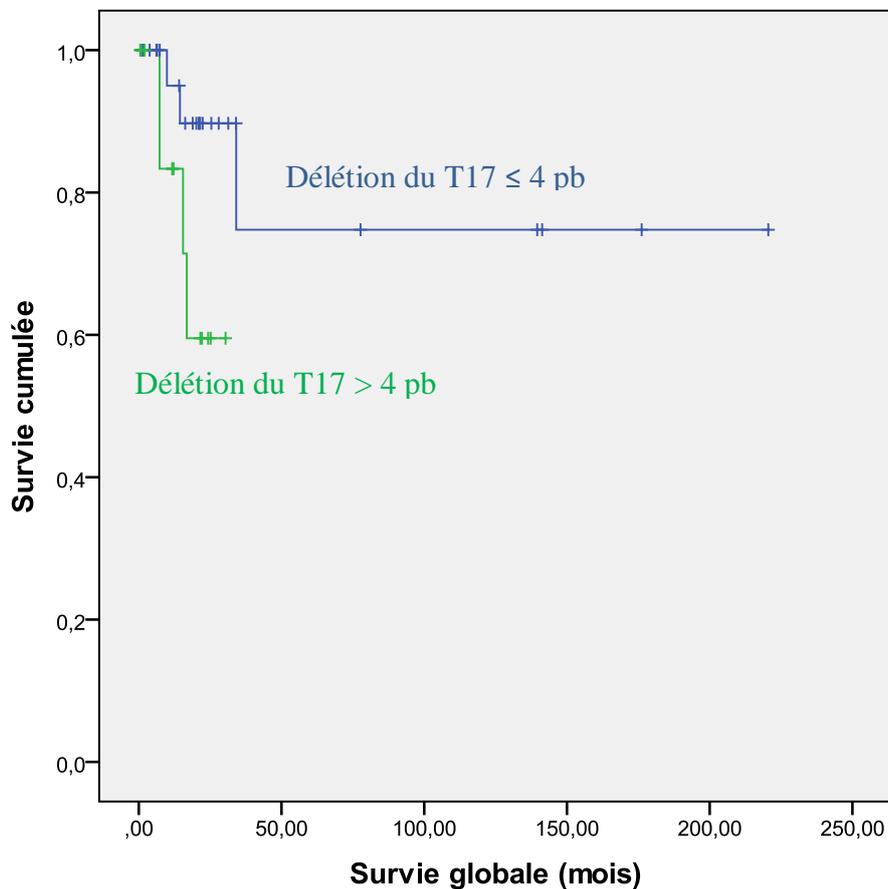


Figure 11 : Courbes de survie globale des patients en fonction de la taille de la délétion du T17 dans la tumeur. La courbe bleue correspond aux patients présentant dans leur tumeur une délétion du T17 inférieure ou égale à 4 paires de bases. La courbe verte correspond aux patients présentant dans leur tumeur une délétion du T17 supérieure à 4 paires de bases. Les croix correspondent aux évènements censurés. On n'observe pas de différence significative de survie entre les deux groupes ($p = 0,07$).

5 Discussion

5.1 Structure et fonction du microsatellite T17 d'HSP110.

Les microsatellites sont des zones particulièrement sensibles aux insertions/délétions au cours de la réplication de l'ADN, principalement à cause d'un phénomène de « glissement » de l'ADN polymérase sur ces structures répétitives.⁸⁶ On considère que le taux de mutation de ces séquences est de 10^{-3} à 10^{-5} par génération contre 10^{-8} à 10^{-9} pour un nucléotide seul.⁸⁷ Ainsi, de manière générale, les séquences des microsatellites sont polymorphiques entre les individus. Cependant, la variabilité de la séquence d'un microsatellite dépend de la nature, du nombre de répétitions du motif, de sa localisation dans le génome et de sa fonction. Dans leur étude Payseur *et al.*, montrent que les motifs les plus variables sont les microsatellites tétra-nucléotidiques, et que la variabilité est d'autant plus importante que le nombre de répétitions est élevé.⁸⁸ Les microsatellites présents dans les séquences codantes sont généralement bien conservés.⁸⁹ La variabilité des microsatellites présents dans les séquences non-codantes est significativement plus importante, avec par fréquence croissante de variation : les microsatellites des régions 5' et 3' UTR, ceux des introns et ceux des régions intergéniques.⁹⁰ Cependant, certains microsatellites introniques ou intergéniques jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes, l'épissage ou la localisation cellulaire et sont peu polymorphiques. Hugo *et al.* ont par exemple montré que la taille du microsatellite polyT de l'intron 1 du gène *MYB*, intervenant dans la régulation de l'expression du gène, ne variait pas de plus d'une base entre les individus.¹⁹ Le microsatellite T17 d'HSP110 est décrit comme une répétition de 17 thymidines située dans l'intron 8 d'HSP110, à proximité d'un site d'épissage.⁸³ Dans notre population, nous observons un faible polymorphisme du microsatellite T17 au niveau constitutionnel avec une répétition de 16T pour trois quart des patients et une répétition de 17T pour le quart restant. Cette faible variabilité du microsatellite suggère son importance fonctionnelle. Compte-tenu des données de l'étude de Dorard *et al.*, on suppose que ce microsatellite intervient dans l'épissage.⁸³ Quatre éléments, dont les séquences sont relativement conservées chez l'homme, sont nécessaires au bon déroulement de l'épissage⁹¹ : un site donneur en 5' (GURAGU), un site accepteur en 3' (YAG), un site de branchement⁹² (YUNAY) à proximité du site d'épissage en 3' et une séquence polypyrimidique entre les sites de branchement et d'épissage en 3'. L'étude des séquences adjacentes au microsatellite T17 (Chromosome 13 : 31,722,618 - 31,724,090) permet de confirmer cette hypothèse. En effet, en 5' et 3' du microsatellite T17 on retrouve les séquences « ATGAT » et « AAG » qui correspondent respectivement au site de branchement

du complexe protéique d'épissage et au site d'épissage en 3'. Le microsatellite T17 correspond donc probablement au « polypyrimidine tract » une séquence essentielle de l'ARN pré-messager qui participe au bon assemblage des différentes protéines du spliceosome et la reconnaissance du site d'épissage en 3'.

5.2 Déficit du MMR et conséquences sur le microsatellite T17 d'HSP110

L'inactivation du système MMR conduit à une instabilité du génome¹⁷ et à l'accumulation de nombreuses mutations, notamment au niveau des microsatellites, favorisant la transformation cellulaire et le développement de cancers chez l'homme.^{20, 21} Dans l'ensemble des cancers colorectaux, 15% des tumeurs présentent un phénotype MSI. Cependant, les tumeurs MSI sont en général moins invasives et ce phénotype est peu fréquemment retrouvé chez les patients atteints d'une maladie métastatique.⁹³ Dans notre population de patients traité pour un CCRm, un phénotype MSI, avec une instabilité des 5 marqueurs mononucléotidiques, a été retrouvé chez 6 patients (7,7%) ce qui concorde avec les données de la littérature (χ^2 test ; $p = 0,23$).⁹³ Les caractéristiques des patients ont été comparées en fonction du statut MSI de leur tumeur. On constate que les patients avec une tumeur MSI sont en moyenne plus âgés (72,5 ans) que ceux avec une tumeur MSS (62,2 ans). Chez les patients atteints d'un syndrome de Lynch, l'âge médian au diagnostic est de 42 ans.⁹⁴ Tandis que chez les patients présentant une tumeur MSI sporadique, l'âge d'apparition est supérieur à 70 ans. Dans notre étude, l'âge des patients avec une tumeur de phénotype MSI est donc plus en faveur d'une origine sporadique du déficit du MMR que d'une origine germinale. On note également une différence de prévalence de la mutation V600E du gène *BRAF* en fonction de la nature MSI (50%) ou MSS (8,7%) de la tumeur. L'équipe de Mano, retrouve dans une étude des résultats similaires avec la mutation de *BRAF* retrouvée chez 43% des patients avec une tumeur MSI et uniquement chez 4% des patients présentant une tumeur MSS.⁹⁵ Par ailleurs, cette mutation constitue un facteur d'exclusion du diagnostic de syndrome de Lynch au niveau des arbres décisionnels.⁹⁶ On peut donc affirmer qu'au moins trois des patients MSI de notre étude ne présentent pas de syndrome de Lynch, mais une tumeur MSI d'origine sporadique. Pour les trois autres patients des investigations complémentaires (analyse immuno-histochimique et génétique, enquête familiale) seraient nécessaires pour déterminer l'origine de cette instabilité. Le phénotype MSI est retrouvé chez 11,3% des cancers coliques et chez 4% des cancers rectaux. Malgré cette différence apparente, les tests statistiques ne permettent pas de mettre en évidence de différence significative entre les deux groupes, probablement à cause du faible nombre de patients présentant une tumeur MSI. En effet, dans leur étude Hong *et al.* obtiennent des

proportions similaires, mais montrent que le phénotype MSI-H est significativement moins fréquent dans les tumeurs rectales (4,5%) que dans les tumeurs coliques (13%).⁴⁴ En termes de grade histologique, de classification TNM de la tumeur primitive (données non présentées), de nombre et de la nature synchrone ou asynchrone des métastases, on n'observe pas de différence entre les deux groupes.

Dans la deuxième partie de notre étude nous avons étudié une population de 120 patients présentant une tumeur de phénotype MSI : un patient présentant un phénotype MSI-L et 119 patients présentant un phénotype MSI-H. L'analyse immunohistochimique a pu être réalisée chez 94 patients et met en évidence dans la majorité des cas un déficit des protéines MLH1 (n = 66) ou MSH2 (n = 14). Les déficits en MLH1 sont les plus fréquents, que ce soit dans les syndromes de Lynch (50%) à cause d'une mutation ponctuelle/duplication/délétion ou dans les tumeurs MSI sporadiques par inactivation épigénétique du gène MLH1 (> 90%). Les déficits en MSH2 sont moins fréquents et sont principalement retrouvés chez des patients présentant un cancer MSI héréditaire.²⁷ Dans les cancers colorectaux, les syndromes de Lynch représentent un tiers des tumeurs MSI, les deux tiers restants ayant une origine sporadique. Comme dans la précédente population, on retrouve une forte prévalence de la mutation V600E du gène *BRAF* qui a été retrouvée chez 48 patients (40%) et permet d'exclure chez ces patients un syndrome de Lynch. Chez un de ces patients, une hyperméthylation du promoteur de MLH1 a également été mise en évidence confirmant l'origine sporadique du déficit en MMR. On retrouve cette inactivation épigénétique de MLH1 chez trois autres patients présentant une tumeur *BRAF* sauvage. L'ensemble de ces données permet d'exclure un syndrome de Lynch pour ces 51 patients. Pour 14 tumeurs, une anomalie génétique délétère a été mise en évidence sur un gène du MMR. Les tumeurs héréditaires sont liées à des mutations germinales au niveau d'un gène du MMR, principalement au niveau de MLH1 et MSH2 et plus rarement au niveau de MSH6 ou PMS2.²⁷ Dans notre étude nous retrouvons essentiellement des anomalies au niveau des gènes MLH1 (n = 6) et MSH2 (n = 7), et une mutation ponctuelle du gène MSH6, ce qui concorde avec les données de la littérature. Au total, l'origine du déficit du système MMR a pu être déterminée chez 65 patients avec, comme dans la littérature, une majorité de tumeurs présentant un déficit d'origine sporadique (75%).

Malgré une origine différente du déficit du MMR entre les cancers MSI sporadiques et héréditaires, les gènes cibles de l'instabilité génétique semblent être les mêmes. Dans un premier temps, les insertions/délétions au niveau de séquences microsatellites ont été recherchées dans les exons de gènes intervenant dans les phénomènes de réparation de

l'ADN, de la signalisation cellulaire, de l'apoptose, de la transduction du signal et la régulation de la transcription, et intervenant possiblement dans l'oncogenèse, tels que TGFβ-RII et BAX.⁹⁷ Plus récemment, des études ont montré, que des anomalies au niveau de séquences répétées introniques pouvaient également altérer l'expression de certaines protéines et participer à l'oncogenèse.^{18, 19} Dans un certain nombre de cas, c'est l'analyse in-silico du génome qui a permis de prédire les gènes cibles de l'instabilité microsatellite. C'est grâce à ce type d'approche que Dorard *et al*, ont mis en évidence la présence d'une délétion du microsatellite T17 de l'intron 8 d'HSP110 dans 43 tumeurs colorectales MSI de stade II et III.⁸³ Dans notre étude, le microsatellite T17 d'HSP110 a été étudié chez 206 patients atteint d'un cancer colorectal de stade I à IV, en comparant le nombre de répétitions entre le tissu sain et la tumeur. Comme dans l'étude princeps, nous retrouvons le même nombre de répétitions de T entre le tissu sain et la tumeur chez les patients présentant une tumeur MSS : 49 patients avec 16 répétitions de T et 23 avec 17 répétitions de T. Une variation de la taille du T17 d'HSP110 est retrouvée chez 96,7% des patients porteurs d'une tumeur MSI. Dans tous les cas on observe une délétion, de 1 à 8 pb, mais aucune insertion. En théorie, un déficit du MMR prédispose les cellules à une augmentation des insertions ou délétions au niveau des séquences microsatellites. Cependant, on retrouve dans les études peu de cas d'insertions comparativement aux délétions. L'étude du gène SMAP1 dans des lignées cellulaires de cancers colorectaux MSI, a retrouvé seulement 3 lignées avec une insertion d'une paire de bases contre 25 lignées présentant une délétion de 1 à 2 pb.⁹⁸ L'analyse de MSH6 chez des patients présentant un déficit de MLH1 montre des résultats similaires, avec pour 12 anomalies du microsatellite C(8) de l'exon 5 : 16,7% d'insertions et 83,3% de délétions.⁹⁹ Dans leur travail Lu *et al* montrent que, de manière générale, un déficit du MMR est plutôt à l'origine de courtes délétions que d'insertions.¹⁰⁰ Ils montrent également que le type de motif influe sur la nature de l'anomalie génétique. Il semblerait que les microsatellites mono-nucléotidiques soient plus prompts à être délétés, alors que l'on retrouve plus d'insertions dans des motifs plus complexes. Par exemple, dans 40 microsatellites mono-nucléotidiques ils retrouvent 35 délétions pour 5 insertions, alors que pour des microsatellites ayant un motif bi-nucléotidique le rapport insertion/délétion est proche de 50/50.¹⁰⁰ En 2002, Bayer *et al* ont étudié sur des modèles cellulaires les répétitions G(17) et A(17). Ils montrent que le type de nucléotide a également de l'importance avec uniquement des délétions pour les bases Pyrimidiques dans les cellules MSI, alors qu'on observe à la fois des insertions et des délétions pour les bases puriques.¹⁰¹ Une revue de la littérature souligne également l'influence du type de protéine du MMR déficitaire, avec plus de délétions que d'insertions dans les

tumeurs présentant un déficit de MLH1 ou MSH2, et des proportions similaires des deux anomalies lors de déficits en MSH6.²⁴ Toutes ces données permettent en partie d'expliquer l'absence d'insertion retrouvées dans le T17 d'HSP110 dans notre population de tumeurs MSI. Par contre, nous n'observons pas d'altération du microsatellite T17 chez 4 patients, qui présentent 16T à la fois dans leur tissu sain et dans leur tumeur. Ces données sont contradictoires avec les résultats des autres études pour lesquelles la délétion du T17 d'HSP110 est une constante dans les tumeurs colorectales MSI.^{83, 102}

En 1998, lors de la conférence de consensus de Bethesda, cinq critères ont été proposés de manière à distinguer les mutations susceptibles d'intervenir dans la carcinogénèse de celles reflétant l'instabilité globale qui caractérise les tumeurs MSI : (1) forte fréquence de mutation, (2) inactivation bi-allélique, (3) rôle dans une voie de signalisation, (4) gène impliqué dans l'oncogénèse chez les MSS, (5) études in vivo ou in vitro.⁴⁵ Cependant, certains de ces critères sont controversés, et de nombreux auteurs considèrent que le paramètre le plus simple permettant de suspecter l'importance d'une mutation dans la carcinogénèse est la fréquence de la mutation.^{103, 104} On considère ainsi que les gènes mutés à haute fréquence jouent un rôle dans l'initiation et/ou la progression tumorale, tandis que les gènes présentant une faible fréquence de mutation sont considérés quelconques. L'équipe de Hamelin définit le seuil de significativité d'une mutation d'un microsatellite à une fréquence dans les tumeurs MSI supérieure à 10%.¹⁰³ Dans leur étude portant sur 25 gènes candidats présentant des microsatellites dans des séquences codantes, seuls 9 présentent un taux de mutation supérieur à ce seuil, avec une majorité comprise entre 10 et 40%. Seul TGFβ-RII montre une incidence de mutation très importante (92%). La plupart de ces modèles ont été établis pour des microsatellites situés dans des régions codantes. Néanmoins, il semblerait que ces résultats soient extrapolables aux microsatellites des séquences introniques. En effet, en l'absence de toute pression de sélection, les conséquences du déficit en MMR peuvent survenir à la même fréquence dans les séquences codantes que dans les séquences non codantes. Ainsi, on peut considérer que les insertions/délétions fréquentes dans des microsatellites introniques reflètent également un avantage sélectif pour les cellules tumorales. L'équipe de Gulino a proposé que MRE11, gène impliqué dans un complexe multiprotéique avec NBS1 et RAD50 participant à la réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN, puisse être une cible dans les tumeurs MSI.¹⁸ Ils ont étudié une répétition poly(T) dans l'intron 4 de MRE11 dans 49 tumeurs MSI. Un raccourcissement du microsatellite a été retrouvé chez 41 tumeurs, avec pour la moitié d'entre elles une inactivation bi-allélique. Ils mettent également en évidence

que l'inactivation bi-allélique est deux fois plus importante chez les patients présentant un syndrome de Lynch que chez ceux présentant une tumeur MSI d'origine sporadique. Compte-tenu de la contamination possible de l'ADN tumoral par de l'ADN constitutionnel dans les échantillons, il nous est impossible de déterminer la proportion d'inactivation bi-allélique *versus* mono-allélique pour une majorité des patients. On observe une inactivation bi-allélique chez 19 patients sur 120: T10/T11 (2), T10/T13 (1), T11/T12 (3), T11/T13 (5), T11/T16 (1), T12/T13 (2), T12/T14 (4) et T13/T15 (1). De manière surprenante, l'anomalie de l'intron 4 de MRE11 est observée pour toutes les tumeurs de stade A/B, mais la fréquence de mutation n'est que de 70% pour les tumeurs plus avancées au diagnostic. Dans notre travail, nous avons étudié des tumeurs de stade I à IV, et il ne semble pas y avoir de différence d'incidence entre les stades précoces et tardifs. La proportion de tumeurs MSI présentant une délétion du T17 d'HSP110, à l'instar de TGF β -RII, suggère son importance dans la carcinogénèse colorectale. Dans l'étude de Dorard *et al*, la délétion du T17 d'HSP110 a été détectée pour 53% des adénomes MSI, mais pour l'ensemble des tumeurs MSI, suggérant que contrairement à l'instabilité microsatellite la délétion du T17 était un phénomène plus tardif.⁸³ L'instabilité chromosomique retrouvée chez les cellules MSS est, elle aussi, responsable de l'accumulation de mutations. Dans l'étude initiale, seules des tumeurs MSS de stades II et III avaient été étudiées. Dans notre étude nous avons étudié le microsatellite T17 d'HSP110 chez 72 tumeurs présentant un phénotype MSS, et nous ne retrouvons de délétion chez aucune d'entre elles. Il semble donc que l'altération du T17 d'HSP110 soit exclusive des tumeurs MSI, bien qu'elle n'y soit pas constante.

Les tailles de délétions du T17 d'HSP110 de notre population concordent avec celles de la première étude et varient de 1 à 8 pb en fonction des patients, avec une médiane à 4 pb. La taille moyenne du T17 au niveau de l'ADN constitutionnel est de 16,25 pb (16 – 17 pb) tandis que dans le tissu tumoral elle est de 12,7 pb (9 – 16 pb). Le microsatellite de l'intron 1 de *MYB* est de taille équivalente à celui de l'intron 8 d'HSP110, cependant la taille de la délétion dans les tumeurs MSI est beaucoup plus faible que dans pour HSP110. Dans leur étude Hugo *et al* dénombre en moyenne 18,5 répétitions de T dans le tissu sain et 16,8 répétitions dans le tissu tumoral.¹⁹ Le microsatellite de l'intron 4 de MRE11 contient 11 thymidines, et les délétions retrouvées faisaient 3 pb au maximum. Les délétions observées pour le T17 d'HSP110 sont plus importantes que dans les deux cas précédents, sans que nous puissions expliquer ce phénomène. Des études ont montré que, dans les cancers du côlon MSI-H, les microsatellites tendaient à se raccourcir au cours de la progression tumorale. En effet,

l'accumulation de mutations au niveau de gènes intervenant dans les mécanismes de réparation de l'ADN au cours du développement de la tumeur tels que MRE11 (73%), MSH3 (42%) ou MSH6 (26%) serait à l'origine d'une augmentation des anomalies de réplication. Ainsi, pour les microsatellites BAT-25 et BAT-26, les délétions sont plus petites dans les adénomes MSI ou les petites tumeurs, qu'à des stades tumoraux plus avancés.¹⁰⁵ Une étude a même montré l'existence d'une corrélation entre le nombre de gènes cibles altérés et la taille des délétions au niveau des microsatellites.¹⁰³ Dans notre population, le stade au diagnostic était connu pour 40 patients. Nous n'observons pas de relation entre le stade tumoral au diagnostic et la taille de la délétion ($p = 0,16$). On observe une délétion moyenne de 5 pb pour les tumeurs de stade I ; de 3,7 pb pour celles de stade II ; de 3,9 pb pour celles de stade III et de 5,5 pb pour les tumeurs métastatiques. Cependant ces résultats sont à nuancer compte tenu des petits effectifs, notamment en ce qui concerne les stades I et IV. On note par contre que le type de déficit du MMR a une influence sur la taille des délétions du T17 d'HSP110. En effet, la taille moyenne des délétions est de 2,6 pb dans les tumeurs présentant un déficit en MSH6, contre 4,0 pb lors d'un déficit en MLH1 ; 3,9 pb pour un déficit de MSH2 et 4,5 pb pour un déficit de PMS2. La protéine MSH6 s'associe à MSH2 pour former le complexe protéique MutS α qui intervient dans la reconnaissance des mésappariements « base-base » et des boucles d'insertion/délétion faisant un maximum de 1 à 2 nucléotides. MutS β , dimère de MSH3 et MSH2, participe à la réparation des boucles d'insertion/délétion pouvant aller jusqu'à 16pb. Les fonctions de MutS α et MutS β sont donc partiellement redondantes en ce qui concerne les boucles d'insertion/délétion. A cause de cette redondance, il apparaît que les altérations de MSH6 sont associées principalement à l'accumulation de substitutions à l'origine de mésappariement base-base, et moins fréquemment de grandes insertions ou délétions dans les séquences microsatellites. Ainsi, il n'est pas étonnant que nous n'observions pas de délétion du T17 pour une des tumeurs déficitaires en MSH6. Les tumeurs caractérisées par un déficit en MSH6 se distinguent de celles causées par la perte de MLH1 ou MSH2. En effet, les déficits en MSH6 sont souvent associés à des phénotypes MSI-L ou frustrés, notamment lorsque le panel du « National Cancer Institute » est utilisé. D'ailleurs, cette caractéristique peut concourir au sous diagnostic des syndromes HNPCC dus à un déficit en MSH6. Deux études ont recherché des anomalies de MSH6 dans des tumeurs présentant un phénotype MSI-L, et ont retrouvé une mutation ponctuelle du gène MSH6 dans 22% des cas pour l'une, et dans 7,3% des cas pour l'autre.^{106, 107} Dans notre étude, les tumeurs déficitaires en MSH6 présentaient toutes un phénotype MSI-H avec dans 90% des cas une instabilité sur les 5 marqueurs, mais seulement sur 3 pour un cas. Par contre, l'instabilité pouvait être

subtile, avec dans plusieurs cas un décalage du marqueur microsatellite d'une seule paire de base. A l'inverse de MSH6, les déficits en MLH1, MSH2 ou PMS2 sont à l'origine d'une forte instabilité génétique. En effet, ces deux protéines sont essentielles au bon fonctionnement du MMR avec respectivement la formation des complexes MutL et MutS. Ainsi, il ne semble pas surprenant que la taille moyenne des délétions du T17 d'HSP110 soit significativement plus importante chez ces patients. Cependant, pour deux patients présentant un déficit de MLH1 en immunohistochimie, on ne retrouve pas de délétion au niveau du T17 d'HSP110. De manière singulière, une des deux tumeurs était également caractérisée par un phénotype MSI-L, avec une instabilité uniquement sur BAT25. La cause de déficit en MLH1 devra être investiguée chez ce patient pour envisager une hypothèse quant à cette présentation atypique. Pour le deuxième patient, le déficit en MLH1 est lié à une hyperméthylation du promoteur du gène, et les 5 marqueurs mono-nucléotidiques sont instables. Enfin, nous n'observons pas de différence entre les patients atteints d'un cancer MSI sporadique et ceux touchés par un syndrome de Lynch en ce qui concerne la taille de la délétion ($p = 0,77$). Cette absence de différence s'explique probablement par le fait que, dans les deux groupes, la majorité des tumeurs est caractérisée par un déficit en MLH1. Malgré une origine différente, les conséquences de la perte d'expression de MLH1 sont en effet probablement les mêmes dans les tumeurs sporadiques et héréditaires.

5.3 Délétion du T17 d'HSP110 et expression d'HSP110 Δ E9

L'instabilité microsatellite conduit à une instabilité globale du génome. Dans les séquences codantes, les insertions ou délétions au niveau de microsatellites conduisent à la modification du cadre de lecture et à l'obtention d'une protéine tronquée, non fonctionnelle dans la plupart des cas. Longtemps considérés comme n'ayant aucune fonction, il apparaît que certains microsatellites des régions non-codantes interviennent dans les phénomènes d'épissage alternatif ou de régulation de l'expression des gènes. L'équipe de Ramsay a exploré le mécanisme de régulation de l'expression du facteur de transcription MYB dans des cancers colorectaux MSI. Ils ont montré que la présence d'une délétion au sein d'une séquence poly(T) de l'intron 1 était à l'origine d'une augmentation de l'expression de MYB, sans altération de la protéine.¹⁹ Des anomalies d'épissage ont également été rapportées, avec notamment des délétions au niveau des séquences permettant l'ancrage ou la reconnaissance des sites d'excision. La séquence poly-pyrimidine (Py) est une séquence essentielle de l'ARN pré-messager qui participe au bon assemblage des différentes protéines du spliceosome et la reconnaissance du site d'épissage en 3'. On constate de manière générale dans la littérature,

que la taille des Py est plus courte dans les tumeurs colorectales MSI que dans celles MSS.^{18, 19, 108-110} Des études ont montrés que les mutations ou les délétions au sein de cette séquence pouvaient conduire à des anomalies d'épissage. Ce mécanisme a par exemple été mis en évidence dans des maladies héréditaires telles que l'hémophilie B,¹¹¹ ou certaines surdités familiales.^{112, 113} Dans leur étude Yu *et al*, ont montré que la délétion de 3 nucléotides au niveau de la séquence poly-pyrimidine de l'intron 7 du gène *DFNA5* (Deafness, Autosomal Dominant 5) conduisait l'épissage de l'exon 8 du gène et l'obtention d'une protéine tronquée, à l'origine d'une surdité familiale.¹¹³ Des anomalies similaires ont été mises en évidence dans certains cancers, et pourraient participer à l'amplification de l'instabilité génétique caractéristique de cellules MSI. L'Equipe de Sasaki a mis en évidence dans des lignées de cancer colorectal MSI, une altération de l'expression de la protéine ATM à cause d'un épissage aberrant.¹⁰⁸ Ils ont montré que l'anomalie d'épissage résultait de la présence d'une délétion au niveau du Py en amont de l'exon 8 ou de l'exon 12. Plusieurs études, dans des cellules tumorales gastriques MSI et des cellules tumorales coliques MSI, ont mis en évidence que la délétion du Py de l'intron 4 de *MRE11* était à l'origine de l'excision d'un exon et l'obtention d'une protéine tronquée.^{18, 109, 114} Les auteurs suggèrent qu'en l'absence d'expression de *MRE11*, il y a une diminution de la réparation des cassures double brin de l'ADN ce qui participe à la croissance tumorale. En ce qui concerne *HSP110*, l'équipe de Duval a montré, dans une série de 13 lignées cellulaires de cancers colorectaux MSI et dans 43 tumeurs colorectales MSI, qu'une délétion du T17 de l'intron 8 d'*HSP110* était à l'origine de l'excision de l'exon 9 lors de l'épissage, confirmant la fonction de Py du T17.⁸³ Pour les lignées cellulaires MSI, nous retrouvons des résultats similaires à ceux de leur étude. Pour les cellules HCT116 et LS174T on détecte à la fois la présence d'*HSP110* et d'*HSP110ΔE9*, bien que la taille du T17 soit identique sur les deux allèles, respectivement 14 et 11T. Il semble donc que la délétion du T17 n'abolisse pas totalement l'épissage normal, mais favorise l'excision de l'exon 9 d'*HSP110* au détriment de sa conservation. Une étude portant sur la taille du Py de l'intron 9 du gène *CFTR* suggère que plus le Py est court, et moins la reconnaissance et la liaison de la « polypyrimidine tract binding protein » et/ou du facteur UA2 du spliceosome au Py est efficace, favorisant ainsi l'excision d'exon.¹¹⁵ Des résultats similaires sont exposés par Giannini *et al* pour le gène *MRE11* dans les cellules LS174T, avec une persistance de l'expression de la protéine sauvage malgré une mutations bi-alléliques du poly(T)11.¹⁸ On n'observe pas de différence significative entre les taux d'*HSP110ΔE9* / *HSP110* estimés dans notre travail et ceux de l'équipe de Duval avec respectivement 17,6% et 14,3% pour les cellules HCT116 ; 162,4% et 193,9% pour les

cellules LS174T. Par contre, pour la lignée MSS SW480, nous ne retrouvons pas l'expression d'HSP110 Δ E9, alors que les résultats initiaux montraient un taux HSP110 Δ E9 / HSP110 de 8,4%. Cette différence pourrait s'expliquer par un manque de sensibilité de notre technique et/ou un manque de spécificité de la technique utilisée dans la première étude. En ce qui concerne les tumeurs, nous obtenons également des résultats légèrement différents de ceux de Dorard *et al*, en partie parce que nous n'avons pas utilisé les mêmes références. Dans leur travail, ils ont choisi comme référence un microsatellite de 17T et n'ont considéré que des délétions supérieures à 2 nucléotides, estimant qu'en deçà il s'agissait d'un polymorphisme. Pour chaque patient, nous avons comparé la taille du T17 dans le tissu sain et dans la tumeur de façon à connaître de manière précise la taille d'une éventuelle délétion. Nous mettons ainsi en évidence que, dès qu'il existe une différence d'une base entre le T17 du tissu sain et celui de la tumeur, on observe la présence d'un variant alternatif d'HSP110, HSP110 Δ E9 où l'exon 9 fait défaut. Par contre, pour les tumeurs MSS, dont la taille du T17 ne varie pas entre le tissu sain et la tumeur, nous ne détectons pas la présence d'HSP110 Δ E9, contrairement à Dorard *et al* qui décèlent la présence des 2 variants, avec parfois même un ratio HSP110 Δ E9 / HSP110 avoisinant les 25%. On notera, que pour les quatre patients MSI ne présentant pas de délétion du T17, nous ne décelons pas non plus l'expression d'HSP110 Δ E9. Nos résultats laissent par ailleurs apparaître que l'épissage alternatif de l'exon 9 d'HSP110 ne dépend pas de la taille absolue du T17, mais bien de la présence d'une délétion du T17 dans la tumeur. En effet, une majorité des tumeurs MSS présentent 16 répétitions de T, et pourtant on ne décèle pas l'expression HSP110 Δ E9. Alors que, pour un patient MSI présentant une délétion de 1 pb entre le tissu sain et la tumeur (17T \rightarrow 16T), on estime le ratio HSP110 Δ E9 / HSP110 à 20,5%. Nous avons pu estimer le ratio HSP110 Δ E9 / HSP110 pour 54 tumeurs. On observe une grande variabilité de ce ratio entre les patients, avec une médiane à 16,9%, mais des valeurs comprises entre 2,5% et 112%. L'équipe de Duval observe une variabilité encore plus forte avec des taux allant de 11,7 à 479,2% en fonction des patients. Ils expliquent cette fluctuation par l'influence de la taille de la délétion sur l'expression des deux variants. Ils remarquent que plus la diminution de taille du T17 d'HSP110 est importante et plus l'expression du transcrite d'HSP110 Δ E9 augmente au détriment du transcrite sauvage. Statistiquement nous observons la même relation entre taille de la délétion du T17 d'HSP110 et taux d'HSP110 Δ E9 / HSP110 ($p < 0,01$). D'autres études ont montré la relation entre la proportion variable d'expression de deux transcrits et la taille du Py. Le Py de l'intron 9 du gène *CFTR* est polymorphique avec 5, 7 ou 9 répétitions de T. Chu *et al* montrent que la proportion de transcrite muté par rapport à

l'ARNm de CFTR total est beaucoup plus importante chez les sujets présentant un Py homozygote T5 ($\approx 90\%$) que chez les patients présentant un Py homozygote T7 ($\approx 25\%$) ou T9 ($\approx 15\%$).¹¹⁵ Chez les patients présentant un Py hétérozygote, ils notent l'influence des deux allèles, avec un pourcentage d'expression du transcrit muté d'environ 65% chez les hétérozygotes T5/T7, 55% chez les hétérozygotes T5/T9 et légèrement moins de 20% chez les T7/T9. Dans les cellules colorectales MSI, l'expression des variants sauvages et mutés de MRE11 semble également conditionnée par le caractère mono- ou bi-allélique et la taille de la délétion.¹⁸ L'expression de MRE11 est presque inhibée pour la lignée cellulaire de cancer de l'endomètre AN3CA qui présente un Py homozygote T9/T9. Pour les cellules LS174T (T9/T10) ils observent une plus forte diminution de l'expression de MRE11 que pour la lignée cellulaire de cancer de la prostate DU145 (T9/T11). Des taux normaux de transcrit sauvage et de protéine sont par contre retrouvés pour toutes les cellules ayant un Py homozygote T11/T11. Dans notre analyse, comme dans l'étude princeps, nous avons uniquement considéré la délétion la plus grande pour réaliser notre étude statistique. Il aurait été souhaitable de pouvoir effectuer une étude en sous-groupes, mais nous n'avions pas identifié suffisamment de patients avec une délétion bi-allélique pour réaliser une étude statistique. Cependant, dans les deux études citées précédemment, il semble que l'allèle le plus court ait une influence majeure sur l'expression du transcrit muté.

On constate qu'une grande délétion n'induit pas forcément une forte expression du variant tronqué. En effet, autant pour les délétions inférieures ou égales à 3 pb on observe systématiquement un taux d'HSP110 Δ E9 / HSP110 faible, pour les délétions plus grandes la variabilité d'expression est beaucoup plus importante, ce qui suggère qu'il existe d'autres mécanismes modulant l'expression du transcrit sauvage et du transcrit muté. Dans la première partie de notre étude nous avons démontré qu'il existait une relation entre la taille de la délétion du T17 et la protéine du MMR déficitaire. On retrouve cette tendance pour l'expression d'HSP110 Δ E9 / HSP110, avec notamment, pour une même taille de délétion du T17, une expression plus importante d'HSP110 Δ E9 lors d'un déficit de MLH1 que pour un déficit en MSH6 (données non présentées). Cependant, on ne met pas en évidence de relation statistiquement significative. Nous avons également recherché un lien entre stade tumoral et l'expression d'HSP110 Δ E9. Il a été montré qu'HSP110 était constamment surexprimé dans de nombreuses tumeurs,¹¹⁶ dont les tumeurs colorectales,⁸⁰ et participait à la transformation cellulaire en protégeant les cellules tumorales de l'apoptose. Plusieurs études ont mis en évidence que le taux d'expression d'HSP110 était d'autant plus important que le stade

tumoral était avancé.^{79, 80} Dans leurs travaux, Slaby *et al* ont constaté que le taux d'expression d'HSP110 était deux fois plus important chez les patients présentant une maladie métastatique que chez les patients avec une maladie localisée.⁸⁰ Dans notre étude, nous ne distinguons pas de différence d'expression du taux d'HSP110ΔE9 / HSP110 en fonction du stade tumoral. Cependant, nous n'avons réalisé qu'une quantification relative d'HSP110ΔE9 vis-à-vis de la protéine sauvage, et il serait intéressant de réaliser une quantification absolue du transcrit muté pour chaque tumeur, pour voir s'il existe une différence d'expression en fonction du stade tumoral. D'autres pistes peuvent être avancées pour expliciter ces variations d'expression, mais n'ont pas encore été explorées. Le déficit du MMR est responsable d'une instabilité de toutes les séquences microsatellites, et des études ont suggéré que des insertions/délétions dans des régions non-codantes pouvaient déréguler l'expression des gènes. L'équipe de Ramsay a mis en évidence une délétion au sein d'un microsatellite du « c-myb transcriptional attenuator region » situé dans l'intron 1, responsable de la surexpression du facteur de transcription MYB dans les cellules tumorales coliques.^{19, 117} Plus récemment, une équipe a étudié 42 microsatellites courts (8-14pb) situés dans les régions 3'UTR de gènes. L'étude retrouve une délétion au niveau séquence T11 de la région 3'UTR du gène « RB1 inducible coiled-coil 1 » (RB1CC1) qui entraînerait la perte d'un site de fixation d'un miARN et induirait une surexpression du gène.¹¹⁸ On peut également imaginer que la mutation au niveau d'un ou plusieurs facteurs de transcription puisse moduler l'expression d'HSP110ΔE9 par rapport au transcrit sauvage.

Les westerns blot réalisés à partir de lignées cellulaires permettent de confirmer qu'HSP110ΔE9 induit bien la formation d'une protéine tronquée. Nous avons utilisé un anticorps (Ac) dirigé contre la partie N-terminale d'HSP110 qui permettait ainsi de détecter à la fois la protéine sauvage et HSP110ΔE9. On retrouve, pour les deux lignées cellulaires MSI étudiées, la présence des deux variants protéiques. Pour les cellules LS174T on observe une expression beaucoup plus importante du variant tronqué par rapport à HSP110, et le phénomène inverse pour les cellules HCT116, ce qui confirme les résultats obtenus par les techniques de biologie moléculaire. Cependant, en plus des deux bandes recherchées, nous observons le marquage de plusieurs autres bandes dont la taille est comprise entre 10 et 105kDa. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces bandes surnuméraires : un marquage aspécifique de notre Ac, l'existence d'autres formes tronquées d'HSP110, des modifications post-traductionnelles. L'analyse *in silico* du gène d'HSP110 (www.seltarbase.org) met en évidence 22 autres répétitions introniques de T ou de A de 4 à 7 pb, à proximité d'un site

d'épissage. Celles-ci peuvent être le siège de délétion dans les cellules MSI et conduire à l'obtention d'au moins 5 autres protéines tronquées dont la masse moléculaire est estimée à 9,35 ; 19,8 ; 36,6 ; 47,8 et 51,1 kDa. Notre Ac ciblant la partie N-terminale de la protéine, commune à toutes ces protéines tronquées, il est possible que nous détectons tous ces variants. L'analyse des autres microsatellites est donc nécessaire pour vérifier cette hypothèse. L'analyse *in silico* de la protéine tronquée grâce au logiciel NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) a également mis en évidence 5 sites potentiels de glycosylation, nous avons donc effectué un traitement des extraits protéiques avec une N-déglycosydase pendant une nuit à 37°C, mais nous obtenons des résultats de western blot identiques (données non présentées). Des analyses complémentaires doivent donc être réalisées pour préciser la nature de ces autres bandes. Puis, il sera nécessaire de vérifier le ratio d'expression des protéines d'HSP110 et HSP110ΔE9 dans les tumeurs.

5.4 Instabilité microsatellite, survie et réponse à la chimiothérapie à base de 5-FU dans les cancers colorectaux métastatiques.

5.4.1 Survie

De nombreuses études ont évalué l'influence du déficit du MMR et de l'instabilité microsatellite sur le pronostic des patients présentant un cancer colorectal. Il semblerait que, malgré quelques études contradictoires,^{119, 120} le phénotype MSI soit un marqueur de bon pronostic quel que soit le stade tumoral.^{42, 44, 121-124} Dans une première méta-analyse, Popat *et al*, ont analysé les résultats de 32 études pour évaluer l'impact du phénotype MSI sur le pronostic. Ils montrent un avantage pour les tumeurs MSI à la fois en ce qui concerne la survie globale (HR = 0,65 ; 95% CI : 0,59-0,71), mais aussi la survie sans progression (HR = 0,67 ; 95% CI : 0,53-0,83), indépendamment du stade tumoral.⁴³ Dans une méta-analyse plus récente, Guastadisegni *et al* ont colligé les données de survie de 20 études différentes.⁶⁸ Leurs résultats confirment l'avantage pronostic du déficit en MMR avec un odd ratio (OR) de 0,6 (95% CI 0,53 – 0,69 ; p < 0,0001) sans hétérogénéité notable entre les études. Cependant, on constate que dans la majorité des études, les effectifs sont majoritairement constitués de patients avec un cancer colorectal de stade II ou III, et que peu de travaux ont analysés les données de survie en fonction des stades tumoraux. Nous avons répertorié 11 études présentant des données de survie pour les tumeurs de stade IV en fonction du statut MSI. Leurs conclusions sont contradictoires concernant le caractère pronostic du déficit du MMR dans les cancers colorectaux métastatiques (*Tableau 15*). L'hétérogénéité de

ces résultats peut s'expliquer, au moins partiellement, par les différences de techniques utilisées pour dépister le déficit du MMR et/ou le phénotype MSI. Seulement 6 travaux ont utilisé le panel recommandé par la conférence de consensus de Bethesda pour le diagnostic du phénotype MSI par biologie moléculaire. Quatre études n'ont analysé qu'un ou deux marqueurs (BAT25 et/ou BAT26), et une dernière étude a utilisé un panel de 10 marqueurs dont la sensibilité de diagnostic n'est pas connue. Il existe ainsi, pour ces études, un risque de sous diagnostic du phénotype MSI. Une étude immuno-histochimique a été effectuée dans 7 études, mais dans la majorité des cas seule l'expression des protéines MLH1 et MSH2 a été recherchée. Parmi toutes les études répertoriées, deux études concluent au caractère péjoratif du phénotype MSI.^{125, 126} La majorité des études n'observent pas de différence significative de survie entre les patients présentant une tumeur MSI et ceux présentant une tumeur MSS. Cependant, la plupart de leurs données suggèrent que dans les cancers colorectaux métastatiques le déficit du MMR n'est pas un facteur de bon pronostic. En effet, la médiane de survie des groupes MSS est en moyenne supérieure de 10 mois à celle des patients avec une tumeur MSI. L'absence de significativité de ces résultats peut être en partie liée aux faibles effectifs de tumeurs MSI (3 – 16,8%) comparés aux tumeurs MSS. Enfin, deux études concluent que le déficit du MMR, est comme pour les tumeurs de grade II ou II, un marqueur de bon pronostic.^{127, 128} Les résultats de notre travail vont dans le sens de la majorité des études et suggèrent que le phénotype MSI est plutôt de mauvais pronostic dans les cancers colorectaux métastatiques. Les médianes de survie globale et de survie sans progression des patients sont comparables avec les données des études antérieures. On constate que la survie des patients avec une tumeur MSI est inférieure à celle des patients présentant une tumeur MSS, avec respectivement mois 8,56 vs 24,37 mois pour la survie globale, et 6,6 mois vs 9,9 mois pour la survie sans progression, mais ces différences ne sont pas significatives. Plusieurs études ont montré l'impact péjoratif de la mutation V600E du gène *BRAF* dans les cancers colorectaux MSI,^{125, 126, 129} mais ce paramètre n'a pas pu être étudié compte tenu du faible nombre de tumeurs présentant un déficit du MMR. Dans leur étude, Benatti *et al* constatent que les données de survie sont meilleures pour les patients présentant un syndrome de Lynch que ceux avec un cancer MSI sporadique, principalement car l'âge et le stade au diagnostic sont plus faibles dans le premier groupe que dans le second.¹³⁰ Dans notre travail, trois patients présentaient une tumeur MSI sporadique, caractérisée par la mutation *BRAF* V600E, mais le caractère héréditaire ou sporadique n'a pas pu être déterminé pour les trois autres. Nous n'avons donc pas pu étudier l'influence de ce paramètre sur la survie.

| Auteurs | Nombre de tumeurs | | Diagnostic de l'instabilité microsatellite | Données de survie (médiane) | Impact pronostic du phénotype MSI |
|-------------------------------------|-------------------|-----------|---|--|-----------------------------------|
| | Stade IV | MSI (%) | | | |
| Smith <i>et al</i> ¹²⁵ | 1406 | 46 (3,3) | <u>PCR</u> : BAT25 et BAT26 | Survie globale : - MSI = 9,3 mois | Mauvais |
| Kim <i>et al</i> ¹³¹ | 297 | 23 (11,7) | <u>PCR</u> : Panel Bethesda <u>IHC</u> : MLH1 et MSH2 | Survie globale : - MSI = 15,7 mois - MSS = 25,1 mois | Aucun |
| Kim <i>et al</i> ¹³² | 171 | 10 (5,8) | <u>PCR</u> : Panel Bethesda <u>IHC</u> : MLH1 et MSH2 | Survie globale : - MSI = 20,3 mois - MSS = 29,6 mois | Aucun |
| Tran <i>et al</i> ¹²⁶ | 524 | 40 (7,6) | <u>PCR</u> : Panel Bethesda Ou <u>IHC</u> : MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 | Survie globale : - MSI = 11,1 mois - MSS = 22,1 mois | Mauvais |
| Koopman <i>et al</i> ⁹³ | 515 | 18 (3,5) | <u>PCR</u> : BAT25 et BAT26 ± 4 autres marqueurs <u>IHC</u> : MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 | Survie globale : - MSI = 10,2 mois - MSS = 17,9 mois | Aucun |
| Jover <i>et al</i> ⁶⁵ | 146 | 11 (7,5) | <u>PCR</u> : Panel Bethesda <u>IHC</u> : MLH1 et MSH2 | % de survie à 5 ans : - MSI = 18% - MSS = 15% | Aucun |
| Malesci <i>et al</i> ¹²¹ | 234 | 7 (3,0) | <u>PCR</u> : BAT 25 et BAT 26 <u>IHC</u> : MLH1 et MSH2 | Non précisées | Aucun |
| Jover <i>et al</i> ¹¹⁹ | 146 | 9 (6,2) | <u>PCR</u> : BAT26 <u>IHC</u> : MLH1 et MSH2 | % de survie à 4 ans : - MSI = 33% - MSS = 28% | Aucun |
| Benatti <i>et al</i> ¹³⁰ | 184 | 31 (16,8) | <u>PCR</u> : Panel Bethesda + BAT40 | Non précisées | Aucun |
| Liang <i>et al</i> ¹²⁷ | 244 | 52 (21,3) | <u>PCR</u> : Panel Bethesda | Non précisées | Bon |
| Gryfe <i>et al</i> ¹²⁸ | 134 | 15 (6,7) | PCR : 10 marqueurs | Non précisées | Bon |

Tableau 15: Résumé des publications étudiant l'influence du phénotype MSI sur le pronostic dans les cancers colorectaux métastatiques. Les études sont classées par année de publication décroissante. PCR : Polymerase Chain Reaction. IHC : Immunohistochimie.

5.4.2 Réponse à la chimiothérapie FOLFIRI-CETUX.

Actuellement le « National Comprehensive Cancer Network® » recommande pour le traitement des patients présentant un cancer colorectal métastatique l'utilisation du 5-FU ou de la capécitabine seuls ou en association avec l'oxaliplatine et/ou l'irinotécan et/ou une thérapie ciblée.⁷¹ Il est admis que les patients avec une tumeur MSI présentent un profil de sensibilité différent aux molécules de chimiothérapie comparés aux patients avec une tumeur MSS, avec par exemple une résistance au carboplatine et au cisplatine. Cependant, peu d'études cliniques ont évalué l'influence du phénotype MSI sur la réponse aux chimiothérapies contenant du 5-FU dans les CCRm : 5-FU + acide folinique,^{127, 133} 5-FU + oxaliplatine,^{70, 134, 135} 5-FU + irinotécan,⁶³ Capécitabine + oxaliplatine ou irinotécan,⁹³ 5-FU + oxaliplatine ± cétuximab.¹²⁵ Dans notre étude, nous avons évalué l'impact du phénotype MSI sur la réponse à une chimiothérapie associant 5-FU, irinotécan et cétuximab. Soixante-dix-huit patients présentant un CCRm ont bénéficié de cette association en première ou deuxième ligne de chimiothérapie métastatique. Quel que soit le statut MSI ou MSS de la tumeur, les

patients ont en moyenne reçu le même nombre de cycles de FOLFIRI-cétuximab. La réponse a été évaluée au terme de 6 puis 12 cures de chimiothérapie par FOLFIRI-Cétuximab, sans que l'on mette en évidence de différence entre les MSI et les MSS. Compte-tenu des faibles effectifs, nous avons uniquement considéré deux types de réponses : maladie contrôlée (réponse complète, réponse partielle et maladie stable) vs progression de la maladie. L'évaluation à 3 mois ne montre pas de différence significative entre les 2 groupes, avec une maladie contrôlée chez 75% des MSS contre 67,7% des MSI, tout comme à 6 mois avec respectivement 25,9% et 17,7% de maladies contrôlées. L'instabilité microsatellite ne semble pas être un marqueur prédictif de réponse, ou de non réponse, à cette poly-chimiothérapie. Ce résultat contraste avec certaines conclusions de travaux ayant étudié ces mêmes principes actifs isolément ou associés.

In vitro, plusieurs études ont mis en évidence l'importance du MMR dans la cytotoxicité du 5-FU.^{58, 59} Le MMR, grâce à hMutS α et hMutS β , reconnaît les adduits de FdUMP dans l'ADN à l'origine d'un mésappariement, et conduirait la cellule à l'apoptose. Le déficit du MMR serait donc à l'origine d'une inefficacité partielle du 5-FU. *In-vivo*, plusieurs études ont évalué le caractère prédictif du phénotype MSI sur la réponse à la chimiothérapie adjuvante à base de 5-FU. Il semble que chez ces patients présentant une tumeur de stade II ou stade III, le 5-FU n'améliore pas les données de survie, contrairement aux résultats obtenus chez ceux présentant une tumeur MSS.^{42, 65, 66, 119, 120} Dans leur travail, Sargent *et al* montrent qu'il n'existe pas de différence de survie chez les patients MSI qu'ils aient bénéficié ou non d'une chimiothérapie adjuvante.⁶⁶ Ils observent que le pourcentage de survie sans progression à 5 ans est de 76% dans le groupe non traité, contre 72% dans le groupe traité ($p = 0,56$). Par contre, dans les tumeurs MSS, ils confirment l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante avec respectivement 64% et 53% de survie sans progression dans les groupes traités et non traités ($p = 0,02$). En 2011, Dorard *et al* ont montré qu'un ratio d'HSP110 Δ E9 / HSP110 supérieur à 75% était un marqueur prédictif de bonne réponse des cellules MSI au 5-FU. Dans notre population de patient de CCRm, une seule patiente présente une telle expression, ce qui ne nous permet pas d'évaluer son influence sur la réponse à la chimiothérapie dans notre population.⁸³ Le MMR n'intervenant qu'à hauteur de 10% dans le mécanisme d'action du 5-FU, certaines équipes ont explorées d'autres pistes pouvant expliquer ce défaut d'efficacité du 5-FU. On sait que la TS est un élément clé du mécanisme d'action du 5-FU, et des études ont mis en évidence que la forte expression de la TS induisait une faible réponse aux chimiothérapies à base de 5-FU. Ricciardiello *et al* ont examiné le niveau d'expression de la

TS dans les cellules MSI.¹³⁶ L'expression de la TS a été évaluée par immunohistochimie, et les tumeurs classées en trois catégories d'expression : nulle, faible et élevée. Ils mettent en évidence une surexpression de la TS dans les tumeurs MSI par rapport aux tumeurs MSS ($p < 0,0001$), qui pourrait expliciter la moindre efficacité du 5-FU dans les cellules MSI. Ces résultats ont été confirmés plus récemment par l'équipe de Sørensen, avec une forte expression de la TS retrouvée chez 70% des tumeurs MSI contre 18% des tumeurs MSS.¹²⁴ Les études pour évaluer l'impact du phénotype MSI sur la réponse au 5-FU sont par contre beaucoup plus rares, et contredisent les conclusions des études in-vitro et chez les patients avec des tumeurs de stades II et III. Liang *et al* ont étudié la survie de 244 patients présentant un cancer colorectal métastatique et traités ou non par l'association 5-FU et acide folinique.¹²⁷ Ils constatent que, pour les patients ayant bénéficié d'une chimiothérapie, la médiane de survie globale est plus importante dans le groupe MSI (24 mois) que dans le groupe MSS (13 mois). Par contre, pour les patients n'ayant pas bénéficié d'une chimiothérapie, la médiane de survie globale est de 7 mois dans les 2 groupes. Les auteurs concluent à une meilleure chimio-sensibilité au 5-FU des tumeurs MSI que des tumeurs MSS. Brueckl *et al* ont mis en évidence des résultats similaires avec une meilleure réponse des tumeurs colorectales métastatiques MSI (72%) par rapport aux tumeurs MSS (41%) pour les patients traités par l'association 5-FU et acide folinique.¹³³

En ce qui concerne l'irinotécan (CPT11), des études ont montré à la fois dans des lignées cellulaires de cancers colorectaux^{137, 138} et dans des xénogreffes de tumeurs colorectales,¹³⁹ que les cellules MSI étaient plus sensibles au CPT11 que les cellules MSS. Vilar *et al*, mettent en évidence des concentrations inhibitrices 50 (CI50) inférieures à $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans les lignées cellulaires présentant une hyperméthylation du promoteur de MLH1 (SW48, HCT116 et RKO), et supérieure à $12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans la lignée MSS HT-29.¹³⁸ Dans la lignée HCT15 qui présente un déficit de MSH6, la diminution de la CI50 est moins franche ($\approx 9 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Les auteurs expliquent ces différences par la forte prévalence des mutations altérant l'expression de MRE11^{18, 114} et RAD50.¹³⁸ En effet, ces deux protéines interviennent dans la réparation des cassures double brin de l'ADN, sous la forme d'un complexe multi-protéique avec NSB1, et participe à la résistance des cellules aux inhibiteurs de topo-isomérase. L'absence ou la diminution d'expression de MRE11 et RAD50 pourrait donc sensibiliser les cellules au CPT11. Bertagnolli *et al*, ont réalisé une étude clinique prospective, randomisée, dans une population de 723 patients avec un CCR de stade III bénéficiant d'une chimiothérapie par 5-FU + acide folinique \pm irinotécan. Il apparaît que, pour les patients ayant bénéficié de

l'ajout de CPT11, la survie sans récurrence est plus longue dans le groupe MSI que dans le groupe MSS ($p = 0,03$). Les auteurs suggèrent que l'instabilité microsatellite pourrait être un marqueur prédictif de bonne réponse à la chimiothérapie associant 5-FU et irinotécan, contrairement au 5-FU seul. On retrouve peu de données sur l'efficacité du CPT11 seul dans les CCRm. De plus les conclusions des études cliniques sont à nuancer compte tenu de la grande hétérogénéité des populations étudiées. On retrouve une seule étude clinique ayant évalué l'influence du statut MSI sur la réponse à la chimiothérapie par CPT11 seul. Les auteurs concluent à l'existence d'une relation favorable entre la réponse au CPT11 et le phénotype MSI.¹⁴⁰ Cependant ces résultats sont à modérer, car ils portaient sur une population de 31 patients dont seulement 4 présentaient une tumeur MSI. La même équipe a étudié une population de 72 patients avec un CCRm et observe une réponse chez 71,4% des patients avec une tumeur MSI contre 9,2% dans le groupe MSS, cependant les patients n'avaient pas tous bénéficié du même régime de chimiothérapie (CPT11 seul ou en association avec le 5-FU) ce qui rend difficile toute conclusion.¹⁴¹ En 2011, Kim *et al* ont présenté les résultats d'une étude chez 297 patients avec un CCRm ayant reçu une chimiothérapie de type FOLFIRI ou XELERI.¹³¹ Malgré une différence apparente de réponse entre les 2 groupes, respectivement 46,0% des taux de réponse pour les MSS et 56,5% pour les MSI, leurs résultats ne sont pas statistiquement significatifs. Ils n'observent pas non plus de différences significatives entre les deux groupes en ce qui concerne la survie sans progression ou la survie globale. Dans notre étude, on constate que la posologie d'irinotécan ($\text{mg}/\text{m}^2/\text{cure}$) est significativement moins importante chez les patients présentant une instabilité microsatellite au niveau de leur tumeur, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence de bénéfice de la chimiothérapie entre les deux groupes. Cependant, cette différence s'explique par les adaptations de doses qui ont été réalisées suite au dépistage des polymorphismes de la TATA box du promoteur de l'UGT1A1. Celui-ci a permis de mettre en évidence la présence d'un syndrome de Gilbert (7/7) chez trois des patients, et un profil hétérozygote (6/7) chez les trois autres patients. Ceux-ci sont plus à risque d'effets indésirables graves à l'irinotécan que les patients présentant un phénotype sauvage (6/6).¹⁴² Une diminution *a priori* des doses d'irinotécan a donc été effectuée chez les 6 patients présentant une tumeur MSI, de manière à minimiser les effets toxiques. L'étude clinique FOLFIRICETUX a montré que ces adaptations posologiques n'entraînaient pas de perte de chance pour les patients (données non publiées). D'ailleurs, chez les patients MSS, une adaptation de dose également a été effectuée en fonction du statut des patients vis-à-vis de l'UGT1A1, avec en moyenne $196,5 \text{ mg}/\text{cure}/\text{m}^2$ pour les patients 6/6,

183,1 pour les 6/7 et 142,7 pour les 7/7 sans que cela impacte sur la réponse à 3 mois ($p = 0,22$) ou 6 mois ($p = 0,26$).

Le cétuximab, est un anticorps monoclonal murin humanisé, dirigé contre le récepteur à l'EGF (EGFR) et indiqué dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques, seul ou en association avec une chimiothérapie conventionnelle. Il a été montré que la présence d'une mutation du gène *KRAS* était à l'origine d'une perte d'efficacité des thérapies ciblant l'EGFR. L'autorisation de mise sur le marché du cétuximab, stipule d'ailleurs que seuls les patients présentant une tumeur avec un gène *KRAS* sauvage peuvent bénéficier de cette thérapeutique. Environ 40% des cancers colorectaux portent une mutation du gène *KRAS*. Dans les cancers MSI, il apparaît que celles-ci sont plus fréquentes dans les tumeurs d'origine sporadiques que dans les tumeurs héréditaires.³⁴ Dans notre population de patients, nous avons sélectionné uniquement les patients ne présentant pas de mutations au niveau des codons 12, 13, 61 et 146. Actuellement, il existe une restriction de l'AMM uniquement pour les mutations de *KRAS*. Cependant, certaines études suggèrent que des mutations en aval sur la voie de signalisation cellulaire ou sur d'autres voies cellulaires pourraient également inhiber l'action des anti-EGFR. Di Nicolantonio *et al*, ont par exemple mis en évidence que la forme sauvage de *BRAF* était nécessaire à l'action du cétuximab.¹⁴³ Récemment, une méta-analyse a colligé les données de 19 études, et obtient les mêmes conclusions.¹⁴⁴ Dans les CCR MSI, la mutation du gène V600E du gène *BRAF* est fréquemment associée à l'hyper-méthylation du promoteur de *MLH1* et signe l'origine sporadique du déficit du MMR. Dans notre travail, 50% des patients avec une tumeur MSI présentent cette mutation de *BRAF*, contre uniquement 8,6% des tumeurs MSS. Cette différence pourrait en partie expliquer le fait qu'on n'observe pas de différence de réponse entre les groupes MSI et MSS lors de l'ajout du cétuximab au protocole FOLFIRI. Par ailleurs, il pourrait être intéressant de vérifier le statut des gènes *PI3K* et *PTEN* dans notre population de patients pour voir s'il n'existe pas d'autres facteurs pouvant diminuer ou inhiber l'efficacité du cétuximab. En effet, Miyaki *et al*, montrent que les mutations de *PI3K* surviennent dans 21% des syndromes de Lynch et dans 15% des cancers MSI sporadiques. Par ailleurs, l'étude de Baranovskaya *et al* suggèrent que la moindre efficacité du cétuximab chez les patients ayant une tumeur MSI fait suite à une sous expression de l'EGFR causée par l'élongation d'un microsatellite (CA)_n aux propriétés régulatrices.¹⁴⁵

Au total, les données de la littérature ne permettent pas de statuer définitivement sur l'efficacité du 5-FU, de l'irinotécan ou du cétuximab dans les cellules MSI. Il semblerait que

dans les CCRm, l'association FOLFIRI induise une meilleure réponse dans les tumeurs MSI que dans les tumeurs MSS. D'autre part, plusieurs arguments suggèrent la moindre efficacité des anti-EGFR dans les cellules MSI. Ainsi, la moindre efficacité du protocole FOLFIRI dans les cellules MSS pourrait être compensée par l'ajout du cétuximab, et expliquer le fait que nous ne voyons pas de différence de réponse entre les patients MSI et MSS avec une chimiothérapie de type FOLFIRI-CETUX. Cependant, il serait intéressant d'étudier l'influence des variations de la TS, MRE11, RAD50, PI3K, PTEN entre autres, sur la pharmacologie des 3 molécules utilisées.

5.5 HSP110 Δ E9 : marqueur pronostique et/ou prédictif ?

En théorie, facteurs pronostics et prédictifs sont des notions distinctes. Un facteur pronostic permet de prévoir l'évolution de la maladie, indépendamment de tout traitement, tandis qu'un marqueur prédictif informe sur la probabilité de réponse à une thérapeutique donnée. Cependant, il est actuellement difficile de valider un marqueur pronostic strict, car son étude devrait être réalisée en dehors de tout traitement. D'autre part, il apparaît que certains marqueurs peuvent être à la fois prédictifs et pronostics. C'est le cas par exemple de l'amplification d'HER-2 dans le cancer du sein qui est un facteur de mauvais pronostic, mais également est un marqueur de bonne réponse au trastuzumab. Les données de l'étude de Dorad *et al* suggèrent que le taux d'expression HSP110 Δ E9 / HSP110 est à la fois un marqueur de bon pronostic et un marqueur de bonne réponse à la chimiothérapie.

Il a été montré, qu'en plus de conférer une thermo-tolérance aux cellules,^{75, 146} les protéines de stress peuvent inhiber l'apoptose induite par de nombreux facteurs de stress. Les mécanismes de prévention de l'apoptose par les HSP ne sont pas totalement élucidés, mais les différentes études suggèrent que les protéines de choc thermique agissent en amont de l'activation des caspases, avec notamment des interactions avec le facteur pro-apoptotique BAX ou le cytochrome c.^{147, 148} Yamagishi *et al* ont mis en évidence la fonction anti-apoptotique d'HSP110 dans des modèles cellulaires soumis à un stress avec de l'eau oxygénée ou de la staurosporine.^{149, 150} Dans les deux cas, il apparaît qu'en prévenant la libération du cytochrome c, HSP110 inhibe l'activation des caspases 3 et 9. Les auteurs suggèrent qu'HSP110 agit à plusieurs niveaux et notamment au niveau de BAX et de la voie de MAP kinases. Dans les cancers colorectaux, les études suggèrent que c'est en participant à l'inhibition de l'apoptose dans les cellules cancéreuses que les HSP favorisent le développement tumoral. Dans leur travail, Hwang *et al* montrent, dans des lignées cellulaires de cancers colorectaux, que l'expression d'HSP110 est fortement augmentée dans les lignées

à fort potentiel métastatique comparée aux lignées à faible pouvoir métastatique.⁷⁹ Ces résultats sont retrouvés *in vivo* avec une expression d'HSP110 corrélée au stade tumoral dans les cancers colorectaux.^{79, 80} Ainsi, il semblerait qu'une surexpression d'HSP110 soit un facteur de mauvais pronostic dans le cancer colorectal, mais également dans d'autres tumeurs solides.¹¹⁶ Dans les cancers colorectaux MSI, il apparaît que la mutation du microsatellite T17 d'*HSP110* conduit à la formation d'une protéine tronquée.⁸³ L'excision de l'exon 9 entraîne la perte de la partie C-terminale de la protéine et par conséquent du domaine de liaison au substrat, des signaux d'export et de localisation nucléaire. HSP110ΔE9 contient uniquement le domaine de liaison à l'ATP. L'absence de site de fixation du substrat est à l'origine de l'absence d'activité chaperonne propre de la protéine tronquée. Par ailleurs, Dorard *et al* constatent qu'HSP110ΔE9 possède un effet dominant négatif sur la protéine sauvage. En effet, HSP110ΔE9 a la capacité de s'associer à HSP110 empêchant à la fois sa translocation nucléaire et son interaction avec d'autres protéines chaperonnes telles que HSP27 et HSP70. Dans les lignées cellulaires, les auteurs ont montré que la présence d'HSP110ΔE9 était associée à une activation de la voie des caspases, et donc l'induction de l'apoptose. L'effet pro-apoptotique de la protéine tronquée a été confirmé dans des modèles de xéno greffe, avec un développement tumoral moins agressif en présence de la protéine tronquée. Les auteurs suggèrent que le ratio d'HSP110ΔE9 / HSP110 serait par conséquent un marqueur de bon pronostic. *In vivo*, ils confirment en partie ces résultats, avec une survie plus longue chez les patients présentant une tumeur de stade III quand l'expression d'HSP110ΔE9 / HSP110 est supérieure à 75% (p = 0,004). Par contre, ils n'observent pas de différence significative en ce qui concerne les tumeurs de stade II. Nous avons confirmé que l'expression d'HSP110ΔE9 / HSP110 était corrélée à la taille de la délétion du T17 et avons étudié l'influence de celle-ci sur la survie des patients présentant une tumeur MSI. Tous stades au diagnostic confondus, on constate que lorsque la taille de la délétion du T17 est supérieure à 4 pb, la survie des patients est moins importante que pour les petites délétions, mais la différence entre les deux groupes n'est pas significative. On obtient le même type de résultats si on analyse séparément les patients en fonction du stade tumoral au diagnostic (II ou III). Ces résultats suggèrent qu'une grande délétion du T17 d'HSP110 et par conséquent une forte expression d'HSP110ΔE9, est plutôt un facteur de mauvais pronostic, ce qui va à l'encontre des résultats de l'étude princeps. On notera cependant que la grande majorité des patients avait bénéficié d'un traitement par chirurgie et/ou radiothérapie et/ou chimiothérapie, donc on ne peut pas exclure un biais à ce niveau. Dans une étude récente, Markovic *et al* montrent que les grandes délétions d'HSP110 sont souvent associées à la mutation *BRAF* V600E

($p = 0,029$).¹⁰² Or plusieurs études ont mis en évidence que *BRAF* était un marqueur de mauvais pronostic dans les tumeurs colorectales.^{126, 151} Les auteurs émettent donc l'hypothèse que les grandes délétions du T17 d'HSP110 sont plutôt associées à un mauvais pronostic, ce qui pourrait expliquer nos résultats. Cependant, notre étude ne retrouve pas de différence de taille de la délétion du T17 en fonction du statut *BRAF*. Par ailleurs, on n'observe pas de différence significative quant à la survie des patients en fonction du statut *BRAF* (données non présentées, $p = 0,2$), même s'il semble que celle-ci soit légèrement supérieure quand *BRAF* est sauvage. Le seul marqueur pronostic que nous retrouvons dans notre étude est le stade au diagnostic ($p = 0,01$) avec une survie d'autant plus faible que le stade au diagnostic est élevé. Dans la première partie de l'étude nous avons montré qu'il n'existait pas de relation entre la taille de la délétion du T17 et le stade tumoral au diagnostic, celui-ci ne permet donc pas d'expliquer nos données de survie. Par contre, Benatti *et al* ont montré que les patients avec un syndrome de Lynch présentaient un meilleur pronostic que ceux avec une tumeur MSI d'origine sporadique.¹³⁰ Or nous avons montré que la taille de la délétion du T17 d'HSP110 était en partie conditionnée par l'origine du déficit du MMR. Il est donc possible que ce soit l'origine sporadique ou héréditaire qui influe sur le pronostic et non le ratio d'HSP110 Δ E9 / HSP110. Il faudrait donc stratifier nos données de survie en fonction de l'origine du déficit pour évaluer si pour un même type de déficit, le ratio d'HSP110 Δ E9 / HSP110 a une influence sur la survie.

Les protéines de choc thermique étant généralement surexprimées dans les cancers, leur impact sur la résistance aux molécules de chimiothérapie a déjà été étudié. La majorité des études portent sur HSP27 et HSP70, et on ne retrouve pas de travaux sur HSP110. Les données des différents travaux sont relativement concordantes, et montrent que l'augmentation de l'expression des HSP est associée en général à une résistance aux molécules de chimiothérapie. En 2007, Choi *et al* ont étudié HSP27 dans des lignées cellulaires de cancers colorectaux traitées par irinotécan.¹⁵² Ils observent une expression d'HSP27 plus importante dans les cellules résistantes à l'irinotécan que dans les cellules sensibles. Plus récemment, l'équipe de Nakamura a mis en évidence un résultat similaire dans des cellules de cancer pancréatiques traitées par gemcitabine.¹⁵³ L'augmentation d'HSP27 a également été associée à une moindre sensibilité au 5-FU dans des lignées cellulaires de cancers colorectaux. Il apparaît que la CI50 du 5-FU est 10 fois supérieure dans les lignées cellulaires de CCR sur-exprimant HSP27, que dans celles l'exprimant à un taux normal. Grivicich *et al*, ont également montré que l'accumulation d'HSP70 protégeait les cellules de l'apoptose induite par un traitement à base de 5-FU.¹⁵⁴ Dans cette étude, les auteurs suggèrent

que c'est le traitement par 5-FU qui est à l'origine de l'induction de l'expression d'HSP70. Ainsi, la capacité d'une cellule à induire l'expression des HSP peut également être un moyen de résistance aux molécules anti-cancéreuses. Les études portant sur l'inhibition des HSP, confirment leur rôle protecteur contre la chimiothérapie. Mc Namara *et al* montrent que l'inhibition d'HSP90 est à l'origine d'une augmentation de l'apoptose en diminuant l'expression de Bcl-2, et sensibilise les cellules aux inhibiteurs de topo-isomérase.¹⁵⁵ Certains travaux montrent également l'efficacité anti-tumorale propre des inhibiteurs de HSP dans des tumeurs solides^{156, 157} et dans des hémopathies malignes.^{158, 159} La plupart des études s'accordent à dire que le mécanisme de résistance aux molécules de chimiothérapie associé à la surexpression d'HSP est un mécanisme aspécifique. Ils évoquent que cette diminution de sensibilité des cellules tumorales résulte principalement d'une inhibition de l'apoptose, avec notamment une diminution de l'activité des caspases. *In vitro*, Dorard *et al*, ont montré qu'HSP110ΔE9 inhibait les fonctions d'HSP110. Ils observent que, de manière générale, l'expression du variant tronqué d'HSP110 est associée à une augmentation de l'apoptose, avec une augmentation du clivage de la protéine PARP d'autant plus importante que l'expression d'HSP110ΔE9 est élevée.⁸³ Il apparaît que ce phénomène est amplifié lors des traitements par 5-FU ou oxaliplatine. L'inhibition d'HSP110 est donc bien à l'origine d'une augmentation de la sensibilité des cellules aux molécules de chimiothérapie. La même équipe a étudié la pertinence clinique du taux d'expression d'HSP110ΔE9 / HSP110 chez 28 patients présentant un CCR de stade II ou III, et traités par chimiothérapie. Ils observent une survie sans récurrence plus grande chez les patients présentant une expression d'HSP110ΔE9 / HSP110 supérieure à 75% (HSP110ΔE9-H), et concluent que ce ratio est un marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie. Cependant, ces résultats sont à nuancer car il s'agit d'une étude rétrospective réalisée sur seulement 28 patients (12 HSP110ΔE9-H et 16 HSP110ΔE9-L) dont 86% présentaient une tumeur de stade III. Les résultats seraient donc à confirmer pour les autres stades tumoraux. D'autre part, il apparaît que les patients ont bénéficié de protocoles de chimiothérapie différents : 16 FOLFOX, 9 LV5FU2 et 3 XELOX + bevacizumab. Dans le groupe exprimant fortement HSP110ΔE9, deux tiers des patients ont été traités selon le protocole FOLFOX, contre seulement 50% des patients dans le groupe HSP110ΔE9-L. L'influence d'HSP110ΔE9 / HSP110 en fonction du type de chimiothérapie n'a pas été explorée, probablement à cause des faibles effectifs dans chaque groupe. Malheureusement, nous n'avons pas pu étudier le caractère prédictif d'HSP110ΔE9-H initialement prévu dans notre travail. En effet, dans notre population de patients présentant un CCRm, sur les 6 patients présentant une tumeur MSI, un seul individu présentait une forte

expression d'HSP110 Δ E9, ce qui ne permettait pas de réaliser une analyse de survie. Dans la deuxième population de patients, l'hétérogénéité des traitements reçus par les patients, que ce soit en terme de chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie, rendait impossible l'étude de la réponse à la chimiothérapie en fonction de l'expression d'HSP110 Δ E9.

6 Conclusion et perspectives

L'étude du microsatellite T17 de l'intron 8 d'HSP110, à l'aide d'une technique simple associant la PCR et l'analyse de fragment, n'a pas mis en évidence un polymorphisme important entre les différents patients, soulignant l'intérêt probable de cette répétition se trouvant pourtant dans une région non codante. Au niveau tumoral, nous confirmons l'absence de délétion du T17 d'HSP110 chez les patients présentant un CCR MSS, même pour des stades avancés. Par contre, on ne retrouve pas systématiquement de délétion du T17 dans les tumeurs affichant un déficit du MMR, ce qui contraste avec les résultats de l'étude princeps. Les données obtenues suggèrent que la taille de la délétion est indépendante du stade tumoral, mais est influencée par le type de protéine du MMR déficitaire. Pour compléter ces résultats, il serait intéressant de différencier au sein du groupe présentant un déficit de MLH1, ceux présentant une inactivation épigénétique du gène de ceux présentant une mutation héréditaire de *MLH1*, pour voir s'il existe une différence. On observe que la délétion du T17 de l'intron 8 d'HSP110, quelle que soit sa taille, est à l'origine d'une anomalie d'épissage, et conduit à l'obtention d'une protéine tronquée HSP110ΔE9. L'expression du variant tronqué d'HSP110 est variable en fonction des patients, et nous constatons, à la fois dans les lignées cellulaires et les tumeurs, que plus la délétion est grande, et plus le ratio HSP110ΔE9 / HSP110 est élevé. En ce qui concerne les analyses de survie, on n'observe pas de différence entre les patients avec CCRm MSI et ceux avec un CCRm MSS, même s'il semble qu'un système du MMR efficace soit de meilleur pronostic dans notre population. Cette observation est en accord avec les conclusions de la littérature qui montrent que contrairement aux tumeurs moins avancées, le phénotype MSI est associé à une moins bonne survie chez les patients métastatiques. D'autre part, le ratio HSP110ΔE9 / HSP110 élevé était décrit comme un marqueur de bon pronostic, et nous ne confirmons pas ce résultat. Les données de notre travail suggèrent même l'effet inverse avec une meilleure survie chez les patients exprimant peu HSP110ΔE9. Enfin, nous n'observons pas de différence de réponse à la chimiothérapie selon le protocole FOLFIRI-CETUX entre les patients avec une tumeur MSI et ceux présentant une tumeur MSS. Malheureusement, compte tenu des faibles effectifs ou de l'hétérogénéité des données, il nous a été impossible d'évaluer l'influence du ratio HSP110ΔE9 / HSP110 sur la réponse à la chimiothérapie.

Les résultats de notre travail nuancent les conclusions affichées par la première étude, et incitent à la réalisation d'études complémentaires. Sur le plan fondamental, il serait nécessaire de déterminer les mécanismes de régulation de l'expression d'HSP110ΔE9, avec notamment

l'influence de l'origine de l'instabilité microsatellite, mais également de préciser son action au niveau cellulaire et expliciter la manière dont il influe sur la pharmacologie des différentes molécules de chimiothérapie. Par ailleurs, il faudrait valider la pertinence clinique du ratio HSP110 Δ E9 / HSP110 en tant que marqueur pronostic et/ou prédictif de réponse à la chimiothérapie à base de 5-FU dans le cancer colorectal. Il faudrait envisager la réalisation d'une étude clinique prospective pour étudier l'efficacité de différents protocoles de chimiothérapie en fonction des caractéristiques du patient et de la tumeur (statut MSI/MSS, origine de l'instabilité microsatellite, taux d'expression de HSP110 Δ E9). Enfin, on doit envisager l'inhibition d'HSP110 comme un nouvel axe de recherche pharmacologique pour la potentialisation de la chimiothérapie dans le cancer du côlon. Actuellement, de nombreuses études précliniques et cliniques évaluent l'efficacité d'inhibiteurs des HSP dans le traitement de certains cancers, notamment ciblant HSP27 et HSP90.¹⁶⁰ Il semble que l'inhibition d'HSP110 par HSP110 Δ E9 augmente la sensibilité des cellules à la chimiothérapie. Plusieurs axes de recherche peuvent être envisagés : stimulation de l'expression d'HSP110 Δ E9 au détriment d'HSP110 dans les cellules MSI, et recherche d'autres inhibiteurs d'HSP110 pouvant potentialiser la chimiothérapie dans les cellules MSS.

Bibliographie

1. Cancer, I.A.f.R.o. *Colorectal Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008*. 2010 (2013/06/01); Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>.
2. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012*. Eur J Cancer, 2013. **49**(6): p. 1374-403.
3. Hagggar, F.A. and R.P. Boushey, *Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors*. Clin Colon Rectal Surg, 2009. **22**(4): p. 191-7.
4. *La situation du cancer en France en 2012, Ouvrage collectif, INCA*. Collection état des lieux et des connaissances. 2012, p.61-69:
5. Markowitz, S.D. and M.M. Bertagnolli, *Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(25): p. 2449-60.
6. Al-Sohaily, S., et al., *Molecular pathways in colorectal cancer*. J Gastroenterol Hepatol, 2012. **27**(9): p. 1423-31.
7. Issa, J.P., *CpG island methylator phenotype in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(12): p. 988-93.
8. Hughes, L.A., et al., *The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1825**(1): p. 77-85.
9. Kunkel, T.A., *DNA replication fidelity*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 16895-8.
10. Kunkel, T.A. and D.A. Erie, *DNA mismatch repair*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 681-710.
11. Kolas, N.K. and P.E. Cohen, *Novel and diverse functions of the DNA mismatch repair family in mammalian meiosis and recombination*. Cytogenet Genome Res, 2004. **107**(3-4): p. 216-31.
12. Peled, J.U., et al., *The biochemistry of somatic hypermutation*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 481-511.
13. Tian, L., L. Gu, and G.M. Li, *Distinct nucleotide binding/hydrolysis properties and molar ratio of MutSalpha and MutSbeta determine their differential mismatch binding activities*. J Biol Chem, 2009. **284**(17): p. 11557-62.
14. Marra, G., et al., *Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the MSH3 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8568-73.
15. Kantelinen, J., et al., *MutSbeta exceeds MutSalpha in dinucleotide loop repair*. Br J Cancer, 2010. **102**(6): p. 1068-73.
16. Genschel, J., et al., *Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha*. J Biol Chem, 1998. **273**(31): p. 19895-901.
17. Hsieh, P. and K. Yamane, *DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing*. Mech Ageing Dev, 2008. **129**(7-8): p. 391-407.
18. Giannini, G., et al., *Mutations of an intronic repeat induce impaired MRE11 expression in primary human cancer with microsatellite instability*. Oncogene, 2004. **23**(15): p. 2640-7.
19. Hugo, H., et al., *Mutations in the MYB intron 1 regulatory sequence increase transcription in colon cancers*. Genes Chromosomes Cancer, 2006. **45**(12): p. 1143-54.
20. Hamelin, R., et al., *[Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers]*. Bull Cancer, 2008. **95**(1): p. 121-32.
21. Zaanan, A., et al., *Microsatellite instability in colorectal cancer: from molecular oncogenic mechanisms to clinical implications*. Cell Oncol (Dordr), 2011. **34**(3): p. 155-76.
22. Woerner, S.M., et al., *SeITarbase, a database of human mononucleotide-microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D682-9.
23. Ionov, Y., et al., *Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis*. Nature, 1993. **363**(6429): p. 558-61.
24. Shah, S.N., S.E. Hile, and K.A. Eckert, *Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes*. Cancer Res, 2010. **70**(2): p. 431-5.

25. Shaw, J.A., *et al.*, *Microsatellite instability in early sporadic breast cancer*. *Br J Cancer*, 1996. **73**(11): p. 1393-7.
26. Duval, A., *et al.*, *The mutator pathway is a feature of immunodeficiency-related lymphomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(14): p. 5002-7.
27. Peltomaki, P. and H. Vasen, *Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database*. *Dis Markers*, 2004. **20**(4-5): p. 269-76.
28. Discipline of Genetics, F.o.M., Memorial University of Newfoundland. *Mismatch repair genes variant database*. 2007 15/062013]; Available from: <http://www.med.mun.ca/MMRvariants/statistics.aspx>.
29. Ponti, G. and M. Ponz de Leon, *Muir-Torre syndrome*. *Lancet Oncol*, 2005. **6**(12): p. 980-7.
30. Lebrun, C., *et al.*, *Turcot syndrome confirmed with molecular analysis*. *Eur J Neurol*, 2007. **14**(4): p. 470-2.
31. Bonadona, V., *et al.*, *Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome*. *JAMA*, 2011. **305**(22): p. 2304-10.
32. Vasen, H.F., *et al.*, *New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC*. *Gastroenterology*, 1999. **116**(6): p. 1453-6.
33. Cunningham, J.M., *et al.*, *Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability*. *Cancer Res*, 1998. **58**(15): p. 3455-60.
34. Deng, G., *et al.*, *BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(1 Pt 1): p. 191-5.
35. Levine, A.J., *et al.*, *Cancer risks for the relatives of colorectal cancer cases with a methylated MLH1 promoter region: data from the Colorectal Cancer Family Registry*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2012. **5**(2): p. 328-35.
36. Lin, C.C., *et al.*, *Clinicopathologic features and prognostic analysis of MSI-high colon cancer*. *Int J Colorectal Dis*, 2012. **27**(3): p. 277-86.
37. Corso, G., *et al.*, *Oncogenic mutations and microsatellite instability phenotype predict specific anatomical subsite in colorectal cancer patients*. *Eur J Hum Genet*, 2013.
38. Fleming, M., *et al.*, *Colorectal carcinoma: Pathologic aspects*. *J Gastrointest Oncol*, 2012. **3**(3): p. 153-73.
39. McGregor, D.K., *et al.*, *Reduced expression of cytokeratin 20 in colorectal carcinomas with high levels of microsatellite instability*. *Am J Surg Pathol*, 2004. **28**(6): p. 712-8.
40. Takemoto, N., *et al.*, *The correlation of microsatellite instability and tumor-infiltrating lymphocytes in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) and sporadic colorectal cancers: the significance of different types of lymphocyte infiltration*. *Jpn J Clin Oncol*, 2004. **34**(2): p. 90-8.
41. Phillips, S.M., *et al.*, *Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic*. *Br J Surg*, 2004. **91**(4): p. 469-75.
42. Ribic, C.M., *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**(3): p. 247-57.
43. Popat, S., R. Hubner, and R.S. Houlston, *Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(3): p. 609-18.
44. Hong, S.P., *et al.*, *The differential impact of microsatellite instability as a marker of prognosis and tumour response between colon cancer and rectal cancer*. *Eur J Cancer*, 2012. **48**(8): p. 1235-43.
45. Boland, C.R., *et al.*, *A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer*. *Cancer Res*, 1998. **58**(22): p. 5248-57.

46. Umar, A., et al., *Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(4): p. 261-8.
47. *Chirurgie prophylactique des cancers avec prédisposition génétique, Ouvrage collectif, INCA*. Collection recommandations et référentiels, 2009.
48. Suraweera, N., et al., *Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR*. Gastroenterology, 2002. **123**(6): p. 1804-11.
49. Fink, D., et al., *The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance*. Cancer Res, 1996. **56**(21): p. 4881-6.
50. Heggie, G.D., et al., *Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile*. Cancer Res, 1987. **47**(8): p. 2203-6.
51. van Kuilenburg, A.B., et al., *Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(5): p. 1149-53.
52. Morel, A., et al., *Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(11): p. 2895-904.
53. Boisdron-Celle, M., et al., *5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency*. Cancer Lett, 2007. **249**(2): p. 271-82.
54. Armstrong, R.D., et al., *Acute effect of 5-fluorouracil on cytoplasmic and nuclear dihydrofolate reductase messenger RNA metabolism*. J Biol Chem, 1986. **261**(16): p. 7366-71.
55. Major, P.P., et al., *5-Fluorouracil incorporation in DNA of human breast carcinoma cells*. Cancer Res, 1982. **42**(8): p. 3005-9.
56. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 330-8.
57. Carethers, J.M., et al., *Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil*. Gastroenterology, 1999. **117**(1): p. 123-31.
58. Tajima, A., et al., *The mismatch repair complex hMutS alpha recognizes 5-fluorouracil-modified DNA: implications for chemosensitivity and resistance*. Gastroenterology, 2004. **127**(6): p. 1678-84.
59. Tajima, A., et al., *Both hMutSalpha and hMutSss DNA mismatch repair complexes participate in 5-fluorouracil cytotoxicity*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28117.
60. Meyers, M., et al., *Role of the hMLH1 DNA mismatch repair protein in fluoropyrimidine-mediated cell death and cell cycle responses*. Cancer Res, 2001. **61**(13): p. 5193-201.
61. Arnold, C.N., A. Goel, and C.R. Boland, *Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines*. Int J Cancer, 2003. **106**(1): p. 66-73.
62. Park, J.M., et al., *MSH3 Mismatch Repair Protein Regulates Sensitivity to Cytotoxic Drugs and a Histone Deacetylase Inhibitor in Human Colon Carcinoma Cells*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e65369.
63. Bertagnolli, M.M., 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): p. 1814-21.
64. Des Guetz, G., et al., *Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis*. Eur J Cancer, 2009. **45**(10): p. 1890-6.
65. Jover, R., et al., *The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status*. Eur J Cancer, 2009. **45**(3): p. 365-73.
66. Sargent, D.J., 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**(20): p. 3219-26.

67. An, J.Y., et al., *Microsatellite instability in sporadic gastric cancer: its prognostic role and guidance for 5-FU based chemotherapy after R0 resection*. *Int J Cancer*, 2012. **131**(2): p. 505-11.
68. Guastadisegni, C., et al., *Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data*. *Eur J Cancer*, 2010. **46**(15): p. 2788-98.
69. Des Guetz, G., et al., *Prognostic impact of microsatellite instability in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX*. *Anticancer Res*, 2010. **30**(10): p. 4297-301.
70. Kim, S.T., et al., *Clinical impact of microsatellite instability in colon cancer following adjuvant FOLFOX therapy*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010. **66**(4): p. 659-67.
71. Benson, A.B., 3rd, et al., *NCCN Clinical practice guidelines in oncology : Colon Cancer*. National comprehensive network, 2013. **Version 3.2013**: p. 120.
72. Wirth, D., et al., *Les protéines de choc thermique : classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques*. *Ann med vet*, 2002. **146**: p. 15.
73. Oh, H.J., et al., *The chaperoning activity of hsp110. Identification of functional domains by use of targeted deletions*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(22): p. 15712-8.
74. Yamagishi, N., et al., *Characterization of stress sensitivity and chaperone activity of Hsp105 in mammalian cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **409**(1): p. 90-5.
75. Oh, H.J., X. Chen, and J.R. Subjeck, *Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(50): p. 31636-40.
76. Foster, C.S., et al., *Hsp-27 expression at diagnosis predicts poor clinical outcome in prostate cancer independent of ETS-gene rearrangement*. *Br J Cancer*, 2009. **101**(7): p. 1137-44.
77. Pick, E., et al., *High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(7): p. 2932-7.
78. Hsu, P.L. and S.M. Hsu, *Abundance of heat shock proteins (hsp89, hsp60, and hsp27) in malignant cells of Hodgkin's disease*. *Cancer Res*, 1998. **58**(23): p. 5507-13.
79. Hwang, T.S., et al., *Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003. **18**(6): p. 690-700.
80. Slaby, O., et al., *Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression*. *Oncol Rep*, 2009. **21**(5): p. 1235-41.
81. Tweedle, E.M., et al., *Low molecular weight heat shock protein HSP27 is a prognostic indicator in rectal cancer but not colon cancer*. *Gut*, 2010. **59**(11): p. 1501-10.
82. Calderwood, S.K., et al., *Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis*. *Trends Biochem Sci*, 2006. **31**(3): p. 164-72.
83. Dorard, C., et al., *Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis*. *Nat Med*, 2011. **17**(10): p. 1283-9.
84. Sanders, H.R., et al., *Exon scanning by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of known and novel EML4-ALK fusion variants in non-small cell lung cancer*. *Cancer Genet*, 2011. **204**(1): p. 45-52.
85. Eisenhauer, E.A., et al., *New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)*. *Eur J Cancer*, 2009. **45**(2): p. 228-47.
86. Levinson, G. and G.A. Gutman, *Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution*. *Mol Biol Evol*, 1987. **4**(3): p. 203-21.
87. Weber, J.L. and C. Wong, *Mutation of human short tandem repeats*. *Hum Mol Genet*, 1993. **2**(8): p. 1123-8.
88. Payseur, B.A., P. Jing, and R.J. Haasl, *A genomic portrait of human microsatellite variation*. *Mol Biol Evol*, 2011. **28**(1): p. 303-12.
89. Metzgar, D., J. Bytof, and C. Wills, *Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA*. *Genome Res*, 2000. **10**(1): p. 72-80.
90. Ashley, M.V. and B.D. Dow, *The use of microsatellite analysis in population biology: background, methods and potential applications*. *EXS*, 1994. **69**: p. 185-201.

91. Will, C.L. and R. Luhrmann, *Spliceosome structure and function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(7).
92. Gao, K., *et al.*, *Human branch point consensus sequence is yUnAy*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(7): p. 2257-67.
93. Koopman, M., *et al.*, *Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer*. Br J Cancer, 2009. **100**(2): p. 266-73.
94. Peltomaki, P., *Lynch syndrome genes*. Fam Cancer, 2005. **4**(3): p. 227-32.
95. Koinuma, K., *et al.*, *Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas*. Int J Cancer, 2004. **108**(2): p. 237-42.
96. Loughrey, M.B., *et al.*, *Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer*. Fam Cancer, 2007. **6**(3): p. 301-10.
97. Yashiro, M., K. Hirakawa, and C.R. Boland, *Mutations in TGFbeta-RII and BAX mediate tumor progression in the later stages of colorectal cancer with microsatellite instability*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 303.
98. Sangar, F., *et al.*, *Involvement of small ArfGAP1 (SMAP1), a novel Arf6-specific GTPase-activating protein, in microsatellite instability oncogenesis*. Oncogene, 2013.
99. de Leeuw, W.J., *et al.*, *Bias in detection of instability of the (C)8 mononucleotide repeat of MSH6 in tumours from HNPCC patients*. Oncogene, 2001. **20**(43): p. 6241-4.
100. Lu, Y., T.D. Soong, and O. Elemento, *A novel approach for characterizing microsatellite instability in cancer cells*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63056.
101. Boyer, J.C., *et al.*, *Sequence dependent instability of mononucleotide microsatellites in cultured mismatch repair proficient and deficient mammalian cells*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(6): p. 707-13.
102. Markovic, S., *et al.*, *Microsatellite instability affecting the T17 repeats in intron 8 of HSP110, as well as five mononucleotide repeats in patients with colorectal carcinoma*. Biomark Med, 2013. **7**(4): p. 613-21.
103. Duval, A., *et al.*, *Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(5): p. 513-8.
104. Woerner, S.M., *et al.*, *Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes*. Oncogene, 2003. **22**(15): p. 2226-35.
105. Pedroni, M., *et al.*, *Microsatellite instability and mismatch-repair protein expression in hereditary and sporadic colorectal carcinogenesis*. Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 896-9.
106. Parc, Y.R., *et al.*, *HMSH6 alterations in patients with microsatellite instability-low colorectal cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(8): p. 2225-31.
107. Wu, Y., *et al.*, *Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(5): p. 1291-8.
108. Ejima, Y., L. Yang, and M.S. Sasaki, *Aberrant splicing of the ATM gene associated with shortening of the intronic mononucleotide tract in human colon tumor cell lines: a novel mutation target of microsatellite instability*. Int J Cancer, 2000. **86**(2): p. 262-8.
109. Ottini, L., *et al.*, *MRE11 expression is impaired in gastric cancer with microsatellite instability*. Carcinogenesis, 2004. **25**(12): p. 2337-43.
110. Takenoshita, S., *et al.*, *Mutation analysis of the Smad2 gene in human colon cancers using genomic DNA and intron primers*. Carcinogenesis, 1998. **19**(5): p. 803-7.
111. Van de Water, N.S., *et al.*, *Factor IX polypyrimidine tract mutation analysis using mRNA from peripheral blood leukocytes*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(11): p. 2073-5.
112. Hildebrand, M.S., *et al.*, *A novel splice site mutation in EYA4 causes DFNA10 hearing loss*. Am J Med Genet A, 2007. **143A**(14): p. 1599-604.
113. Yu, C., *et al.*, *A 3-nucleotide deletion in the polypyrimidine tract of intron 7 of the DFNA5 gene causes nonsyndromic hearing impairment in a Chinese family*. Genomics, 2003. **82**(5): p. 575-9.

114. Giannini, G., *et al.*, *Human MRE11 is inactivated in mismatch repair-deficient cancers*. EMBO Rep, 2002. **3**(3): p. 248-54.
115. Chu, C.S., *et al.*, *Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA*. Nat Genet, 1993. **3**(2): p. 151-6.
116. Kai, M., *et al.*, *Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors*. Oncol Rep, 2003. **10**(6): p. 1777-82.
117. Thompson, M.A., *et al.*, *Microsatellite deletions in the c-myc transcriptional attenuator region associated with over-expression in colon tumour cell lines*. Oncogene, 1997. **14**(14): p. 1715-23.
118. Paun, B.C., *et al.*, *Screening for microsatellite instability identifies frequent 3'-untranslated region mutation of the RB1-inducible coiled-coil 1 gene in colon tumors*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7715.
119. Jover, R., *et al.*, *Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer*. Gut, 2006. **55**(6): p. 848-55.
120. Carethers, J.M., *et al.*, *Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 394-401.
121. Malesci, A., *et al.*, *Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(13): p. 3831-9.
122. Kakar, S., *et al.*, *Mucinous carcinoma of the colon: correlation of loss of mismatch repair enzymes with clinicopathologic features and survival*. Mod Pathol, 2004. **17**(6): p. 696-700.
123. Ogino, S., *et al.*, *CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer*. Gut, 2009. **58**(1): p. 90-6.
124. Jensen, S.A., *et al.*, *Microsatellite instability in colorectal cancer and association with thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 25.
125. Smith, C.G., *et al.*, *Somatic profiling of the epidermal growth factor receptor pathway in tumors from patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy {+/-} cetuximab*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(15): p. 4104-13.
126. Tran, B., *et al.*, *Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer*. Cancer, 2011. **117**(20): p. 4623-32.
127. Liang, J.T., *et al.*, *High-frequency microsatellite instability predicts better chemosensitivity to high-dose 5-fluorouracil plus leucovorin chemotherapy for stage IV sporadic colorectal cancer after palliative bowel resection*. Int J Cancer, 2002. **101**(6): p. 519-25.
128. Gryfe, R., *et al.*, *Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer*. N Engl J Med, 2000. **342**(2): p. 69-77.
129. Ogino, S., *et al.*, *Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: results from intergroup trial CALGB 89803*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(3): p. 890-900.
130. Benatti, P., *et al.*, *Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(23): p. 8332-40.
131. Kim, J.E., *et al.*, *Association between deficient mismatch repair system and efficacy to irinotecan-containing chemotherapy in metastatic colon cancer*. Cancer Sci, 2011. **102**(9): p. 1706-11.
132. Kim, S.T., *et al.*, *The effect of DNA mismatch repair (MMR) status on oxaliplatin-based first-line chemotherapy as in recurrent or metastatic colon cancer*. Med Oncol, 2010. **27**(4): p. 1277-85.
133. Brueckl, W.M., *et al.*, *Relationship between microsatellite instability, response and survival in palliative patients with colorectal cancer undergoing first-line chemotherapy*. Anticancer Res, 2003. **23**(2C): p. 1773-7.
134. Muller, C.I., *et al.*, *Predictive and prognostic value of microsatellite instability in patients with advanced colorectal cancer treated with a fluoropyrimidine and oxaliplatin containing first-*

- line chemotherapy. A report of the AIO Colorectal Study Group. *Int J Colorectal Dis*, 2008. **23**(11): p. 1033-9.
135. des Guetz, G., et al., *Microsatellite instability and sensitivity to FOLFOX treatment in metastatic colorectal cancer*. *Anticancer Res*, 2007. **27**(4C): p. 2715-9.
 136. Ricciardiello, L., et al., *High thymidylate synthase expression in colorectal cancer with microsatellite instability: implications for chemotherapeutic strategies*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(11): p. 4234-40.
 137. Jacob, S., et al., *The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(17): p. 6555-62.
 138. Vilar, E., et al., *Microsatellite instability due to hMLH1 deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines*. *Br J Cancer*, 2008. **99**(10): p. 1607-12.
 139. Bras-Goncalves, R.A., et al., *Sensitivity to CPT-11 of xenografted human colorectal cancers as a function of microsatellite instability and p53 status*. *Br J Cancer*, 2000. **82**(4): p. 913-23.
 140. Fallik, D., et al., *[Response of metastatic colorectal cancers to treatment with CPT11 (irinotecan): implications of the mismatched base repair system]*. *Gastroenterol Clin Biol*, 2000. **24**(10): p. 917-22.
 141. Fallik, D., et al., *Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer*. *Cancer Res*, 2003. **63**(18): p. 5738-44.
 142. Ando, Y., et al., *Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis*. *Cancer Res*, 2000. **60**(24): p. 6921-6.
 143. Di Nicolantonio, F., et al., *Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(35): p. 5705-12.
 144. Xu, Q., 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**(8): p. 409-16.
 145. Baranovskaya, S., et al., *Down-regulation of epidermal growth factor receptor by selective expansion of a 5'-end regulatory dinucleotide repeat in colon cancer with microsatellite instability*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(14): p. 4531-7.
 146. Parsell, D.A., J. Taulien, and S. Lindquist, *The role of heat-shock proteins in thermotolerance*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1993. **339**(1289): p. 279-85; discussion 85-6.
 147. Garrido, C., et al., *HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9*. *FASEB J*, 1999. **13**(14): p. 2061-70.
 148. Gupta, S. and A.A. Knowlton, *Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis*. *Circulation*, 2002. **106**(21): p. 2727-33.
 149. Yamagishi, N., Y. Saito, and T. Hatayama, *Mammalian 105 kDa heat shock family proteins suppress hydrogen peroxide-induced apoptosis through a p38 MAPK-dependent mitochondrial pathway in HeLa cells*. *FEBS J*, 2008. **275**(18): p. 4558-70.
 150. Yamagishi, N., et al., *Hsp105 family proteins suppress staurosporine-induced apoptosis by inhibiting the translocation of Bax to mitochondria in HeLa cells*. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(17): p. 3215-23.
 151. Lochhead, P., et al., *Microsatellite Instability and BRAF Mutation Testing in Colorectal Cancer Prognostication*. *J Natl Cancer Inst*, 2013. **105**(15): p. 1151-6.
 152. Choi, D.H., et al., *Heat shock protein 27 is associated with irinotecan resistance in human colorectal cancer cells*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(8): p. 1649-56.
 153. Kuramitsu, Y., et al., *Heat-shock protein 27 plays the key role in gemcitabine-resistance of pancreatic cancer cells*. *Anticancer Res*, 2012. **32**(6): p. 2295-9.
 154. Grivicich, I., et al., *Hsp70 response to 5-fluorouracil treatment in human colon cancer cell lines*. *Int J Colorectal Dis*, 2007. **22**(10): p. 1201-8.

155. McNamara, A.V., et al., *Hsp90 inhibitors sensitise human colon cancer cells to topoisomerase I poisons by depletion of key anti-apoptotic and cell cycle checkpoint proteins*. *Biochem Pharmacol*, 2012. **83**(3): p. 355-67.
156. Mehta, P.P., et al., *Effective targeting of triple-negative breast cancer cells by PF-4942847, a novel oral inhibitor of Hsp 90*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(16): p. 5432-42.
157. Lu, C., et al., *Inhibition of gastric tumor growth by a novel Hsp90 inhibitor*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **85**(9): p. 1246-56.
158. Reikvam, H., et al., *Increased antileukemic effects in human acute myeloid leukemia by combining HSP70 and HSP90 inhibitors*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2013. **22**(5): p. 551-63.
159. Tavernier, E., et al., *HSP90 inhibition results in apoptosis of Philadelphia acute lymphoblastic leukaemia cells: an attractive prospect of new targeted agents*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012. **138**(10): p. 1753-8.
160. Ying, W., et al., *Ganetespib, a unique triazolone-containing Hsp90 inhibitor, exhibits potent antitumor activity and a superior safety profile for cancer therapy*. *Mol Cancer Ther*, 2011.

Liste des Tableaux

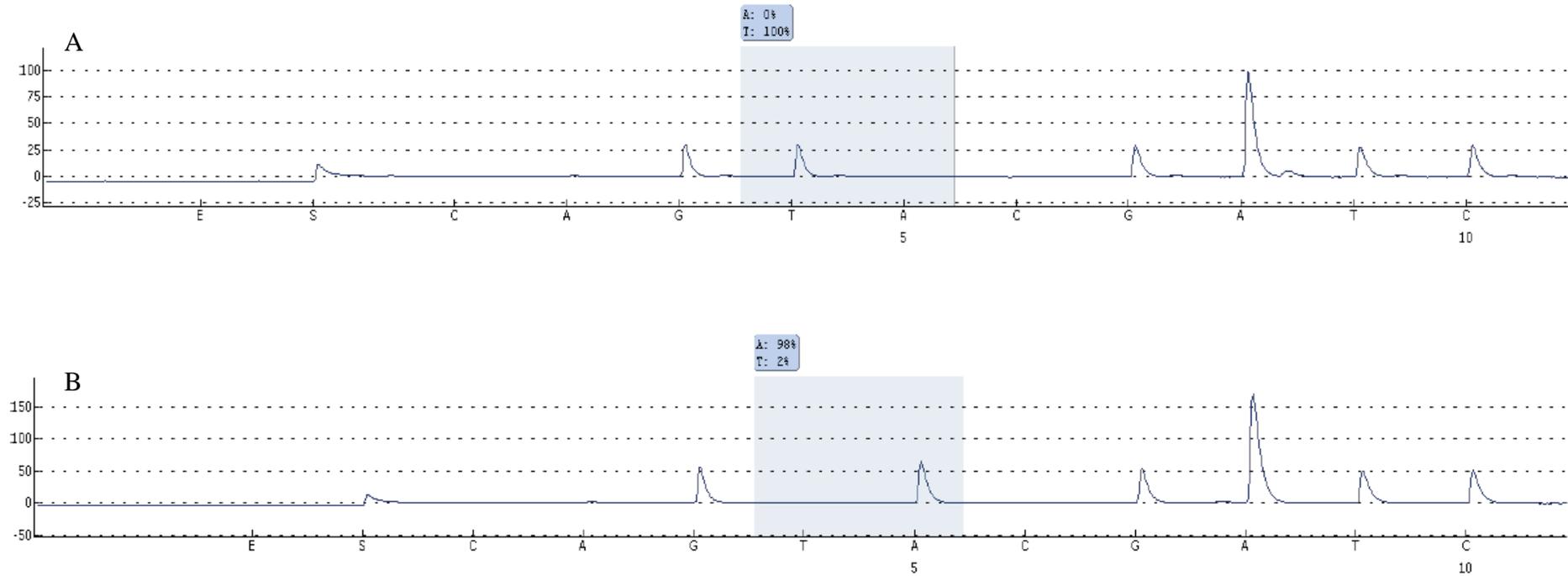
| | |
|--|----|
| TABLEAU 1 : COMPARAISON DES PROTEINES DU « MISMATCH REPAIR » (MMR) CHEZ E. COLI ET L'HOMME : NATURES ET FONCTIONS..... | 20 |
| TABLEAU 2 : RISQUE CUMULATIF DE CANCERS A 70 ANS CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS D'UN SYNDROME DE LYNCH ET DANS LA POPULATION GENERALE..... | 22 |
| TABLEAU 3 : DIFFERENCES ENTRE LES TUMEURS PRESENTANT UN PHENOTYPE MICROSATELLITE INSTABLE ET CELLES PRESENTANT UNE INSTABILITE CHROMOSOMIQUE..... | 24 |
| TABLEAU 4 : CRITERES DE BETHESDA REVISES | 25 |
| TABLEAU 5 : PROFILS D'EXPRESSION DES PROTEINES DU MMR EN IHC ET DIAGNOSTIC D'INSTABILITE MICROSATELLITE..... | 26 |
| TABLEAU 6 : CARACTERISTIQUES DES LIGNEES CELLULAIRES ISSUES DE CANCERS COLORECTAUX | 34 |
| TABLEAU 7 : CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION DE PATIENTS PRESENTANT UN CCRM ET TRAITES PAR L'ASSOCIATION FOLFIRI-CETUX..... | 35 |
| TABLEAU 8 : CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION DE PATIENTS PRESENTANT UN CCR MSI. | 35 |
| TABLEAU 9 : LISTE DES MARQUEURS MICROSATELLITES ETUDIES POUR LE DIAGNOSTIC D'UNE INSTABILITE MICROSATELLITE. | 37 |
| TABLEAU 10 : TABLEAU COMPARATIF DES CARACTERISTIQUES EPIDEMIOLOGIQUES, CLINIQUES ET BIOLOGIQUES DES PATIENTS PRESENTANT UNE TUMEUR MSI OU MSS. | 45 |
| TABLEAU 11 : TABLEAU RECAPITULANT POUR CHAQUE PATIENT LE STATUT MSI, LE NOMBRE DE REPETITIONS DU MICROSATELLITE T17 DE L'INTRON 8 D'HSP110 DANS LE TISSU SAIN ET TUMORAL, AINSI QUE DU TAUX D'EXPRESSION HSP110 Δ E9 / HSP110..... | 47 |
| TABLEAU 12 : COMPARAISON DES MARQUEURS PREDICTIFS DE TOXICITE ET DES POSOLOGIES DES DIFFERENTES MOLECULES DE CHIMIOETHERAPIE ENTRE LES PATIENTS PRESENTANT UNE TUMEUR MSI ET CEUX PRESENTANT UNE TUMEUR MSS. | 48 |
| TABLEAU 13 : REPOSE DES PATIENTS A LA CHIMIOETHERAPIE PAR FOLFIRI-CETUXIMAB EN FONCTION DU STATUT MSI OU MSS DE LA TUMEUR A 3 ET A 6 MOIS..... | 49 |
| TABLEAU 14 : RESULTATS CROISES DE L'IMMUNOHISTOCHEMIE DES PROTEINES DU MMR ET DU NOMBRE DE MARQUEURS MICROSATELLITES INSTABLES. | 51 |
| TABLEAU 15 : RESUME DES PUBLICATIONS ETUDIANT L'INFLUENCE DU PHENOTYPE MSI SUR LE PRONOSTIC DANS LES CCRM..... | 70 |

Table des figures

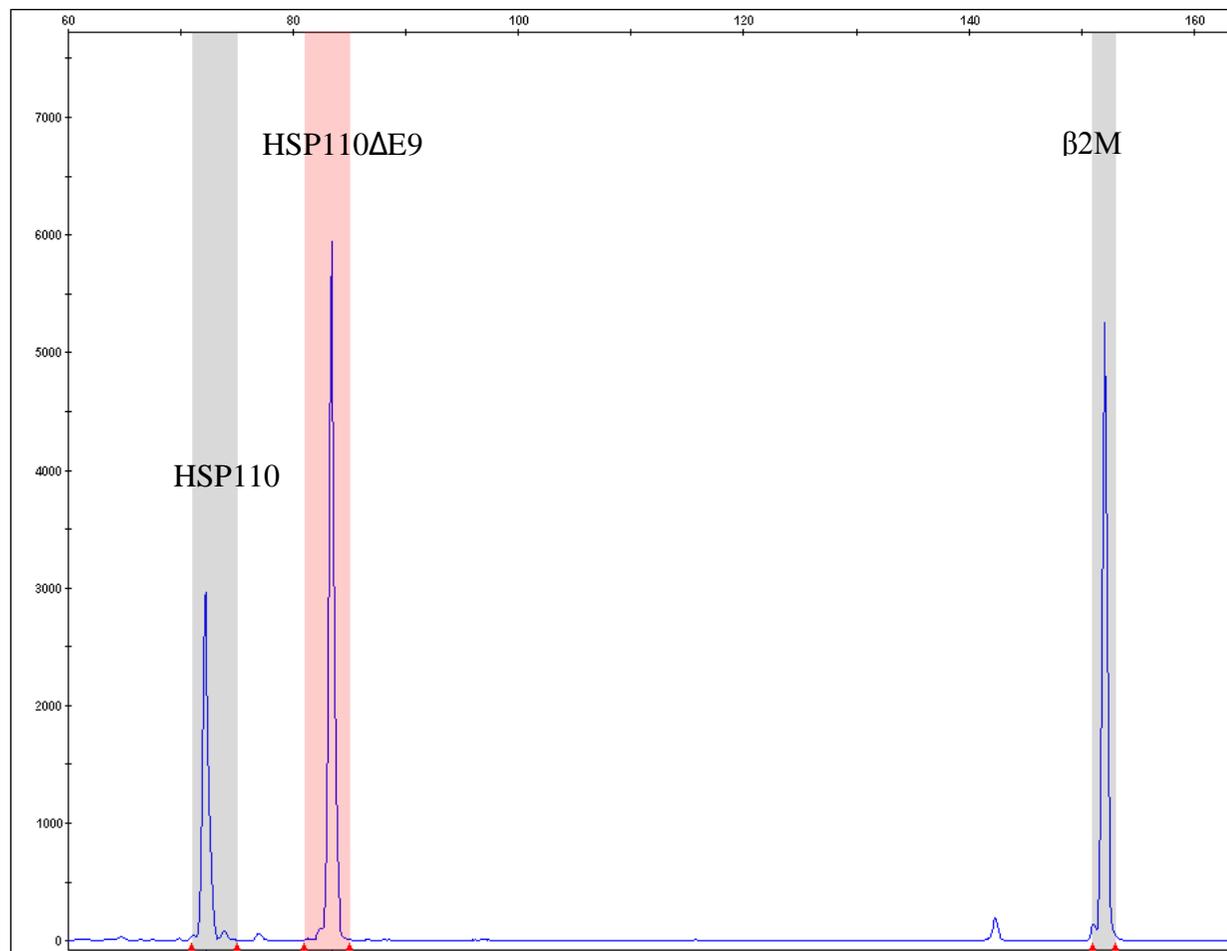
| | |
|--|----|
| FIGURE 1 : TIRÉE DE DORARD ET AL.: STRUCTURE DES PROTEINES HSP110 SAUVAGES ET MUTÉE. | 31 |
| FIGURE 2 : SCHEMA SIMPLIFIE DE L'INTERACTION ENTRE MMR, HSP110 ET HSP110 Δ E9 DANS LE MECANISME D'ACTION DU 5-FU..... | 32 |
| FIGURE 3 : PROFILS D'ANALYSE DE FRAGMENTS OBTENUS AVEC LE KIT "MSI ANALYSIS" (PROMEGA®) DES LIGNEES CELLULAIRES HT29 ET HCT116..... | 42 |
| FIGURE 4 : TAILLE DU MICROSATELLITE T17 DANS 5 LIGNEES DE CANCER COLORECTAL..... | 43 |
| FIGURE 5 : EXPRESSION D'HSP110 Δ E9 DANS 3 LIGNEES CELLULAIRES DE CCR. | 44 |
| FIGURE 6 : PROFIL D'ANALYSE DE FRAGMENTS DE LA PCR HSP110 AU NIVEAU DU TISSU SAIN (A) ET DU TISSU TUMORAL (B) POUR LE PATIENT MAJ. | 46 |
| FIGURE 7 : SURVIE GLOBALE [A] ET DE SURVIE SANS PROGRESSION [B] DES PATIENTS EN FONCTION DU STATUT MICROSATELLITE DE LEUR TUMEUR. | 50 |
| FIGURE 8 : REPARTITION DES PATIENTS EN FONCTION DE LA TAILLE DE LA DELETION DU T17 DANS LA TUMEUR. | 52 |
| FIGURE 9 : REPARTITION DES TAILLES DES DELETIONS DU T17 D'HSP110 EN FONCTION DU TYPE DE DEFICIT EN PROTEINE DU MMR..... | 53 |
| FIGURE 10 : INFLUENCE DE LA TAILLE DE LA DELETION DU T17 SUR L'EXPRESSION DU TAUX D'HSP110 Δ E9 / HSP110..... | 54 |
| FIGURE 11 : COURBES DE SURVIE GLOBALE DES PATIENTS EN FONCTION LA TAILLE DE LA DELETION DU T17 DANS LA TUMEUR..... | 55 |

Annexes

Annexe 1 : Pyrogrammes du séquençage d'une partie du gène *BRAF*. A. Pyrogramme obtenu à partir d'une tumeur présentant un gène *BRAF* sauvage. On observe la séquence GTGAATC. B. Pyrogramme obtenu à partir d'une tumeur présentant la mutation V600E du gène *BRAF*. On observe la séquence GAGAATC



Annexe 2 : Exemple d'électrophorégramme obtenu par analyse de fragment des produits de RT-PCR multiplex pour la lignée cellulaire de cancer colorectal LS174T. Le logiciel GeneMapper identifie automatiquement les différents fragments avec par ordre de migration : HSP110, HSP110 Δ E9 et la β 2-microglobuline.



Annexe 3 : Caractéristiques des 120 tumeurs présentant un phénotype microsatellite instable.

| | sexe | Localisation tumorale | Nombre de marqueurs MSI | Déficit du MMR en IHC | Mutation BRAF V600E | Délétion du T17 (pb) | Taux HSP110ΔE9 / HSP110 (%) |
|----|------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | M | côlon | 5 | MSH2 | non | 5 | ND |
| 2 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 4 | ND |
| 3 | M | côlon | 1 | MLH1 | non | 0 | 0 |
| 4 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 6 | 38,8 |
| 5 | M | côlon | 5 | PMS2 | non | 4 | ND |
| 6 | M | côlon | 5 | Multiple | non | 6 | 9 |
| 7 | M | côlon | 4 | MSH2 | non | 3 | ND |
| 8 | M | côlon | 5 | MSH6 | oui | 2 | ND |
| 9 | M | côlon | 5 | ND | non | 4 | 22,9 |
| 10 | M | côlon | 4 | ND | oui | 5 | ND |
| 11 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 3 | ND |
| 12 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 4 | ND |
| 13 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 0 | 0 |
| 14 | M | côlon | 5 | MLH1 | oui | 3 | 7,2 |
| 15 | M | côlon | 4 | MLH1 | oui | 3 | ND |
| 16 | M | côlon | 5 | MSH6 | non | 4 | ND |
| 17 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 5 | ND |
| 18 | M | côlon | 5 | MLH1 | oui | 4 | 71 |
| 19 | M | côlon | 5 | MSH2 | non | 4 | 2,5 |
| 20 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 3 | ND |
| 21 | F | côlon | 4 | MLH1 | oui | 2 | ND |
| 22 | M | côlon | 5 | ND | oui | 4 | 23 |
| 23 | F | côlon | 4 | MLH1 | non | ND | ND |
| 24 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 4 | 11 |
| 25 | F | côlon | 5 | PMS2 | non | 5 | ND |
| 26 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 4 | 7,25 |
| 27 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 4 | ND |
| 28 | F | côlon | 5 | ND | non | ND | ND |
| 29 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 5 | 62,3 |
| 30 | F | côlon | 5 | ND | oui | 5 | ND |
| 31 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 3 | 9 |
| 32 | M | côlon | 5 | MLH1 | non | 4 | 2,5 |
| 33 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 2 | ND |
| 34 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 1 | ND |
| 35 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 5 | ND |
| 36 | F | rectum | 5 | MLH1 | non | 5 | 66,8 |
| 37 | M | côlon | 3 | MSH6 | non | 2 | 2,5 |
| 38 | M | côlon | 5 | MLH1 | non | ND | ND |
| 39 | M | côlon | 5 | MSH2 | non | 1 | ND |
| 40 | F | rectum | 5 | MLH1 | non | 5 | ND |
| 41 | M | côlon | 5 | ND | oui | 3 | ND |
| 42 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 5 | ND |

| | sexe | Localisation tumorale | Nombre de marqueurs MSI | Déficit du MMR en IHC | Mutation <i>BRAF</i> V600E | Délétion du T17 (pb) | Taux HSP110ΔE9 / HSP110 (%) |
|----|------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| 43 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 4 | ND |
| 44 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 3 | 20 |
| 45 | F | côlon | 4 | MLH1 | non | 3 | ND |
| 46 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 3 | 16,5 |
| 47 | F | côlon | 5 | MSH6 | non | 0 | 2,5 |
| 48 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 4 | 20 |
| 49 | M | côlon | 5 | ND | non | 5 | ND |
| 50 | M | côlon | 5 | ND | non | 3 | 2,5 |
| 51 | F | côlon | 5 | Multiple | non | 5 | 13 |
| 52 | M | côlon | 5 | MLH1 | non | 6 | ND |
| 53 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 5 | ND |
| 54 | M | côlon | 5 | MSH6 | non | 3 | ND |
| 55 | M | côlon | 1 | ND | oui | 0 | 0 |
| 56 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 4 | 101,5 |
| 57 | M | côlon | 5 | MLH1 | non | 3 | ND |
| 58 | M | côlon | 5 | MSH2 | non | 4 | ND |
| 59 | F | côlon | 4 | ND | non | ND | 21 |
| 60 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 4 | 20,4 |
| 61 | M | côlon | 5 | ND | non | 2 | 2,5 |
| 62 | F | côlon | 4 | PMS2 | non | ND | ND |
| 63 | M | côlon | 5 | MLH1 | non | 6 | ND |
| 64 | M | côlon | 5 | MSH6 | non | 1 | ND |
| 65 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 4 | ND |
| 66 | F | côlon | 5 | MSH6 | non | 3 | 17 |
| 67 | F | côlon | 5 | ND | non | 2 | ND |
| 68 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 4 | ND |
| 69 | M | côlon | 5 | MLH1 | non | 5 | ND |
| 70 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 6 | 26,5 |
| 71 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 1 | 2,5 |
| 72 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 4 | ND |
| 73 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 3 | 11,8 |
| 74 | M | côlon | 5 | MLH1 | oui | 4 | 2,5 |
| 75 | M | côlon | 5 | MLH1 | oui | 2 | ND |
| 76 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 3 | 28 |
| 77 | F | côlon | 5 | ND | non | 6 | ND |
| 78 | M | côlon | 5 | MSH6 | non | 4 | 56 |
| 79 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 4 | ND |
| 80 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 3 | 21 |
| 81 | F | côlon | 4 | MLH1 | oui | 4 | 23 |
| 82 | M | côlon | 5 | MLH1 | oui | 4 | 105 |
| 83 | M | côlon | 5 | MLH1 | oui | 6 | ND |
| 84 | M | côlon | 4 | MLH1 | non | ND | 2,5 |
| 85 | M | côlon | 5 | MSH2 | non | 4 | 2,5 |
| 86 | M | côlon | 3 | MSH2 | non | 4 | 24 |

| | sexe | Localisation tumorale | Nombre de marqueurs MSI | Déficit du MMR en IHC | Mutation <i>BRAF</i> V600E | Délétion du T17 (pb) | Taux HSP110ΔE9 / HSP110 (%) |
|-----|------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| 87 | M | côlon | 5 | MSH2 | non | 5 | 16 |
| 88 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 4 | 35,15 |
| 89 | F | côlon | 5 | Multiple | oui | 4 | ND |
| 90 | M | côlon | 5 | MLH1 | oui | 7 | ND |
| 91 | M | côlon | 5 | Multiple | non | 2 | ND |
| 92 | M | côlon | 5 | MSH2 | non | 3 | 15,8 |
| 93 | F | côlon | 5 | MSH6 | non | 3 | ND |
| 94 | F | côlon | 4 | MSH2 | non | 6 | ND |
| 95 | F | côlon | 5 | Multiple | oui | 5 | ND |
| 96 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 1 | ND |
| 97 | M | côlon | 5 | MLH1 | non | 4 | ND |
| 98 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 4 | ND |
| 99 | F | côlon | 5 | ND | non | 3 | ND |
| 100 | M | côlon | 5 | MSH2 | non | 4 | 35,5 |
| 101 | M | côlon | 5 | MSH2 | non | 4 | 10 |
| 102 | M | côlon | 5 | MSH6 | non | 4 | 19,1 |
| 103 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 5 | 32 |
| 104 | M | côlon | 2 | Multiple | non | ND | ND |
| 105 | M | côlon | 5 | MSH2 | non | 4 | 112 |
| 106 | F | côlon | 5 | MLH1 | oui | 2 | 5 |
| 107 | F | côlon | 5 | PMS2 | oui | 5 | ND |
| 108 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 5 | 108,25 |
| 109 | M | côlon | 5 | MLH1 | non | 5 | ND |
| 110 | F | côlon | 5 | PMS2 | non | 4 | ND |
| 111 | M | côlon | 5 | ND | non | ND | ND |
| 112 | M | côlon | 5 | MLH1 | oui | 8 | ND |
| 113 | F | côlon | 5 | MLH1 | non | 5 | ND |
| 114 | M | côlon | 5 | ND | non | 5 | ND |
| 115 | M | côlon | 5 | ND | non | 1 | 20,5 |
| 116 | M | côlon | 5 | ND | oui | 4 | ND |
| 117 | F | côlon | 5 | ND | non | 5 | 104,5 |
| 118 | M | côlon | 5 | ND | non | 5 | 16,7 |
| 119 | M | côlon | 5 | MLH1 | oui | 7 | 14,6 |
| 120 | M | rectum | 5 | ND | oui | 4 | ND |

Tableau récapitulatif, pour chaque patient présentant une tumeur colorectale de phénotype MSI, le nombre de marqueurs microsatellites instables, le type de protéine déficiente en immunohistochimie (IHC), la différence de taille du T17 entre le tissu sain et la tumeur, le statut *BRAF*, ainsi que le taux d'expression d'HSP110ΔE9 / HSP110.