



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*

Discipline ou spécialité : *Innovation pharmacologique-Biologie cellulaire*

Présentée et soutenue par *Catherine DO*

Le 25 Octobre 2011

Titre : *EXPRESSION DE MARQUEURS PRO-ONCOGENIQUES DANS LES PHASES PRECOCES DE LA CARCINOGENESE COLORECTALE*

JURY

Thierry LEVADE (Président)
Anne COUVELARD (Rapporteur)
Annie SCHMID-ALLIANA (Rapporteur)
Laurence TERRAIL (Examineur)

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologies*
Unité de recherche : *Inserm U1037*
Directeur(s) de Thèse : *Catherine SEVA et Audrey FERRAND*
Rapporteurs : *Anne COUVELARD, Annie SCHMIDT-ALLIANA*

A notre président de Thèse, Monsieur le Professeur Thierry Levade,

Vous nous faites l'honneur de présider cette thèse. Merci de votre confiance et du soutien que vous nous avez porté. Sachez trouver en ce travail, la traduction de notre reconnaissance.

A Madame le Professeur Anne Couvelard,

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites d'avoir accepté de découvrir et juger ce travail.

A Madame le Docteur Annie Schmid-Alliana,

Votre présence, le temps et l'attention que vous nous avez accordés à lire ce travail sont un honneur pour nous.

A Madame le Professeur Laurence Terrail,

Nous vous remercions d'avoir accepté notre invitation en tant que membre de jury à cette thèse.

A notre directrice de Thèse, Madame le Docteur Catherine Seva,

Nous vous sommes très reconnaissant d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse et de nous avoir permis de le mener à bien. Nous vous remercions pour la confiance que vous nous avez accordée en accueillant dans votre laboratoire une interne sans expérience en biologie et aux connaissances limitées dans le domaine de la signalisation cellulaire. Merci également de nous avoir transmis vos connaissances et partager votre expérience tout au cours de ces années de master puis de thèse. Votre savoir, votre intégrité et vos qualités humaines font de vous un modèle que nous espérons atteindre un jour.

A notre directrice de Thèse, Madame le Docteur Audrey Ferrand,

Nous vous remercions pour avoir relu ce travail, pour votre œil expert en détection des doubles espaces et pour m'avoir montré comment utilisé Adobe Acrobat Pro, à un moment plus que critique mais surtout pour vos conseils précieux et pertinents de chercheur expérimenté, et pour votre bonne humeur.

A **Madame le Professeur Marie-Bernadette Delisle**, Professeur des Universités,
Praticien Hospitalier, Chef du Service d'Anatomie Pathologique de l'Hôpital Ranguel,

Nous vous remercions pour nous avoir permis de réaliser ce projet en collaboration avec votre service, pour vos conseils et la confiance que vous nous avez accordée, sans lesquels ce travail n'aurait pu avoir lieu et sommes particulièrement déçue que d'autres obligations vous aient empêchée de faire partie de ce jury.

REMERCIEMENTS

Au **Dr Julien Palasse**, Praticien Hospitalier attaché dans le service d'Anatomie Pathologique du Centre Hospitalo-Universitaire de Limoges et pathologiste dans le laboratoire de la clinique Saint-Jean de Toulouse, *pour avoir relu toutes les lames (le travail final ne représentant qu'un dixième de tout ce qui a été réalisé, merci pour ces soirées et weekends passés au microscope du laboratoire), pour son expertise en anatomo-pathologie digestive mais avant tout pour son soutien sans faille dans les moments les plus difficiles, et son amitié fidèle, pour avoir été la voix de la raison lorsque des projets insensés germaient dans ma petite tête ou au contraire de m'avoir encouragée lorsqu'ils n'étaient pas si incongrus, en résumé d'avoir été mes yeux, mon épaule, ma raison et bien plus, comme par exemple ma béquille après ce fâcheux accident (causé par « le sauvetage d'un baleineau échoué sur les rivages des Mascareignes », d'après la version romancée de Sandrine) et enfin d'avoir toujours été présent.*

A **Claudine Bertrand** *pour son amitié, son soutien, ses conseils en matière d'assortiment des couleurs (je ne mélangerai plus le rouge aloha au rouge fushia), sa compagnie pendant mes pauses cigarettes (qui n'auront plus lieu puisque j'arrête de fumer... après la soutenance...sauf en cas de remarques assassines du jury), les inoubliables moments à Cadaquès, Marciac et Hossgor, autant que pour ces conseils, son expérience et son aide concernant les analyses immunohistochimiques. C'est pourquoi, je lui adresse cette citation de Bergson, « Le temps réel échappe aux mathématiques. Son essence étant de passer, aucune de ses parties n'est encore là quand une autre se présente.», qui fait écho à sa tout aussi fameuse phrase « Un certain temps ! » qui m'a accompagnée pendant ces quatre années de thèse. Je lui promets, par ailleurs, que si je dois faire une troisième thèse, le sujet portera sur les tardigrades ou plus sérieusement, sur la faune encore méconnue de la colline de Rangueil, parmi laquelle nous avons déjà répertorié plusieurs espèces rares dont le Colubris Rangueilus et l'Ursus Volans, malheureusement, souvent, respectivement, confondus avec le papillon-colibri et le bourdon, ces diagnostics différentiels nécessitant un œil d'entomologiste avisé...*

A **Aline Chauvel** *pour m'avoir encadrée à mes tout débuts dans le laboratoire et enseignée la culture, les techniques de biologie moléculaire et de biochimie, avec patience, mais surtout pour ne pas avoir tenu un cahier de mes meilleures boulettes, comme ensemer des plaques de culture sans cellules, ou envoyer, dans un mouvement ample et gracieux, l'eppendorf contenant le contrôle de la manip après l'avoir malencontreusement accroché à mes gants en le refermant, dans une faille spatio-temporelle. Je dois avouer que secrètement, j'espérais que l'une d'elles serait à l'origine d'une découverte fortuite et extraordinaire, à l'instar de la découverte de la pénicilline...Mes rêves de prix Nobel n'ont malheureusement pas été exaucés, mais je la remercie d'avoir continué à croire en moi et tenter la fabuleuse aventure de la progastrine et des ovaires de souris, en m'aidant à réaliser l'extraction des ovocytes, à l'aide de la très poétique technique du « toothpaste tube ». Un grand merci aussi pour son aide de dernière minute sur le mise en page de ce manuscrit, un peu irrégulière avant son passage.*

A **Souad Najib**, *pour son soutien, ses conseils, son aide dans ma recherche de post-doctorat et pour cette jolie petite robe qui me va très bien.*

A **Nicolas Fénié** qui n'a ni joué le jeu de la hiérarchie ni montré le respect qu'il devait à son aînée en refusant de me faire mes cafés, de me les apporter et de les touiller, j'adresse des non remerciements. D'ailleurs, tous les bons points qu'il a reçus mais qui, soit dit en passant, pour la plupart, n'étaient pas mérités, seront confisqués jusqu'à ce qu'il change son attitude irrévérencieuse.

A tous les membres de l'ex-unité **INSERM U858**, pour m'avoir accueillie, il y a 5 ans déjà...

Aux membres des autres unités du **4^{ème} étage** de l'ex-I2MR, et tout particulièrement, à **Bernard Masri** pour son humour et ses conseils de « motard ».

A toute l'équipe d'**Oncomip**, qui a récupéré un zombie tous les matins, après mes nuits blanches passées à écrire cette thèse, pour ses encouragements et pour m'avoir changé les idées à travers des discussions enflammées métaphysico-philosophico-politico-DSKo-sociologiques (qui ne nous ont pas empêchés de travailler, pour rassurer Eric Bauvin). Je remercie également tout particulièrement **Attika**, qui s'est presque « vendue » pour m'obtenir une piste de post-internat.

A tous mes amis, pour leur soutien, en particuliers à **Sandrine**, pour m'avoir inventé cette histoire héroïque de baleineau et m'avoir supporté en colocation toutes ces années, à **Kim** qui a essayé de me faire dormir la tête en position Nord-Est et les pieds non orientés vers la porte, c'est-à-dire en travers du lit et toute tordue, pour attirer les bonnes ondes Feng Shui, mais qui a été une oreille attentive et toujours de bon conseil pour mes choix de carrière, de vie et de techniques de maturation de jambon italien, à **Florence**, encore une ana-path (au passage, félicitations pour le petit Raphael), pour m'avoir toujours gardé une place à l'internat de Ranguel à midi quand je montais au laboratoire, mais surtout pour les discussions et les moments agréables partagés pendant ces déjeûners, à **Raphael et Sylvain**, (et oui, vous êtes en couple même pour les remerciements) pour avoir bien voulu descendre du bus une station trop tôt et finir le chemin à pied par -20°C car mon russe était trop rouillé pour expliquer à la gentille dame que notre arrêt était le suivant, à **Téma**, avec qui j'ai pu partager ma passion de la littérature et dont l'enthousiasme m'a donné l'envie de lire Faulkner, à **Benoît**, qui est malheureusement reparti au Cambodge, pour ces soirées autour d'une, voire plusieurs « femmes fatales » à l'Elephant Bar de Phnom Penh, pour avoir assisté à mon concert d'Ehru désastreux, et m'avoir appris tout ce que je sais (c'est-à-dire pas grand-chose) sur la culture du Plasmodium en condition extrême (sans hôte, sans gant, sans pipette), et à **Dushyant**, pour être venu assister à la soutenance, même si je ne suis pas sûre qu'il arrive à l'heure, surtout avec Kim qui est toujours en retard.

A ma **famille**, pour leur soutien et leur amour.

Et enfin, à **Eiko**, mon petit loulou d'or, pour ses calins même à 4h du matin.

*« ...la rencontre fortuite sur une table de dissection
d'une machine à coudre et d'un parapluie. »*
Lautréamont

RESUME

Les polypes hyperplasiques (PH) constituent les lésions colorectales les plus fréquentes. Ces lésions ont pendant longtemps été considérées comme des lésions sans potentiel malin et le suivi coloscopique des patients ayant développé des PH n'est pas recommandé. Récemment, plusieurs études suggèrent qu'une partie de ces polypes pourrait constituer des précurseurs de certains cancers colorectaux sporadiques. Cependant, aucun biomarqueur permettant de détecter les PH à risque d'évolution maligne n'a pu être identifié. La progastrine est une prohormone impliquée dans la carcinogénèse colique. Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de la progastrine dans des PH provenant de 74 patients sans antécédent de pathologie colorectale et avons mis en évidence une surexpression de la prohormone dans 40% des cas. Dans un sous-échantillon composé de 39 patients pour lesquels un suivi coloscopique avait été réalisé, 41% des patients ayant présenté un PH ont développé des polypes adénomateux métachrones. Nous avons pu montrer une association significative entre l'expression de la progastrine et la survie sans néoplasme ($p=0.001$). En effet, la survie sans néoplasme à 5 ans était de 38% chez les patients présentant une forte surexpression de progastrine alors qu'elle était de 100% chez les patients avec une faible expression. Par ailleurs, nous avons démontré qu'un test prédictif composite basé sur le marquage de la progastrine et l'âge des patients permettraient de prédire la survenue d'un événement néoplasique métachrone chez les patients ayant développé un PH avec une sensibilité de 100% (Intervalle de confiance à 95% : 79%-100%) et une spécificité de 74% (51%-90%).

La progastrine peut activer plusieurs voies pro-oncogéniques dans les cancers colorectaux. Certaines d'entre elles, en particulier les voies JAK/STAT ou ERK n'ont pas encore été explorées dans les polypes hyperplasiques. Afin de mieux caractériser les polypes exprimant la progastrine, nous avons, dans un second temps, étudié l'activation de STAT3 et ERK dans un deuxième échantillon de 49 polypes hyperplasiques. Le pourcentage de cellules marquées par des anticorps spécifiques anti-progastrine, anti-phospho-STAT3 et anti-phospho-ERK étaient en moyenne de 31% (écart-type : 35), 10% (23) et 34% (30%), respectivement et étaient significativement augmentée dans les PH par rapport aux tissus normaux contrôles pour la progastrine et P-ERK ($p=0,0008$ et 0.0003). De plus, l'augmentation progressive de l'expression de ces deux marqueurs entre le tissu normal, les PH, les adénomes de dysplasie légère, modérée et sévère étaient significative ($p<0.0001$ pour la progastrine et $p=0.001$ pour P-ERK) et suggèrent une activation de ces deux facteurs dans les PH intermédiaire entre le colon normal et les adénomes. Nous avons également montré, dans ces lésions, que l'expression de la progastrine était corrélée à celle de P-ERK ($p=0,0184$). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la progastrine pourrait être associée à un sous-type de PH à risque d'évolution maligne et permettre de l'identifier.

ABBREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
APC	Adenomatous polyposis coli
ARN	Acide ribonucléique
AT	Adénomes tubuleux
ATV	Adénomes tubulo-villeux
AV	Adénomes villeux
BAX	BCL-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BER	Base excision repair
BRCA1	Breast cancer-associated gene 1
CCK2	Cholecystokinin 2
CCK2R	Cholecystokinin 2 receptor
CCR	Cancer colorectal
CD44	Cluster of Differentiation 44
cdc42	Cell division control protein 42
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDX2	Caudal-related homeobox
c-fos	Cellular fos
CHK1	Checkpoint kinase 1
CIMP	Cpg island methylator phenotype
CIN	Chromosomal instability
c-myc	Cellular myc
COX-2	Cyclooxygenase 2
CTNNB1	Catenin beta1
CYP1a	Cytochrome P4501A
CYP1A2	Cytochrome P-450
DCC	Deleted in colorectal carcinoma
EB1	End binding 1
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ES	Embryonic stem,
FAK	Focal adhesion kinase
FCA	Foyer de cryptes aberrantes
G17-NH2	Gastrine amidée 17
G34-NH2	Gastrine amidée 34
GCHP	Globlet cell-rich hyperplastic polyps
GRB1	Ginsenoside rb1
Grb2	GTP-exchange complex growth factor receptor bound 2)
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta

GTPase	Guanosine triphosphatase
HAS	Haute Autorité de Santé
HE	Hématoxiline-éosine
hMLH1	Human Mutl-homolog 1
ICAT	Inhibitor of beta-catenin
IFN β	Interferon beta
I κ B	Inhibitor of nf κ b
JAK	Janus kinase
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor 1
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
mcl-1	Myeloid cell leukemia 1
MCR	Mutation cluster region
MEK	Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase
MGMT	O-6-methylguanine-DNA- Methyltransferase
MINT1	Munc18-1-interacting protein 1
MINT2	Munc18-1-interacting protein 2
MLH3	Mutl-homolog 3
MMP2	Matrix metalloproteinase-2
MMR	Mismatch repair
MPHP	Mucin poor hyperplastic polyps
MSH3	Muts-homolog 6
MSH6	Muts-homolog 6
MSI	Microsatellite instability
MSI-H	Microsatellite instable high
MSI-L	Microsatellite instable low
MST1	Mammalian sterile 20-like 1
MTHFR	Méthylène-tétra-hydro-folate-réductase
MUTYH	Muty homolog
MVHP	Microvesicular hyperplastic polyps
NAT	N-acétyl-transférases
NF κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAF	Polypose adénomateuse familiale
PAM	Polypose associée à la mutation MUTYH
PH	Polype hyperplasique
PIP2	Phosphoinositides
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RASSF1	Ras association domain family protein 1
RASSF2	Ras association domain family protein 2
RASSF5	Ras association domain family protein 5
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
ROS	Reactive oxygen species
SH2	Src homology 2
Shc	Src homology 2 domain containing

siARN	Small interfering ARN
SOS	Son of sevenless
SSA	Sessile serrated adenoma
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TCF	Transcription factor 4
TCF-4	Transcription factor 4
TGF β	Transforming growth factor β
TGF β R2	Transforming growth factor β receptor 2
TNM	Tumor node metastasis
TSA	Traditional serrated adenoma
TYK	Tyrosine kinase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZO-1	Zonula occludens-1
β -TrCP	B-transducin repeat-containing protein

Sommaire

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	4
I-Epidémiologie du Cancer colorectal	5
II-Etiologie du Cancer colorectal.....	5
II-1-Régime et mode de vie.....	5
II-2-Inflammation chronique.....	5
II-3-Prédisposition génétique	6
II-3-1-Syndromes héréditaires	6
II-3-2-Les polymorphismes à forte pénétrance et polymorphismes nucléotidiques.....	8
III-Les différentes tumeurs épithéliales colorectales: la classification histo-pathologique.....	8
III -1- Les lésions prénéoplasiques: les foyers de cryptes aberrantes.....	9
III -1-1-Les foyers de crypte aberrantes dysplasiques	9
III -1-2-Les foyers de cryptes aberrantes hyperplasiques	10
III-2-Les lésions précurseurs.....	10
III-2-1-Les adénomes.....	11
III-2-2-Les tumeurs festonnées	12
III-3-Les adénocarcinomes colorectaux	14
IV-Les différentes voies de carcinogénèse colorectale : Vers une classification moléculaire	16
IV -1-Le modèle multi-étape de la carcinogénèse colique	16
IV -2-Une classification moléculaire basée sur les mécanismes moléculaires permettant l'accumulation des mutations génétiques	17
IV -2-1-L'instabilité chromosomique :.....	18
IV -2-2-L'instabilité microsatellitaire.....	24
IV -2-3-l'Hyperméthylation des îlots CpG, CIMP (CpG island methylator phenotype).....	28
V- Corrélation entre les différents types histologiques d'adénocarcinomes et les mécanismes moléculaires initiateurs.....	29
V-1-La voie classique.....	30
V-2-Les voies des tumeurs festonnées	30
V-2-1-La voie des tumeurs festonnées sessiles associées à une hyperméthylation forte de l'ADN et une instabilité microsatellitaire forte : groupe 1	31
V-2-2-La voie des tumeurs festonnées sessiles associées à une hyperméthylation forte de l'ADN et microsatellite stable (ou à faible instabilité microsatellitaire) : groupe 2.....	31
V-3-Le syndrome de Lynch : groupe 5	32
VI -Les polypes hyperplasiques.....	32
VI -1-Epidémiologie et facteurs de risque des polypes hyperplasiques	32
VI -2-Caractéristiques histologiques et sous-types de polypes hyperplasiques.....	33

VI -3-Caractéristiques moléculaires des polypes hyperplasiques.....	34
VI -4-Syndromes associés à la présence de multiples PH	36
VI -5-Place des polypes hyperplasiques dans la carcinogénèse colique.....	37
VI -6- Valeur pronostic des PH	38
VI -7- Surveillance après exérèse d'un polype hyperplasique	39
RESULTATS EXPERIMENTAUX	41
ARTICLE 1 ET BREVET	42
INTRODUCTION : La progastrine	43
I-Synthèse et sécrétion de la progastrine dans les conditions physiologiques	43
II- Synthèse et sécrétion de la progastrine dans les tumeurs colorectales	44
III- La progastrine, un facteur de croissance des cellules épithéliales coliques	45
IV- Effets anti-apoptotiques de la progastrine sur les cellules épithéliales coliques	46
V- Effet de la progastrine sur l'adhésion et la migration des cellules épithéliales coliques.....	46
VI- Les récepteurs /protéines de liaison de la progastrine	47
OBJECTIFS	49
PATIENTS ET METHODES	50
I-Schéma de l'étude	50
II-Taille de l'échantillon, patients et recueil de données.....	50
III-Immunohistochimie.....	52
IV-Analyses statistiques	52
ARTICLE.....	54
ARTICLE 2.....	77
INTRODUCTION	78
I-La voie WNT/ β -caténine /TCF4.....	78
I-1-L'activation de la voie WNT/ β -caténine /TCF4	78
I-2-La progastrine active la voie WNT/ β -caténine /TCF4.....	79
I-3-La voie WNT/ β -caténine /TCF4 dans les tumeurs colorectales	79
II-La voie RAS/RAF/MEK/ERK	80
II-1-L'activation et les cibles de ERK.....	80
II-2-La progastrine active la voie ERK.....	80
II-3-La voie ERK dans les cancers colorectaux.....	81
III-La voie JAK/STAT.....	81
III-1-Activation et cibles de la voie JAK/STAT.....	81
III-2-La progastrine active la voie JAK2/STAT3.....	82
III-4-la voie Ras/Raf/MEK/ERK permettrait une activation maximale de la voie JAK/STAT	84
IV-La voie PI3K/AKT.....	84

IV-1-Activation et cibles de la voie PI3K/AKT.....	84
IV-2-La progastrine active la voie PI3K/AKT.....	85
IV-3-PI3K/AKT dans les cancers colorectaux.....	85
OBJECTIFS	87
PATIENTS ET METHODES	88
I-Schéma de l'étude	88
II-Taille de l'échantillon, patients et recueil de données.....	88
III-Immunohistochimie.....	88
IV-Analyses statistiques	89
ARTICLE	90
CONCLUSION ET DISCUSSION	113
ANNEXES :	119
A gastrin precursor, gastrin-gly, upregulates VEGF expression in colonic epithelial cells through an HIF-1-independent mechanism.	120
A 'DNA replication' signature of progression and negative outcome in colorectal cancer.....	121
Anaplastic lymphoma kinase-positive diffuse large B-cell lymphoma: a rare clinicopathologic entity with poor prognosis.....	122
Distribution, function and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue imaging study.....	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125

INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE
LES TUMEURS
COLORECTALES

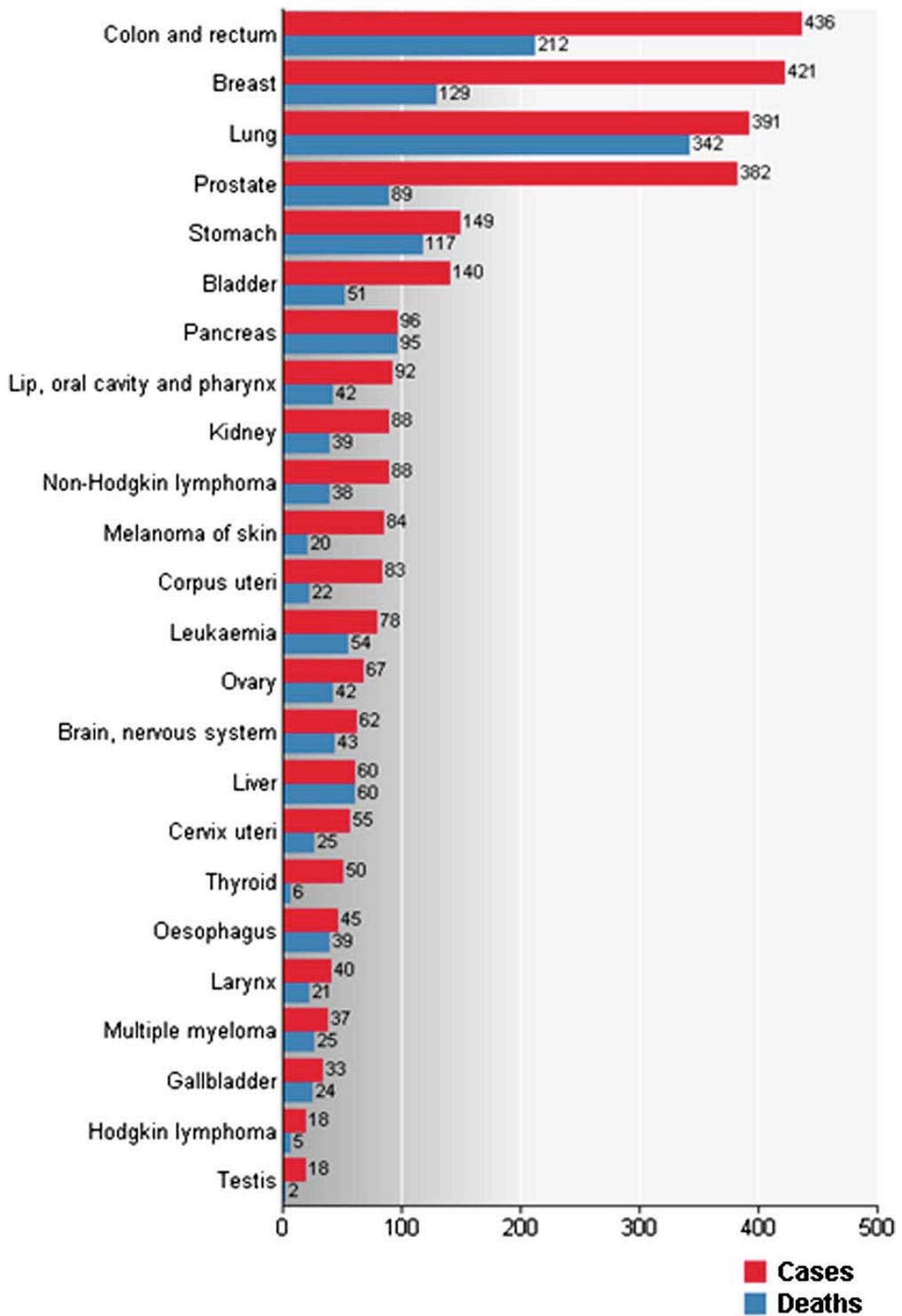


Figure 1 : Estimation de l'incidence (en milliers d'individus) des cancers et de leur mortalité en Europe, en 2008 (Ferlay, Parkin et al. 2010)

I-Epidémiologie du Cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR) constitue le 3^{ème} cancer le plus fréquent chez l'homme et le second chez la femme dans le monde en 2008. En termes de mortalité, il représente la 4^{ème} cause de décès par cancer (Ferlay, Shin et al. 2010). Cependant, près de 60% des cas sont détectés dans les pays développés. Ainsi, en Europe, le cancer colorectal est le cancer le plus fréquent et la 2^{ème} cause de mortalité par cancer (Ferlay, Parkin et al. 2010) (figure 1).

II-Etiologie du Cancer colorectal

Le cancer colorectal résulte de l'interaction complexe entre susceptibilité héréditaire et facteurs environnementaux (Potter 1999).

II-1-Régime et mode de vie

La plus forte incidence du CCR dans les pays occidentaux pourrait s'expliquer en partie par le mode de vie sédentaire et l'alimentation occidentale, calorique et riche en graisse animale (Potter 1999). Plusieurs études épidémiologiques ont montré une association positive avec l'abus d'alcool (Cho, Smith-Warner et al. 2004), le tabagisme (Botteri, Iodice et al. 2008) et l'obésité (Calle, Rodriguez et al. 2003). En revanche, l'activité physique (Wolin, Yan et al. 2009) et la prise d'aspirine au long cours seraient des facteurs protecteurs. L'action protectrice de l'aspirine serait expliquée par l'inhibition de COX-2, impliquée dans les phénomènes inflammatoires (voir, ci-dessous, le chapitre inflammation chronique) et surexprimé dans les cancers colorectaux (Rothwell, Wilson et al. 2010). Les régimes riches en fibres ou pauvres en graisse pourraient aussi avoir un rôle protecteur (Potter 1999), bien que certaines études d'intervention récentes n'aient pu mettre en évidence une réduction du risque de CCR associée à ces régimes (Park, Hunter et al. 2005; Beresford, Johnson et al. 2006).

II-2-Inflammation chronique

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont associées à un risque accru de CCR, en particulier après 8 à 10 ans d'évolution. Parmi elles, la colite ulcéreuse est considérée comme un état pré-néoplasique de CCR et la maladie de Crohn présente un risque augmenté à la fois de cancer du grêle et du gros intestin (Gillen, Walmsley et al. 1994).

II-3-Prédisposition génétique

II-3-1-Syndromes héréditaires

La polypose adénomateuse familiale

La polypose adénomateuse familiale (PAF) est un syndrome autosomique dominant rare, causé par une mutation germinale du gène suppresseur de tumeur, APC (adenomatous polyposis coli), sur le bras long du chromosome 5q (5q21-22) (Grodin, Thliveris et al. 1991). Cette mutation conduit à la formation d'une protéine tronquée. La PAF est caractérisée par le développement à un âge précoce, entre 10 et 20 ans, de multiples adénomes colorectaux, allant de quelques polypes à plusieurs milliers. Ces adénomes non traités évoluent naturellement vers des adénocarcinomes avec un âge moyen d'apparition de 40 ans (Jarvinen 1985).

Le syndrome de Lynch

Le syndrome de Lynch est un syndrome autosomique dominant. Il se caractérise par une histoire familiale ou personnelle de CCR avant 50 ans, mais également de cancer de l'endomètre, des voies urinaires, de l'estomac et des voies biliaires (Lynch, Lynch et al. 2009). Les adénocarcinomes colorectaux présentent une instabilité microsatellitaire, due à une mutation germinale dans la famille de gènes impliqués dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN (Mismatch repair, MMR), principalement hMLH1 et hMSH2 (Leach, Nicolaides et al. 1993; Papadopoulos, Nicolaides et al. 1994). Le système MMR permet de réparer les erreurs d'appariement produites par la DNA polymérase au niveau des répétitions nucléotidiques (de 1 à 5 nucléotides) lors de la réplication (Kolodner 1995). La perte du système MMR entraîne donc une accumulation de petites délétions et insertions qui peuvent survenir au niveau de gènes pro-oncogéniques ou suppresseurs de tumeur (Boland and Goel 2010). Les cibles du système MMR sont détaillées dans le chapitre « gènes associés à l'instabilité microsatellitaire ».

Le syndrome de Li-Fraumeni

Il s'agit d'un syndrome autosomique dominant qui se traduit par la présence de multiples cancers chez l'enfant et le jeune adulte, avec une prédominance de sarcomes des tissus mous,

ostéosarcomes et cancer du sein, ainsi qu'une augmentation de l'incidence des tumeurs cérébrales, leucémies et carcinomes adrénocorticaux. Les tumeurs du tractus digestif, principalement CCR, représentent environ 10% des tumeurs observées dans les familles Li-Fraumeni (Nichols, Malkin et al. 2001). L'âge moyen de survenue des CCR est de 33 ans et le risque relatif est d'environ 2 par rapport à la population générale (Ruijs, Verhoef et al. 2010). Ce syndrome est causé par une mutation germinale sur le gène suppresseur de tumeur TP53 dans 70% des cas (Li, Fraumeni et al. 1988)

La polypose associée aux mutations de MUTYH (PAM)

Il s'agit d'un syndrome autosomique récessif caractérisé par la présence d'un nombre variable de polypes colorectaux (>10) de phénotypes histologiques différents (principalement adénomes classiques mais également festonnés et polypes hyperplasiques), ayant tendance à évoluer vers des carcinomes. Ces polypes sont localisés dans tout le colon mais également dans l'intestin grêle (Lubbe, Di Bernardo et al. 2009). Ce syndrome est causé par une mutation germinale biallélique au niveau du gène MUTYH. La protéine MUTYH est une ADN glycosylase du système de réparation par excision de bases (BER, Base Excision Repair) qui joue un rôle majeur dans la réparation des lésions oxydatives de l'ADN. (Cleary, Cotterchio et al. 2009). Une perte de fonction de MUTYH entraîne donc un défaut de réparation des lésions oxydatives de l'ADN, et une accumulation de transversions G : C vers T : A dans les gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes. Ce type de transversions au niveau des sites GAA du gène APC conduisent, notamment, à une sélection du codon stop TAA. De même, dans l'étude de Boparai *et al*, 70% des polypes hyperplasiques (PH) et des adénomes festonnés sessiles (sessile serrated adenoma, SSA) des patients avec une polypose associée aux mutations de MUTYH présentaient des transversions au niveau du codon 12 de KRAS comparés à 17% pour les PH et SSA sporadiques (Boparai, Dekker et al. 2008). Deux transversions sont possibles au niveau de ce codon (GGT → TGT ou GTT) et conduisent à l'inactivation de l'activité GTPase de Ras. Le risque associé aux mutations MUTYH et la prévalence des porteurs bialléliques sont encore inconnus.

Study Reference	Genotyping platform (Nb. of SNPs)	Sample Size for Stage I	Sample Size for Subsequent Stages	Population	SNP ID (minor allele frequency in Europeans)	Gene/Region	OR per allele	p-value over all sample sets
Zanke Nat Genet 2007 39:989–94. (7)	Illumina and Affymetrix (99,632)	1,257 cases/1,336 Controls	4,024 cases/4,042 controls	First-stage: Canada	rs10505477 (0.50)	8q24	1.18	1.41×10^{-8}
				Other stages: Canada, US, Scotland	rs719725	9p24	1.14	1.32×10^{-5}
Tomlinson Nat Genet 2007 39:984–8. (8)	Illumina (547,647)	930 cases/960 controls	7,334 cases/5,246 controls	First-stage: UK	rs6983267 (0.49)	8q24	1.21	1.27×10^{-14}
Broderick Nat Genet 2007 39:1315–7. (9)	Affymetrix (550,163)	940 cases/965 controls	7,473 cases/5,984 controls	First-stage: UK	rs4939827 (0.52)	18q21 <i>SMAD7</i>	1.18	1.0×10^{-12}
				Second stage: UK				
Jaeger Nat Genet 2008 40:26–8. (10)	Illumina (547,647)	730 cases/960 controls	4,500 cases/3,860 controls	First-stage: UK	rs4779584 (0.19)	15q13 <i>CRAC1</i>	1.26	4.4×10^{-14}
				Second stage: UK				
Tomlinson Nat Genet 2008 40:623–30. (11)	Illumina (550,163)	940 cases/965 controls	17,891 cases/17,575 controls	First-stage: UK	rs10795668 (0.33)	10p14	0.89	2.5×10^{-13}
				Second stage: UK, EU	rs16892766 (0.07)	8q23.3 <i>EIF3H</i>	1.25	3.3×10^{-18}
Tenesa Nat Genet 2008 40:631–7. (12)	Illumina (541,628)	981 cases/1,002 Controls	16,476 cases/15,351 controls	First-stage: Scotland	rs4939827 (0.52)	18q21 <i>SMAD7</i>	1.20	7.8×10^{-28}
				Second stage and replication: Canada, UK, Israel, Japan, EU	rs7014346 (0.37)	8q24	1.19	8.6×10^{-26}
COGENT Nat Genet 2008 40:1426–35 (13)	Multiple (38,710)	6,780 cases, 6,843 controls	13,406 cases, 14,012 controls	First-Stage: UK	rs4444235 (0.46)	14q22.2 <i>BMP4</i>	1.11	8.1×10^{-10}
				Replication: EU, Canada	rs9929218 (0.29)	16q22.1 <i>CDH1</i>	1.20	1.2×10^{-8}
					rs10411210 (0.10)	19q13.1 <i>RHPN2</i>	0.87	4.6×10^{-9}
					rs961253 (0.36)	20p12.3	1.12	2.0×10^{-10}

Tableau 1. Etudes de GWAS publiées au 1^{er} janvier 2009 et loci de susceptibilité au cancer colorectal identifiés (Le Marchand 2009)

Les mutations germinales du gène BRCA1 situé sur le chromosome 17q sont responsables d'une prédisposition héréditaire aux cancers du sein et de l'ovaire. Les familles BRCA1 présenteraient également un risque significativement augmenté de CCR, avec un risque relatif d'environ 4 (Ford, Easton et al. 1994).

II-3-2-Les polymorphismes à forte pénétrance et polymorphismes nucléotidiques

Les amines aromatiques hétérocycliques (contenues notamment dans la viande cuite à haute température) pourraient constituer des carcinogènes colorectaux. Des polymorphismes d'enzymes impliquées dans les voies métaboliques de ces amines, à savoir, la méthylène-tétra-hydro-folate-réductase (MTHFR), les N-acétyl-transférases (NAT1, NAT2), les glutathione-S-transférases, l'aldéhyde déshydrogénase et les enzymes du cytochrome P-450 (CYP1A2), pourraient donc expliquer les susceptibilités et prédispositions individuelles parmi des populations soumises aux mêmes expositions (Rafter and Glinghammar 1998; Houlston and Tomlinson 2001).

De même certains polymorphismes nucléotidiques (single nucleotide polymorphism) à faible pénétrance ont été identifiés plus récemment par les études génomiques (Genome Wide Association Studies) et restent à être confirmés comme facteurs de prédisposition (Le Marchand 2009) (Tableau 1).

III-Les différentes tumeurs épithéliales colorectales: la classification histopathologique

La classification de l'OMS distingue plusieurs types histologiques de tumeurs épithéliales colorectales (Bosman, F. et al. 2010) :

Les lésions prénéoplasiques comprennent:

- Les foyers de cryptes aberrantes dysplasiques (Figure 2) et hyperplasiques (Figure 3)

Les lésions précurseurs incluent

-Les adénomes tubulaires (Figure 4), vilieux (Figure 5), tubulo-vilieux (Figure 6)

-Les tumeurs festonnées : polypes hyperplasiques, adénomes festonnés sessiles (Figure 5), adénomes festonnés traditionnels (Figure 7).

Les adénocarcinomes (Figure 8)

Parmi les adénocarcinomes, plusieurs variants plus rares sont distingués

Adénocarcinomes mucineux (Figure 9)

Carcinomes à cellules en bague à chaton (Figure 10)

Carcinomes médullaires (Figure 11)

Carcinomes festonnés (Figure 12)

Le diagnostic et la distinction entre ces tumeurs, au pronostic différent, reposent, dans la plupart des cas, uniquement sur des critères histopathologiques.

III -1- Les lésions prénéoplasiques: les foyers de cryptes aberrantes

Ils constituent les précurseurs morphologiques les plus précoces des néoplasies épithéliales. Les foyers de cryptes aberrantes (FCA) sont composés de larges cryptes recouvertes d'un épithélium épaissi pauvre en mucine. Il existe 2 principaux types de foyers de cryptes aberrantes (Cheng and Lai 2003; Suehiro and Hinoda 2008) .

III -1-1-Les foyers de crypte aberrantes dysplasiques

Les foyers de cryptes aberrantes dysplasiques sont fréquents chez les patients présentant une polypose adénomateuse familiale. Chez ces patients, ils sont également caractérisés par une hyperprolifération épithéliale de la partie supérieure des cryptes, l'absence de méthylation et de mutation KRAS, et la présence de mutations APC. L'hypothèse d'une séquence -foyers de cryptes aberrantes dysplasiques / adénomes / carcinomes- a ainsi été proposée pour caractériser la voie de carcinogénèse classique des CCR (Nascimbeni, Villanacci et al. 1999). Cependant, alors que les foyers de cryptes aberrantes dysplasiques sont très fréquents chez les patients atteints de polypose familiale adénomateuse, ils sont plus rares dans les formes sporadiques, les foyers de cryptes aberrantes dysplasiques représentant environ 5% des foyers de cryptes aberrantes sporadiques (Alrawi, Schiff et al. 2006). Par ailleurs, ces lésions dysplasiques sporadiques présentent, moins souvent des mutations APC et plus fréquemment des mutations KRAS et une hyperméthylation, comparées aux foyers de cryptes aberrantes

dysplasiques des polyposes adénomateuses familiales (Les mutations APC restent, cependant plus fréquentes que dans les FCA hyperplasiques). Ces résultats suggèrent que la grande majorité des foyers de cryptes aberrantes sporadiques (notamment hyperplasiques et une fraction des dysplasiques) n'évolue pas en lésions néoplasiques.

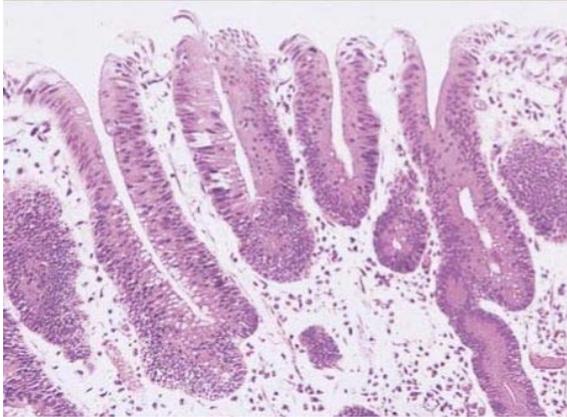


Figure 2. Foyer de cryptes aberrantes dysplasiques, présentant une perte de polarité, un hyperchromatisme des noyaux et une stratification nucléaire. Grossissement x20. Coloration HE.

(Takayama, Katsuki et al. 1998)

III -1-2-Les foyers de cryptes aberrantes hyperplasiques

Les foyers de cryptes aberrantes hyperplasiques possèdent certaines caractéristiques morphologiques des polypes hyperplasiques et présentent fréquemment des mutations du proto-oncogène KRAS. Ils pourraient constituer des précurseurs précoces d'une sous-population de cancers colorectaux dans laquelle la mutation KRAS précéderait la mutation APC (Takayama, Ohi et al. 2001). Par ailleurs, certains FCA hyperplasiques, festonnés, présentent plus fréquemment des mutations BRAF et moins souvent des mutations KRAS que les FCA hyperplasiques non festonnés (Rosenberg, Yang et al. 2007). Ils ont également été associés à des méthylations des îlots CpG et pourraient donc être des précurseurs des carcinomes festonnés à travers une séquence FCA hyperplasique festonnée/adénome festonné/adénocarcinome (Chan, Broaddus et al. 2002).

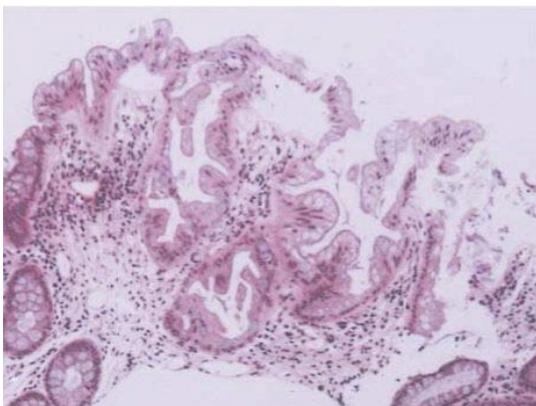


Figure 3. Foyer de cryptes aberrantes hyperplasiques, présentant une lumière festonnée. Grossissement x20. Coloration HE.

(Takayama, Katsuki et al. 1998)

III-2-1-Les adénomes

Ces lésions sont définies par la présence d'une néoplasie intra-épithéliale et sont caractérisées par une hypercellularité avec des noyaux volumineux et hyperchromatiques, une stratification nucléaire et une perte de polarité. L'inactivation de la voie APC/ β -caténine est typique (Jen, Powell et al. 1994). Les adénomes sont classiquement considérés comme les précurseurs des adénocarcinomes à microsatellite stable.

Les adénomes tubuleux (AT) peuvent être pédiculés ou plats. Au moins 80% des glandes sont dysplasiques.



Figure 4. Petit adénome tubulaire pédiculé du colon, présentant une prolifération et désorganisation glandulaire. Les cellules caliciformes sont moins nombreuses et les noyaux hyperchromatiques. Grossissement x4, coloration à l'hématoxyline-éosine (HE). (Source: Pathologie-Bilddatenbank)

Les adénomes vilieux (AV) sont typiquement sessiles (non pédiculés). Les projections vilieuses sont tapissées par des glandes dysplasiques sur plus de 80% du revêtement.

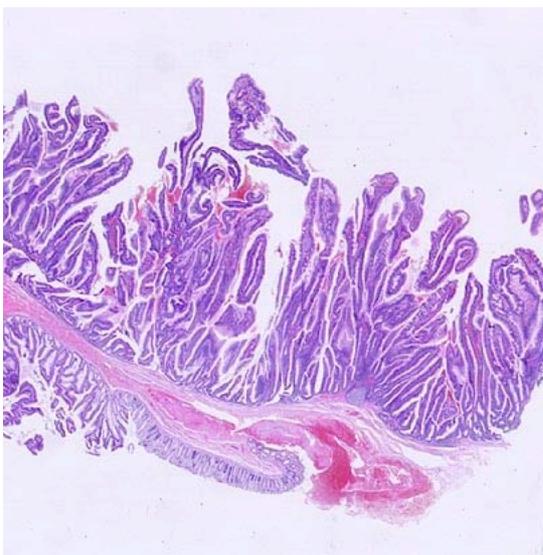


Figure 5. Adénome vilieux sessile du colon, présentant de longues franges papillaires avec un axe conjonctif recouvert de glandes dysplasiques. Grossissement x4, coloration HE (Source: Pathologie-Bilddatenbank).

Les adénomes tubulo-villeux (ATV) présentent une architecture mixte, à la fois tubuleuse et vilieuse.

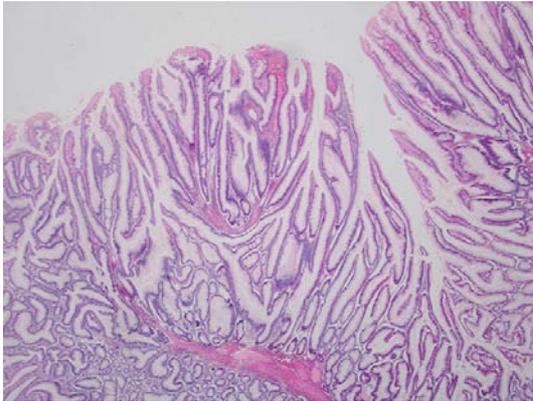


Figure 6. Adénome tubulo-villeux du colon, présentant une architecture mixte avec des embranchements tubulaires (à gauche) et des franges vilieuses (à droite). Grossissement x20. Coloration HE. (Source: John Hopkins medical school).

III-2-2-Les tumeurs festonnées

Elles font partie d'un groupe hétérogène de tumeurs dont les caractéristiques histomorphologiques ont été récemment précisées par Torlakovic (Torlakovic and Snover 1996; Torlakovic, Skovlund et al. 2003).

Les polypes hyperplasiques sont des lésions préneoplasiques. Ils font l'objet de cette thèse et seront détaillés dans le chapitre 2,

Les adénomes festonnés sont caractérisés par une architecture en dent de scie (festonnée) sur la totalité de la longueur des glandes. Celles-ci sont dysplasiques au niveau de leur partie supérieure. On distingue les trois types histologiques décrits ci-dessous:

Les adénomes festonnés sessiles (SSA, sessile serrated adenoma) : Il s'agit de lésions larges généralement supérieures à 5 mm, de localisation proximale qui seraient présentes chez près de 9% des patients ayant subi une coloscopie (Bosman, F. et al. 2010). Ces lésions sont caractérisées par une élongation et dilatation des glandes avec d'importants festons, présents plutôt à la base des glandes qu'en superficie, comme pour les polypes hyperplasiques. Les SSA non compliqués ne présentent pas de dysplasie, mais lors de la progression carcinomateuse acquièrent des lésions de dysplasie semblables aux adénomes classiques.

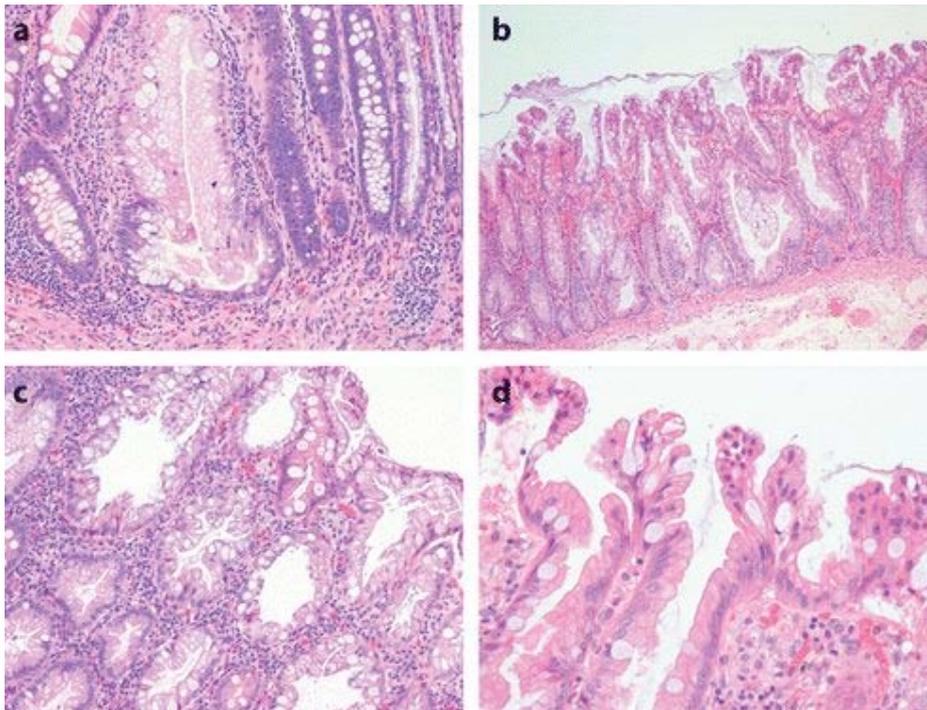


Figure 7. Adénome sessile festonné présentant typiquement (a) des anomalies architecturales avec des cryptes en T ou L, (b) (c) des dilatations importantes des cryptes avec un aspect festonné marqué présent jusqu'à la base et (d) des cellules dans la partie supérieure des cryptes contenant des noyaux larges et désorganisés. Grossissement x20 (a et b) et x40 (c et d). Coloration HE. (Noffsinger 2009)

Les adénomes festonnés traditionnels (TSA, traditional serrated adenoma) : Ce sont des lésions rares (<1% de tous les polypes) caractérisées par une architecture vilieuse et présentant des lésions cytologiques de type dysplasique. Ces anomalies sont à différencier des dysplasies observées dans les adénomes classiques ou les SSA avec dysplasie.

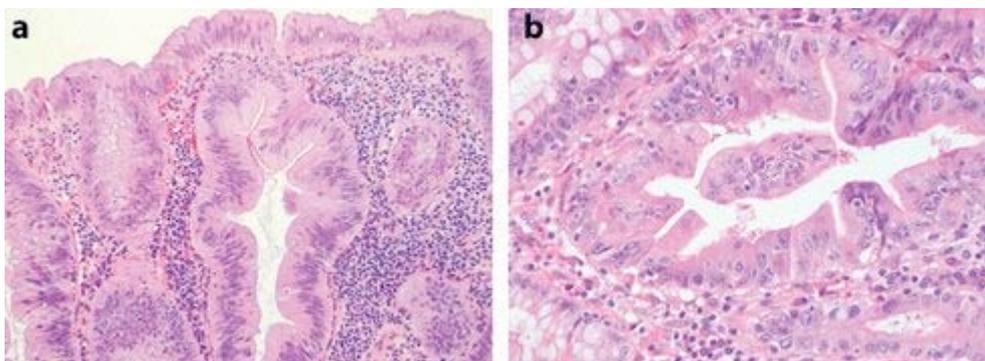


Figure 6. Adénome festonné traditionnel présentant (a) des cryptes festonnées recouvertes de cellules cylindriques élargies et nombreuses au cytoplasme très éosinophile avec (b) parfois une dysplasie de haut grade (Noffsinger 2009). Grossissement x40. Coloration HE.

III-3-Les adénocarcinomes colorectaux

La plupart des adénocarcinomes colorectaux sont d'architecture glandulaire. La taille et la configuration des structures glandulaires sont variables et les cellules épithéliales sont souvent larges et hautes dans les adénocarcinomes bien et moyennement différenciés. On distingue plusieurs variants. Certains sont associés à des caractéristiques moléculaires spécifiques.

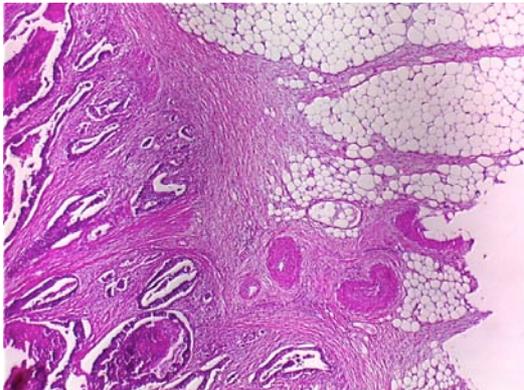


Figure 8. Adénocarcinome moyennement différencié du colon, présentant une prolifération glandulaire infiltrante. Grossissement x4. Coloration HE.

Les Adénocarcinomes mucineux

Ces tumeurs constituent une variante des adénocarcinomes, dans laquelle plus de 50% de la lésion est constituée de mucine extracellulaire. Les nappes de mucines contiennent de l'épithélium malin se présentant sous formes de structures glandulaires, de lambeaux ou de cellules épithéliales isolées. Ce type histopathologique caractérise de nombreux carcinomes à instabilité microsatellitaire forte (microsatellite instable high, MSI-H).

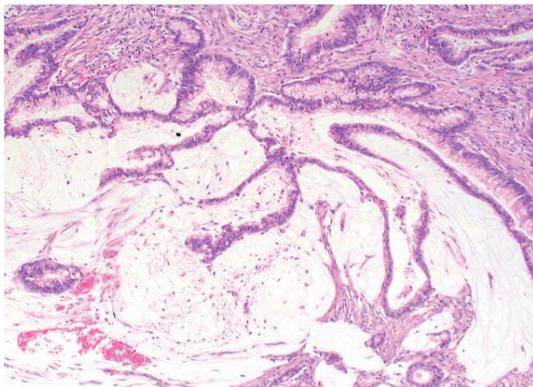


Figure 9. Adénocarcinome mucineux bien différencié (tubulaire), présentant de larges nappes de mucines. Grossissement x20. Coloration HE.

(Egashira, Yoshida et al. 2004)

Carcinomes à cellules en bague à chaton

Les carcinomes à cellules en bague à chaton sont définis par la présence de plus de 50% de cellules tumorales contenant de la mucine intra-cytoplasmique. Les cellules en bague à chaton se caractérisent par une large vacuole de mucine repoussant le noyau en périphérie. Certains carcinomes MSI-H sont de ce type.

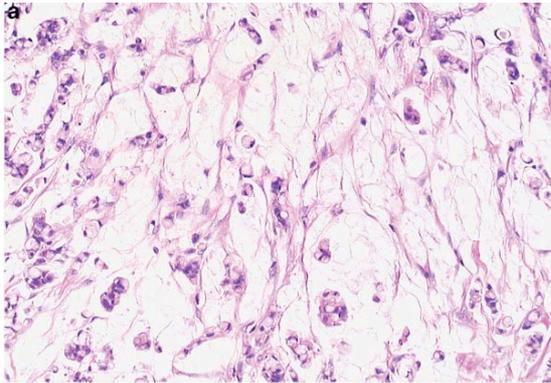


Figure 10. Carcinome à cellules en bague à chaton. Grossissement x20. Coloration HE.

(Egashira, Yoshida et al. 2004)

Carcinomes médullaires

Il s'agit d'un variant histopathologique rare caractérisé par des cellules contenant un noyau vésiculaire avec un nucléole proéminent et un cytoplasme abondant. L'infiltration lymphocytaire intra-épithéliale est importante. Les carcinomes médullaires sont associés de manière invariable aux carcinomes MSI-H.

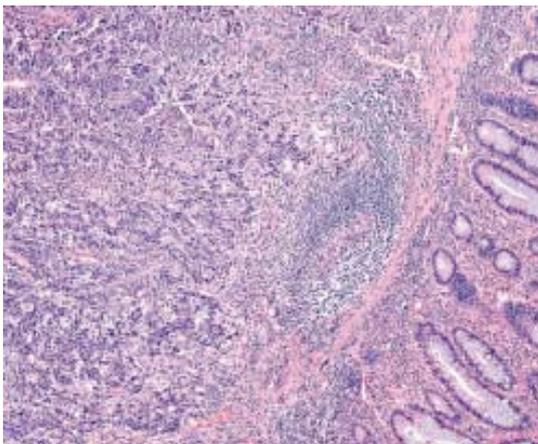


Figure 11. Carcinome médullaire. Les cellules tumorales de grande taille s'organisent en cordons et nids. Grossissement x20. Coloration HE.

(Wick, Vitsky et al. 2005)

Ces adénocarcinomes sont d'architecture festonnée, similaire à celle des adénomes festonnés sessiles. Ils peuvent être à instabilité microsatellitaire forte ou faible (MSI low ou MSI-L), BRAF muté et avec hyperméthylation des îlots CpG (segment d'ADN riche en paires de bases GC).

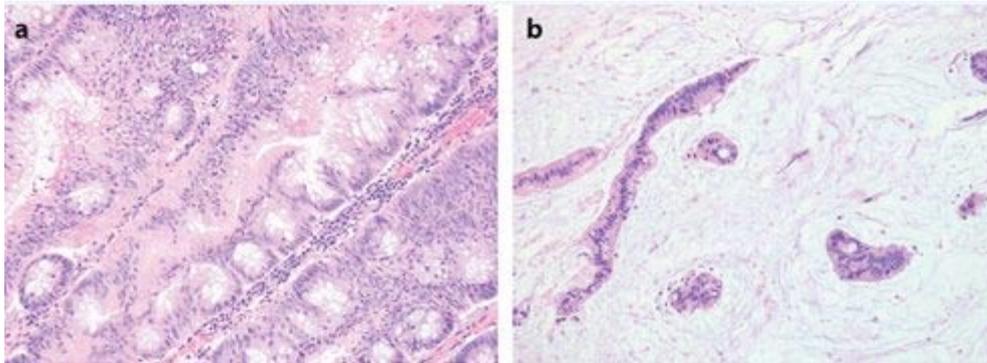


Figure 12. Adénocarcinome festonné, présentant (a) des cryptes festonnées et des cellules au cytoplasme éosinophile semblables aux adénomes festonnés traditionnels. La nécrose sale (nécrose tumorale avec débris de cellules et nucléaires) est typiquement absente. (b) Ces tumeurs sont fréquemment mucineuses, les flaques de mucine contenant des amas arrondis ou cordons de cellules tumorales. Grossissement x40. Coloration HE. (Noffsinger 2009)

IV-Les différentes voies de carcinogénèse colorectale : Vers une classification moléculaire

Les cancers colorectaux ne constituent donc pas un groupe homogène. Ces différents types histologiques traduisent d'une part des étapes successives de la transformation tumorale (modèle multi-étape de la carcinogénèse colique) et d'autre part, l'existence de différentes voies de carcinogénèse

IV -1-Le modèle multi-étape de la carcinogénèse colique

Le concept de la progression adénome/carcinome a été proposé dans les années 1970 à la suite d'une étude portant sur plus de 1000 échantillons histopathologiques par Morson *et al* (Muto, Bussey et al. 1975). Dans cette étude, les auteurs ont observé la présence de foyers malins au sein de larges adénomes et la présence d'adénomes bénins près des carcinomes, ainsi qu'une similarité histologique entre ces lésions adjacentes.

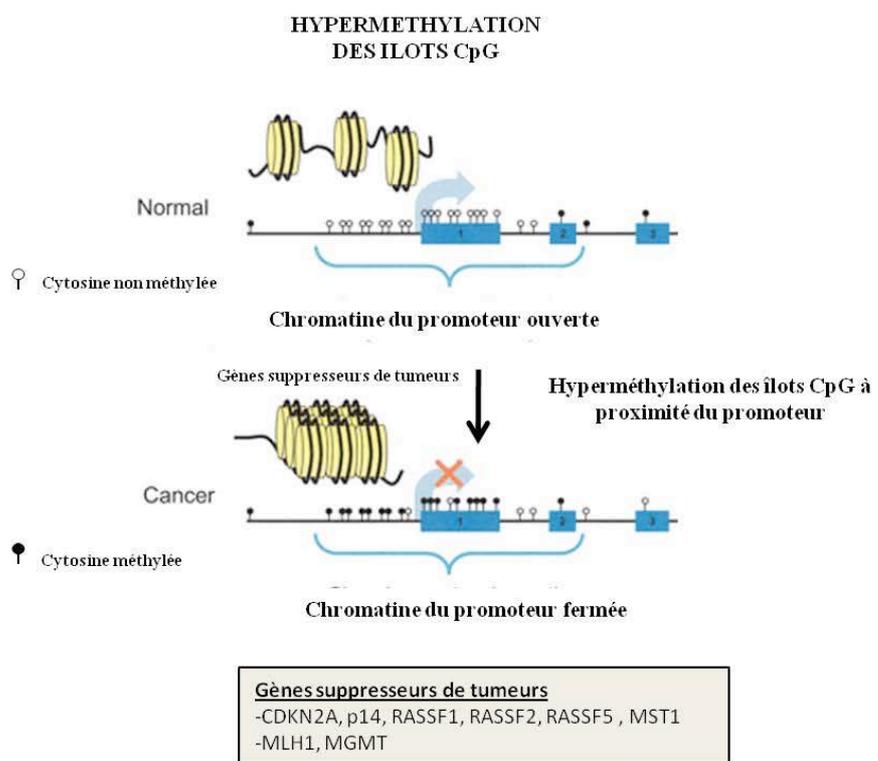
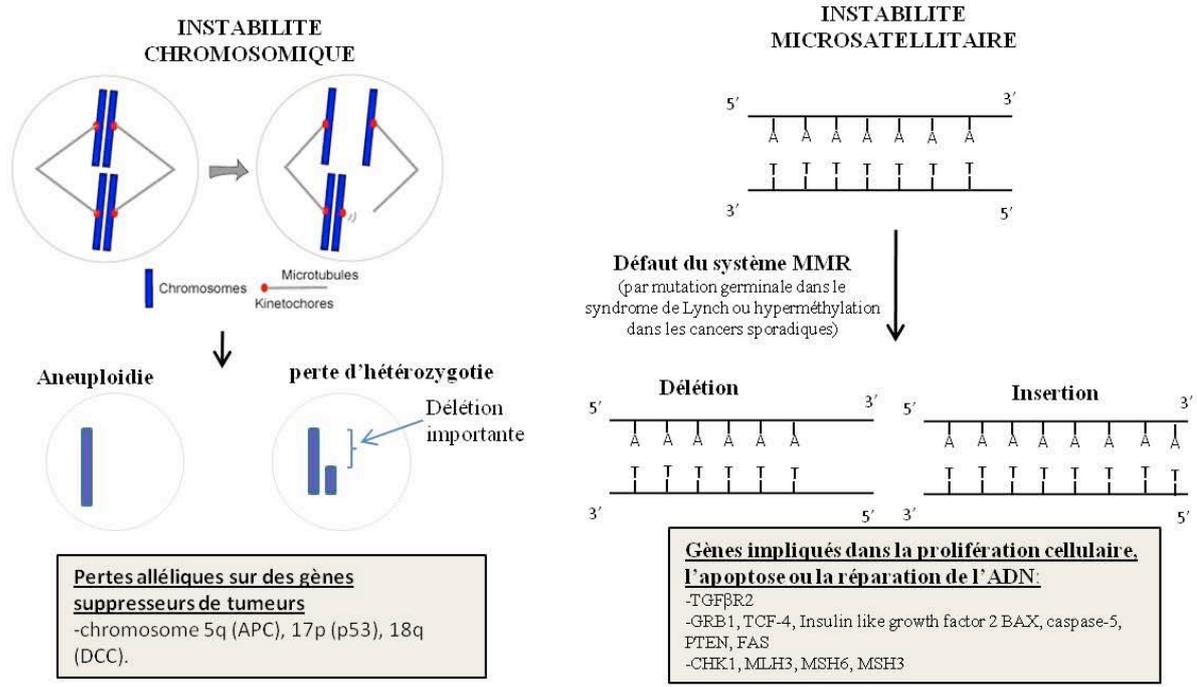


Figure 13. Les 3 mécanismes initiateurs décrits dans les cancers colorectaux : l'instabilité chromosomique, l'inastabilité microsatellitaire et l'hyperméthymation des îlots CpG.

Les différentes étapes morphologiques de la progression néoplasique colorectale, foyer de cryptes aberrantes (FCA), adénomes et carcinomes, ont, par la suite, été mises en parallèle avec l'acquisition progressive de mutations à chaque étape de la transformation adénome-adénocarcinome, chacune d'elles étant associées à un nombre croissant de mutations génétiques (Vogelstein, Fearon et al. 1988; Fearon and Vogelstein 1990).

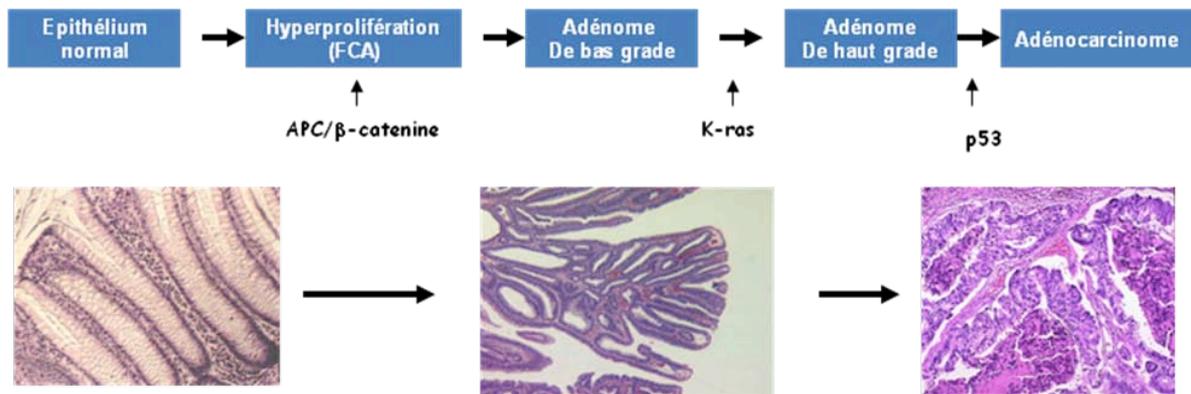


Figure 17. Séquence adénome-carcinome classique. Les mutations APC initient le processus néoplasique et la séquence histopathologique de transition adénome-carcinome reflète l'accumulation des mutations génétiques (Seules les mutations les plus fréquentes sont indiquées sur ce schéma) .

IV -2- Une classification moléculaire basée sur les mécanismes moléculaires permettant l'accumulation des mutations génétiques

Trois mécanismes permettraient d'expliquer l'accumulation de mutations sur les gènes contrôlant la prolifération et la mort cellulaire : l'instabilité chromosomique, l'instabilité microsatellitaire et l'hyperméthylation de l'ADN (figure 13). Ils sont associés à des types histologiques d'adénocarcinomes du colon et à des caractéristiques moléculaires distinctes. Bien que certaines voies puissent s'entrecroiser et être communes à plusieurs groupes, les cibles moléculaires de ces 3 mécanismes initiateurs sont différentes et expliquent l'existence de plusieurs voies de carcinogénèse plus ou moins parallèles (Kruhoffer, Jensen et al. 2005).

La classification moléculaire des CRC, proposée en 2007 par Jass (Jass 2007), est basée à la fois sur le type d'instabilité génétique (chromosomique, CIN ou microsatellitaire MSI) et la présence de méthylation des îlots CpG (CIMP).

De façon schématique et simplifiée, 5 groupes de CCR peuvent être distingués, en fonction du ou des mécanisme(s) initiateur(s) impliqué(s) :

Les groupes 2, 4 et 5 correspondent à des tumeurs avec un mécanisme unique ou prédominant, respectivement hyperméthylation, instabilité chromosomique et instabilité microsatellitaire. Le groupe 1 comporte des tumeurs à la fois à instabilité microsatellitaire et hyperméthylées alors que le groupe 2 est constitué des tumeurs à instabilité chromosomique et hyperméthylées (figure 14).

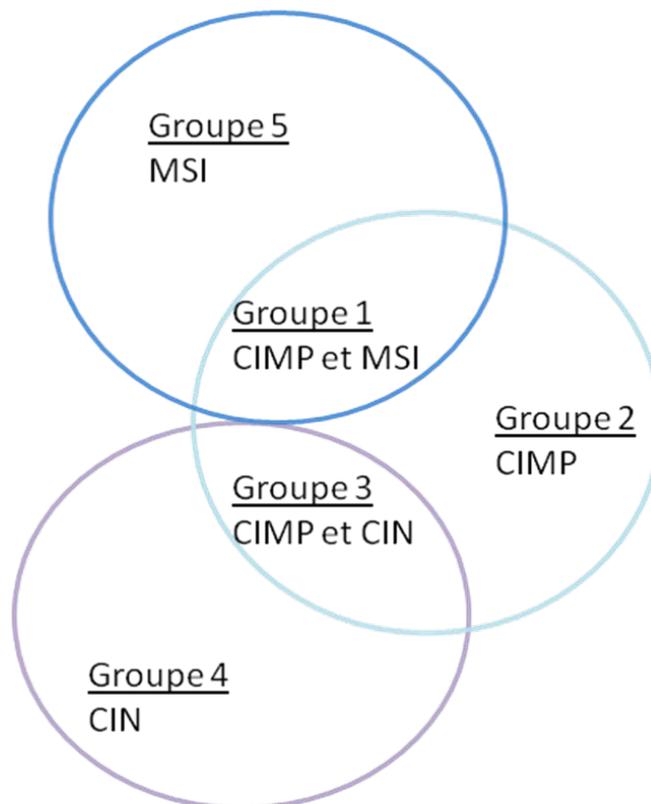


Figure 14. Représentation graphique de la classification des cancers colorectaux, selon Jass (Jass 2007).

MSI: microsatellite instability
 CIMP: CpG island methylator phenotype
 CIN: chromosomal instability

IV -2-1-L'instabilité chromosomique :

L'instabilité chromosomique est le mécanisme initiateur caractérisant les cancers colorectaux du groupe 4. Ils représentent près de 57 % des cancers colorectaux (Jass 2007). Il s'agit d'un des premiers mécanismes décrit pour expliquer l'accumulation des mutations génétiques au cours de la séquence adénome-carcinome du modèle multi-étape de Vogelstein (Kinzler and Vogelstein 1996) mais également dans d'autres types de cancers (Lengauer, Kinzler et al. 1998). Ainsi, la voie de carcinogénèse impliquée est également appelée voie de

l'instabilité chromosomique ou voie classique. L'instabilité chromosomique entraîne une aneuploidie ou des pertes d'hétérozygotie (Lengauer, Kinzler et al. 1998). La plupart des CCR présentent une perte de 4 ou 5 allèles. La majorité de ces pertes alléliques portent sur les chromosomes 5q (APC), 17p (p53) et 18q (DCC, deleted in colorectal carcinoma) (Gryfe, Swallow et al. 1997).

Les mutations associées à l'instabilité chromosomique

Les cancers colorectaux associés à l'instabilité chromosomique présentent différentes délétions ou mutations d'oncogènes ou suppresseurs de tumeur qui sont détaillées ci-dessous.

L'inactivation du gène APC

L'inactivation du gène APC serait l'événement le plus précoce et initiateur de la carcinogénèse dans les tumeurs du groupe 4 (à instabilité chromosomique) (Kinzler and Vogelstein 1996). La protéine APC agirait comme un gardien moléculaire contre le développement des adénomes et son inactivation conduirait à un déséquilibre entre prolifération et mort cellulaire (Morin, Vogelstein et al. 1996). En effet, l'activation de la voie APC est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, incluant la migration, l'adhésion, la prolifération et la stabilité chromosomique.

Les fonctions suppresseur de tumeur d'APC s'expliquent en partie par son rôle dans la régulation de la voie WNT/ β -caténine, par différents mécanismes. L'interaction entre β -caténine et APC dans un complexe comprenant la sérine/thréonine kinase GSK3 β et l'axine permet de réguler le niveau cytoplasmique de β -caténine. Dans ce complexe, la β -caténine est phosphorylée puis ubiquitinylée et dégradée par le protéasome (Rubinfeld, Albert et al. 1996). En l'absence de dégradation, la β -caténine se transloque dans le noyau où, après formation d'un complexe avec les facteurs de transcription TCF/LEF, elle initie la transcription de plusieurs gènes pro-oncogéniques dont c-myc et la cycline D1 (He, Sparks et al. 1998; Shtutman, Zhurinsky et al. 1999). La protéine APC peut également favoriser l'exportation nucléaire de β -caténine et ainsi empêcher la transcription de ses gènes cibles (Neufeld, Zhang et al. 2000). Par ailleurs, il a été montré que le complexe APC/C-terminal binding protein / β -TrCP (Sierra, Yoshida et al. 2006) peut inhiber la transcription des gènes cibles de la voie WNT/ β -caténine en entrant en compétition avec le complexe β -caténine activateur (figure 15).

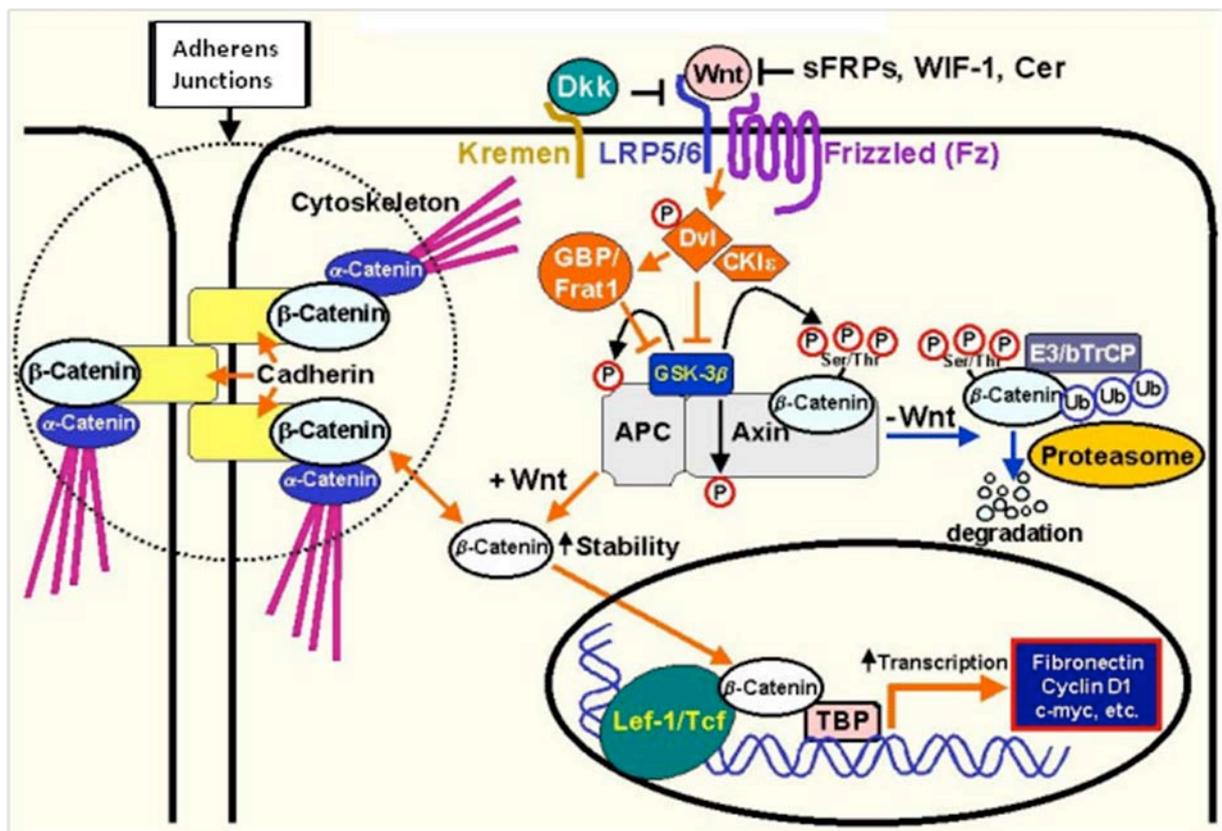


Figure 15. La voie WNT/β-caténine (Howard, Varallo et al. 2003).

La protéine APC serait également impliquée dans la régulation de la migration cellulaire par différents mécanismes. D'une part, sa partie C-terminale peut interagir avec la protéine de liaison au microtubule, EB1 et ainsi stabiliser les microtubules (Morrison, Wardleworth et al. 1998). D'autre part, APC peut également activer cdc42, impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et la formation de lamellipodes et filopodes (Kawasaki, Senda et al. 2000). Il a été, de même, montré qu'APC était capable d'interagir avec la protéine de soutien IQGAP1, un des effecteurs de cdc42 (Watanabe, Wang et al. 2004).

La perte d'APC pourrait également induire une instabilité chromosomique (CIN) (Fodde, Kuipers et al. 2001). En effet, EB1 est impliqué dans l'orientation des microtubules au cours de la mitose. Fodde *et al* ont montré que des cellules souches ES (embryonic stem) exprimant la protéine APC tronquée présentaient une instabilité chromosomique liée à la perte d'accumulation de EB1 au niveau du kinétochore des cellules en mitose.

Les mutations bi-alléliques du gène APC surviennent à la fois dans les polyposes adénomateuses familiales et les cancers colorectaux sporadiques. Environ 95% de ces mutations conduisent à la formation d'une protéine APC tronquée et près de 60% des mutations somatiques surviennent dans la région MCR (mutation cluster region) du gène (Fearnhead, Wilding et al. 2002). Ces mutations confèrent à la protéine tronquée un fort effet dominant négatif par absence des domaines nécessaires à la liaison à la β -caténine. Ainsi l'un des principaux avantages sélectifs apporté par la protéine APC tronquée réside dans la perte de régulation de la β -caténine. Cette hypothèse est confirmée par l'observation de la mutation gain de fonction dans l'exon 3 du gène de la β -caténine, CTNNB1, principalement dans les CCR sans mutations APC (Sparks, Morin et al. 1998).

Les dernières données de la littérature (Snover 2011) montrent que 60% des CCR sporadiques présentent une activation constitutive de la voie Wnt/ β -caténine, que ce soit par des mutations sur le gène APC ou CTNNB1.

Plusieurs modèles animaux transgéniques ont été développés pour confirmer le rôle de l'inactivation d'APC dans la carcinogénèse colique. L'un des mieux caractérisés est le modèle de souris APC^{min/+} (Min, multiple intestinal neoplasia). Ces souris présentent une mutation d'APC au niveau du codon 850, transformant une leucine (TTG) en codon stop (TAG). La délétion homozygote d'APC est létale. En revanche, les souris hétérozygotes développent des centaines de polypes adénomateux au niveau de l'intestin grêle. Chez les animaux plus âgés, des tumeurs localement invasives ont été détectées, ainsi que de petites zones d'adénocarcinomes *in situ* (Moser, Pitot et al. 1990; Su, Kinzler et al. 1992). Ces lésions

présentent un niveau de β -caténine augmenté, à la fois, au niveau du cytoplasme et du noyau. Cette surexpression est majeure aux stades précoces (foyers de cryptes aberrantes et petits adénomes), les lésions plus avancées (adénomes de grande taille et carcinomes) présentant de larges plages sans surexpression (Kongkanuntn, Bubb et al. 1999). Par la suite, d'autres modèles de souris transgéniques APC muté, dont $APC^{\Delta 474}$, $APC^{\Delta 716}$ et $APC^{\Delta 14}$ ont été développés par mutagenèse dirigée et confirment ce phénotype (Oshima, Oshima et al. 1995; Sasai, Masaki et al. 2000). De plus, dans tous les adénomes des souris $APC^{\Delta 716}$, une perte d'hétérozygotie a été détectée (l'allèle mutant APC restant inchangée). Ces résultats confirment la théorie de « second événement » de Knudson (Knudson 1971).

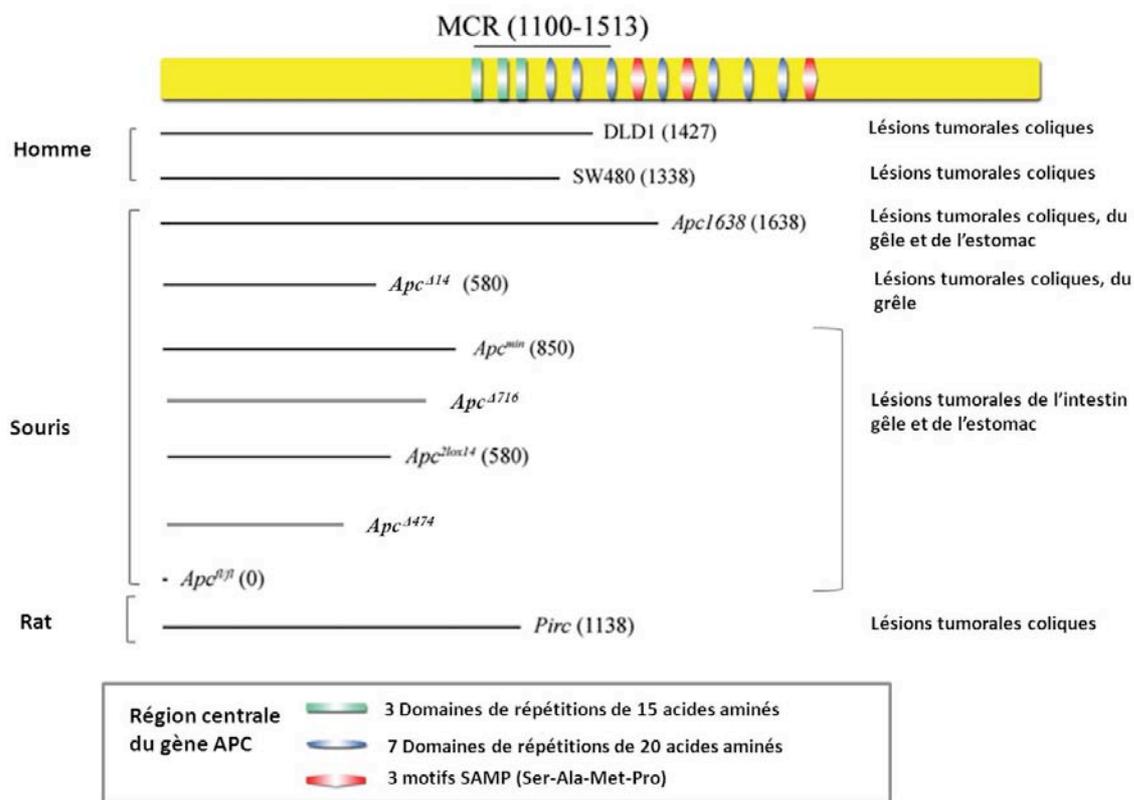


Figure 16: Différents modèles de mutation APC et localisations principales des tumeurs induites, modifié d'après Phelps *et al* (Phelps, Broadbent et al. 2009). Dans les cancers colorectaux humains, près de 60% des mutations somatiques surviennent dans la région MCR (mutation cluster region).

En revanche les souris APC^{1638} , possédant une mutation hétérozygote « chain-terminating » conduisant à une protéine tronquée au niveau de l'acide aminé 1638, présentent à 10 semaines des lésions hyperplasiques polypoïdes coliques. A un âge plus avancé, elles développent des adénomes et adénocarcinomes coliques, ainsi que des lésions tumorales de l'intestin grêle et de l'estomac (Fodde, Edelmann et al. 1994). De même, les souris $APC^{\Delta 14/+}$, comportent une délétion de l'exon 14 sur un des allèles d'APC aboutissant la formation d'une

protéine tronquée au niveau de l'acide aminé 580. Ces souris développent une polypose adénomateuse colique sévère associée à une activation de β -caténine et de ces cibles, cycline D1 et c-myc (Colnot, Niwa-Kawakita et al. 2004). Ces différences de phénotypes pourraient être dues à des terrains génétiques et des protéines tronquées de tailles différentes (Figure 16).

Par ailleurs, les rats Pirc (polyps in the rat colon) contenant une mutation APC au niveau de la région MCR (comme pour la majorité des mutations APC retrouvées dans les cancers colorectaux humains) développent également des adénomes coliques dans lesquels l'activation de β -caténine est retrouvée pour les stades avancés (Amos-Landgraf, Kwong et al. 2007).

Plus récemment, l'utilisation du système de recombinaison Cre-Lox a permis de développer des modèles d'inactivation conditionnelle, inductible (souris CYP1a-Cre;APC^{fl/fl} (Sansom, Reed et al. 2004) ou ciblant plus particulièrement le colon (souris CDX2P-Cre;APC^{+2lox14} (Hinoi, Akyol et al. 2007)). Des modèles murins d'inactivation conditionnelle aléatoire permettent également de mieux reproduire les étapes de la carcinogénèse sporadique intestinale (Miller, Dudley et al. 2008).

Les mutations du gène KRAS

Les mutations du gène KRAS seraient également des événements précoces dans la progression néoplasique. Elles sont retrouvées dans 10 à 95% des foyers de cryptes aberrantes (la mutation KRAS étant plus fréquente dans le type hyperplasique, voir chapitre correspondant). Elles sont également présentes dans 0-40% des adénomes, (Alrawi, Schiff et al. 2006) et dans 30-50% des carcinomes (Jiang, Kimchi et al. 2009). Les protéines Ras sont des petites GTPases, jouant un rôle dans de nombreuses voies de signalisation de récepteurs tyrosine kinase (Karnoub and Weinberg 2008). Les mutations de KRAS entraînent souvent une activation constitutive de voies de signalisation qui favorisent la croissance, la survie, la progression tumorale, la formation de métastases et l'angiogénèse (Downward 2003). En particulier Ras active la voie Raf/MEK/ERK (Leervers and Marshall 1992) qui conduit à la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Ras induit également la voie Pi3K/AKT, régulant la survie cellulaire et l'apoptose (Khawaja, Rodriguez-Viciana et al. 1997).

Plusieurs modèles de souris transgéniques ont été développés pour étudier le rôle de KRAS dans la carcinogénèse colique. Cependant, les différences de phénotypes induits très variables, en fonction de l'approche et du terrain génétique utilisés rendent l'interprétation

des résultats difficile. Certains modèles reposent sur la surexpression d'un mutant KRAS oncogénique. Kim *et al.*, et Coopersmith *et al.* ont développé des souris dans lesquelles l'expression de KRAS^{G12V} oncogénique était régulée par le promoteur de la fatty acid binding protéine (fabp) conduisant à une surpression du mutant au niveau de l'intestin. Dans ces deux études, les souris ne développaient aucune anomalie phénotypique intestinale et aucune activation de ERKs n'avait pu être mise en évidence (Kim, Roth et al. 1993; Coopersmith, Chandrasekaran et al. 1997). En revanche, lorsque l'oncogène KRAS^{G12V} est mis sous la dépendance du promoteur de la villine, permettant la surexpression du transgène dans les cellules progénitrices intestinales, les souris développaient des tumeurs, allant des foyers de cryptes aberrantes à des adénocarcinomes au niveau de l'intestin grêle et du colon (7%). De même dans ces souris, la surexpression de KRAS oncogénique était associée à une activation des ERKS (Janssen, el-Marjou et al. 2002).

Dans les cancers colorectaux, le gène KRAS est muté mais non surexprimé. Ainsi, des souris dans lesquelles l'allèle mutant KRAS est régulé par le promoteur endogène de KRAS ont été développées en utilisant des approches Cre-Lox. Dans ces systèmes, l'expression de l'oncogène KRAS est sous le contrôle d'une cassette transcriptionnelle STOP floxée. L'allèle mutant reste transcriptionnellement silencieux tant que la cassette STOP n'est pas excisée par la recombinaison Cre. Dans les études de Sansom *et al.*, et de Guerra *et al.*, l'expression du mutant KRAS^{G12V} n'entraînait aucune lésion au niveau de l'intestin murin ni activation de ERKs (Guerra, Mijimolle et al. 2003; Sansom, Meniel et al. 2006). Cependant, après l'inactivation d'APC, dans des souris (APC^{+/-F1}, KRAS^{+/-G12V}), l'activation de KRAS conduit à l'accélération de la formation d'adénomes et augmentent l'invasion des cellules tumorales de manière ERK dépendante. Ces résultats suggèrent que la mutation de KRAS^{G12V} seule, lorsqu'elle est exprimée au niveau des entérocytes postmitotiques, est insuffisante pour induire la transformation maligne des cellules coliques (Sansom, Meniel et al. 2006).

En revanche, les souris exprimant le mutant conditionnel KRAS^{G12D} dans le colon, développent une hyperplasie ainsi que des lésions dysplasiques coliques associées à une activation de ERKs (Tuveson, Shaw et al. 2004; Haigis, Kendall et al. 2008). Cette différence phénotypique pourrait être due à des propriétés moléculaires différentes entre les mutants KRAS^{G12D} et KRAS^{G12V} et des terrains génétiques différents des souris utilisées.

Les mutations du gène de p53

Le gène p53, localisé sur le chromosome 17p, code pour une DNA binding phosphoprotéine qui assure une fonction suppresseur de tumeur en inhibant le passage en phase G1 du cycle cellulaire en cas de dommage de l'ADN ou en induisant la mort cellulaire par apoptose.

Les mutations inactivantes de p53 apparaîtraient plus tardivement au cours de la séquence néoplasique colorectale, au stade d'adénome de haut grade et marqueraient la transition entre adénome et carcinome. Elles sont présentes dans plus de 50% des CCR (Rodrigues, Rowan et al. 1990).

Plusieurs modèles de souris d'inactivation biallélique pour le gène p53 ont été développés. Les souris p53^{-/-} sont viables et présentent une prédisposition principalement à des lymphomes, et sarcomes. En revanche, ces souris ne présentent pas de lésions coliques ni de prédisposition à des cancers colorectaux (Donehower, Harvey et al. 1992; Jacks, Remington et al. 1994; Clarke, Cummings et al. 1995). De même, les souris (APC^{+min}, p53^{-/-}) présentent le même phénotype que les souris APC^{+min} au niveau intestinal. Ces résultats suggèrent que p53 n'est pas impliqué dans le développement initial des tumeurs coliques mais plus tardivement au cours de la carcinogénèse, les effets de l'inactivation du gène p53 sur les cellules épithéliales coliques nécessitant la coopération d'autres voies pro-oncogéniques (Clarke, Cummings et al. 1995; Kongkanuntn, Bubb et al. 1999).

Autres mutations

D'autres mutations peuvent survenir, de façon plus inconstante, au cours de l'évolution tumorale. Elles concernent des gènes codant pour des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (p21, p27), l'apoptose (Bcl-2) ou la réplication des télomères (Gryfe, Swallow et al. 1997).

IV -2-2-L'instabilité microsatellitaire

Un deuxième type d'instabilité a été décrit, initialement dans les tumeurs des patients atteints du syndrome de Lynch mais également, dans les tumeurs festonnées sporadiques (Gryfe, Swallow et al. 1997). Ces tumeurs présentent une inactivation biallélique d'un des gènes de réparation des mésappariements, généralement MLH1, et sont associées à une

instabilité microsatellitaire (MSI) et à un taux de mutation augmenté (Markowitz 2000), notamment sur certains gènes suppresseurs de tumeurs comportant des séquences répétitives sur les parties codantes (Jass 2007).

On distingue deux niveaux d'instabilités microsatellitaires :

L'instabilité forte, MSI high (MSI-H), définie par la présence de plus de 30% de mutations dans un panel de marqueurs microsatellitaires, par consensus international en 1997 (Boland and Goel 2010). L'instabilité microsatellitaire élevée, MSI-H caractérise les tumeurs du syndrome de Lynch (groupe 5) et 15-20% des tumeurs sporadiques, à savoir, principalement les adénocarcinomes sporadiques du colon droit du groupe 1.

L'instabilité faible, MSI low (MSI-L), définie par la présence d'au moins un marqueur mais moins de 30% de marqueurs mutés. Bien que controversé, ce phénotype a été associé non pas à une méthylation du promoteur de MLH1, ni aux autres gènes du système de réparation des mésappariements, mais au gène de réparation de l'ADN, MGMT (O-6-MethylGuanine-DNA- Methyltransferase). La perte d'expression de MGMT se traduit par une accumulation des mésappariements G méthylé :T et un excès de stress sur le système de réparation des mésappariements, conduisant à un phénotype MSI-L (Whitehall, Walsh et al. 2001). Celui-ci semblerait associé aux tumeurs festonnées traditionnelles.

Les deux formes d'instabilité, chromosomique et microsatellitaire, sont mutuellement exclusives. Ainsi, les CCR avec instabilité chromosomique sont microsatellites stables (MSS, microsatellite stable) et, inversement, les CCR microsatellites instables ne présentent pas d'instabilité chromosomique.

Les mutations associées à l'instabilité microsatellitaire

Les cibles de l'instabilité microsatellitaire sont constituées principalement de gènes possédant des répétitions mononucléotidiques d'au moins 7 adénines (Chang, Metzgar et al. 2001), ces séquences étant particulièrement sensibles à la perte du système de réparation des appariements. Les différents gènes cibles de l'instabilité microsatellitaire sont détaillés ci-dessous.

Le récepteur au transforming growth factor β (TGF β) de type 2

La voie de signalisation induite par le TGF β aboutit à une inhibition de la prolifération épithéliale colique. Le récepteur au TGF β de type 2 (TGF β R2) est exprimé dans les tumeurs

microsatellite stables mais ne semble pas être exprimé dans les tumeurs MSI (Markowitz, Wang et al. 1995). Le gène du TGFβ2 possède 2 séquences microsatellites, dont l'une comporte 10 adénines consécutives. Des délétions dans ces séquences entraînent l'expression de mutants non actifs. Ces derniers ont été retrouvés principalement dans les lignées cellulaires MSI. Markowitz *et al* ont également montré que ces lignées ne répondaient pas au TGFβ. De plus, des mutations de TGFβ2 ont été détectées dans 90% des carcinomes MSI.

Les autres cibles de l'instabilité microsatellitaire

D'autres gènes cibles de l'instabilité microsatellitaire ont été identifiés. Ces gènes codent pour des protéines régulant la prolifération (GRB1, TCF-4, Insulin like growth factor 2), le cycle cellulaire et l'apoptose (BAX, caspase-5, PTEN, FAS) et la réparation de l'ADN (CHK1, MLH3, MSH6, MSH3) (Duval and Hamelin 2002). Cependant, contrairement au TGFβ2, une traduction fonctionnelle de ces mutations n'a pas été démontrée et aucune mutation bi-allélique n'a été documentée dans les tumeurs MSI.

La voie APC/β-caténine

Les tumeurs MSI se caractérisent par des lésions moléculaires distinctes de celle des tumeurs classiques microsatellites stables. Cependant, les voies activées dans les adénocarcinomes microsatellites stables peuvent également être induites dans les adénocarcinomes MSI, à travers d'autres protéines impliquées dans ces voies de signalisation.

Les tumeurs colorectales MSI ont généralement une expression normale d'APC. Cependant des mutations de β-caténine se traduisant par une protéine incapable d'interagir avec la protéine APC ont été retrouvées dans les tumeurs MSI. De plus certaines tumeurs MSI non mutées pour APC et β-caténine, présentent des mutations de TCF4, un effecteur de cette voie (Boland and Goel 2010).

Différence moléculaire entre tumeurs à instabilité microsatellitaire sporadiques et familiales

Pendant longtemps, les cancers colorectaux MSI ont été décrits comme les équivalents sporadiques des cancers du syndrome de Lynch. La caractérisation moléculaire de ces tumeurs a remis en cause cette hypothèse. Les tumeurs sporadiques MSI-H sont associées à

une méthylation importante de l'ADN (phénotype CIMP) et à des mutations de BRAF alors que les cancers colorectaux du syndrome de Lynch sont CIMP négatifs et présentent plutôt des mutations de KRAS. De plus, dans les tumeurs MSI du syndrome de Lynch, les mutations sur les gènes APC, KRAS et TP53 sont fréquemment retrouvées. Elles sont plus rares dans les tumeurs sporadiques MSI (Jass 2007). Contrairement aux cancers du syndrome de Lynch, le mécanisme initiateur des tumeurs MSI sporadiques semble donc plutôt être l'hyperméthylation de l'ADN, l'instabilité microsatellitaire survenant à un stade plus tardif (adénomes festonnées sessiles avancés) (figure 17).

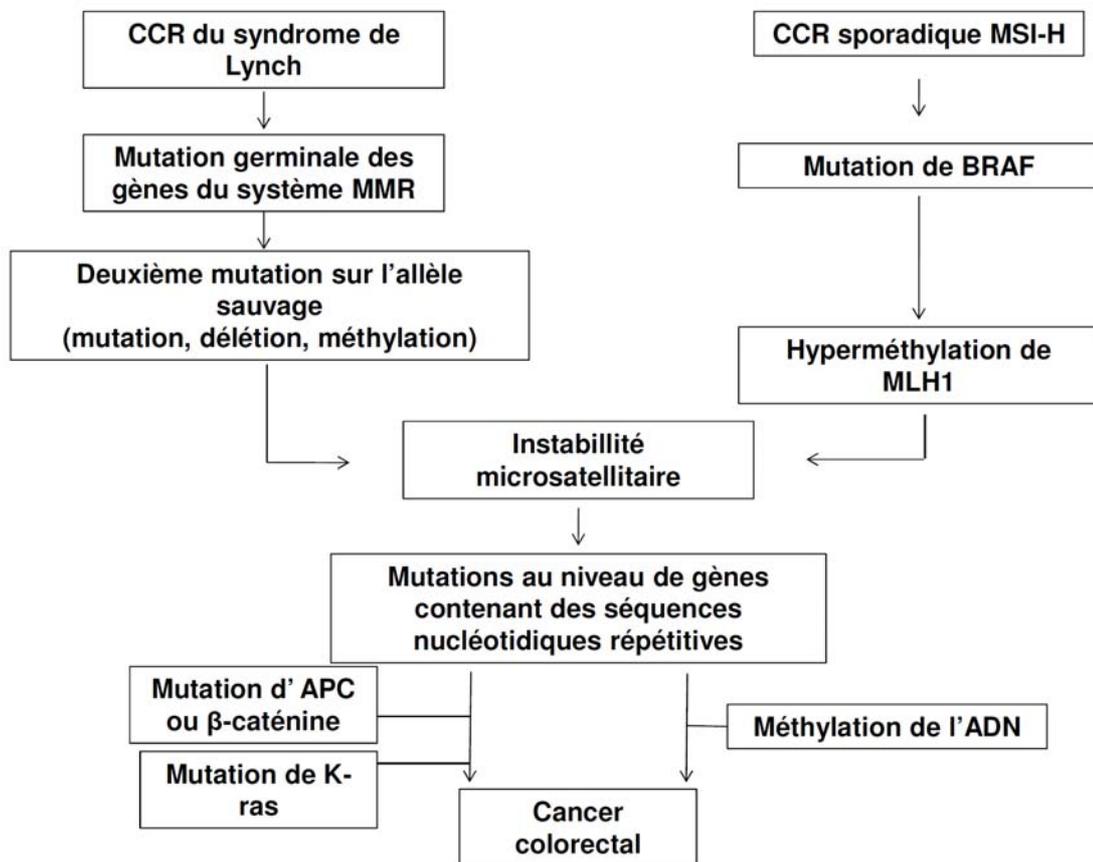


Figure 17: Cancers colorectaux à instabilité microsatellitaire : Syndrome de Lynch et cancers sporadiques MSI-H

IV -2-3-l'Hyperméthylation des îlots CpG, CIMP (CpG island methylator phenotype)

L'hyperméthylation de l'ADN a été associée à une méthylation des îlots CpG (CpG island methylator phenotype, CIMP). Près de 50% des régions promotrices des gènes humains contiennent des régions riches en dinucléotides cytosine et guanine, appelées les îlots CpG. La méthylation des résidus cytosine des îlots CpG induit des modifications structurales des chromosomes. Ces modifications épigénétiques peuvent inhiber l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeurs comme celle du gène MLH1 (Issa, Shen et al. 2005). Les tumeurs CIMP sont hétérogènes. On distingue, en fonction du niveau de méthylation, des tumeurs à forte méthylation (CIMP-high) et des tumeurs à faible méthylation (CIMP-L). La différence entre ces deux phénotypes ne se résume pas à une différence quantitative. En effet, les cancers colorectaux CIMP-H sont fréquemment associés à des mutations BRAF et présentent une méthylation de nombreux marqueurs. Ce phénotype semble donc traduire une augmentation globale de la méthylation de l'ADN (Shen, Toyota et al. 2007). En revanche, les cancers CIMP-low sont très souvent KRAS mutés et le plus faible nombre de gènes méthylés suggèrent un phénomène épigénétique localisé.

Les mutations associées à l'hyperméthylation

Ces méthylation concerneraient en particulier des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire comme CDKN2A et/ou p14 pour les tumeurs associées aux mutations KRAS (Nagasaka, Sasamoto et al. 2004). Les tumeurs BRAF mutées seraient quant à elles associées à une méthylation de gènes pro-apoptotiques comme RASSF1, RASSF2, RASSF5 et MST1 (Minoo, Baker et al. 2006).

Comme nous l'avons décrit plus haut, MLH1 est également une cible de méthylation dans les cancers conduisant à une forte instabilité microsatellitaire (CIMP-H, MSI-H groupe 1). En revanche, la méthylation de MGMT aboutirait à la formation de tumeurs à faible instabilité microsatellitaire (MSI-L). Ces cancers colorectaux sont associés à une hyperméthylation faible (groupe 3 : cancers CIMP-L et MSI-L) ou forte (groupe 2 : cancers CIMP-H et MSI-L)

V- Corrélation entre les différents types histologiques d'adénocarcinomes et les mécanismes moléculaires initiateurs

On peut distinguer 5 voies de carcinogénèse associées à des types histologiques d'adénocarcinomes et à des précurseurs distincts (voir Tableau 2).

Caractéristiques moléculaires et histocliniques	voie des tumeurs festonnées			Instabilité chromosomique	Syndrome de Lynch
	groupe 1	groupe 2	groupe 3	groupe 4	groupe 5
Statut MSI	MSI-H	MSS ou MSI-L	MSS ou MSI-L	MSS	MSI-H
Statut CIMP	CIMP-H	CIMP-H	CIMP-L	Négatif	Négatif
Instabilité chromosomique	Absente	Absente	Présente	Présente	Absente
APC	+/-	+/-	+	+++	++
KRAS	-	+	+++	++	++
BRAF	+++	++	-	-	-
Statut MLH1	Méthylation	Méthylation partielle	Normal	Normal	Mutation
méthylation MGMT	+/-	+++	+++	-	-
Localisation	Proximale	Proximale	Distale	Distale	Proximale
Précurseur	SSA	SSA	TSA/Adénome	Adénome	Adénome

Tableau 2: Classification moléculaire des cancers colorectaux basée sur leur mécanisme initiateur : hyperméthylation de l'ADN, instabilité microsatellitaire et chromosomique (d'après Jass (Jass 2007)). La fréquence des différentes mutations est codée de - (pas de mutation) à +++ (mutations très fréquentes).

Cependant, la corrélation histo-moléculaire n'est pas parfaite et certains adénocarcinomes histologiquement semblables peuvent présenter des mécanismes moléculaires initiateurs différents. De plus, certaines de ces voies peuvent se recouper (Jass 2007) (Figure 18).

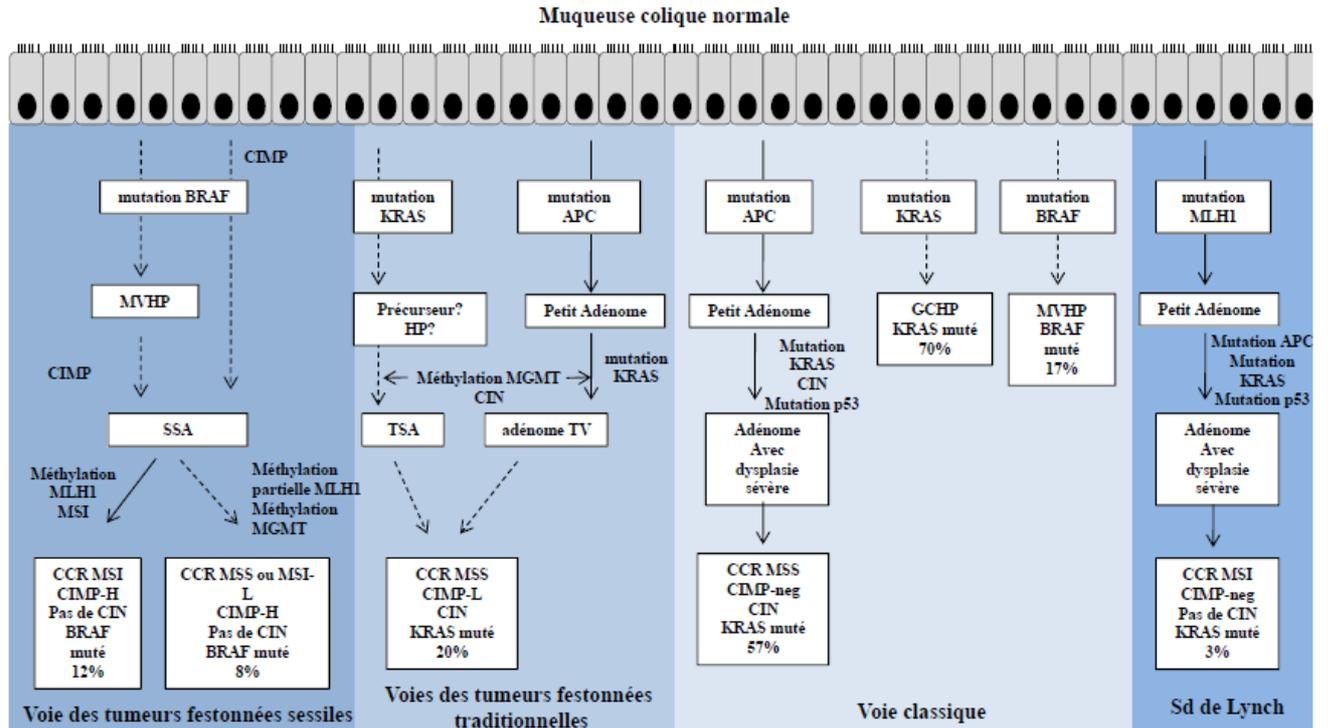


Figure 18. Les différentes voies de carcinogénèse colorectale. Les flèches en pointillées correspondent aux étapes controversées. GCHP : Polype hyperplasique à cellules caliciformes ; MVHP : polype hyperplasique à cellules microvésiculaires ; TV : tubulo-villeux ; SSA : adénomes festonnés sessiles; TSA : adénomes festonnés traditionnels.

V-1-La voie classique

Schématiquement les cancers colorectaux du groupe 4 correspondent aux tumeurs de la voie classique APC mutée. Ces tumeurs se caractérisent par une instabilité chromosomique. Elles ne présentent pas d'instabilité microsatellitaire ni d'hyperméthylation. Il s'agit des adénocarcinomes les plus fréquents. Leurs précurseurs sont les adénomes classiques (tubuleux, tubulo-villeux et vilieux).

V-2-Les voies des tumeurs festonnées

Les adénocarcinomes festonnés se répartissent dans les groupes 1, 2 et 3. Ils se caractérisent par la présence d'une hyperméthylation de l'ADN, associée ou non à une instabilité microsatellitaire. On distingue 3 voies :

V-2-1-La voie des tumeurs festonnées sessiles associées à une hyperméthylation forte de l'ADN et une instabilité microsatellitaire forte :
groupe 1

Les cancers colorectaux de cette voie représenteraient 12% des cancers colorectaux. Ils sont plus fréquemment de localisation proximale, d'architecture festonnée et retrouvés chez les patients âgés.

Le profil associant hyperméthylation forte et instabilité microsatellitaire (CIMP-H et MSI-H) observé dans ce type de cancers sporadiques a également été décrit dans les adénomes sessiles festonnés du colon proximal (Jass 2007). Cette observation a, ainsi, conduit à l'hypothèse d'une voie dans laquelle les adénomes festonnés sessiles constitueraient les lésions précédant des carcinomes festonnés MSI-H et CIMP-H. Dans cette voie, la méthylation de l'ADN serait un des événements initiateurs comparable à la mutation APC de la voie adénome-carcinome classique et expliquerait la perte du système de réparation des mésappariement dans les cancers colorectaux sporadiques à instabilité microsatellitaire forte (figure). Par ailleurs, cette séquence carcinogénique est également caractérisée par des mutations BRAF fréquentes et précoces (Leggett and Whitehall 2010).

V-2-2-La voie des tumeurs festonnées sessiles associées à une hyperméthylation forte de l'ADN et microsatellite stable (ou à faible instabilité microsatellitaire) : groupe 2

L'hyperméthylation ne s'accompagne pas d'instabilité microsatellitaire forte dans plus de 50% des cas. Ces cancers colorectaux hyperméthylés et à microsatellites stables (ou à faible instabilité microsatellitaire) ne présentent pas de méthylation de MLH1 (Toyota, Ahuja et al. 1999). Certains auteurs suggèrent qu'une partie des adénomes festonnés sessiles pourrait, être à l'origine de ces carcinomes CIMP-H et MSS/MSI-L (Makinen 2007). Les mécanismes de cette progression restent encore inconnus. Les cancers du groupe 2 représenteraient 8% des cancers colorectaux.

*V-2-3-La voie des tumeurs festonnées traditionnelles associée à une hyperméthylation faible de l'ADN et une instabilité microsatellitaire faible ou à microsatellites stables :
groupe 3*

Ce groupe représente 20 % des cancers colorectaux. Ces carcinomes associent une faible hyperméthylation à une instabilité microsatellitaire faible ou absente. Ils pourraient prendre leur origine dans les adénomes sessiles traditionnels (TSA). En effet, les adénomes sessiles

traditionnels ne sont pas associés à la méthylation de MLH1, ni aux carcinomes CIMP-H/MSI. De plus, au moins 25% d'entre eux présentent une mutation K-ras et non BRAF (O'Brien, Yang et al. 2006). Ils présenteraient, en revanche, une méthylation du promoteur de MGMT (Snover 2011). En effet, la perte d'expression de MGMT serait associée à des mutations KRAS et une instabilité chromosomique, par lésions chromosomiques lors des tentatives de réparation des mésappariements G méthylé : T (Nagasaka, Sasamoto et al. 2004).

V-3-Le syndrome de Lynch : groupe 5

Les cancers colorectaux de ce groupe constituent 3% des carcinomes colorectaux. Les adénomes classiques constituent leur précurseur. Ce groupe partage des caractéristiques communes avec le groupe 1 (carcinomes festonnés sporadiques à instabilité microsatellitaire forte et hyperméthylation forte) et 4 (adénocarcinomes classiques, microsatellite stable).

VI -Les polypes hyperplasiques

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement, à ces lésions dont les caractéristiques moléculaires et le potentiel néoplasique sont encore incomplètement élucidés et controversés. En effet, la distinction récente entre polypes hyperplasiques et adénomes festonnés sessiles (dont le potentiel néoplasique est maintenant admis) rend l'interprétation des données de la littérature difficile.

VI -1-Epidémiologie et facteurs de risque des polypes hyperplasiques

D'après plusieurs études prospectives, reposant sur de grandes cohortes de patients asymptomatiques de plus de 50 ans, la prévalence des polypes hyperplasiques (PH) dans les populations occidentales serait de l'ordre de 10% (Imperiale, Wagner et al. 2000; Lieberman, Prindiville et al. 2003).

Les facteurs de risque environnementaux des polypes hyperplasiques sont similaires à ceux du cancer colorectal, à savoir, l'abus d'alcool, l'obésité et le tabagisme (Martinez, McPherson et al. 1997; Morimoto, Newcomb et al. 2002). Les polypes hyperplasiques apparaissent à un âge plus précoce en comparaison aux adénomes. Dans une série autopsique européenne, 23% des patients entre 20 et 54 ans présentaient des PH mais seul 11% d'entre

eux avaient des adénomes (Clark, Collan et al. 1985). Par ailleurs, contrairement, aux adénomes colorectaux, l'âge ne serait pas ou peu associé à la présence de polype hyperplasique (Clark, Collan et al. 1985; DiSario, Foutch et al. 1991; Morimoto, Newcomb et al. 2002).

VI -2-Caractéristiques histologiques et sous-types de polypes hyperplasiques

D'un point de vue histologique, les polypes hyperplasiques appartiennent aux groupes des tumeurs festonnées et présentent certaines des caractéristiques morphologiques de ce groupe, en particulier une architecture glandulaire en dent de scie. Ce sont typiquement des lésions sessiles de 1 à 5mm et rarement >1cm. Les festons n'occupent que la première moitié des cryptes. Par ailleurs, l'activité proliférative est essentiellement localisée en fond de crypte et contrairement aux adénomes, n'intéresse pas sa partie supérieure ni la surface épithéliale (Torlakovic, Gomez et al. 2008).

Les polypes hyperplasiques forment un groupe hétérogène de lésions. Ainsi, la dernière classification de l'OMS (Bosman, F. et al. 2010) distingue 3 de types polypes hyperplasiques en fonction du contenu des cellules à mucine (Figure 19):

-Les polypes hyperplasiques riches en cellules caliciformes (GCHP ou globlet cell-rich hyperplastic polyps). Les cellules caliciformes sont prédominantes et les festons sont peu marqués. Ce type de polypes est retrouvé majoritairement au niveau du colon distal (70% des cas dans l'étude d'O'Brien (O'Brien, Yang et al. 2006)).

-Les polypes hyperplasiques microvésiculaires (MVHP ou microvesicular hyperplastic polyps), caractérisés par des cellules épithéliales contenant des microvacuoles de mucines et des festons proéminents. Bien que localisées principalement au niveau du colon distal ces lésions sont également retrouvées dans le colon proximal avec une fréquence plus élevée (45% des cas (O'Brien, Yang et al. 2006)) par rapport aux PH riches en cellules caliciformes

-Les polypes hyperplasiques pauvres en mucine (MPHP, mucin poor hyperplastic polyps), sont des lésions rares et mal caractérisées.

Bien que cette classification n'ait pour l'instant que peu d'application et d'intérêt clinique, en raison de la difficulté à distinguer les différents sous-types en pratique courante, ces trois types de PH présentent des caractéristiques moléculaires différentes.

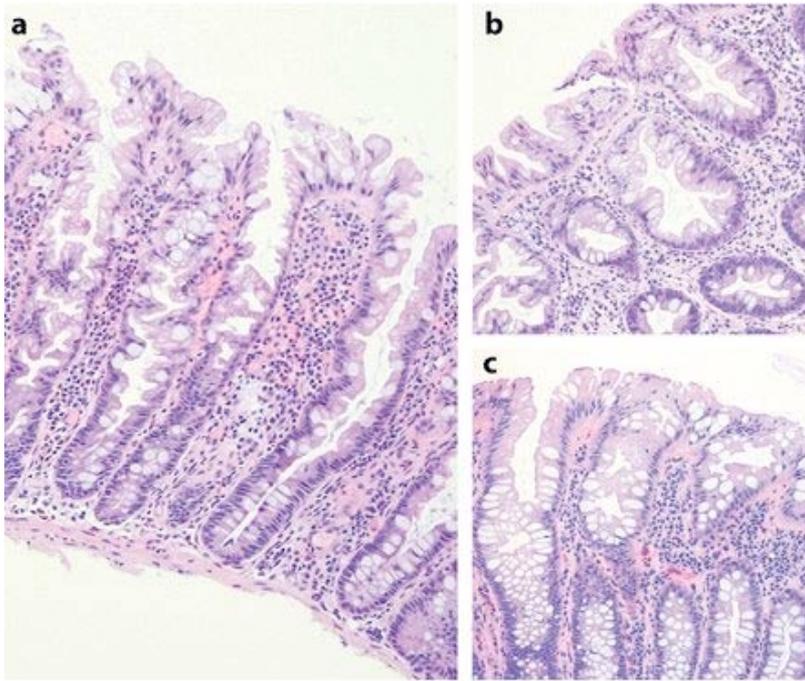


Figure 19. Polypes hyperplasiques. (a) Les glandes ne sont festonnées que sur la moitié superficielle et leur fond présente un aspect normal non dilaté. (b) Dans les polypes hyperplasiques microvésiculaires, le cytoplasme des cellules bordant les glandes contiennent des microvésicules. Quelques cellules caliciformes sont dispersées le long des glandes. (c) Le revêtement glandulaire des polypes hyperplasiques à cellules caliciformes est composé de nombreuses cellules caliciformes sans cellule microvésiculaire. Grossissement x20. Coloration HE. (Noffsinger 2009)

VI -3- Caractéristiques moléculaires des polypes hyperplasiques

Le profil moléculaire des HP est lié à la fois à leur type histologique et à leur localisation dans le colon. (O'Brien, Yang et al. 2004).

Méthylation dans les îlots CpG (CIMP)

La méthylation dans les îlots CpG des régions promotrices de gènes impliqués dans la carcinogénèse colorectale constitue une des plus fréquentes altérations génétiques survenant dans les polypes hyperplasiques. Près de 64% des polypes hyperplasiques présenteraient ce phénotype. Parmi eux, 65% serait CIMP-High (ce qui correspond à 42% des PH) (O'Brien, Yang et al. 2004). Par ailleurs, le phénotype CIMP-H serait 5 fois plus fréquent dans les PH microvésiculaires comparé aux PH riches en cellules caliciformes et associé à une localisation proximale. Les gènes méthylés dans les polypes hyperplasiques par ordre de fréquence sont MINT2, hMLH1, MINT1, p16 et MGMT (O'Brien, Yang et al. 2006). Les méthylations de hMLH1 sembleraient par ailleurs être associées à des polypes hyperplasiques de localisation

proximale et/ou de grande taille. En revanche, aucune de ces associations n'a été démontrée pour MGMT.

Instabilité microsatellitaire

Bien que les méthylations de MLH1 et MGMT puissent survenir dès le stade PH, elles sont partielles et la perte d'expression de ces marqueurs n'a pas été retrouvée dans les PH. Le statut MSI semble donc être associé aux lésions plus avancées (O'Brien, Yang et al. 2004; O'Brien, Yang et al. 2006).

BRAF/KRAS

Les gènes KRAS et BRAF codent pour des protéines impliquées dans la voie RAS/RAF/MEK/ERK. Dans le colon, les mutations sur ces gènes sont mutuellement exclusives (Chan, Zhao et al. 2003; Lee, Choi et al. 2005) et la plupart des polypes hyperplasiques possèdent l'une ou l'autre de ces mutations, avec selon les études entre 36%-61% de mutations BRAF et 18%-22% de mutation KRAS (Chan, Zhao et al. 2003; O'Brien, Yang et al. 2006). Certains auteurs suggèrent que l'activation de cette voie pourrait constituer l'un des mécanismes impliqués dans le développement des lésions hyperplasiques (Huang, O'Brien M et al. 2004). Par ailleurs, le statut KRAS/BRAF des polypes hyperplasiques dépend de leur type histologique et de leur localisation. Ainsi, les polypes hyperplasiques à cellules caliciformes semblent être associés aux mutations KRAS alors que les polypes hyperplasiques microvésiculaires seraient plutôt BRAF muté. De même, les polypes hyperplasiques avec mutations KRAS sont plutôt de localisation distale (O'Brien, Yang et al. 2004). L'ensemble de ces résultats supporte l'hypothèse de l'existence de deux voies parallèles qui s'entrecroiseraient rarement.

La Wnt/ β -caténine/APC

La voie Wnt/ β -caténine ne semble pas être activée dans les polypes hyperplasiques (Fogt, Brien et al. 2002; Wu, Montgomery et al. 2008; Fu, Li et al. 2009). Les polypes hyperplasiques montrent un marquage membranaire de β -caténine, à l'exception de quelques cellules en fond de crypte dont le marquage nucléaire correspond à l'augmentation commune

et déjà décrite du signal Wnt en fond de crypte (Clevers 2006). De même, les polypes hyperplasiques ne semblent pas présenter de mutation d'APC ni CTNNB1.

VI -4-Syndromes associés à la présence de multiples PH

La Polypose associée à la mutation MUTYH (PAM)

Les patients présentant une polypose associée à la mutation MUTYH développent un syndrome qui ressemble à une polypose adénomateuse familiale mais atténuée, avec généralement un âge plus tardif et un nombre inférieur d'adénomes. Par ailleurs, contrairement aux polyposes adénomateuses familiales, les polyposes associées à la mutation MUTYH se caractérisent également par la présence de polypes hyperplasiques. Ainsi, Boparai *et al* ont retrouvé sur une série de 17 patients avec PAM, la présence de multiples polypes hyperplasiques chez 47% d'entre eux (Boparai, Dekker et al. 2008). Aucune mutation APC n'a été retrouvée après analyse de ces polypes hyperplasiques mais 70% d'entre eux étaient mutés pour KRAS. Parmi ces mutations, 94% présentaient une transversion G : C → T : A. au niveau du codon 12 de KRAS (GGT → TGT ou GTT), conduisant à l'activation constitutive.

La polypose festonnée

La polypose festonnée (anciennement polypose hyperplasique) est un syndrome encore mal connu dont la définition repose sur des critères cliniques empiriques, en l'absence d'étiologie génétique identifiée. Quelques cas de polypose festonnée familiale ont été décrits et les parents au premier degré des patients atteints de ce syndrome sembleraient présenter un risque augmenté de CCR (Boparai, Reitsma et al. 2010). Les critères diagnostiques proposés par l'OMS incluent : la présence d'au moins 5 polypes festonnés à proximité du sigmoïde avec au moins 2 polypes de plus de 10mm ; la présence de polypes festonnés à proximité du sigmoïde, quel que soit leur nombre chez un patient avec un antécédent familial au premier degré de polypose festonnée; ou plus de 20 polypes festonnés quelle que soit leur taille mais distribués sur l'ensemble du colon. La polypose festonnée semblerait être associée à un risque augmenté de CCR (Hyman, Anderson et al. 2004; Boparai, Mathus-Vliegen et al. 2010). Ainsi, dans une étude multicentrique portant sur 77 patients présentant ce syndrome, les auteurs ont pu montrer une association significative entre la survenue de CCR et le nombre de

PH, (Boparai, Mathus-Vliegen et al. 2010). Dans cette étude, $\frac{3}{4}$ des CCR détectés chez ces patients avaient pour origine un polype hyperplasique et $\frac{1}{4}$ un adénome festonné sessile. Le profil moléculaire (en particulier présence de méthylation de l'ADN et fréquence des mutations BRAF ou KRAS) des adénocarcinomes développés chez les patients avec une polypose festonnée suggèrent la prédominance des voies des tumeurs festonnées dans ce syndrome. Ces résultats semblent également confirmer le rôle d'une partie des polypes hyperplasiques, en tant que lésions précurseurs.

VI -5-Place des polypes hyperplasiques dans la carcinogénèse colique

Le potentiel malin des polypes hyperplasiques a longtemps été méconnu, mais les récentes études de caractérisation moléculaire ont apporté des arguments en faveur du caractère néoplasique de ces lésions, en mettant en évidence la présence d'altérations génétiques pronocogénétiques dans ces lésions (voir paragraphe ci-dessus). De plus, l'analyse de polypes mixtes dans l'étude de Iino (Iino, Jass et al. 1999) a mis en évidence une relation clonale entre les deux composantes épithéliales, hyperplasique et adénomateuse de ces polypes. Ces résultats suggèrent que les polypes mixtes ne seraient pas dus à une fusion de lésions hyperplasiques et adénomateuses mais surtout appuient l'hypothèse d'un continuum entre PH et adénomes.

Cependant, c'est depuis l'émergence de voies alternatives à la voie classique de carcinogénèse proposée par Vogelstein (Vogelstein, Fearon et al. 1988), que le rôle de certains sous-types de PH en tant que précurseurs néoplasiques est évoqué, en particulier, dans les voies des tumeurs festonnées (Snover 2011). Certains auteurs ont ainsi suggéré que les PH pouvaient constituer des « sanctuaires néoplasiques » dans lesquels l'accumulation de mutations et d'altérations génétiques n'activeraient pas les mécanismes normaux d'apoptose et de mort cellulaire (Jass, Whitehall et al. 2002).

Cependant, comme nous l'avons décrit plus haut, les PH sont des lésions hétérogènes d'un point de vue histologique et moléculaire. Les différentes études moléculaires identifieraient au moins deux types de PH impliqués dans des voies parallèles des tumeurs festonnées, la voie des tumeurs festonnées sessiles et la voie des tumeurs festonnées traditionnelles (figure 23). En effet, les PH de type microvésiculaire, de grande taille et de localisation proximale, seraient associés à des méthylation dans les îlots CpG (phénotype CIMP-high) et à des mutations BRAF. Ces PH pourraient être des précurseurs des adénomes festonnés sessiles et conduire à des cancers colorectaux de la voie des tumeurs festonnées sessiles (figure 23). Les

polypes hyperplasiques à cellules caliciformes, de localisation distale seraient, eux, plus souvent CIMP-Low et associés à des mutations KRAS. Ces polypes hyperplasiques pourraient précéder les adénomes festonnés traditionnels et conduire à des cancers colorectaux de la voie des tumeurs festonnées traditionnelles.

Cependant, ces hypothèses basées sur la caractérisation moléculaire des polypes hyperplasiques sont à confronter à la prévalence des PH dans la population générale. Si l'on compare cette prévalence à celle des adénomes ou carcinomes, seule une partie des PH semblerait pouvoir progresser vers des tumeurs malignes. L'identification des polypes hyperplasiques à risque d'évolution maligne est donc essentielle, aussi bien pour mieux comprendre l'évolution naturelle des cancers colorectaux que pour permettre une prise en charge adaptée et optimale des patients.

VI -6- Valeur pronostic des PH

Association entre polypes hyperplasiques et présence des lésions synchrones

Plusieurs études ont recherché l'association entre la présence de polypes hyperplasiques distaux et celle d'adénomes proximaux mais leurs résultats sont contradictoires. L'étude de Imperiale *et al* montre que des patients ayant de PH distaux ont un risque augmenté d'adénomes proximaux synchrones. Dans 4% des cas, la présence de PH distaux était associée à un adénome de plus de 1 cm ou à un cancer colique proximal (Imperiale, Wagner et al. 2000). Au contraire dans l'étude de Lieberman *et al*, aucune association n'a été mise en évidence. Il est à noter, toutefois que cette dernière étude avait inclus 96,8% d'hommes. Ces conclusions ne sont donc pas généralisables à l'ensemble de la population (Lieberman, Weiss et al. 2000). Une méta-analyse portant sur 13 études publiées avant 2001 semble, cependant, confirmer ce résultat. Le risque de lésions néoplasiques proximales chez des patients présentant des PH distaux n'était pas augmenté. (Lewis, Ng et al. 2003)

Association entre polypes hyperplasiques et apparition de lésions métachrones

De même, l'association entre PH et la survenue ultérieure de lésions néoplasiques (métachrones) est controversée.

Dans l'étude de Croizet *et al* (Croizet, Moreau et al. 1997), sur un suivi moyen de 58 mois, le risque ultérieur d'adénomes était multiplié par 2,4 chez des patients porteurs de PH, ne présentant pas d'autres facteurs de risque personnel ou familial de cancer colorectal, comparé aux patients sans PH. De même, Huang *et al* ont montré que la présence de PH était un facteur prédictif d'adénome après un suivi médian de 4,3 ans. (Huang, Whelan et al. 2001). En revanche, l'étude prospective de Rex *et al* réalisée sur 5 ans chez 158 patients à risque moyen de CCR (c'est à dire semblable à celui de la population générale) dont 27 étaient initialement porteurs de PH n'a pu mettre en évidence d'association entre PH et survenue d'adénomes métachrones (Rex, Cummings et al. 1996).

VI -7- Surveillance après exérèse d'un polype hyperplasique

PH sporadique

En l'absence d'élément de preuve suffisant concernant le potentiel malin des PH et de marqueurs prédictifs d'évolution, la surveillance coloscopique (Aust and Baretton 2010) n'est pas indiquée dans la plupart des polypes hyperplasiques. Ainsi, la surveillance des polypes hyperplasiques rectosigmoïdiens de petite taille n'est pas recommandée par la haute autorité de santé (HAS 2004), ni par l'American Cancer Society (Winawer, Zauber et al. 2006), qui recommande de considérer la coloscopie des patients ne présentant que de petits polypes hyperplasiques colorectaux comme normale. En France, une coloscopie totale à 5 ans est proposée seulement pour les PH de grande taille (≥ 1 cm) ou multiples ($n > 5$) et de siège colique ou siégeant sur le colon proximal dans un contexte d'antécédent familial de polypose hyperplasique.

Dans ces cas, lorsque la coloscopie à 5 ans est normale, une surveillance 10 ans plus tard est recommandée, en l'absence d'antécédents familiaux de polypose hyperplasique.

Cette proposition sur accord professionnel repose sur le risque démontré des SSA et la difficulté du diagnostic différentiel entre SSA et certains PH.

Polypose hyperplasique

Pour les polyposes hyperplasiques, une coloscopie tous les 1 ou 2 ans, en l'absence de contre-indication et de co-morbidités significatives, est proposée par certains auteurs (East,

Saunders et al. 2008; Leggett and Whitehall 2010). Elle permettra l'exérèse des polypes de plus de 5 mm. De même, une surveillance coloscopique est recommandée chez les parents au premier degré dès 10 ans avant l'âge du cas index.

En conclusion, l'évolution des lésions précurseurs en carcinomes entraînant inévitablement leur disparition « histologique », les étapes précoces de l'histoire naturelle des cancers colorectaux sont encore mal connues et malgré les découvertes moléculaires récentes, la place des polypes hyperplasiques dans la carcinogénèse encore controversée. Ainsi, seule la caractérisation moléculaire des PH associés à une progression maligne permettra de placer les PH dans un contexte clinique et une prise en charge appropriés.

La grande majorité des PH n'évolue pas en adénomes. Proposer une surveillance coloscopique à tous les patients porteurs de PH exposerait la plupart d'entre eux aux complications de cet examen. Dans l'étude de Lieberman *et al*, dans laquelle 3196 patients avaient été inclus, 0,3% ont été sujets à des complications graves pendant la coloscopie ou en post-examen immédiat, malgré la bonne expérience endoscopique des médecins participant. Ces complications correspondaient à des hémorragies gastrointestinales nécessitant une hospitalisation, un infarctus du myocarde, un accident vasculaire cérébral, une gangrène de Fournier et une thrombophlébite (Lieberman, Weiss et al. 2000). En raison de ces complications rares mais sévères, la balance bénéfique/risque d'une surveillance coloscopique doit être prise en compte. Afin de proposer aux seules populations à risque de développer une tumeur maligne, l'identification de marqueurs prédictifs est donc essentielle dans cette démarche.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à caractériser les lésions hyperplasiques et à identifier des marqueurs associés à une évolution maligne des PH.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

ARTICLE 1

**A new biomarker that predicts colonic
neoplasia outcome in patients with
hyperplastic colonic polyps**

BREVET

**EP11305671.7
Déposé le 01 juin 2011**

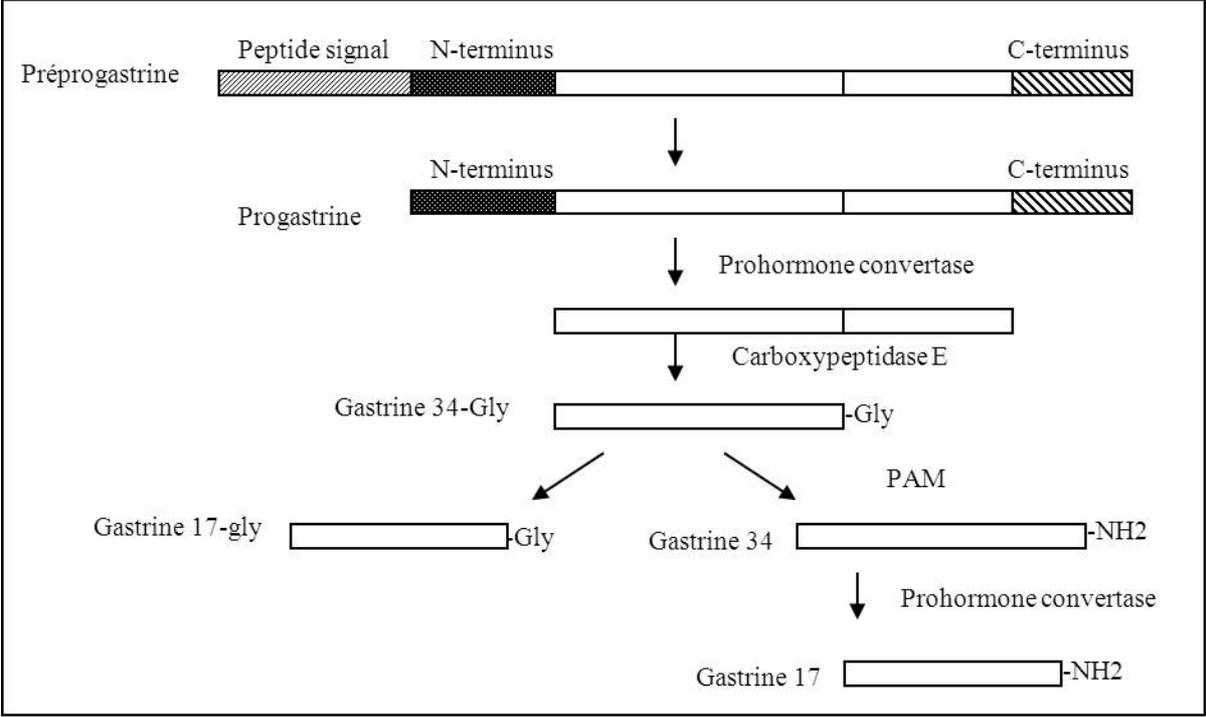


Figure 27: Maturation de la préprogastrine. PAM : peptidyl α -amidating mono-oxygénase.

INTRODUCTION

L'évolution maligne de certains polypes hyperplasiques pourrait être liée à l'activation de certaines voies pro-oncogéniques, et ce, de façon très précoce. Ainsi, l'identification de leurs effecteurs permettrait, d'une part de mieux appréhender l'évolution naturelle de ces lésions et d'autre part, de distinguer un sous type de polypes hyperplasiques dans lesquels le processus de carcinogénèse est probablement plus avancé et dont le potentiel malin nécessite une prise en charge adaptée. Dans ce premier travail, nous nous sommes intéressés tout particulièrement à l'expression d'une prohormone, la progastrine, reconnue comme un facteur de croissance impliqué dès les stades précoces de la carcinogénèse colique.

La progastrine

I-Synthèse et sécrétion de la progastrine dans les conditions physiologiques

La gastrine, hormone impliquée dans la régulation de l'acidité gastrique, est synthétisée par les cellules endocrines de l'antrum gastrique sous la forme d'une préprohormone (la préprogastrine) de 101 acides aminés. La préprogastrine subit, entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi un clivage d'un peptide signal de 21 acides aminés situé en N-terminal aboutissant à la formation de la progastrine. Au cours du processus de maturation, la prohormone subit plusieurs clivages par des endoprotéases, appartenant à la famille des prohormone convertases (Figure 27). Elle donne, ainsi, naissance à des précurseurs non amidés qui possèdent une extension glycine carboxy-terminale : la G34-gly et la G17-gly. Ces derniers servent de substrats à la « Peptidyl-glycine α -Amidating Monooxygenase » (PAM) qui permet la formation d'hormone mature amidée sur la partie N-terminale (Rehfeld 1998).

En conditions physiologiques, les formes gastrines amidées G34-NH₂ et G17-NH₂ constituent les principales formes sécrétées par les cellules endocrines de l'estomac. Les formes précurseurs, dont la progastrine sont retrouvées en très faible concentration dans le plasma chez l'homme et les rongeurs (Rehfeld 1998).

En dehors de l'estomac, les formes matures amidées de la gastrine sont également sécrétées par les cellules neuroendocrines du duodénum, le pancréas foetal/néonatal et le cerveau. En revanche, les formes précurseurs non amidées (gastrine glycine-étendue et progastrine) sont produites par les cellules pituitaires mais également en très faible concentration dans le colon, le poumon et le tractus génital (Rehfeld 1998).

En raison de la synthèse négligeable de progastrine par les cellules normales, la progastrine ne semble pas impliquée dans les fonctions biologiques physiologiques.

II- Synthèse et sécrétion de la progastrine dans les tumeurs colorectales

L'expression du gène de la progastrine est fréquemment augmentée dans le cancer colorectal. Plusieurs voies de signalisation ont été impliquées. En particulier, les mutations fréquentes du gène APC dans les cancers colorectaux à microsatellites stables entraînent une activation de la voie WNT/ β -caténine/TCF-4. Le gène de la gastrine dont le promoteur possède plusieurs éléments de réponse à β -caténine/TCF-4 (Koh, Bulitta et al. 2000), constitue une cible de cette voie et l'activation constitutive de ce complexe entraîne la surexpression du gène de la progastrine.

La voie KRAS/BRAF/MEK/ERK est également fréquemment activée dans les CCR par mutation soit sur le gène KRAS soit sur le gène BRAF. Nakata *et al* (Nakata, Wang et al. 1998) ont montré que l'activation du proto-oncogène RAS pouvait induire l'expression du gène de la progastrine. Par ailleurs, la régulation du promoteur de la progastrine impliquerait une coopération synergique entre les oncogènes K-RAS et β -caténine (Chakladar, Dubeykovskiy et al. 2005).

De même, des modèles de lignées cellulaires cancéreuses coliques contrôlées par une boucle autocrine TGF- α /EGF ont permis de mettre en évidence une régulation de la transcription du gène de la progastrine à travers l'activation d'un élément de réponse à EGF présent sur son promoteur (Howell, Ziober et al. 1995; Chupreta, Du et al. 2000; Watson, Robinson et al. 2000).

En raison d'un défaut de maturation dans les cellules cancéreuses coliques, l'expression du gène de la progastrine aboutit majoritairement à la synthèse protéique et la sécrétion de formes non maturées de la gastrine, en particulier de progastrine. Ainsi, la progastrine a été retrouvée en forte concentration dans les tumeurs cancéreuses coliques, dès le stade

adénomateux. Dans ces lésions, elle représente, la principale forme de peptides gastriniques produites (Nemeth, Taylor et al. 1993; Van Solinge, Nielsen et al. 1993; Singh, Xu et al. 1994; Smith and Watson 2000). La progastrine est également présente en concentration élevée dans le sang des patients présentant un cancer colorectal (Siddheshwar, Gray et al. 2001), alors que dans les conditions physiologiques, seules les formes matures amidées de gastrine sont présentes dans la circulation.

III- La progastrine, un facteur de croissance des cellules épithéliales coliques

Plusieurs études ont montré un effet prolifératif direct de la progastrine sur des lignées de cellules épithéliales coliques (Baldwin, Hollande et al. 2001; Brown, Yallampalli et al. 2003; Singh, Lu et al. 2003). De plus, l'inhibition de la production endogène de progastrine dans des lignées cancéreuses coliques en utilisant des petits ARN interférants (siRNA) ou des ARN antisens ont montré une inhibition *in vitro* de la prolifération (Singh, Owlia et al. 1996; Grabowska, Hughes et al. 2007; Bertrand, Kowalski-Chauvel et al. 2010) et une diminution de la tumorigénicité de ces cellules après xénogreffe sur des souris immunodéficientes (Pannequin, Delaunay et al. 2007). Par ailleurs, Ferrand *et al* ont montré dans des échantillons d'adénocarcinomes colorectaux humains et une sous population de cellules cancéreuses humaines, présentant des caractères de cellules progénitrices cancéreuses, une coexpression de progastrine et des marqueurs de cellules souches coliques, CD44, LGR5 et en particulier CD133. De plus, l'inhibition de l'expression du gène de la progastrine par un ARN antisens dans ces cellules, entraînait la perte d'expression de CD133. Cette diminution était associée à la perte de leur capacité à induire des tumeurs après xénogreffes sur des souris immunodéficientes et des modifications morphologiques cellulaires, pouvant refléter un changement dans leur état de différenciation (Ferrand, Sandrin et al. 2009).

Cet effet prolifératif de la progastrine au niveau colique a été confirmé *in vivo* sur les souris transgéniques, qui expriment un transgène préprogastrine humain au niveau du foie. La maturation de la gastrine étant incomplète dans les hépatocytes, ces souris ont un taux circulant élevé de progastrine alors que le taux de gastrine est normal. La muqueuse colique de ces souris est hyperplasique et présente un index de prolifération augmenté comparé à la muqueuse des souris sauvages contrôles (Wang, Koh et al. 1996). De plus, elles présentent un taux plus élevé de mitoses épithéliales coliques après lésion de l'ADN par irradiation gamma (Ottewell, Watson et al. 2003) et un risque accru de développer des lésions préneoplasiques et des adénocarcinomes coliques, après traitement par un carcinogène (Singh, Velasco et al.

2000). Des résultats similaires ont été retrouvés dans un autre modèle de souris transgénique surexprimant la progastrine sous le promoteur de la FABP murine (fatty acid binding protein) au niveau des cellules épithéliales coliques (Cobb, Wood et al. 2004). L'effet prolifératif et co-carcinogène de la progastrine a été, de même, confirmé dans des souris surexprimant la progastrine humaine croisées avec des souris invalidées pour la gastrine murine (Ottewell, Varro et al. 2005). Dans cette étude, les auteurs ont également montré que chez les souris invalidées pour le gène de la gastrine, l'administration de progastrine exogène avait un effet prolifératif sur l'épithélium colique après irradiation gamma. Par ailleurs, les souris APC^{Δ14/+}, présentant une mutation APC prédisposant au développement de tumeurs coliques surexpriment également la progastrine. Après inhibition de l'expression de la progastrine endogène dans ces souris par un siARN, Pannequin *et al* ont démontré une diminution de la taille des tumeurs pré-existantes (Pannequin, Delaunay et al. 2007).

IV- Effets anti-apoptotiques de la progastrine sur les cellules épithéliales coliques

La progastrine possède également un rôle anti-apoptotique sur les cellules épithéliales coliques. En effet, elle diminue la fragmentation de l'ADN des cellules en réponse à la camptothécine, un inhibiteur de la topoisomérase-1 aux propriétés pro-apoptotiques par inhibition des caspases 9 et 3 (Wu, Owlia et al. 2003). *In vivo*, dans les souris surexprimant la progastrine, après traitement par l'azoxyméthane, un carcinogène colique, l'index apoptotique est diminué ainsi que l'activation de la caspase 3 (Umar, Sarkar et al. 2008).

V- Effet de la progastrine sur l'adhésion et la migration des cellules épithéliales coliques

La progastrine pourrait être impliquée dans la régulation de la dissociation des jonctions serrées (ZO-1, occludine) et adhérentes (β -caténine, E-cadhérine) et ainsi favoriser la migration cellulaire dans les cancers colorectaux. En effet, Hollande *et al* ont montré que l'inhibition de l'expression de progastrine par un ARN antisens dans des cellules cancéreuses colorectales entraînait une augmentation de l'expression de ZO-1, occludine, claudine-1, E-cadhérine et FAK dans ces cellules, ainsi qu'une augmentation de leur marquage membranaire comparée aux cellules contrôles transfectées par le vecteur vide. Un traitement par de la progastrine permet de réverser cet effet et d'induire une dissociation des complexes β -caténine/E-cadhérine. De plus, cette diminution de l'adhésion cellule/cellule induite par la

progastrine a été corrélée à une augmentation de la perméabilité paracellulaire, ainsi qu'à une augmentation de la mobilité cellulaire (Hollande, Lee et al. 2003).

VI- Les récepteurs /protéines de liaison de la progastrine

L'activité biologique de la progastrine serait médiée par un récepteur ou une protéine de liaison présente à la surface cellulaire des cellules cibles mais son identification et ses caractéristiques pharmacologiques sont encore controversées.

Singh *et al* dans une étude de liaison utilisant de la progastrine radiomarquée a mis en évidence des sites de haute affinité pour la progastrine sur les cellules épithéliales intestinales. Dans cette étude, cette protéine de liaison lierait également mais avec une affinité moindre les autres peptides gastriniques, dont la gastrine mature (gastrine 17 amidée) et la gastrine glycine étendue (Singh, Lu et al. 2003) .

De même, Dubeykovsliy *et al*, à travers une approche de cytométrie de flux et l'utilisation de progastrine biotinylée, ont montré la présence de sites de liaison de haute affinité pour la progastrine sur des cellules épithéliales intestinales, des lignées cellulaires cancéreuses coliques et sur la muqueuse colique de souris C57/B16 sauvages. En revanche, aucune compétition avec la gastrine 17 amidée ni la gastrine glycine étendue n'a été observée. Ce résultat semble suggérer, contrairement aux observations de Singh *et al*. que cette protéine de liaison serait spécifique de la progastrine et ne lierait pas les autres peptides gastriniques (Dubeykovskiy, Nguyen et al. 2008).

Récemment, l'annexine II a été proposé comme protéine de liaison de la progastrine et des autres peptides gastriniques (Singh, Wu et al. 2007). Cependant, dans leur étude, Dubeykovsliy *et al* n'ont pu mettre en évidence la présence de l'annexine II à la surface des cellules épithéliales coliques. Par ailleurs, ils ont montré que les anticorps anti-annexine II n'affectaient pas l'interaction de la progastrine avec ces cellules (Dubeykovskiy, Nguyen et al. 2008).

Une autre controverse concerne le rôle potentiel du récepteur de la gastrine mature, le récepteur CCK2 (cholecystokinin 2), dans la médiation des effets de la progastrine.

Des études *in vitro* ont montré que la progastrine ne se liait, ni activait le récepteur CCK2 transfecté sur différentes lignées cellulaires (Baldwin, Hollande et al. 2001; Dubeykovskiy, Nguyen et al. 2008). De plus, les antagonistes spécifiques du récepteur CCK2R ne semblaient pas inhiber la prolifération induite par la progastrine sur des cellules coliques transformées de souris (Baldwin, Hollande et al. 2001). Dubeykovskiy *et al* ont également mis en évidence la

liaison de la progastrine sur des cellules issues de lignées cancéreuses coliques humaines et aucune compétition entre la progastrine et la gastrine (ligand du récepteur CCK2) dans des tests de liaison (Dubeykovskiy, Nguyen et al. 2008). Ces résultats suggèrent que l'activité biologique *in vitro* de la progastrine passe par un mécanisme indépendant du récepteur CCK2. Au contraire, une étude récente utilisant un modèle de souris surexprimant la progastrine et invalidé pour les 2 allèles du gène CCK2R (souris hGAS+,CCK2R^{-/-}), suggère un rôle de ce récepteur dans les effets de la progastrine. Toutefois il est à noter que l'invalidation seule du CCK2R aurait un effet antitumoral équivalent à celui observé chez les souris hGAS+,CCK2R. Le nombre et la taille des tumeurs dans les souris CCK2R^{-/-} et hGAS+,CCK2R^{-/-} étant comparables ces résultats semblent plutôt suggérer que l'effet anti-prolifératif observé, était indépendant de la progastrine.

Ainsi, la progastrine confère aux cellules cancéreuses coliques, un avantage sélectif par son effet prolifératif et anti-apoptotique. Elle est impliquée dans la carcinogénèse colique dès les stades précoces (adénomes). Les principales études concernant son rôle dans le cancer colorectal, se sont intéressées uniquement aux tumeurs microsatellites stables, APC mutées. Cependant, son rôle pourrait être étendu à d'autres types de tumeurs colorectales, notamment les tumeurs KRAS ou BRAF mutées.

Il est maintenant admis qu'une partie des polypes hyperplasiques possède un potentiel malin. Dans ce travail, nous avons voulu d'une part étudier l'expression de la progastrine dans ces lésions et d'autre part analyser l'association entre cette expression et la survie sans néoplasme des patients afin d'identifier un sous-groupe de patients présentant des polypes hyperplasiques potentiellement à risque de progression néoplasique.

OBJECTIFS

- Etudier l'expression de la progastrine dans les polypes hyperplasiques
- Etudier l'association entre l'expression de la progastrine dans les polypes hyperplasiques et la survie sans néoplasie colorectale
- Evaluer l'utilité de la progastrine comme marqueur prédictif de la survenue de néoplasie colorectale chez des patients présentant des polypes hyperplasiques

PATIENTS ET METHODES

I-Schéma de l'étude

Une étude de cohorte historique monocentrique a été réalisée.

II-Taille de l'échantillon, patients et recueil de données

La taille de l'échantillon nécessaire a été estimée pour le test du log-rank portant sur le critère de jugement principal de l'étude (la survie sans néoplasie), à l'aide de la méthode de Freedman et schoenfeld. Un échantillon de 38 patients était requis afin de détecter un hazard ratio minimum de 4 avec une puissance de 80%. Pour cette estimation, des résultats préliminaires ont permis de fixer la probabilité de survie sans néoplasie à 0.65 dans le groupe contrôle et une prévalence de polype hyperplasiques (PH) présentant une forte expression à 50%.

Les dossiers médicaux de tous les cas de polypes hyperplasiques diagnostiqués dans le service d'anatomo-pathologie de l'hôpital de Ranguel, entre le 1^{er} janvier 2000 et le 31 décembre 2001 ont été examinés. Les patients présentant des adénomes ou adénocarcinomes colorectaux synchrones, des antécédents familiaux d'adénocarcinomes, des antécédents personnels d'adénomes ou d'adénocarcinomes colorectaux, de polypose hyperplasique ou de maladie inflammatoire de l'intestin ont été exclus de l'étude. De même, les patients pour lesquels les données concernant la localisation du PH ou le suivi n'avaient pu être récupérées ont été écartés. L'échantillon d'étude final comportait 74 patients. De plus, 13 échantillons de colons normaux, provenant des tranches de sections saines de résection de diverticules non compliqués, 8 adénomes tubuleux et 6 adénocarcinomes colorectaux ont été inclus dans l'étude en tant que contrôle.

Les données histo-cliniques (âge, sexe, localisation, nombre, taille des PH, suivi clinique) ont été récupérées pour tous les patients. Parmi ces patients, 39 avaient reçu un suivi coloscopique, dont les données ont, également, été recueillies. En accord avec la loi de bioéthique, ce projet a été approuvé par le comité de protection des patients.

III-Immunohistochimie

L'analyse immunohistochimique a été réalisée sur des coupes en paraffine fixées au formaldéhyde. Les échantillons ont été incubés toute la nuit avec l'anticorps primaire et la détection réalisée à l'aide du système HRP Envision+ de Dako®. L'anticorps polyclonal anti-progastrine (Ciccotosto, McLeish et al. 1995) a été gracieusement fourni par le Pr Shulkes.

Le marquage de la progastrine a été mesuré en pourcentage de cellules épithéliales marquées dans le polype. Tous les échantillons ont été examinés en double aveugle, par un pathologiste et un interne formé à examiner les tissus colorectaux. La concordance entre examinateurs étant excellente (coefficient de concordance de Lin=0.99, (Lin 1989)), les analyses ont été effectuées avec la moyenne des pourcentages observés par les 2 lecteurs.

IV-Analyses statistiques

Une analyse univariée a été menée afin de comparer les caractéristiques cliniques et immunohistochimiques entre les différents groupes. Le test du Chi² ou le test exact de Fisher (lorsque les conditions d'application du test du Chi² n'étaient pas remplies) ont été utilisés pour les variables catégorielles et le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney pour les variables quantitatives (de distribution non gaussienne). Les intervalles de confiance à 95% exactes ont été calculés pour tous les pourcentages.

Pour l'analyse de survie, seuls les patients ayant reçu un suivi coloscopique ont été inclus (39 patients). La courbe de Kaplan-Meier et le test du log-rank ont été utilisés afin de tester l'association entre l'expression de la progastrine dans les PH et la survenue d'un événement néoplasique colorectal (adénome ou adénocarcinome) de même localisation que le polype initial. Le critère de jugement principal était la survie sans néoplasie. Le délai de suivi a été défini comme l'intervalle de temps entre le diagnostic de PH et la survenue d'un événement ou, en l'absence d'événement, comme l'intervalle de temps entre le diagnostic de PH et la date de la dernière coloscopie. Le pourcentage de marquage de la progastrine a été analysé en 3 classes : absence/faible marquage, marquage modéré et marquage fort. Le seuil d'expression « normale » de la progastrine (absence/faible marquage) a été fixé au niveau du 95^{ème} percentile des pourcentages de marquage observés dans les échantillons de muqueuses

coliques normales (<10% de cellules épithéliales marquées). Au sein des PH surexprimant la progastrine (>10% de cellules épithéliales marquées), l'expression modérée a été définie comme un marquage dans 10% à 50% des cellules épithéliales du polype et la forte expression comme un marquage dans plus de 50% des cellules. Lorsqu'un patient présentait plusieurs PH au moment du diagnostic, le polype présentant la plus forte expression de progastrine a été retenu pour l'analyse de survie. Le test du log-rank a, également, été utilisé pour tester l'association entre les différentes caractéristiques cliniques et la survenue d'événement néoplasique. Les variables quantitatives ont été recodées en 2 classes, en utilisant leur médiane. Une analyse multivariée a été effectuée à l'aide d'un modèle de Cox, incluant toutes les covariables associées à un $p < 0.20$ dans l'analyse univariée. Après une sélection pas-à-pas descendante, seules les covariables significatives ($p < 0.05$) ont été conservées dans le modèle final.

Afin de déterminer le seuil diagnostique optimal du pourcentage de marquage, une courbe de ROC (Receiver operating characteristic) a ensuite été calculée pour les variables quantitatives significatives après l'analyse multivariée. A partir de ces résultats, un test prédictif, reposant sur les variables significatives, a été construit afin de prédire la survenue d'événement néoplasique chez les patients porteurs de PH. Les performances du test ont été mesurées par la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et négative, ainsi que par l'intervalle de confiance à 95% de ces valeurs. Afin d'évaluer la capacité de ce test à classer les différentes populations à risque, un arbre de classification a également été construit. Le taux d'erreur de classification a été estimé après validation interne par une méthode de rééchantillonnage (bootstrap sur 100 échantillons) (Efron 1979; Breiman 1998).

Dans cette étude, tous les tests statistiques étaient bilatéraux et la significativité fixée à 0.05. Les analyses ont été réalisées à l'aide des logiciels de statistiques STATA v11 et R (avec les packages « tree » et « ipred »)

A new biomarker that predicts colonic neoplasia outcome in patients with hyperplastic colonic polyps

Catherine DO¹, Claudine BERTRAND¹, Julien PALASSE¹, Marie-Bernadette DELISLE², Arthur SHULKES³, Elizabeth COHEN-JONATHAN-MOYAL¹, Audrey FERRAND¹, Catherine SEVA¹.

¹ INSERM UMR.1037-Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Université Paul Sabatier Toulouse III, France. ² Service d'Anatomie Pathologique et Histologie Cytologie, CHU Rangueil and Faculté de Médecine Rangueil, France. ³ University of Melbourne, Department of Surgery, Austin Health, Victoria, Australia.

Correspondence to: Catherine SEVA

INSERM UMR.1037-Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Université Paul Sabatier Toulouse III, 1 avenue J. Poulhes, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 4, France. cathy.seva@inserm.fr Phone: +33- 5 61 32 24 08 Fax: +33- 5 61 32 24 03

Runnig Title: A biomarker for colonic neoplasia recurrence

Key words: colorectal polyps, biomarker, progastrin

Financial supports: This work was supported by: grants from INSERM, Ligue contre le Cancer, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC N° A09/4/5033).

Conflicts of interest: Each co-author certifies that he has no conflict of interest.

Word count: 3721 **Figures/tables:** 6

ABSTRACT

The most frequently occurring lesions in the colon are the hyperplastic polyps (HP). HP have long been considered as lesions with no malignant potential and colonoscopy for these patients is not recommended. However recent works suggest that HP may represent precursor lesions of some sporadic colorectal cancers. Until now, none biomarker allows to identify the subset of HP that may have a malignant potential. Because the hormone precursor, progastrin has been involved in colon carcinogenesis, we investigated whether its expression in HP predicts occurrence of colonic neoplasm after resection of HP. We retrospectively analyzed progastrin expression in HP from 74 patients without history of colorectal pathology. In our study, 41% of patients presenting an initial HP subsequently developed adenomatous polyps, recognized as precursor lesions for colorectal adenocarcinomas. Progastrin was overexpressed in the HP in 40% of the patients. We showed a significant association between progastrin overexpression and shortened neoplasm-free survival ($P= 0.001$). Patients with high overexpression of progastrin had a 5 year neoplasm-free survival of 38% as compared to 100% for the patients with low progastrin expression. In addition, we established a predictive test based on progastrin staining and patient's age that predicts occurrence of neoplasm after developing a first HP with a sensitivity of 100% (95%CI: 79%-100%) and a specificity of 74% (51%-90%).

We show that progastrin expression evaluation in HP is an efficient prognostic tool to determine patients with higher risk of metachronous neoplasms who could benefit from an adapted follow-up.

INTRODUCTION

In the general population the most frequently occurring lesion in the colon is the hyperplastic polyp (HP), with a prevalence in western populations of 10% to 35% (Huang, O'Brien M et al. 2004). HP have long been considered as innocuous lesions with no malignant potential, whereas adenomatous polyps were recognized as neoplastic precursor lesions for colorectal adenocarcinomas.

However, large HP (size > 1cm) and the presence of multiple HP (number > 5) in hyperplastic polyposis syndrome have been clearly associated with colorectal adenomas or adenocarcinoma (Warner, Glick et al. 1994; Jeevaratnam, Cottier et al. 1996; Torlakovic and Snover 1996; Renaut, Douglas et al. 2002). In addition to these cases, more recent studies have suggested a link between HP and sporadic colorectal cancer. Huangl (Huang, Whelan et al. 2001) found that patients with HP on initial colonoscopic examination have an increased incidence of colorectal adenomas on follow-up colonoscopy. Other groups have proposed the idea that HP may represent precursors of some sporadic colorectal cancers, particularly in the serrated neoplasia pathway (Jass, Young et al. 2000; Goldstein, Bhanot et al. 2003; Torlakovic, Skovlund et al. 2003; Jass 2004). Despite these new data, the colonoscopy for patients with HP is not recommended, except after resection of one large hyperplastic polyp (≥ 1 cm) and/or multiple polyps ($n \geq 5$) or if there is a family history of HP, neither in the guidelines from the French National Agency for Accreditation and Evaluation in Healthcare, nor by the American College of Gastroenterology (Bond 2000; Rex, Johnson et al. 2009).

Until now, there is no biomarker to identify the subset of HP that may have a malignant potential. However, data previously enounced strongly suggest that identifying a marker that could predict, with a good sensitivity and specificity, the occurrence of colonic neoplasm after resection of HP would be crucial for identifying the subset of patients at risk after HP who could benefit from a more suitable follow up strategy.

The hormone precursor progastrin (PG) is now recognized as a growth factor playing an important role in colon carcinogenesis. Transgenic mice overexpressing progastrin present an increased proliferative index in colonic mucosa. They also have an increased risk of developing preneoplastic lesions and adenocarcinomas in colonic epithelium when treated with a carcinogen, azoxymethane (Wang, Koh et al. 1996; Singh, Velasco et al. 2000). The role of progastrin in proliferation, survival and migration of human colon cancer cells has also been clearly established (Baldwin, Hollande et al. 2001; Brown, Yallampalli et al. 2003; Hollande, Lee et al. 2003; Singh, Lu et al. 2003; Wu, Owlia et al. 2003; Umar, Sarkar et al. 2008). PG-growth promoting effects are mediated through the activation of several key signal transduction pathways (Ferrand, Bertrand et al. 2005; Ferrand and Wang 2006). In addition, several works including ours showed that depletion of endogenous progastrin produced by colon cancer cells, leads to an inhibition of tumour growth (Bertrand, Kowalski-Chauvel et al. ; Grabowska, Hughes et al. 2007). Moreover, high concentrations of PG are found in colon tumours and in blood of 80% of patients with colorectal cancer. Surgical resection of the tumour induces a dramatic decrease of PG levels in the serum, suggesting that the tumour itself is the source of PG (Nemeth, Taylor et al. 1993; Van Solinge, Nielsen et al. 1993; Siddheshwar, Gray et al. 2001). PG is also expressed in adenomatous polyps (Smith and Watson 2000; Siddheshwar, Gray et al. 2001), which represent neoplastic precursor lesions for colorectal adenocarcinomas. In contrast, this hormone precursor is absent from the healthy intestinal epithelium.

All these data and our previous results suggested that progastrin may be a key factor of colon carcinogenesis and that its expression may predict the clinical outcome of early colonic lesions such as HP. In consequence, we investigated whether progastrin is expressed in hyperplastic polyps and determined whether its expression in HP is associated to the occurrence of colorectal. We also assessed the performance of a predictive test based on progastrin staining of HP.

MATERIALS AND METHODS

Study design

We conducted a single centre historical cohort study.

Sample size, patients and data collection

The required sample size for our study main endpoint, Neoplasm-free survival (NFS), was estimated for the logrank test using the method of Freedman and Schoenfeld, with STATA v11 software. Thirty-eight patients were required. To demonstrate an association between progastrin staining and neoplasm occurrence, our sample size was calculated to detect a 4-fold increase in the hazard of the case group (minimum hazard ratio (HR) of 4) with 80% power. Based on our preliminary data, the probability of free-neoplasm surviving to the end of the study was set at 0.65 in the control group and prevalence of strong expression of progastrin at 50%.

We reviewed the medical records of all cases of HP diagnosed in the Pathology department of Ranguel Hospital, from 1st January 2000 through 31th December 2001. We excluded cases with a preceding colorectal adenocarcinoma or adenoma, familial colorectal adenocarcinoma history, hyperplastic polyposis, chronic inflammatory bowel disease, insufficient colon site information or follow-up data. The final study group included 74 patients. We also selected 13 normal colonic tissues from resected non-complicated diverticula, 8 adenomas and 6 colorectal adenocarcinomas. Clinical data were collected for all the patients, colonoscopic data for 39 patients. Approval of an institutional research ethics committee was obtained in accordance with the precepts of the Helsinki Declaration.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry on the formaldehyde-fixed, paraffin embedded tissues, primary antibodies were applied overnight and detection was done using the

DakoCytomation Envision+ System-HRP. Anti-progastrin antibody (1137) (Ciccotosto, McLeish et al. 1995) was kindly provided by Pr Shulkes.

Progastrin staining was measured by percentage of stained epithelial cells in the whole polyp. All specimens were examined in a double blinded fashion by two pathologists. Because the inter-rater agreement was excellent (ICC=0.9), percentages were reported as the average between the two readers.

Statistical analysis

Univariate analysis was conducted to compare clinical and immunohistochemistry findings between the different study groups using the Chi² test or Fisher exact test (when required) for categorical variables and Wilcoxon-Mann-Whitney for quantitative variables. We calculated intra-class correlation in order to determine inter-rater agreement for immunohistochemistry staining.

For neoplastic-free survival analysis, only patients with colonoscopic follow up data were included (39 patients). We performed Kaplan-Meier curves and log rank test to assess the association of progastrin expression with the occurrence of a new colorectal neoplastic event. The main end point was neoplasm-free survival. The time to event was determined as the time interval between the diagnosis of HP and the occurrence of metachronous colorectal adenomas in the same site (proximal or distal colon) as the first HP. Progastrin expression was recorded as low, moderate or high expression with the percentage of positive epithelial cells. The “normality” threshold of progastrin expression (low expression) was determined using the 95th percentile of percentage of stained cells in normal colonic tissue (<10%). Moderate expression of progastrin was defined as staining in 10% to 50% of polyp epithelial cells and high expression as staining in more than 50% of cells. When a patient had several polyps, the polyp with the strongest expression of progastrin was retained for evaluation. The log-rank test was also used to assess significance of clinical characteristics. Quantitative variables were recorded into two-class variables using the median. To demonstrate that progastrin was a prognostic factor independent from other clinical factors, cox proportional-hazards model was performed to test the simultaneous influence on disease free survival of

all covariate with a p-value<0.20 in the univariate analysis. After a backward-stepwise selection, only significant variables (p<0.05) were kept in the final cox model.

Receiver operating characteristic analysis was then performed to select optimal “diagnostic” threshold for each significant quantitative variable after multivariate analysis. Using the ROC analysis results, we constructed a predictive test based on a composite score with the significant variables, in order to predict the occurrence of a neoplastic event among patient with HP. Performance of this test was measured by sensitivity (Se), specificity (Spe), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV). We also constructed a classification tree using the same variables significantly associated with occurrence of a neoplastic event. To validate the classification tree, a bootstrap validation (Efron 1979; Breiman 1998) (with 100 bootstrap samples) was performed and the misclassification error rate estimated.

In our study, all tests were two-sided and statistical significance was set at a P value of 0.05. Analyses were performed using STATA v11 (Binquet 1998) and R (with “tree” and “ipred” packs).

RESULTS

Patient and polyps characteristics

Clinical and pathologic features of patients and their polyps are shown in table 1. For the whole cohort, the median age of patients was 65 year old (y.o.) (sd : 14 y.o) and 43% of the patients were female. All polyps measured less than 1 cm with an average diameter of 3 mm, and the number of polyps at diagnosis was less than 5 for all the patients. Twenty % of HP were localized in the proximal colon and 80% in the distal colon, which is consistent with previous observations. In our sample, none HP displayed the major histological features described for sessile serrated adenomas (SSA), including architectural abnormalities and loss of expression of MLH1 (Torlakovic and Snover 1996; Torlakovic, Skovlund et al. 2003; Noffsinger 2009) The subset of patients with colonoscopic follow up was representative of the whole cohort since no statistical difference on clinical and immuno-histochemical features was found between patients with a colonoscopic follow up and the ones with a medical follow up. During the follow-up, an occurrence of adenomas at the same colonic location as the initial HP (proximal or distal colon) was found in 41% of the patients. The pathologic type of these metachronous adenomas was tubular adenomas except in one case where a tubulovillous adenoma was observed. Mainly low grade adenomas (38%) were diagnosed and 3% were high grade adenomas.

Progastrin expression in normal colon, colonic hyperplastic polyps, adenomas and adenocarcinomas

Representative pictures of progastrin staining in the different colon tissues are shown in figures 1 and 2. The percentages of progastrin-positive cells in normal colon, HP, adenomas, and adenocarcinomas are reported in figure 3A. Progastrin expression in HP was significantly different from the expression in normal colon (respectively, median: 45%, range:

0%-100%; versus 1%, range: 0%-10%, $p < 0.0001$). 100% of the tested adenomas or adenocarcinomas displayed an important expression of progastrin. As previously described (Smith and Watson 2000; Siddheshwar, Gray et al. 2001), progastrin expression was higher in adenomas and adenocarcinomas than in normal colon (low grade dysplasia adenomas, $p = 0.001$; high grade dysplasia adenomas, $p = 0.0007$; adenocarcinomas, $p = 0.0005$).

In normal colon, average percentage of progastrin staining was 2.6% (sd: 3.7%, range: 0-10). We considered, that progastrin staining was low when the percentage of staining was less than the 95th percentile of the normal tissue (<10%). In the whole cohort, weak expression of progastrin (<10%) was found in 26% of the HP. Expression of the prohormone was moderate (10%-50% of staining) in 34% of the HP and high (>50% of staining) in 40% of them (Table 1). The results were not significantly different in the patients group with colonoscopic follow up (weak expression 18%, moderate expression 36%, high expression 46%, $p = 0.26$).

Patient neoplasm-free survival

Survival analysis was performed using data from patients who had at least one colonoscopy during their follow up. As mentioned above, clinical and immunohistological characteristics of these patients did not significantly differ from the other patients of the cohort. The mean duration of follow up was 6 years. Only occurrence of metachronous adenomas at the same site of the HP (proximal or distal colon) was considered as a recurrence event. The overall median of neoplasm-free survival (S50%) was 8 years and survival at 5 years was 67% (95%CI: 49%-80%) (Figure 3B). Univariate analysis (Table 2) showed a significant association between progastrin overexpression and shortened neoplasm-free survival ($p = 0.001$). Patients with high expression of progastrin had a median neoplasm-free survival of 5 years, whereas during the 10 years following period, the median survival was not reached by patients with low expression of progastrin, since no recurrence occurred (Table 2, figure 3C). The 5 years-neoplasm-free survival (5y.S) for the patients with

weak progastrin expression was 100%, this value decreases to 84% for the patients with moderate expression and to 38% for the patients with high expression. In the same way, age was significantly associated with occurrence of adenoma ($p < 0.0001$, for patients who were less than 64 years old: 5y.S=95% and S50%=10 years vs 5y.S=26% and S50%=5 years for older patients, Table 2).

To demonstrate that the association between progastrin staining and neoplasm-free survival was independent from the subject's age, HP localisation and HP size, we performed multivariate analysis (table 2). After adjustment, progastrin expression was still highly significantly associated with adenoma occurrences ($p < 0.0001$). Taken together, these results show that progastrin staining in HP is an independent prognostic factor.

A predictive test for recurrence

To assess whether a predictive test using progastrin and age can predict occurrence of neoplasm after developing a first HP, we performed the receiver operating characteristic curves for the percentage of progastrin positive cells and for age (Figure 4A, 4B). The predictive performance of progastrin and age were estimated by the area under the curve (AUC), which were, respectively, 0.81 (95%CI : 0.68-0.94) and 0.86 (95%CI :0.74-0.98). Using the ROC curves, we also determined the best "diagnostic" threshold (i.e. with a 100% sensitivity to detect all the patients at risk to develop an adenoma and an optimal specificity) for each parameter in order to construct a classification tree. For progastrin staining, we chose the 40% - threshold (Sensitivity (Se)=100% and specificity (Spe)=57%) and for age the 54 y.o- threshold (Se=100% and Spe=48%). The classification tree, calculated with R software, shows that all patients with less than 40% of progastrin positive HP cells can be considered "at low risk". Among patients with more than 40% of PG staining in HP, only patients older than 54 y.o. can be considered as "at high risk" (Figure 4C). This composite test had a sensitivity of 100% (95%CI: 79%-100%), a specificity of 74% (51%-90%), a positive predictive value of 73% 95%CI: 50%-89%) and a negative predictive value of 100%

(95%CI: 81%-100%). Misclassification error rate was 15% in our study sample. To estimate generalization error of classification, a bootstrap validation was performed. The out-of-bag misclassification error estimate was 25.6%. Among misclassification errors, no false negative was found and all neoplasm occurrences were detected. Therefore, we established a predictive test based on progastrin staining and patient's age that predicts occurrence of colonic neoplasm after developing a first HP.

DISCUSSION

We show for the first time the expression of progastrin in HP. This supports the hypothesis that this hormonal precursor, known to be expressed in human colorectal adenomas and adenocarcinomas, could also play a pro-tumoral role at the very early stage of colonic carcinogenesis.

More importantly, we also showed that patients, whose HP displayed a strong expression of progastrin, were at higher risk to develop adenoma. These patients had a 5 year neoplasm free survival of 38% as compared to 100% for the patients with no/weak progastrin expression.

In our study, 41% of patients having HP developed metachronous adenomas. This result is in accordance with a previous study which reported a 2 times greater risk for subsequent colon neoplasia in patients having HP compared to HP free patients (Huang, Whelan et al. 2001).

It is generally accepted that a subset of HP, named sessile serrated adenomas (SSA) by Torlakovic (Torlakovic and Snover 1996; Torlakovic, Skovlund et al. 2003), might be preneoplastic lesions. In our study, none HP displayed characteristics of SSA, such as architectural abnormalities and loss of MLH1 (Noffsinger 2009). The metachronous adenomas that we observed in our cohort were all tubular or tubulo-villous adenomas and did not display histological feature of serrated adenoma nor carcinoma. However, the existence of an association between HP and classical neoplasms is not surprising since patients with hyperplastic polyposis develop both serrated and classical carcinomas. Furthermore, HP are known to share the same risk factors as classical colorectal adenocarcinoma. Distinction between the serrated and classical pathway might not be as dichotomic as suggested by the existence of mixed polyps, in which serrated and non serrated features coexist.

In our study, patients with HP presenting a high expression of progastrin were at higher risk to develop metachronous adenomas in the same localisation. This high expression of

progastrin in HP might reflect an environmental background with greater risk for developing colorectal neoplasia. However, in our cohort three patients developed adenomas in another site than their original HP but progastrin was overexpressed (>50%) in only one of them while progastrin was overexpressed in all HP with occurrence at the same site. This result suggests that progastrin overexpression is not only a marker of pejorative background. Indeed, another hypothesis is the presence of molecular abnormality, such as progastrin expression, in these polyps but also in the adjacent colon. Interestingly, adjacent colonic epithelium of HP with a high expression of progastrin also showed a strong expression of the hormonal precursor. Similar observations have also been done on normal colonic epithelium adjacent to adenocarcinomas. This may suggest that the adjacent histologically normal colonic epithelium of both lesions also express early molecular abnormalities. "The molecular security margin" might be lower than histological security margin. Therefore, HP endoscopic excision might thus be not extensive enough to prevent a further neoplastic event. We demonstrated that progastrin staining could be an efficient tool to detect patients with higher risk of metachronous neoplasms. Based on our data, a test based on progastrin staining and age would display 100% of sensitivity and 74% of specificity. In our study, there was no false negative patient (NVP=0). Thus patient with no progastrin overexpression, whatever their age, would have a low risk to develop metachronous neoplasm, whereas patients in our high progastrin expression group had a 73% risk of developing a neoplasm. Misclassification rate of our composite predictive test was only 15%. As guidelines do not recommend coloscopic follow up for patients with "benign" HP, our sample size with coloscopic follow up was restricted to 39 patients. Therefore, it might be interesting to complete this study by a multicentric study including more patients. However, we performed a bootstrap cross-validation to estimate misclassification error. The out-of-bag misclassification rate estimate was 26%. Interestingly, none of the patients in our study cohort met the guidelines criteria for endoscopic surveillance, i.e. resection of one hyperplastic polyp ≥ 1 cm and/or multiple polyps ($n \geq 5$) or a family history of hyperplastic polyps. Hence, a predictive test based on progastrin and age could be useful to select a subset of patients who would benefit from

colonoscopic surveillance. In our study, none of the patients has developed colorectal adenocarcinoma during their follow up. Nevertheless, because these patients have benefited an endoscopic surveillance although current guidelines do not recommend it, they could have been treated at adenoma stage before adenocarcinoma transformation.

We show for the first time that progastrin expression in HP is a strong independent predictive factor of risk for developing an adenoma and we establish here and propose a classification tree allowing to choose the population of patients who need a colonoscopic follow-up. In summary, we have demonstrated that progastrin staining in HP could be an efficient tool to detect patients with higher risk of metachronous neoplasms.

TABLES

Table 1: Clinical and immunohistological features

Variables	Whole cohort N=74	Patients with coloscopic follow up n=39	p- value
	%[95%CI]	%[95%CI]	
Age (y.o)			0.09
Median	65	64	
Range	32-89	33-89	
Sex			0.68
Male	57%[45-68]	59%[42-74]	
Female	43%[32-55]	41%[26-58]	
Number of polyps			0.89
1	59%[47-71]	62%[45-77]	
2-4	41%[29-53]	38%[23-55]	
Size of polyps (largest diameter, mm)			0.49
Median	3	3	
Range	1-6	1-5	
Localization			0.60
Proximal colon	20%[12-31]	18%[8-34]	
Distal colon	80%[69-88]	82%[66-82]	
Occurrence of metachronous adenoma	NA	41%[26-59]	-
Loss of expression of MLH1	0%[0-5]*	0%[0-9]*	NC
Expression of progastrin			0.26
No/low expression (<10%)	26%[16-37]	18%[8-34]	
Moderate expression (10%-50%)	34%[23-46]	36%[21-53]	
High expression (>50%)	40%[29-53]	46%[30-63]	

Progastrin expression was recorded as “No/low moderate or high expression with the percentage of positive colonic epithelial cells. The “physiological” threshold of progastrin expression was determined using the 95th percentile of percentage of stained cells in normal colonic tissue (10% of positive cells).

Chi 2 tests (for categorical variables) and Student tests (for continuous variables) were performed to compare clinical and immune-histological features between patients who had a coloscopic follow up and those who had not.

95%CI: Binomial exact 95- confidence interval was calculated for each percentage.

* One-sided, 97.5% confidence interval.

NA: not available

NC: not calculable

Table 2: Neoplasm-free survival according to clinical and immunohistological features

Neoplasm free Survival					
Variables	Median (y)	Univariate analysis		Multivariate analysis Hazard Ratio (HR)	
		5 y.S – [95% CI]	p-value	[95% CI]	p-value
Age (y.o)					
<64	10	95% [72-99]	<0.0001	7.4 [1.6-34]	0.011
≥64	5	26% [7-51]			
Sex			0.4658		
Male	NR	77% [54-90]			
Female	10	51% [23-73]			
Number of polyps			0.4064		
1	10	73% [51-87]			
2-4	7	56% [27-78]			
Size of polyps (largest diameter, mm)			0.0637		0.329
<3 mm	NR	76% [47-90]		1.5 [0.79-2]	
3-6 mm	7	60% [35-78]			
Localization			0.1378		0.799
Proximal colon	5	43% [10-73]		1.1 [0.3-4]	
Distal colon	10	74% [54-86]			
Expression of progastrin			0.001		
No/low expression (<10%)	NR	100% [NC]		-	
Moderate expression (10%-50%)	10	84% [50-96]		NC	
High expression (>50%)	5	38% [15-61]		1.6e09 [4e09-7e10]	<0.0001

Neoplasm-free survival among patients with colonic hyperplastic polyps who had a coloscopic follow-up.

Multivariate analysis was performed using a cox model including all variables with a p-value<0.20 in the univariate analysis. Final model was obtained after backward stepwise selection, keeping variables with a p-value<0.05.

Y: year, 5y.S.: 5 years-Survival.

95% CI: 95% confident interval was calculated for all 5 years-Survival values.

NR: Not reached, NC: not calculable.

Figure 1

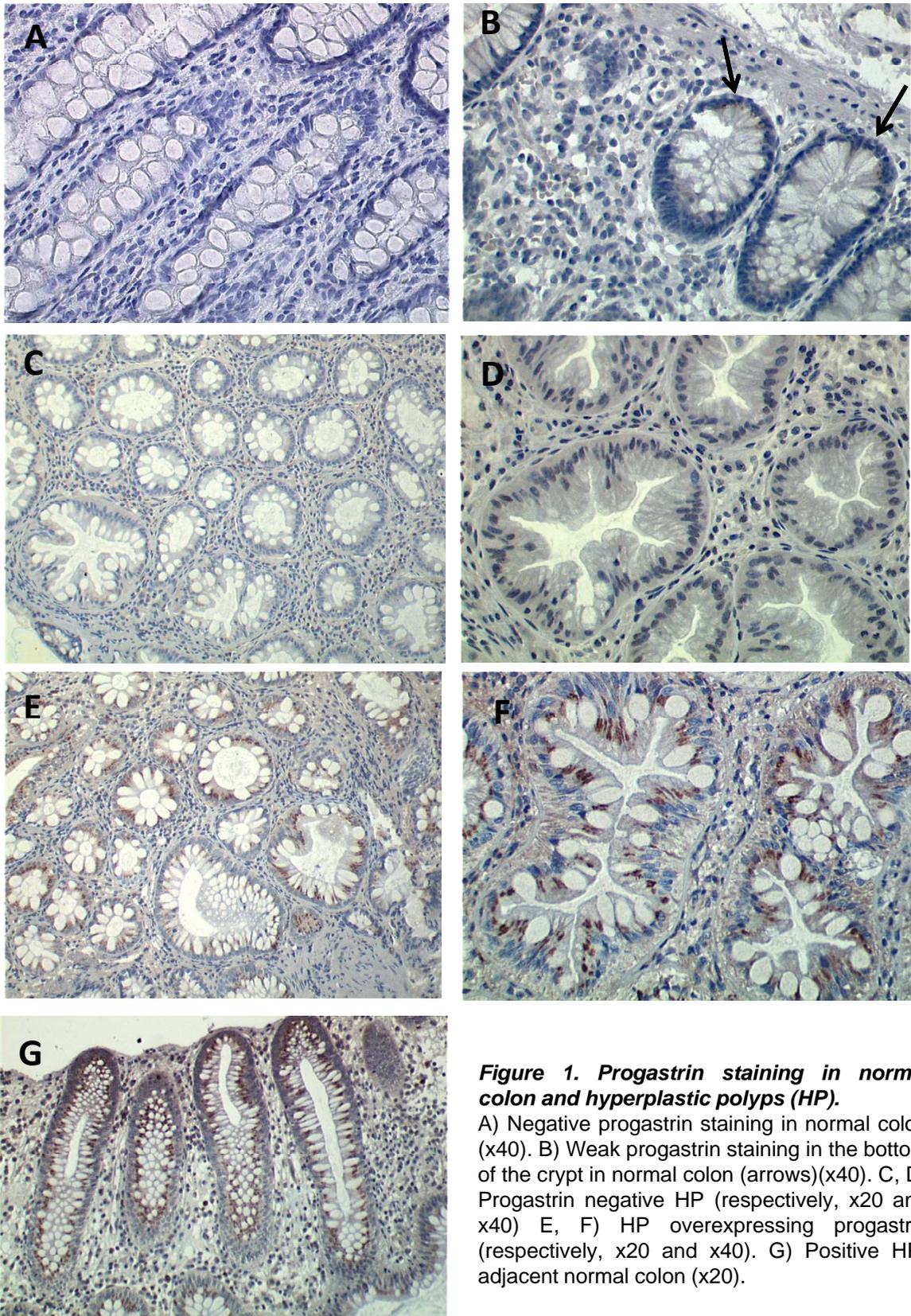


Figure 1. Progastrin staining in normal colon and hyperplastic polyps (HP).

A) Negative progastrin staining in normal colon (x40). B) Weak progastrin staining in the bottom of the crypt in normal colon (arrows)(x40). C, D) Progastrin negative HP (respectively, x20 and x40) E, F) HP overexpressing progastrin (respectively, x20 and x40). G) Positive HP-adjacent normal colon (x20).

Figure 2

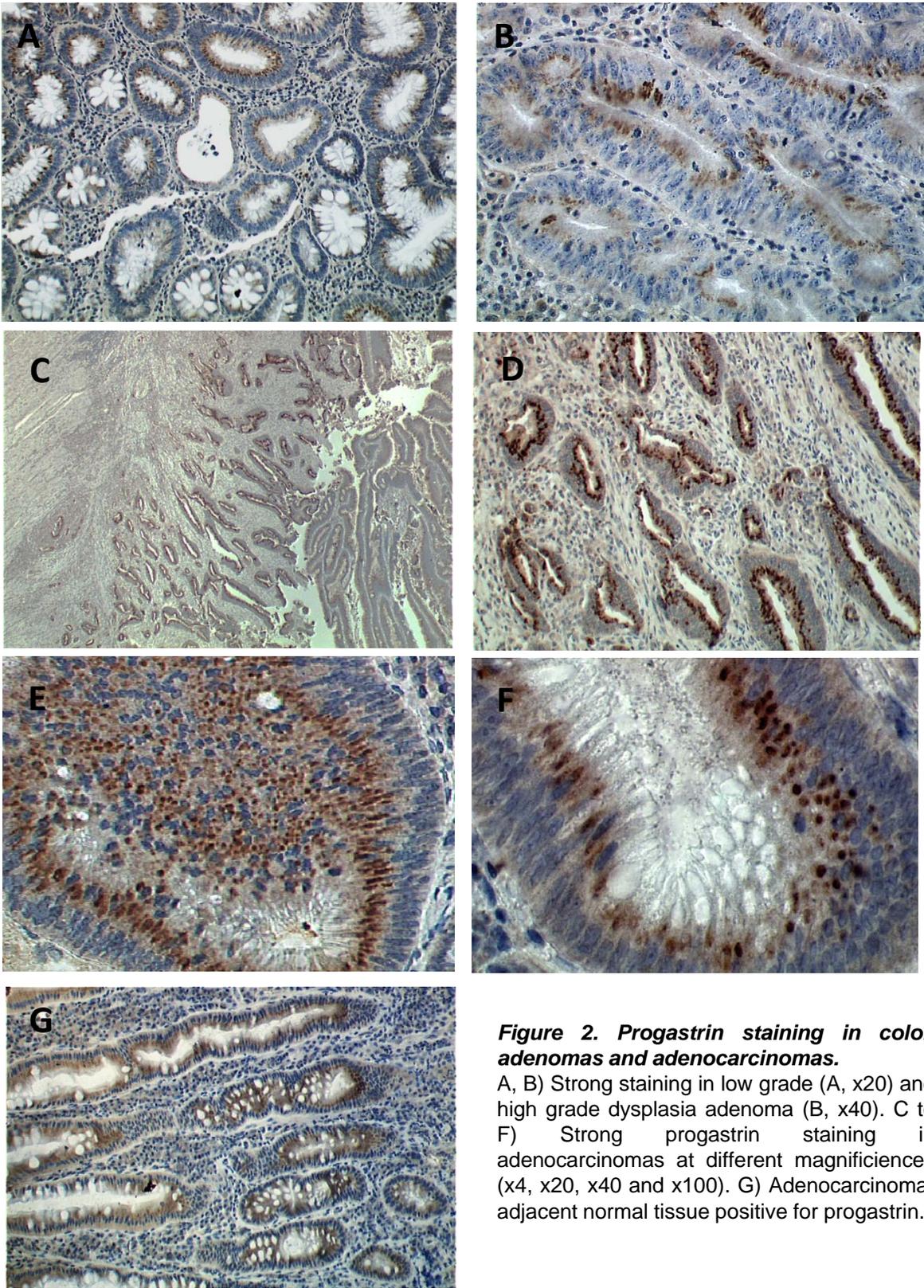
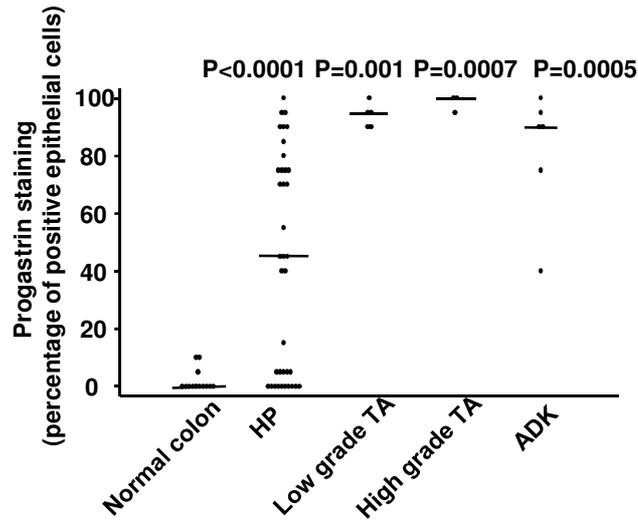
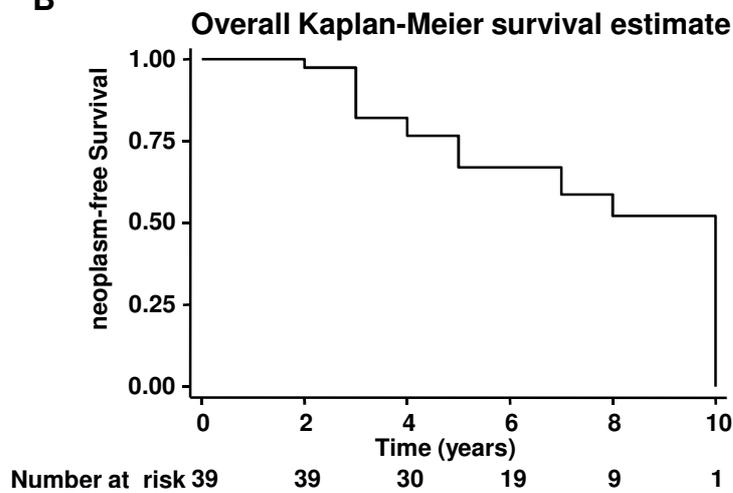


Figure 2. Progastrin staining in colon adenomas and adenocarcinomas.
A, B) Strong staining in low grade (A, x20) and high grade dysplasia adenoma (B, x40). C to F) Strong progastrin staining in adenocarcinomas at different magnificences (x4, x20, x40 and x100). G) Adenocarcinoma-adjacent normal tissue positive for progastrin.

Figure 3 A



B



C

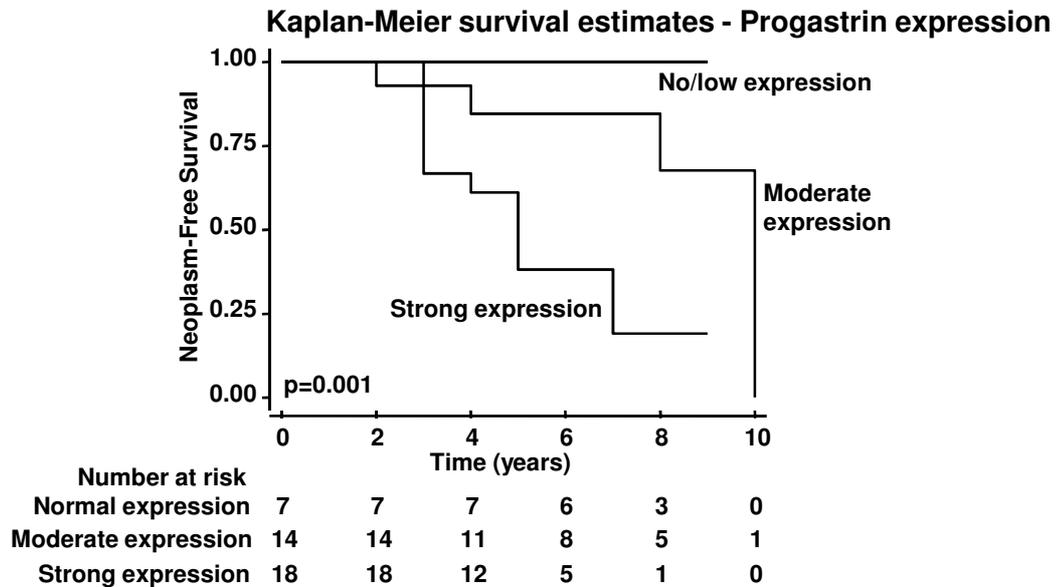


Figure 3. Progastrin expression in colonic tissues and Kaplan Meier survival curves

A) Percentage of progastrin positive cells for normal colon, Hyperplastic polyps (HP), low grade dysplasia tubular adenoma (TA), high grade dysplasia TA, and adenocarcinoma (ADK). Wilcoxon tests were performed to compare the percentage of progastrin positive cells in the different tissues to the percentage in normal colon.

B) Overall neoplasm-free Survival among patients with a coloscopic follow-up, C) neoplasm-free Survival among patients with a coloscopic follow-up, according to progastrin staining. p-value corresponds to logrank univariate analysis.

Figure 4

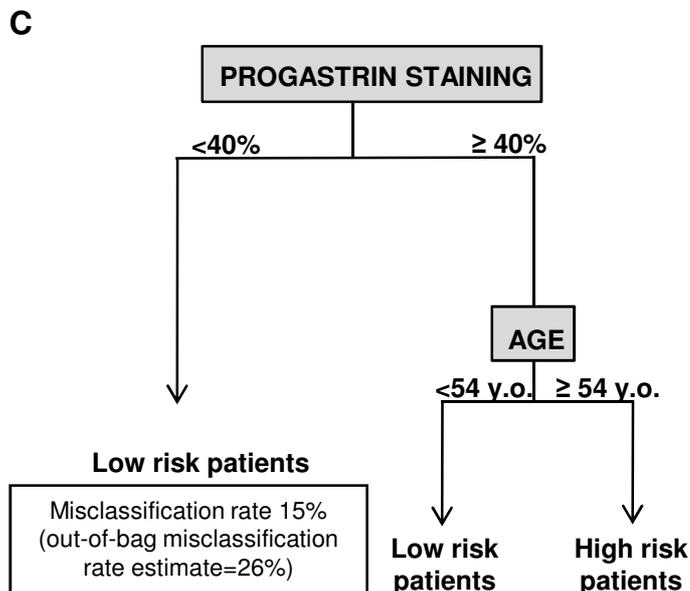
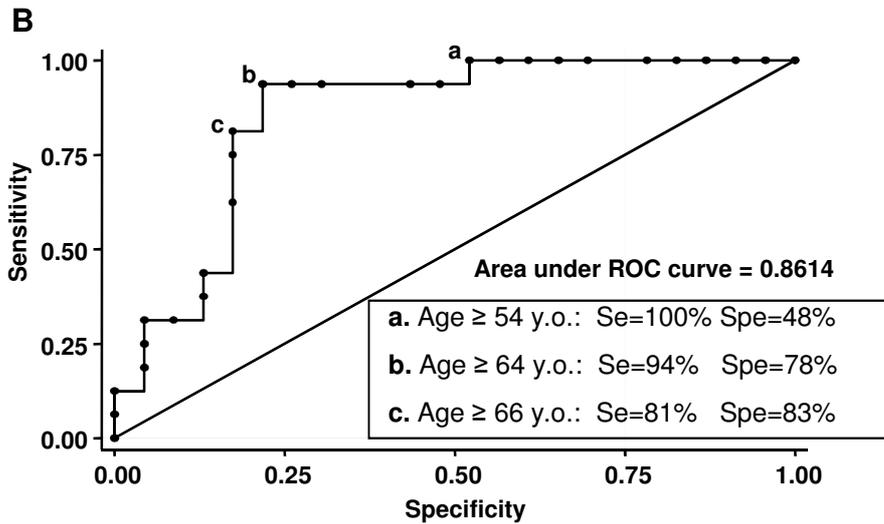
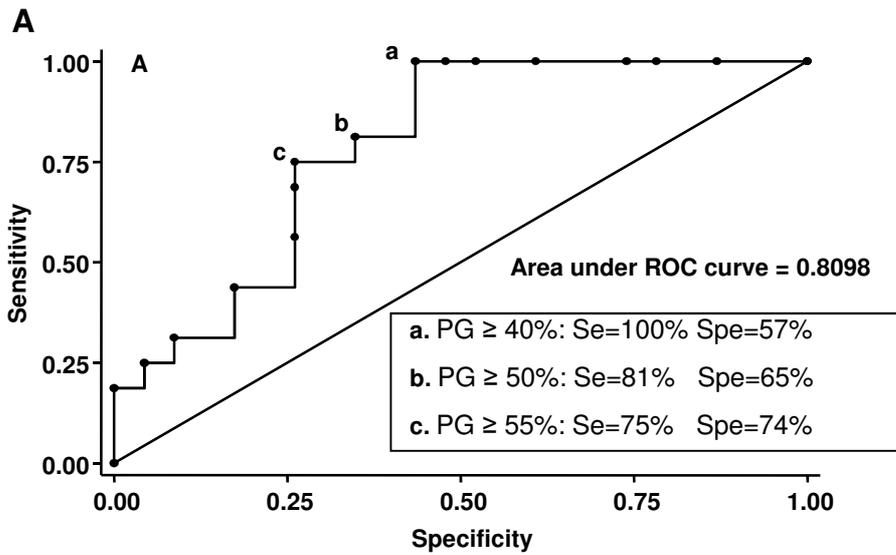


Figure 4. A predictive test for recurrence.

A) Receiver operating characteristic curves for progastrin staining, B) Receiver operating characteristic curves for age. "a"-Threshold had a 100% sensitivity and the optimal specificity. Se: Sensitivity, Spe: specificity, PG: percentage of progastrin staining, y.o.: years old. C) Classification tree using variables significantly associated with neoplasm occurrence after multivariate analysis (Progastrin staining and age).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sophie Leguelec for her help in this project and Serge Estaque for his technical assistance.

REFERENCES

1. Huang CS, O'Brien M J, Yang S, Farraye FA. Hyperplastic polyps, serrated adenomas, and the serrated polyp neoplasia pathway. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2242-55.
2. Jeevaratnam P, Cottier DS, Browett PJ, Van De Water NS, Pokos V, Jass JR. Familial giant hyperplastic polyposis predisposing to colorectal cancer: a new hereditary bowel cancer syndrome. *J Pathol* 1996;179:20-5.
3. Renaut AJ, Douglas PR, Newstead GL. Hyperplastic polyposis of the colon and rectum. *Colorectal Dis* 2002;4:213-5.
4. Torlakovic E, Snover DC. Serrated adenomatous polyposis in humans. *Gastroenterology* 1996;110:748-55.
5. Warner AS, Glick ME, Fogt F. Multiple large hyperplastic polyps of the colon coincident with adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 1994;89:123-5.
6. Huang EH, Whelan RL, Gleason NR, Maeda JS, Terry MB, Lee SW et al. Increased incidence of colorectal adenomas in follow-up evaluation of patients with newly diagnosed hyperplastic polyps. *Surg Endosc* 2001;15:646-8.
7. Goldstein NS, Bhanot P, Odish E, Hunter S. Hyperplastic-like colon polyps that preceded microsatellite-unstable adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 2003;119:778-96.
8. Jass JR. Hyperplastic polyps and colorectal cancer: is there a link? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:1-8.
9. Jass JR, Young J, Leggett BA. Hyperplastic polyps and DNA microsatellite unstable cancers of the colorectum. *Histopathology* 2000;37:295-301.
10. Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland JM. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol* 2003;27:65-81.
11. Bond JH. Polyp guideline: diagnosis, treatment, and surveillance for patients with colorectal polyps. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3053-63.
12. Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, Schoenfeld PS, Burke CA, Inadomi JM. American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]. *Am J Gastroenterol* 2009;104:739-50.
13. Singh P, Velasco M, Given R, Varro A, Wang TC. Progastrin expression predisposes mice to colon carcinomas and adenomas in response to a chemical carcinogen. *Gastroenterology* 2000;119:162-71.
14. Wang TC, Koh TJ, Varro A, Cahill RJ, Dangler CA, Fox JG et al. Processing and proliferative effects of human progastrin in transgenic mice. *J Clin Invest* 1996;98:1918-29.
15. Baldwin GS, Hollande F, Yang Z, Karelina Y, Paterson A, Strang R et al. Biologically active recombinant human progastrin(6-80) contains a tightly bound calcium ion. *J Biol Chem* 2001;276:7791-6.
16. Brown D, Yallampalli U, Owlia A, Singh P. pp60c-Src Kinase mediates growth effects of the full-length precursor progastrin1-80 peptide on rat intestinal epithelial cells, in vitro. *Endocrinology* 2003;144:201-11.
17. Hollande F, Lee DJ, Choquet A, Roche S, Baldwin GS. Adherens junctions and tight junctions are regulated via different pathways by progastrin in epithelial cells. *J Cell Sci* 2003;116:1187-97.
18. Singh P, Lu X, Cobb S, Miller BT, Tarasova N, Varro A et al. Progastrin1-80 stimulates growth of intestinal epithelial cells in vitro via high-affinity binding sites. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G328-39.
19. Umar S, Sarkar S, Cowey S, Singh P. Activation of NF-kappaB is required for mediating proliferative and antiapoptotic effects of progastrin on proximal colonic crypts of mice, in vivo. *Oncogene* 2008;27:5599-611.

20. Wu H, Owlia A, Singh P. Precursor peptide progastrin(1-80) reduces apoptosis of intestinal epithelial cells and upregulates cytochrome c oxidase Vb levels and synthesis of ATP. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G1097-110.
21. Ferrand A, Bertrand C, Portolan G, Cui G, Carlson J, Pradayrol L et al. Signaling pathways associated with colonic mucosa hyperproliferation in mice overexpressing gastrin precursors. *Cancer Res* 2005;65:2770-7.
22. Ferrand A, Wang TC. Gastrin and cancer: a review. *Cancer Lett* 2006;238:15-29.
23. Bertrand C, Kowalski-Chauvel A, Do C, Résa C, Najib S, Daulhac L et al. A gastrin precursor, gastrin-gly, upregulates VEGF expression in colonic epithelial cells through an HIF-1-independent mechanism. *Int J Cancer*;126:2847-57.
24. Grabowska AM, Hughes J, Watson SA. Use of interfering RNA to investigate the role of endogenous gastrin in the survival of gastrointestinal cancer cells. *Br J Cancer* 2007;96:464-73.
25. Nemeth J, Taylor B, Pauwels S, Varro A, Dockray GJ. Identification of progastrin derived peptides in colorectal carcinoma extracts. *Gut* 1993;34:90-5.
26. Siddheshwar RK, Gray JC, Kelly SB. Plasma levels of progastrin but not amidated gastrin or glycine extended gastrin are elevated in patients with colorectal carcinoma. *Gut* 2001;48:47-52.
27. Van Solinge WW, Nielsen FC, Friis-Hansen L, Falkmer UG, Rehfeld JF. Expression but incomplete maturation of progastrin in colorectal carcinomas. *Gastroenterology* 1993;104:1099-107.
28. Smith AM, Watson SA. Gastrin and gastrin receptor activation: an early event in the adenoma-carcinoma sequence. *Gut* 2000;47:820-4.
29. Ciccotosto GD, McLeish A, Hardy KJ, Shulkes A. Expression, processing, and secretion of gastrin in patients with colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1995;109:1142-53.
30. Breiman L. Arcing classifiers. *Ann Statist* 1998;26:801-24.
31. Efron B. Bootstrap methods: Another look at the jackknife. *Ann Statist* 1979;7:1-26.
32. Binquet C. Major statistical Software usable in epidemiology. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1998;46:329-36.
33. Noffsinger AE. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annu Rev Pathol* 2009;4:343-64.

ARTICLE 2

**Activation of pro-oncogenic pathways
in colorectal hyperplastic polyps**

INTRODUCTION

Nous avons montré dans le précédent travail, que l'expression de la progastrine dans les PH était corrélée à la survenue d'événements néoplasiques et identifié ainsi un sous-groupe de patients porteurs de PH à risque d'évolution maligne. La progastrine peut activer plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire qui sont détaillées dans les paragraphes suivants (figure 28).

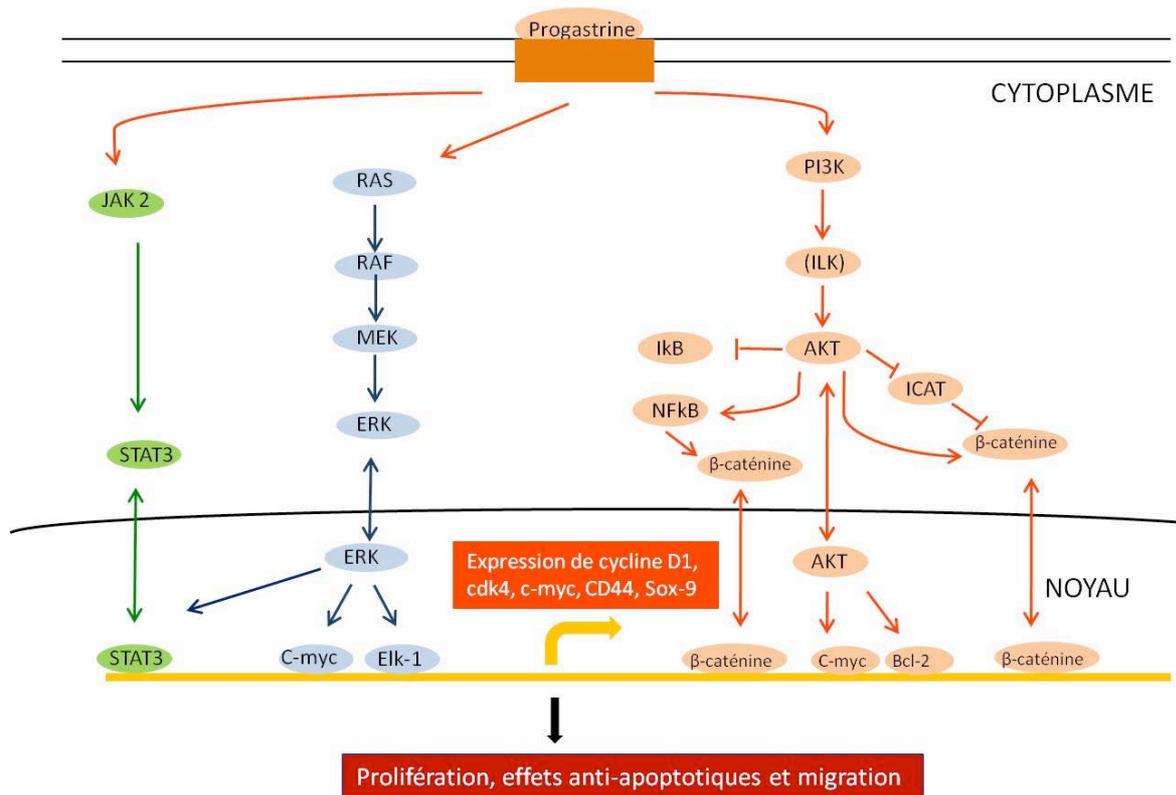


Figure 28. Les voies de signalisation activées par la progastrine dans les cellules épithéliales coliques normales et tumorales.

I-La voie WNT/ β -caténine /TCF4

I-1-L'activation de la voie WNT/ β -caténine /TCF4 et ces cibles

La voie WNT/ β -caténine /TCF4 joue un rôle important dans le développement embryologique et dans le maintien homéostasique des tissus matures, en particulier dans la régénération épithéliale intestinale (Lynch and Lynch 2005). Les protéines de la famille Wnt sont des glycoprotéines extracellulaires sécrétées. La liaison à leurs récepteurs active 4 voies

de signalisation différentes dont la voie Wnt/ β -caténine. Dans cette voie, la liaison des ligands Wnt à leur récepteur, inactive le complexe APC/ GSK3 β / axine impliqué dans la dégradation de la β -caténine. Il en résulte une accumulation de β -caténine puis sa translocation nucléaire. Dans le noyau, β -caténine forme un complexe avec les facteurs de transcription TCF/LEF et régule la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération cellulaire dont c-myc et la cycline D1 (cf introduction générale).

I-2-La progastrine active la voie WNT/ β -caténine /TCF4

Les effets prolifératifs et anti-apoptotiques de la progastrine ont été corrélés, *in vivo*, dans des souris surexprimant la prohormone, à l'activation de NF κ B à travers la dégradation de son inhibiteur I κ B (Umar, Sarkar et al. 2008). Ainsi, la progastrine à travers cette voie de signalisation activerait l'expression du facteur de transcription β -caténine et un de ces gènes cibles, la cycline D1 dans le colon proximal (Umar, Sarkar et al. 2009). Par ailleurs, l'inhibition de la boucle autocrine de progastrine dans les cellules cancéreuses coliques en utilisant des siRNA a permis de mettre en évidence une répression par la progastrine de ICAT, un inhibiteur direct de β -caténine. Cette inhibition conduirait à une activation du complexe transcriptionnel β -caténine /TCF4 et une augmentation de l'expression de leurs gènes cibles incluant c-myc, cycline D1, CD44 ou sox9 (Pannequin, Delaunay et al. 2007). Par ailleurs, la régulation d'ICAT par la progastrine impliquerait la voie PI3K/AKT. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de PI3K permet de rétablir l'expression d'ICAT dans des cellules cancéreuses coliques traitées par la progastrine. De plus, à travers cette activation de β -caténine /TCF4, la progastrine stimulerait également la voie de signalisation Notch en augmentant l'expression d'un de ces ligands, jagged 1 (Pannequin, Bonnans et al. 2009).

I--3-La voie WNT/ β -caténine /TCF4 dans les tumeurs colorectales

La voie WNT/ β -caténine /TCF4 est activée dans 60 à 90% des adénocarcinomes colorectaux, en particulier dans les tumeurs microsatellites stables présentant des mutations du gène suppresseur de tumeur APC. L'activation de β -caténine a également été associée, de façon moins fréquente à des mutations activatrices sur le gène CTNNB1 qui code pour la β -caténine. En revanche, les polypes hyperplasiques ne présentent pas d'activation de β -caténine (voir introduction générale).

II-La voie RAS/RAF/MEK/ERK

II-1-L'activation et les cibles de ERK

Les protéines Ras sont des petites GTPases associées à la membrane, codées par 3 gènes (HRAS, KRAS et NRAS). Elles sont activées par différents signaux extracellulaires (des facteurs de croissance, des cytokines ou des hormones) impliquant des récepteurs tyrosine kinase, ou des récepteurs couplés aux protéines G. La voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK a très bien été décrite dans l'activation du récepteur tyrosine kinase de l'EGF (epidermal growth factor receptor, EGFR) (Campbell, Khosravi-Far et al. 1998; Ruzzo, Graziano et al. 2010). La liaison ligand/récepteur entraîne l'autophosphorylation de résidus tyrosine au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur et permet le recrutement et l'activation des protéines adaptatrices, Shc, Grb2 (GTP-exchange complex growth factor receptor bound 2) et le facteur d'échange, SOS (son of sevenless). Ce complexe permet l'activation de ras en favorisant la formation de ras-GTP (Quilliam, Khosravi-Far et al. 1995). Ras activé recrute à la membrane et permet l'activation des membres de la famille des sérine/thréonine kinases Raf, dont Raf-1. Les protéines Raf activées phosphorylent, ensuite, les kinases MEK1 et MEK2 (mitogen associated/extracellular regulated kinase) qui phosphorylent à leur tour ERK 1 et 2 (extracellular regulated kinase) sur les résidus thréonine et tyrosine. Leur activation conduit à la phosphorylation et l'activation d'autres substrats dans le cytoplasme ou à leur translocation dans le noyau où ils activent différents facteurs de transcription comme Elk induisant l'expression de facteurs pro-prolifératifs ou pro-oncogéniques tels que c-fos (Davis 1993).

II-2-La progastrine active la voie ERK

Les souris transgéniques exprimant un transgène humain de la progastrine au niveau du foie qui ne permet pas la maturation de la prohormone présentent un taux circulant élevé de progastrine. Dans ce modèle, Ferrand et al ont montré, à la fois une augmentation d'expression des protéines ERKs et une augmentation de leur activation comparativement au niveau retrouvé dans les souris contrôle (Ferrand, Bertrand et al. 2005). Ces résultats ont été confirmés par Singh et al dans un autre modèle de souris transgénique exprimant un transgène humain de la progastrine ciblé dans la muqueuse colique. Les auteurs ont mis en évidence

dans le colon de ces souris une augmentation du niveau des ERKs phosphorylés dans les compartiments cellulaire et nucléaire. Cette activation des ERKs serait plus importante au niveau du colon proximal des souris (Umar, Sarkar et al. 2008).

II-3-La voie ERK dans les cancers colorectaux

Plusieurs études ont démontré que des mutants constitutionnellement actifs de MEK-1 étaient capables de transformer des cellules de mammifères (Brunet, Pages et al. 1994; Cowley, Paterson et al. 1994; Mansour, Matten et al. 1994). De plus, de nombreuses lignées cancéreuses et tumeurs humaines présentent une augmentation de l'activité des protéines ERKs. Hoshino et al (Hoshino, Chatani et al. 1999) ont montré une activation constitutive des ERKs dans 50 lignées cellulaires (36.2%), incluant des lignées de cancers du colon. Ces résultats ont été également confirmés sur des échantillons de tissus cancéreux humains. Lee et al, dans leur étude, ont de plus mis en évidence sur un échantillon de 123 tumeurs colorectales (103 adénocarcinomes, 10 adénomes tubulaires et 10 adénomes vilieux) un marquage immuno-histochimique de phospho-ERK dans 76% des adénocarcinomes, 30% des adénomes tubulaires et 40% des adénomes vilieux (Lee, Lee et al. 2004).

III-La voie JAK/STAT

III-1-Activation et cibles de la voie JAK/STAT

Les protéines JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) appartiennent à une large famille de tyrosine kinases. Leur expression est ubiquitaire, à l'exception de JAK3 exprimée dans les lignées myéloïdes et lymphoïdes. La famille des gènes STATs, effecteurs des kinases JAKs, est, quant à elle, constituée de 7 protéines (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5B et STAT6) (Bowman, Garcia et al. 2000)

Les protéines tyrosine kinases JAKs peuvent être activées par des récepteurs de cytokines, des récepteurs tyrosine kinase, notamment EGFR (Berclaz, Altermatt et al. 2001; Shao, Cheng et al. 2003) ou des récepteurs couplés aux protéines G (Marrero, Schieffer et al. 1995; Madamanchi, Li et al. 2001). Leur activation conduit à la phosphorylation des facteurs STATs et la stimulation de leur activité transcriptionnelle. Les mécanismes d'activation par les

récepteurs de cytokines ont été les premiers décrits. Les protéines tyrosine kinsases JAKs associées aux récepteurs des cytokines sont capables de s'activer par trans-phosphorylation suite à l'homo ou l'hétérodimérisation des récepteurs. Les JAKs activés phosphorylent les facteurs de transcription STATs sur un résidu tyrosine présent dans leur domaine d'oligomérisation N-terminal. Dans le cas des RTK, après liaison des ligands, le récepteur peut directement phosphoryler STATs et/ou indirectement par l'activation de kinases intermédiaires de la famille des SRC ou JAK. Les mécanismes d'activation par les RCPG sont moins bien connus. L'un des mécanismes décrits impliquerait les petites GTPases Rho et Rac. La phosphorylation de JAK induite par les récepteurs RCPG serait dépendante de ces petites GTPases. Rac qui régule l'activité de la NADPH oxydase pourrait induire la formation de radicaux libres (ROS). Ces ROS inactiveraient transitoirement des tyrosines phosphatases, déplaçant, ainsi, l'équilibre de l'état de phosphorylation de JAK vers l'autophosphorylation. Rho serait nécessaire pour une activité transcriptionnelle maximale des STATs induite par les RCPG (Pelletier, Duhamel et al. 2003; Raptis, Arulanandam et al. 2011).

La phosphorylation du résidu tyrosine de STAT permet son interaction avec le domaine SH2 d'une autre protéine STAT et ainsi leur dimérisation. Les dimères STATs sont transloqués dans le noyau où ils agissent comme facteur de transcription. Par ailleurs, dans le noyau, une phosphorylation sur sérine, dépendante des ERKs participerait à la régulation de l'activité transcriptionnelle des STATs (voir chapitre III-2-3-4) (Wen, Zhong et al. 1995; Zhang, Blenis et al. 1995).

De nombreux gènes cibles des STATs sont impliqués dans le cycle cellulaire (comme la cycline D1/D2 et c-myc), l'apoptose (bcl-xL et mcl-1) et l'angiogénèse (VEGF) (Ruzzo, Graziano et al.) et jouent un rôle important dans l'oncogénèse.

III-2-La progastrine active la voie JAK2/STAT3

L'analyse en immunofluorescence de coupes de colons de souris transgéniques surexprimant la progastrine et l'analyse en western blot des isolats de cellules coliques correspondants ont permis de montrer une surexpression de JAK2 et STAT3 associée à la progastrine par rapport aux souris contrôle. De même, l'activation de ces facteurs a été mise en évidence par l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les formes activées phosphorylées. En revanche dans ce modèle, l'expression et l'activation de STAT1 ne semble pas être associée à la progastrine (Ferrand, Bertrand et al. 2005).

Par ailleurs, l'activation de la voie JAK2/STAT3 pourrait participer à l'effet prolifératif induit par la progastrine. En effet, les primocultures issues de colon de souris, traitées par la progastrine montrent, d'une part, une augmentation de la prolifération et d'autre part, une activation de la kinase JAK2. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de JAK2 reverse cette prolifération cellulaire dépendante de la progastrine (Ferrand, Bertrand et al. 2005).

III-3-Les facteurs STATs dans les cancers colorectaux

STAT3 est reconnu comme un oncogène et est constitutivement activé dans plusieurs cancers humains (Bromberg, Horvath et al. 1998; Bromberg, Wrzeszczynska et al. 1999; Turkson, Bowman et al. 1999). Plus récemment, Ma et al ont montré un taux de phospho-STAT3 et de ces gènes cibles cycline D1 et bclxL augmentés dans un échantillon de 45 cancers colorectaux (Ma, Wang et al. 2004). Dans cette étude, une corrélation entre le taux de STAT3 phosphorylé et l'expression de cycline D1 a également été mise en évidence. De même, Corvinus et al ont montré dans des tests *in vitro* que STAT3 pouvait accélérer la prolifération cellulaire, induire des signaux anti-apoptotiques et augmenter les capacités invasives des cellules cancéreuses coliques. Les auteurs ont également mis en évidence une activation de STAT3 dans les cellules dédifférenciées sur 32 biopsies de cancers colorectaux. L'analyse des tissus adjacents non néoplasiques a révélé une activation de STAT3 dans plus de la moitié des cas. Ces résultats suggèrent que l'activation de STAT3 dans le colon pourrait survenir de façon précoce, avant même l'apparition de lésions histologiques détectables (Corvinus, Orth et al. 2005).

Par ailleurs, contrairement à d'autres molécules de signalisation, aucune mutation ni amplification de STAT3 n'a été identifiée dans les cancers humains. L'activation de STAT3 semblerait donc plutôt être due à des dérégulations survenant en amont de STAT3, dans la voie JAK/STAT ou dans des voies interagissant avec elle (Burke, Jin et al. 2001).

L'expression de phospho-STAT3 a également été corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers colorectaux. En effet, dans des échantillons d'adénocarcinomes, Kusaba et al ont mis en évidence un marquage positif de phospho-STAT3 dans environ 50% des cas (défini comme plus de 15% de marquage dans les cellules tumorales). L'activation de STAT3 était significativement associée au stade tumoral, à l'invasion lymphatique et à la survenue de récurrence (Kusaba, Nakayama et al. 2005; Kusaba, Nakayama et al. 2006).

De même, STAT5 serait impliqué dans la prolifération tumorale colique, l'invasion et la migration, ainsi que l'angiogénèse à travers la régulation de plusieurs gènes, dont Bcl-2, FAK

(focal adhesion kinase), MMP2 et VEGF. L'expression et l'activation de STAT5 seraient augmentées dans les adénomes et les adénocarcinomes comparées à la muqueuse colique normale (Xiong, Su et al. 2009). De plus, Mao et al ont également démontré une association entre l'activation de STAT5 et des caractères histo-pronostiques comme la profondeur de l'invasion tumorale et le stade TNM (Mao, Li et al. 2011)

III-4-la voie Ras/Raf/MEK/ERK permettrait une activation maximale de la voie JAK/STAT

La voie RAS /RAF/MEK/ERK pourrait également réguler la voie JAK/STAT. En effet, l'étude de la séquence protéique de STAT 1, 3 et 4 met en évidence la présence d'une séquence hautement conservé de phosphorylation par les ERKs. D'autre part, David et al ont montré une co-précipitation, après activation par l'interféron β (IFN β) de STAT1 α et ERK2. La transcription induite par l'IFN β via les protéines STATs serait également dépendante de l'activation de ERK (David, Petricoin et al. 1995).

Dans un modèle de fibroblaste exprimant un récepteur aux œstrogènes fusionné avec BRAF et dans lequel ERK1 et ERK2 peuvent être activés en réponse à la stimulation par un agoniste de l'œstrogène, Chung et al, ont montré que l'activation de Raf et de la voie ERK entraînait une phosphorylation sur sérine de STAT3 (Chung, Uchida et al. 1997). De même, Kuroki et al ont montré une serine phosphorylation de STAT3 dépendante de ERK1 et ERK 2 dans les granulocytes (Kuroki and O'Flaherty 1999).

IV-La voie PI3K/AKT

IV-1-Activation et cibles de la voie PI3K/AKT.

Les PI3-Kinases (PI3K) de classe I sont des protéines hétéro-dimériques, constituées d'une sous unité régulatrice, p85 et d'une sous unité catalytique, p110. La sous unité p85 peut interagir par son domaine SH2 avec les résidus tyrosines phosphorylés de récepteurs tyrosine kinase activés ou de protéines adaptatrices. Cette interaction induit un changement de conformation et une activation de la sous-unité catalytique de la PI3K. Celle-ci phosphoryle des phosphoinositides (PI), dont PIP2 et PIP3. Ces lipides membranaires phosphorylés se lient

à la fois à la protéine kinase AKT et à la phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). Suite à un changement de conformation d'AKT et PDK1 induit par les PI, PDK1 phosphoryle et active AKT (Chan, Rittenhouse et al. 1999). AKT activée est présente dans le noyau et le cytoplasme et est impliquée dans la phosphorylation de nombreuses protéines (Katso, Okkenhaug et al. 2001). AKT participe en particulier à la régulation de l'apoptose, Parmi les cibles d'AKT, Bad est une protéine pro-apoptotique qui va être dégradée suite à sa phosphorylation par AKT. (Chan, Rittenhouse et al. 1999). AKT peut également être impliquée dans la prolifération cellulaire. En effet, elle active indirectement la cycline D1 en inhibant la kinase GSK3 β qui phosphoryle la cycline D1 et induit sa dégradation par le protéasome. De même, GSK3 β phosphoryle et déstabilise la β -caténine. Ainsi son inhibition par AKT peut conduire à une augmentation du niveau de ces protéines. AKT induit, par ailleurs, la phosphorylation et la dégradation d'I κ B, un inhibiteur de NF κ B. Il permet ainsi la libération du facteur de transcription NF κ B qui migre dans le noyau et induit l'activation de gènes cibles impliqués notamment dans la prolifération cellulaire (Chan, Rittenhouse et al. 1999; Steelman, Abrams et al. 2008). De plus, AKT est également impliqué dans la migration (Samuels, Diaz et al. 2005) et l'angiogénèse (en induisant la transcription de VEGF) (Bertrand, Kowalski-Chauvel et al. 2010).

IV-2-La progastrine active la voie PI3K/AKT

La progastrine a également été associée *in vivo* à la voie PI3K/AKT. En effet, les colons des souris surexprimant la prohormone présentent un marquage en immunofluorescence plus élevé de la sous unité régulatrice p85 de PI3K, suggérant une augmentation de son expression par rapport aux souris contrôles. Cette surexpression a été corrélée à une augmentation de la forme activée d'AKT. De plus, *in vitro*, la prolifération de cellules coliques murines induite par la progastrine est réversée par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la PI3K. Ces résultats suggèrent le rôle de la voie PI3K/AKT dans les effets prolifératifs de la progastrine (Ferrand, Bertrand et al. 2005).

IV-3-PI3K/AKT dans les cancers colorectaux

Des mutations ou amplifications de la PI3K ont été identifiées dans de nombreux cancers humains, incluant les cancers du colon, Ces altérations moléculaires conduisent à une

augmentation de l'activation de la sous unité catalytique p110 (Sartore-Bianchi, Martini et al. 2009). De même, des mutations du gène suppresseur de tumeur PTEN, dont le produit est une lipide phosphatase antagonisant les fonctions de PI3K ont été rapportées dans environ 40% des CRC (Ruzzo, Graziano et al. 2010). La perte de PTEN a été corrélée à une mauvaise survie sans récurrence et survie globale (Jang, Song et al. 2010).

De plus, des analyses immunohistochimiques de coupes de tumeurs colorectales ont également mis en évidence un haut niveau d'AKT phosphorylé dans 46 % à 63 % des adénocarcinomes. Les adénomes tubulaires présenteraient également un marquage de phospho-AKT dans 57% à 82% des cas mais à un niveau plus faible (Roy, Olusola et al. 2002; Semba, Itoh et al. 2002; Saglam, Garrett et al. 2007). En revanche, les polypes hyperplasiques ne semblent pas montrer d'activation d'AKT (Roy, Olusola et al. 2002).

Les effets prolifératifs et anti-apoptotiques d'AKT ont également été confirmés *in vitro*. Sur des lignées cancéreuses humaines, plusieurs études ont démontré que l'inactivation d'AKT par un inhibiteur induisait une diminution de la prolifération cellulaire en inhibant l'expression de la cycline D1, une fragmentation de l'ADN et une augmentation du pourcentage de corps apoptotiques. Ces effets anti-apoptotiques sembleraient passer par une inhibition de l'activité de la caspase 3. *In vivo*, l'inhibition d'AKT permet de réduire sur des souris le volume des xénogreffes de cellules cancéreuses colorectales humaines et de diminuer la dissémination intra-abdominale de la tumeur (Itoh, Semba et al. 2002; Semba, Itoh et al. 2002; Sheng, Shao et al. 2003).

Ainsi, la progastrine peut activer plusieurs voies pro-oncogéniques dans les cancers colorectaux. Certaines d'entre elles, en particulier les voies JAK/STAT ou Ras/Raf/MEK/ERK, n'ont pas encore été explorées dans les polypes hyperplasiques. Afin de mieux caractériser les polypes exprimant la progastrine, nous avons étudié l'activation de ces différentes voies pro-oncogéniques en aval de la progastrine.

OBJECTIFS

- Etudier l'activation des voies de signalisation de la progastrine dans les PH (article 2)

PATIENTS ET METHODES

I-Schéma de l'étude

Une étude descriptive rétrospective a été réalisée.

II-Taille de l'échantillon, patients et recueil de données

Nous avons inclus 48 polypes hyperplasiques provenant de 36 patients et diagnostiqués consécutivement dans le service d'anatomo-pathologie de l'hôpital de Ranguel en 2008. Aucun de ces polypes ne présentait les critères histologiques des adénomes festonnés sessiles. Les patients présentant des antécédents familiaux de polypose hyperplasique ou de polypose adénomateuse familiale ont été exclus de l'étude. De plus, 12 échantillons de colons normaux, provenant des tranches de sections saines de résection de diverticules non compliqués et 15 adénomes tubuleux (10 adénomes de bas grade et 5 adénomes de haut grade) ont été inclus en tant que contrôle.

Les données histo-cliniques (âge, sexe, localisation, nombre, taille des PH) ont été récupérées pour tous les patients.

III-Immunohistochimie

L'analyse immunohistochimique a été réalisée sur des coupes en paraffine fixées au formaldéhyde. Les échantillons ont été incubés toute la nuit avec l'anticorps primaire et la détection réalisée à l'aide du système HRP Envision+ de Dako®. L'anticorps polyclonal anti-progastrine (Ciccotosto, McLeish et al. 1995) a été gracieusement fourni par le Pr Shulkes et les anticorps primaires dirigés contre phospho-tyrosine⁷⁰⁵-STAT3 (pY-STAT3) et phospho-thréonine²⁰²/tyrosine²⁰⁴-ERK-1/2 (pERK1/2) fournis par cell signaling.

Les marquages de la progastrine, pY-STAT3 et p-ERK 1/2 ont été mesurés en pourcentage de cellules épithéliales marquées dans le polype. Tous les échantillons ont été examinés en double aveugle, par un pathologiste et un interne formé à examiner les tissus colorectaux. La concordance entre examinateurs étant excellente (coefficients de concordance de Lin=0.99 pour la progastrine et 0,98 pour pY-STAT3 et p-ERK (Lin 1989)), les analyses ont été

effectuées avec la moyenne des pourcentages observés par les 2 lecteurs. Comme défini dans le travail précédent, le marquage de la progastrine a été recodé en 3 classes absence/faible expression, expression modérée et expression forte. Le seuil d'expression « normale » (absence/faible expression) a été déterminé en utilisant le 95^{ème} percentile du pourcentage de cellules épithéliales marquées dans la muqueuse normale (<10%). L'expression modérée a été définie par un pourcentage de cellules épithéliales marquées entre 10% et 50% et l'expression forte par un pourcentage supérieur à 50%.

IV-Analyses statistiques

Une analyse univariée a été menée afin de comparer les caractéristiques cliniques et immunohistochimiques entre les différents groupes. Le test du Chi² ou le test exact de Fisher (lorsque les conditions d'application du test du Chi² n'étaient pas remplies) ont été utilisés pour les variables catégorielles et le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney ou le test non paramétrique de tendance de Cuzick pour les variables quantitatives (de distribution non gaussienne). Les intervalles de confiance à 95% exactes ont été calculés pour tous les pourcentages.

La corrélation entre l'expression de progastrine et celle de p-ERK ou de pY-STAT3 a été étudiée à l'aide du test de corrélation de Spearman.

Dans cette étude, tous les tests statistiques étaient bilatéraux et la significativité fixée à 0.05. Les analyses ont été réalisées à l'aide des logiciels de statistiques STATA v11.

Activation of pro-oncogenic pathways in colorectal hyperplastic polyps

Catherine DO¹, Claudine BERTRAND¹, Julien PALASSE¹, Marie-Bernadette DELISLE², Arthur SHULKES³, Elizabeth COHEN-JONATHAN-MOYAL¹, Audrey FERRAND¹, Catherine SEVA¹.

¹ INSERM UMR.1037-Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Université Paul Sabatier Toulouse III, France. ² Service d'Anatomie Pathologique et Histologie Cytologie, CHU Rangueil and Faculté de Médecine Rangueil, France. ³ University of Melbourne, Department of Surgery, Austin Health, Victoria, Australia.

Progastrin has been shown to activate several pro-oncogenic pathways. Since ERK and STAT3 activation have not been explored yet in HP and to better characterize progastrin positive HP, we assessed the activation of these two pro-oncogenic factors in HP and their association to progastrin expression in a sample of 49 HP. The average percentages of progastrin-, phospho-STAT3- and phospho-ERK1/2- epithelial stained cells in HP were, respectively, 31% (standard deviation: 35), 10% (23) and 34% (30%). The expression levels of progastrin and phospho-ERK were higher in these lesions compared to normal colon ($p=0,0008$ et 0.0003 , respectively). Moreover, the progressive increase of progastrin and phospho-ERK staining in normal colon, HP and adenoma was significant ($p<0.0001$ and $p=0.001$, respectively) and suggests that expression of these factors in HP is intermediate between normal mucosa and colonic adenomas. We also found a significant correlation between progastrin and phospho-ERK expression in HP ($p=0,0184$). Taken together, our results show that progastrin and several pro-oncogenic factors are activated in a subset of HP that might represent colonic neoplastic precursors.

INTRODUCTION

Sporadic hyperplastic polyps (HP) are one of the most frequent colorectal lesions. Prevalence of HP among asymptomatic patients is about 10% (Imperiale, Wagner et al. 2000; Lieberman, Prindiville et al. 2003).

Typical small HP (<10mm) are thought to be non neoplastic lesions without malignant potential and most of medical society guidelines do not recommend colonoscopic follow up after the removal of such lesions (HAS 2004; Winawer, Zauber et al. 2006). However, HP and colorectal cancers share the same risk factors, including alcohol, tobacco use and obesity (Martinez, McPherson et al. 1997; Morimoto, Newcomb et al. 2002). In addition, some authors have proposed that a subset of HP, in particular with B-raf mutations (Chan, Zhao et al. 2003; Huang, O'Brien M et al. 2004; O'Brien, Yang et al. 2006) and/or a CpG island methylator phenotype (CIMP) (O'Brien, Yang et al. 2004) may be neoplastic precursors of sessile serrated adenoma and carcinoma (Boparai, Dekker et al. 2011; Snover 2011). In a previous study, we demonstrated that the prohormone, progastrin recognized as a co-carcinogenic factor, was overexpressed in a subset of HP. This overexpression could predict patients at high risk to develop metachronous colonic neoplasms. Interestingly, in this study, HP with high progastrin expression was associated with the occurrence of tubular but not serrated adenomas. These findings suggest that HP are molecularly heterogeneous and might also be involved in the traditional adenoma-adenocarcinoma pathway potentially through cross-over between the different colorectal carcinogenesis pathways (Jass, Whitehall et al. 2002). Thus, the role of HP in colorectal carcinogenesis as well as the biological mechanisms underlying their development and potential transformation remain controversial and still need to be clarified (Snover 2011).

Progastrin gene is frequently overexpressed in human colorectal cancer. In colonic cancer cells, this expression leads to synthesis and secretion of the incompletely processed forms of gastrin, mainly progastrin (Nemeth, Taylor et al. 1993; Van Solinge, Nielsen et al. 1993; Singh, Xu et al. 1994; Smith and Watson 2000). This prohormone is also present at high

concentration in blood of patients with colorectal adenocarcinomas (Siddheshwar, Gray et al. 2001).

Progastrin has been shown to regulate cell functions involved in carcinogenesis, such as cell proliferation, survival and migration (Wang, Koh et al. 1996; Baldwin, Hollande et al. 2001; Brown, Yallampalli et al. 2003; Hollande, Lee et al. 2003; Singh, Lu et al. 2003; Pannequin, Delaunay et al. 2007; Ferrand, Sandrin et al. 2009). These effects are mediated through the activation of several signal transduction pathways, including APC/beta catenin, PI3K/AKT, ERK and JAK/STAT pathways (Ferrand, Bertrand et al. 2005; Pannequin, Delaunay et al. 2007; Umar, Sarkar et al. 2008; Umar, Sarkar et al. 2009). Previous studies have shown that beta catenin and AKT are not activated in HP (Fogt, Brien et al. 2002; Wu, Montgomery et al. 2008; Fu, Li et al. 2009). However, to date, no study has assessed the activation of the ERK or STAT3 pathways in HP.

The ERK cascade is known to play a central role in growth factor signaling and is involved in cellular proliferation and survival. This pathway is up-regulated in many human cancers. ERK activity has been shown to be increased in human colon cancer cell lines and tumors (Hoshino, Chatani et al. 1999) and immunohistochemistry analyses showed phospho-ERK staining in 76% of colorectal adenocarcinoma, 30% of tubular adenomas and 40% of villous adenomas (Lee, Lee et al. 2004).

. The JAK/STAT pathway is also activated in human cancers. In particular, STAT3 target genes are involved in cell cycle, apoptosis and angiogenesis (Ruzzo, Graziano et al.). STAT3 activity is increased and related to a bad prognosis in several human cancers, such as melanoma, breast, prostate, pancreas or colorectal cancers (Bromberg, Horvath et al. 1998; Bromberg, Wrzeszczynska et al. 1999; Turkson, Bowman et al. 1999). In colorectal cancers, phospho-STAT3 expression has also been associated with cyclin D1 or bcl-xL overexpression (Ma, Wang et al. 2004). Corvinus et al showed that phospho-STAT3 accelerates cell proliferation, induces anti-apoptotic signaling and increases colorectal cancer cell invasiveness *in vitro* (Corvinus, Orth et al. 2005). Expression of phospho-STAT3 has

also been shown in 50% of colorectal adenocarcinomas and has been associated to worse prognostic features in colorectal cancer, including tumor depth, invasion, lymphatic invasion and occurrence of recurrence (Kusaba, Nakayama et al. 2005; Kusaba, Nakayama et al. 2006).

Since ERK and STAT3 pathways have not been explored yet in HP and to better characterize these lesions, we assessed the activation levels of these two pro-oncogenic factors in HP and their association to progastrin expression.

MATERIALS AND METHODS

Patients and data collection

We reviewed the medical records of 48 HP from 36 patients diagnosed in the Pathology department of Ranguel Hospital in 2008. We excluded patients with a history of familial adenomatous polyposis or hyperplastic polyposis and HP which display criteria of sessile serrated adenomas according to Torlakovic (Torlakovic and Snover 1996; Torlakovic, Skovlund et al. 2003). For comparison, we also selected 12 normal colonic tissue specimens from resected non-complicated diverticular disease and 15 adenomas (10 low, and 5 high grade dysplasia adenomas). Clinical data (age, gender, site, size, number of HP at diagnosis, history of colorectal adenoma, or adenocarcinoma and the presence of synchronous adenoma or adenocarcinoma) was collected for each patient.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry on the formaldehyde-fixed, paraffin embedded tissues, antigen retrieval was performed on dewaxed sections by water-bath heating slides in 10mM Tris-EDTA buffer (pH9). After peroxidase and serum blocking, primary antibodies was applied overnight. We then, used the DakoCytomation Envision+ System-HRP according to manufacturer protocol. Specific primary polyclonal antibody against progestin used for immunohistochemistry was kindly provided by Pr Shulkes, Melbourne University and primary monoclonal antibody against phospho-tyrosine⁷⁰⁵-STAT3 (pY-STAT3) and phospho-threonin²⁰²/tyrosin²⁰⁴-ERK-1/2 (pERK1/2) provided by cell signaling.

Analysis of the whole polyp section was performed at x20 magnificence (1 to 3 fields were considered depending on the size of the polyps). Progestin, pY-STAT3 and p-ERK 1/2 staining were analyzed by the percentage of stained epithelial cells.

All specimens were examined in a double blinded fashion by two pathologists trained to identify the pathological features of colonic cancer. The coefficient of concordance correlation, c-rho (Lin 1989) was calculated in order to determine inter-rater agreement for immunohistochemistry staining. Because the inter-rater agreement was excellent (c-rho =0.99 for progestin and pY-STAT3; and c-rho=0.98 for p-ERK staining), percentages were

reported as the average results between the two readers. As defined in our previous work, progastatin staining was also recorded as no/low, moderate or high expression. The “normality” threshold of progastatin expression (low expression) was determined using the 95th percentile of percentage of stained cells in normal colonic tissue (<10%). Moderate expression of progastatin was defined as staining in 10% to 50% of epithelial cells and high expression as staining in more than 50% of epithelial cells.

Statistical analysis

Univariate analysis was conducted to compare clinical and immunohistochemistry findings between the different study groups using the Chi² test or Fisher exact test (when required) for categorical variables and the nonparametric rank tests (Wilcoxon-Mann-Whitney or Kruskal-Wallis) or Cuzick nonparametric test for trend across ordered groups for quantitative variables.

Spearman nonparametric correlation test was used to assess the correlations between the expression of progastatin and p-ERK or pY-STAT3.

All tests were two-sided and statistical significance was set at a p value of 0.05. Analyses were performed using the statistical software, STATA v11 (Binquet, Verret et al. 1998)

RESULTS

Clinical and immuno-histological characteristics

Clinical and immuno-histological features of patients and their polyps are shown in table 1. In 56% (95%IC=41%-71%) of the cases, HP were diagnosed among male. Average age was 65 years old (sd: 12 years). In 29% (95%IC=17%-44%) of the cases, a neoplastic colorectal history, including 14.5% of adenocarcinoma history and 14.5% of adenoma history was found. Synchronous adenomas or adenocarcinomas were observed in 48% (95% CI: 33%-63%) of the cases. Mean number of hyperplastic polyps at time of diagnosis was 3 (sd: 2) with 75% (95% CI: 60%-86%) of the patients having less than 5 synchronous hyperplastic polyps and 25% (95% CI: 14%-40%) more than five polyps. The localisation of the polyps were distal in 73% (95%IC=58%-85%) of the cases and proximal in 27% (95%IC=15%-42%). All polyp size was <10 mm.

Expression of progastrin in normal mucosa and colonic neoplasms

Progastrin positive epithelial cells displayed an apical cytoplasmic dot-like staining in the normal mucosas, HP and adenomas (Figure 1 and 2). The percentages of progastrin-positive cells in normal colon, HP, low grade and high grade adenomas are reported in figure 3A and table 2. Mean percentage of progastrin positive cells observed in 48 HP was 31% (sd: 36%) and was significantly higher than in normal colon with only 2.8% of stained cells (sd: 4%, $p=0.0021$) (table 2). Similarly, in low grade tubular adenomas and high grade tubular adenomas, this mean percentage was higher, compared to normal colon and reached, respectively, 87% of positive cells (sd: 8, $p=0.0001$) and 85% (sd: 7%, $p=0.0014$) (Figure 3A and Table 2).

The progressive increase of progastrin staining in normal colon, HP and adenoma was significant as assessed by the nonparametric test for trend across ordered groups ($p < 0.0001$) (Table 3).

Wide dispersion and bimodal distribution of progastrin in HP suggested a heterogeneous population among HP. Progastrin expression was, thus, analyzed as a 3 classes variable (figure 4). Negative or low progastrin expression was determined using the 95th percentile of percentage of stained cells in normal colonic tissue (<10%). Moreover, in order to take into account the heterogeneity of progastrin expression in HP, we distinguished, among HP overexpressing progastrin (with a percentage of progastrin positive cells $\geq 10\%$), two subpopulations accordingly to progastrin distribution. Thus, moderate expression of progastrin was defined as staining in 10% to 50% of polyp epithelial cells and high expression as staining in more than 50% of cells. Interestingly, we previously associated these three HP subpopulations with different neoplasm free survival in a previous work. In our sample, no/low expression of progastrin was observed in 44% (95% CI: 29%-59%) of the HP, moderate expression in 25% (14%-40%) and strong expression in 31% (19%-46%), whereas all adenomas showed an overexpression of the prohormone.

These results demonstrate that HP show an intermediate expression of progastrin between normal mucosa and colonic adenomas and are consistent with our previous findings.

The ERK pathway in normal mucosa, HP and adenomas and its relationship with progastrin expression

The ERK pathway has never been explored in HP. In addition, progastrin has been shown to activate these signaling pathways (Ferrand, Bertrand et al. 2005; Umar, Sarkar et al. 2008). We, thus, assessed ERK activation in HP and for control, in normal colonic mucosa and adenomas. For this purpose, we used a specific antibody against the phosphorylated activated forms of ERK1/2 (p-ERK1/2).

When present, P-ERK 1/2 staining was restricted to a cytoplasmic localization in normal, colon, HP and adenomas (figure 1 and 2). The percentages of pERK1/2-positive cells in normal colon, HP, low grade and high grade adenomas are reported in figure 3B and table 2. Mean percentage of p-ERK stained epithelial cells in HP reached 33% (sd: 30%). In normal colon, the activation of ERK is significantly lower, with only 7% of stained epithelial cells (sd: 6; range: 0%-15%, $p=0.0008$) (table 2). In low grade and high grade adenomas, mean percentages of stained tumor cells were similar (51%, sd: 29%) and significantly higher than in normal mucosa (respectively, $p=0.0002$ and $p=0.0105$). The progressive increase of p-ERK staining in normal colon, HP and adenoma was significant as assessed by the nonparametric test for trend across ordered groups ($p<0.0001$) (Table 2).

Among HP, ERK activation was significantly stronger ($p=0.015$, using Cuzick test for trend across ordered groups) in lesions with strong progastrin expression (53% of stained cells, sd: 29%) as compared to no/low or moderate expression (respectively, 27% (sd: 29%) and 23% (sd: 22%)) (Table 3).

Furthermore, using the 95th percentile of percentage of p-ERK stained epithelial cells in normal mucosa, we defined p-ERK overexpression as staining in more than 15% of epithelial cells. Moderate overexpression (defined as staining in 15% to 50% of epithelial cells) was distinguished from high expression (staining in more than 50% of epithelial cells). 65% (95% CI: 49%-79%) of HP presented an overexpression of p-ERK, including 37% of moderate expression and 28% of high expression. In HP, expression of p-ERK and progastrin significantly correlated ($p=0.008$, using a spearman correlation test for comparison of ordered qualitative variable) (Table 3) and an overexpression of both p-ERK and progastrin was observed in 19/43 HP (44%, 95%IC: 29%-60%).

These results suggest that ERK activation might occur in very early steps of colonic carcinogenesis and is associated with progastrin expression in HP.

The STAT3 pathway in normal mucosae HP and adenomas and its relationship with progastrin expression

The JAK2/STAT3 transduction pathway has been shown to be one of progastrin downstream targets (Ferrand, Bertrand et al. 2005). In addition the STAT3 status has never been analyzed in HP. We therefore assessed the activation of the transcriptional factor STAT3 using a specific antibody directed against the phosphorylated activated form of STAT3, pY-STAT3. pY-STAT3 staining was nuclear in positive epithelial cells (figure 1 and 2).

The percentages of pY-STAT3-positive cells in normal colon, HP, low grade and high grade adenomas are reported in figure 3C and table 2. Mean percentage of pY-STAT3 positive cells in HP was 10% (sd: 23%), but was not significantly higher than in normal colonic mucosa (1%; sd: 1.7). In low grade and high grade adenomas, mean percentages of stained tumor cells were respectively, 38% (sd: 33%) and 31% (sd: 29%) and significantly higher than in normal mucosa (respectively, $p= 0.0014$ and $p= 0.0041$). The progressive increase of pY-STAT3 staining in normal colon, HP and adenoma was significant as assessed by the nonparametric test for trend across ordered groups ($p<0.0001$) (Table 2).

Using the 95th percentile of percentage of pY-STAT3 stained epithelial cells in normal mucosa, we defined pY-STAT3 overexpression as staining in more than 5% of epithelial cells. High expression was defined as staining in more than 50% of epithelial cells. 23% of HP (95% CI: 10%-40%) present an overexpression of pY-STAT3, including 14% (95% CI: 5%-30%) of moderate expression and 9% (95% CI: 2%-23%) of high expression (Table 3). In HP, mean percentage of pY-sTAT3 staining was not associated to the different classes of progastrin staining ($p= 0.297$) and no correlation between these two factors was observed ($p= 0.5606$).

These findings suggest that STAT3 activation occurs in dysplastic and/or more advanced lesions and is independent from progastrin expression.

DISCUSSION

In the present study, we observed for the first time a significant increase in the activation of the pro-oncogenic pathway, ERK, in HP as compared to normal tissue ($p=0.0008$). Mean percentage of p-ERK positive cells in HP (33%) was intermediate between that of normal mucosa (7%) and adenomas (51%). Interestingly, some HP presented a high expression (staining in more than 50% of epithelial cells) closer to adenoma than to normal mucosa. These results suggest that the ERK pathway might play a pro-tumoral role at the very early stage of colonic carcinogenesis and that a subset of HP might have a greater malignant potential. Indeed, several studies have suggested that the constitutive activation of the ERK pathway may lead to mammalian cells transformation (Brunet, Pages et al. 1994; Cowley, Paterson et al. 1994; Mansour, Matten et al. 1994) and constitutive ERK activation has been identified in several human cancers, including colorectal cancer (Hoshino, Chatani et al. 1999; Lee, Lee et al. 2004).

In a previous paper, we demonstrated that the high expression in HP of the hormone precursor, progastrin, known to play an important role in colon carcinogenesis, predicts occurrence of colonic neoplasm after resection of HP. Here, we confirmed that a subset of HP present an overexpression of progastrin suggesting that these patients may be at higher risk to develop metachronous neoplasms.

Interestingly, in the present study, 44% of HP overexpressed simultaneously p-ERK and progastrin. Expression of these two factors are concordant in 65% of the cases. Furthermore, we demonstrated a significant correlation between p-ERK and progastrin expression in HP ($p=0.008$). As ERK is also known to be activated in colon through progastrin independent signalling (such as EGFR activation, K-ras or B-raf constitutive mutations), unsurprisingly, 21 % of HP presented an increased activation of ERK without progastrin overexpression.

Since p-STAT3 expression has been correlated with worsen prognostic in colorectal cancer (Kusaba, Nakayama et al. 2005; Kusaba, Nakayama et al. 2006) and that progastrin

is known to stimulate this signalling cascade, we also analysed the activation of this pathway in HP.

In our study, STAT3 activation is weakly higher in HP compared to normal colon (not significant). However, 23% of HP overexpressed pY-STAT3. We did not observe a significant correlation with progastrin expression and simultaneous overexpression of progastrin, p-ERK and pY-STAT3 has been observed only in 14% of HP

We previously demonstrated an association between STAT3 activation and progastrin *in vitro* on tumor colonic cell lines treated with exogenous progastrin and *in vivo*, in transgenic mice overexpressing progastrin. These mice display a high level of circulating progastrin and it is established that numerous colonic cell lines present an autocrine loop leading to high endogenous expression of progastrin (Ferrand, Bertrand et al. 2005). Progastrin pY-STAT3 activation might require a high level of progastrin expression, as found in adenomas or adenocarcinomas. Interestingly, in our sample, average percentage of progastrin staining in HP with pY-STAT3 overexpression tended to be higher, compared to HP without pY-STAT3 overexpression (42% vs 34%). This might explain why activation of this factor mainly occurs in more advanced lesions, such as adenomas where progastrin expression is higher.

β -catenin and p-AKT pathways have also been described to be regulated by progastrin. However, they are not upregulated in HP (Fogt, Brien et al. 2002; Roy, Olusola et al. 2002; Wu, Montgomery et al. 2008; Fu, Li et al. 2009). In our sample, β -catenin staining was membranar in all the cases and p-AKT expression in HP was not different from normal tissue ($p=0.1479$) (data not shown).

Following the description of sessile serrated adenomas by Torlakovic and the molecular characterisation of the serrated-MSI pathway, several studies have linked HP to the serrated pathway. However, the existence of an association between HP and classical neoplasms is also suggested by several studies and observations. Firstly, the existence of mixed polyps, in which HP and non serrated adenoma features coexist, suggest a continuum between HP and conventional adenomas (Iino, Jass et al. 1999). Secondly, patients with

hyperplastic polyposis (newly recalled serrated polyposis) and who present multiple HP develop either sessile serrated adenomas or conventional adenomas (Boparai, Dekker et al. 2011). Thirdly, HP have been associated to an increased risk of conventional adenomas (Croizet, Moreau et al. 1997; Imperiale, Wagner et al. 2000; Huang, Whelan et al. 2001). Finally, in our previous study, the metachronous adenomas that we observed in patients presenting an initial HP were all tubular or tubulo-villous adenomas and did not display histological feature of serrated adenoma nor carcinoma. However, considering the relative high HP prevalence, estimated at 10% (Imperiale, Wagner et al. 2000; Lieberman, Prindiville et al. 2003), it is clear that all HP will not evolve towards carcinomas and identifying those at risk is required to propose an optimal follow up, regarding the patient benefit/risk balance of colonoscopy. Previously we demonstrated that progastrin expression may predict occurrence of metachronous adenomas with a 100% sensitivity and 66% specificity. Assessing additional biomarkers might reduce the number of false positive and improve the specificity of such a test. P-ERK might be of interest as this pro-oncogenic factor is overexpressed in some progastrin positive HP, and thus, HP overexpressing both p-ERK and progastrin might reflect less latent lesions.

Table 1. Clinical and histological features of hyperplastic polyps					
Variables	Total	Progastrin staining in HP epithelial cells			p-value
	N=48	No/Low expression N=21	Moderate expression N=12	High expression N=15	
Age, mean (sd)	65 y.o.(12)	61 y.o.(14)	68 y.o (10)	68 y.o (8)	0.2613
Median [min-max]	66 y.o. [30-89]	65 y.o. [30-80]	70 y.o. [51-89]	66 y.o. [53-79]	
Sex , % (95% CI)					0.019
Female	44% [29%-59%]	33% [15%-57%]	25% [5%-57%]	73% [45%-92%]	
Male	56% [41%-71%]	67% [43%-85%]	75% [43%-95%]	27% [8%-55%]	
history of adenoma or adenocarcinoma , % (95% CI)	29% [17%-44%]	33% [15%-57%]	42% [15%-72%]	13% [2%-40%]	0.280a
Synchronous Adenoma or adenocarcinoma, % (95% CI)	48% [33%-63%]	48% [26%-70%]	33% [10%-65%]	60% [32%-84%]	0.387
Number of polyps, % (95% CI)					0.526a
<5	75% [60%-86%]	67% [43%-85%]	83% [52%-98%]	80% [52%-96%]	
≥5	25% [14%-40%]	33% [15%-57%]	17% [2%-48%]	20% [4%-48%]	
Localisation, % (95% CI)					0.154a
Proximal colon	27% [15%-42%]	19% [5%-42%]	17% [2%-48%]	47% [21%-73%]	
Distal colon	73% [58%-85%]	81% [58%-95%]	83% [52%-98%]	53% [27%-79%]	
HP histologic features					0.784a
Goblet-cell rich HP	83% [70%-93%]	81% [58%-95%]	92% [62%-100%]	80% [52%-96%]	
Microvesicular HP	17% [7%-30%]	19% [5%-42%]	8% [0%-38%]	20% [4%-48%]	

Progastrin expression was recorded as No/low (<10%), moderate (10%-50%) or high over-expression (≥50) with the percentage of positive tumoral epithelial cells.

Chi 2 tests (for categorical variables) and Kruskal-Wallis test (for continuous variables) were performed (if no other mention) to compare clinical and immune-histological features between progastrin expression groups.

95%CI: Binomial exact 95- confidence interval was calculated for each percentage, if no other mention.

Sd: standard deviation

a: Fischer exact test

	Normal colon N=12	HP N=48*	Adenomas		Trend test p-value
			Low grade N=10	High grade N=5	
Percentage of progastrin stained cells, mean (sd)	3% (4)	31% (36)	87% (8)	85% (7)	<0.0001
Percentage of p-ERK stained cells, mean (sd)	7% (6)	33% (30)	51% (29)	51% (29)	<0.0001
Percentage of pY-STAT3 stained cells, mean (sd)	1% (1.7)	10% (23)	38% (33)	31% (29)	<0.0001

Progastrin, p-ERK and pY-STAT3 expression levels in HP are intermediate between normal colon and adenomas, as assessed by Cuzick test for trend across normal colon, HP Low-grade and High grade adenomas.

*N=43 for p-ERK staining and N=35 for pY-STAT3 staining

Sd: standard deviation

Table 3. Expression of progastrin, p-ERK1/2 and pY-STAT3 in hyperplastic polyps									
Variables	Total		Progastrin staining in HP epithelial cells						
	N=48		No/Low expression N=21		Moderate expression N=12		High expression N=15		p-value
Percentage of p-ERK1/2 stained cells, N mean (sd)	N=43	33% (30)	N=18	27% (29)	N=12	23% (22)	N=13	53% (29)	
Expression of of p-ERK1/2									0.0079
No/low expression	35% [21%-51%]		50% [26%-74%]		42% [15%-72%]		8% [0%-36%]		
Moderate expression	37% [23%-53%]		33% [13%-59%]		42% [15%-72%]		38% [14%-68%]		
High expression	28% [15%-44%]		17% [4%-41%]		16% [2%-48%]		54% [25%-81%]		
Percentage of pY-STAT3 stained cells, N mean (sd)	N=35	10% (23)	N=15	11% (29)	N=7	3% (7)	N=13	12% (23)	0.297
Expression of of pY-STAT3									0.3116
No/low expression	77% [60%-90%]		80% [52%-96%]		86% [42%-100%]		69% [39%-91%]		
Moderate expression	14% [5%-30%]		7% [0%-32%]		14% [0%-58%]		23% [5%-54%]		
High expression	9% [2%-23%]		13% [2%-40%]		0% [0%-41%]****		8% [0%-36%]		

Progastrin expression was recorded as No/low (<10%), moderate (10%-50%) or high over-expression (>=50) with the percentage of positive tumoral epithelial cells.

P-ERK expression was recorded as No/low (<15%), moderate (15%-50%) or high over-expression (>=50) with the percentage of positive tumoral epithelial cells.

PY-STAT3 expression was recorded as No/low (<5%), moderate (5%-50%) or high over-expression (>=50) with the percentage of positive tumoral epithelial cells.

Spearman nonparametric correlation test was performed to compare trend across no/low, moderate and high expression of p-ERK or pY-STAT3 with progastrin expression groups, whereas Cuzick test for trend across ordered groups was used to test increase in mean percentage of p-ERK or pY-STAT3 stained cells across progastrin expression groups.

* One-sided, 97.5% confidence interval

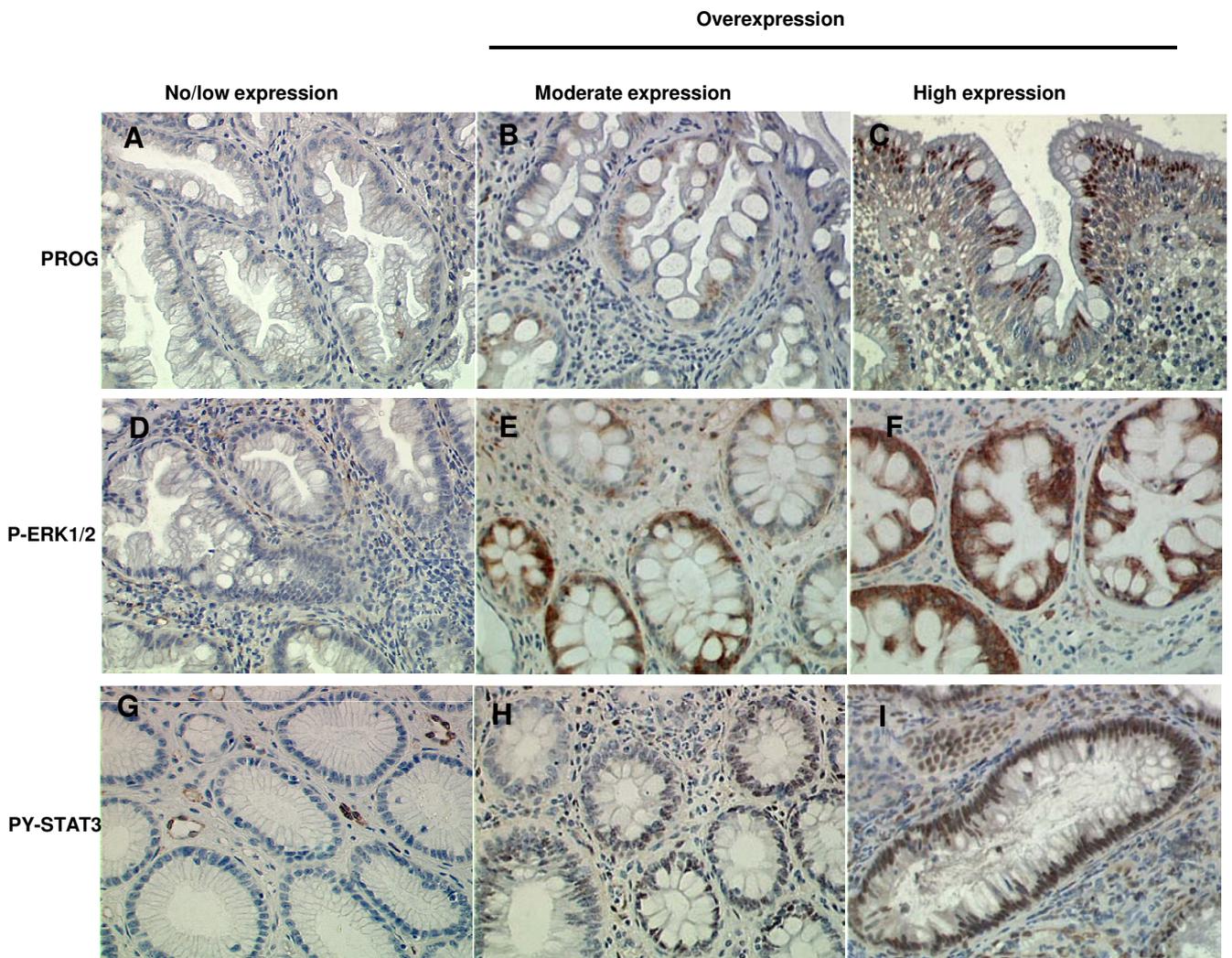


Figure 1. Expression of progastrin, p-ERK1/2 and pY-STAT3 in HP

(A-C) Expression of progastrin in hyperplastic polyps: Negative (A), (B) moderate and (C) high expression. (D-F) Expression of p-ERK1/2 in hyperplastic polyps: Negative (D), (E) moderate and (F) high expression. (G-I) Expression of pY-STAT3 in hyperplastic polyps: Negative (G), (H) moderate and (I) high expression.

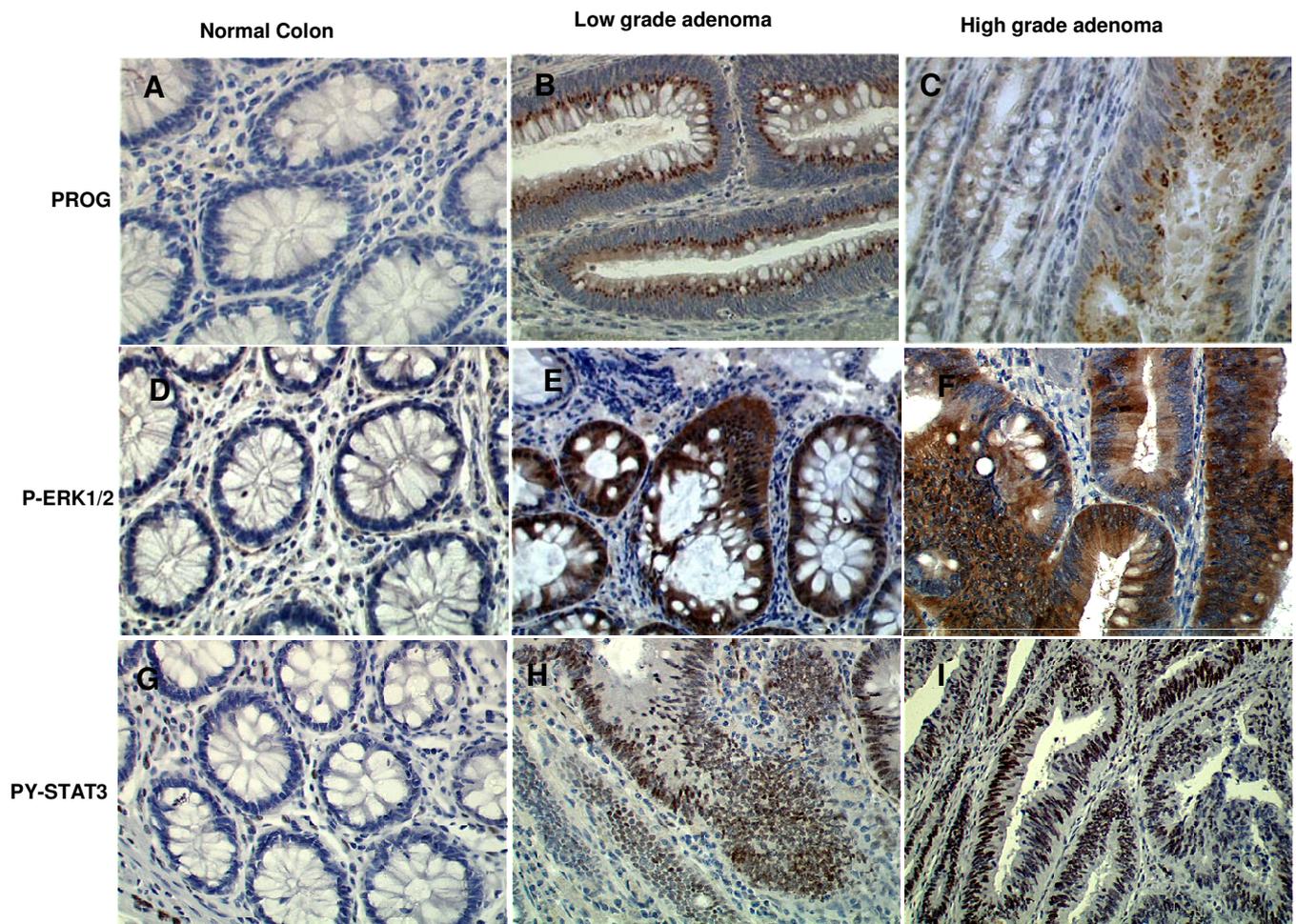


Figure 2. Expression of progastrin, p-ERK1/2 and pY-STAT3 in normal colon and adenomas.

(A-C) Expression of progastrin: (A) Negative expression in normal colon, (B) High expression in low grade and (C) high grade adenomas. (D-F) Expression of p-ERK1/2: (D) Negative expression in normal colon, (E) High expression in low grade and (F) high grade adenomas. (G-I) Expression of pY-STAT3: (G) Negative expression in normal colon, (H) High expression in low grade and (I) high grade adenomas.

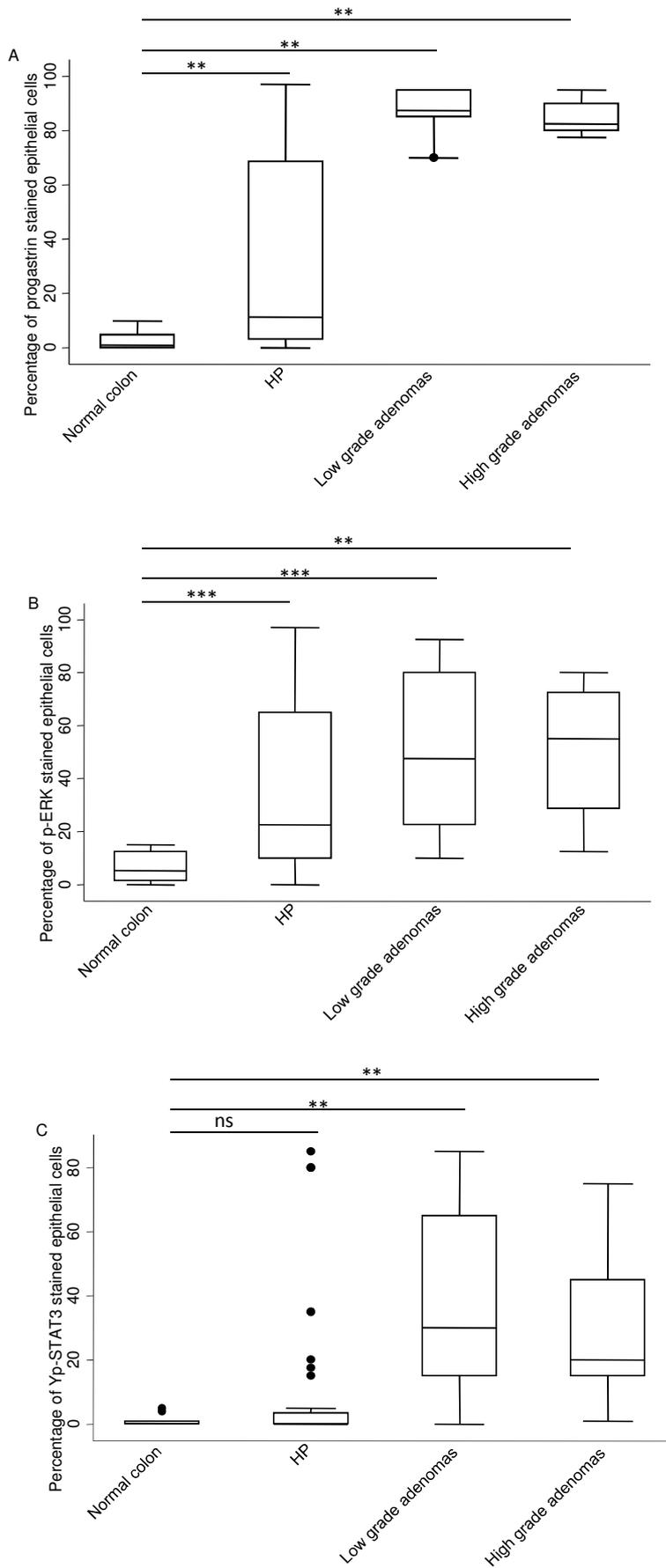


Figure 3: Percentage of progastrin (A), p-ERK (B), and pY-STAT3(C) positive cells by IHC for normal colon, HP, low grade dysplasia tubular adenoma (TA), high grade dysplasia TA.

For each, factor, Wilcoxon tests were performed to compare the percentage of positive cells in the different tumours to the percentage in normal colon. Ns: non significant, * $0.05 < p \leq 0.01$, ** $0.01 < p \leq 0.001$, *** $p < 0.0001$.

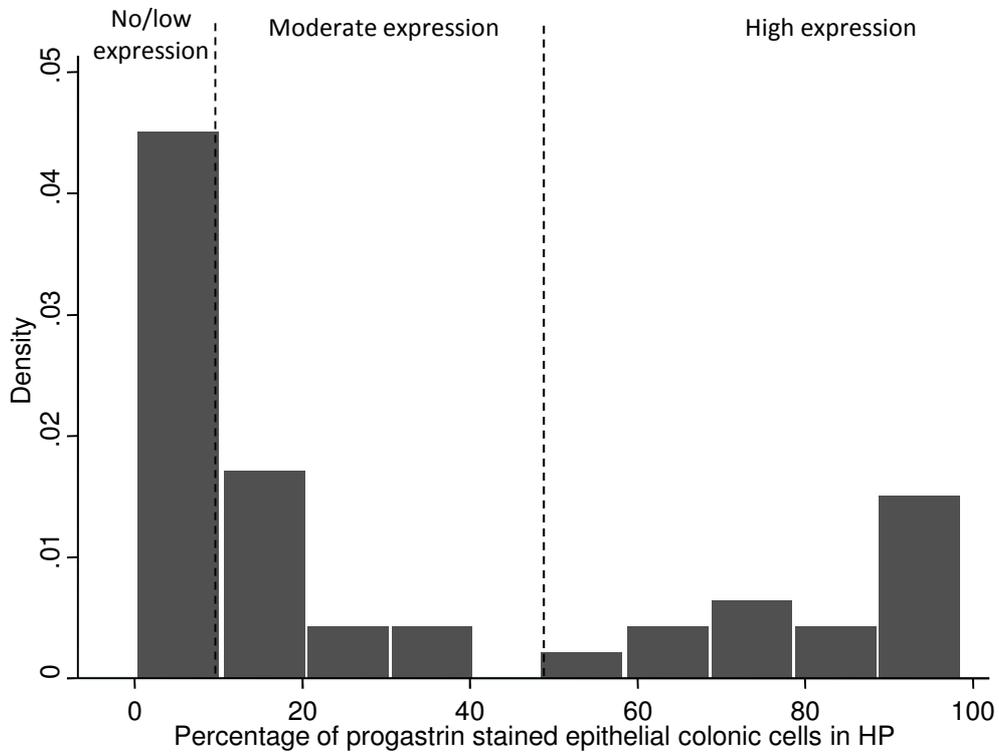


Figure 4. Distribution of percentage of progastrin stained epithelial cells in HP. Negative or low progastrin expression was determined using the 95th percentile of percentage of stained cells in normal colonic tissue (<10%). Among HP overexpressing the prohormone ($\geq 10\%$), moderate expression (10%-50%) and high expression (≥ 50) was distinguished accordingly to the bimodal distribution of progastrin expression.

REFERENCES

1. Imperiale, T.F., et al., *Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings*. N Engl J Med, 2000. **343**(3): p. 169-74.
2. Lieberman, D.A., et al., *Risk factors for advanced colonic neoplasia and hyperplastic polyps in asymptomatic individuals*. JAMA, 2003. **290**(22): p. 2959-67.
3. HAS, *Endoscopie digestive basse: indications en dehors du dépistage en population*. Haute Autorité de Santé, 2004.
4. Winawer, S.J., et al., *Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society*. Gastroenterology, 2006. **130**(6): p. 1872-85.
5. Martinez, M.E., et al., *A case-control study of dietary intake and other lifestyle risk factors for hyperplastic polyps*. Gastroenterology, 1997. **113**(2): p. 423-9.
6. Morimoto, L.M., et al., *Risk factors for hyperplastic and adenomatous polyps: evidence for malignant potential?* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002. **11**(10 Pt 1): p. 1012-8.
7. Chan, T.L., et al., *BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas*. Cancer Res, 2003. **63**(16): p. 4878-81.
8. O'Brien, M.J., et al., *Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points*. Am J Surg Pathol, 2006. **30**(12): p. 1491-501.
9. Huang, C.S., et al., *Hyperplastic polyps, serrated adenomas, and the serrated polyp neoplasia pathway*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(11): p. 2242-55.
10. O'Brien, M.J., et al., *Hyperplastic (serrated) polyps of the colorectum: relationship of CpG island methylator phenotype and K-ras mutation to location and histologic subtype*. Am J Surg Pathol, 2004. **28**(4): p. 423-34.
11. Snover, D.C., *Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma*. Hum Pathol, 2011. **42**(1): p. 1-10.
12. Boparai, K.S., et al., *A Serrated Colorectal Cancer Pathway Predominates over the Classic WNT Pathway in Patients with Hyperplastic Polyposis Syndrome*. Am J Pathol, 2011. **178**(6): p. 2700-7.
13. Jass, J.R., et al., *Emerging concepts in colorectal neoplasia*. Gastroenterology, 2002. **123**(3): p. 862-76.
14. Singh, P., et al., *Incomplete processing of progastrin expressed by human colon cancer cells: role of noncarboxyamided gastrins*. Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 1): p. G459-68.
15. Van Solinge, W.W., et al., *Expression but incomplete maturation of progastrin in colorectal carcinomas*. Gastroenterology, 1993. **104**(4): p. 1099-107.
16. Nemeth, J., et al., *Identification of progastrin derived peptides in colorectal carcinoma extracts*. Gut, 1993. **34**(1): p. 90-5.
17. Smith, A.M. and S.A. Watson, *Gastrin and gastrin receptor activation: an early event in the adenoma-carcinoma sequence*. Gut, 2000. **47**(6): p. 820-4.
18. Siddheshwar, R.K., J.C. Gray, and S.B. Kelly, *Plasma levels of progastrin but not amidated gastrin or glycine extended gastrin are elevated in patients with colorectal carcinoma*. Gut, 2001. **48**(1): p. 47-52.
19. Baldwin, G.S., et al., *Biologically active recombinant human progastrin(6-80) contains a tightly bound calcium ion*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7791-6.
20. Brown, D., et al., *pp60c-Src Kinase mediates growth effects of the full-length precursor progastrin1-80 peptide on rat intestinal epithelial cells, in vitro*. Endocrinology, 2003. **144**(1): p. 201-11.
21. Singh, P., et al., *Progastrin1-80 stimulates growth of intestinal epithelial cells in vitro via high-affinity binding sites*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **284**(2): p. G328-39.
22. Pannequin, J., et al., *Beta-catenin/Tcf-4 inhibition after progastrin targeting reduces growth and drives differentiation of intestinal tumors*. Gastroenterology, 2007. **133**(5): p. 1554-68.

23. Ferrand, A., et al., *Expression of gastrin precursors by CD133-positive colorectal cancer cells is crucial for tumour growth*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(3): p. 477-88.
24. Wang, T.C., et al., *Processing and proliferative effects of human progastrin in transgenic mice*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(8): p. 1918-29.
25. Hollande, F., et al., *Adherens junctions and tight junctions are regulated via different pathways by progastrin in epithelial cells*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 7): p. 1187-97.
26. Umar, S., et al., *Activation of NF-kappaB is required for mediating proliferative and antiapoptotic effects of progastrin on proximal colonic crypts of mice, in vivo*. *Oncogene*, 2008. **27**(42): p. 5599-611.
27. Umar, S., et al., *Functional cross-talk between beta-catenin and NFkappaB signaling pathways in colonic crypts of mice in response to progastrin*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(33): p. 22274-84.
28. Ferrand, A., et al., *Signaling pathways associated with colonic mucosa hyperproliferation in mice overexpressing gastrin precursors*. *Cancer Res*, 2005. **65**(7): p. 2770-7.
29. Fu, X., et al., *Hypermethylation of APC promoter 1A is associated with moderate activation of Wnt signalling pathway in a subset of colorectal serrated adenomas*. *Histopathology*, 2009. **55**(5): p. 554-63.
30. Wu, J.M., E.A. Montgomery, and C.A. Iacobuzio-Donahue, *Frequent beta-catenin nuclear labeling in sessile serrated polyps of the colorectum with neoplastic potential*. *Am J Clin Pathol*, 2008. **129**(3): p. 416-23.
31. Fogt, F., et al., *Genetic alterations in serrated adenomas: comparison to conventional adenomas and hyperplastic polyps*. *Hum Pathol*, 2002. **33**(1): p. 87-91.
32. Hoshino, R., et al., *Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors*. *Oncogene*, 1999. **18**(3): p. 813-22.
33. Lee, S.H., et al., *Colorectal tumors frequently express phosphorylated mitogen-activated protein kinase*. *APMIS*, 2004. **112**(4-5): p. 233-8.
34. Ruzzo, A., et al., *Molecular predictors of efficacy to anti-EGFR agents in colorectal cancer patients*. *Curr Cancer Drug Targets*. **10**(1): p. 68-79.
35. Bromberg, J.F., et al., *Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(5): p. 2553-8.
36. Bromberg, J.F., et al., *Stat3 as an oncogene*. *Cell*, 1999. **98**(3): p. 295-303.
37. Turkson, J., et al., *Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(11): p. 7519-28.
38. Ma, X.T., et al., *Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma*. *World J Gastroenterol*, 2004. **10**(11): p. 1569-73.
39. Corvinus, F.M., et al., *Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth*. *Neoplasia*, 2005. **7**(6): p. 545-55.
40. Kusaba, T., et al., *Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer*. *Oncol Rep*, 2006. **15**(6): p. 1445-51.
41. Kusaba, T., et al., *Expression of p-STAT3 in human colorectal adenocarcinoma and adenoma; correlation with clinicopathological factors*. *J Clin Pathol*, 2005. **58**(8): p. 833-8.
42. Torlakovic, E., et al., *Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps*. *Am J Surg Pathol*, 2003. **27**(1): p. 65-81.
43. Torlakovic, E. and D.C. Snover, *Serrated adenomatous polyposis in humans*. *Gastroenterology*, 1996. **110**(3): p. 748-55.
44. Lin, L.I., *A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility*. *Biometrics*, 1989. **45**(1): p. 255-68.
45. Binquet, C., et al., *[Major statistical software usable in epidemiology]*. *Rev Epidemiol Sante Publique*, 1998. **46**(4): p. 329-36.

46. Brunet, A., G. Pages, and J. Pouyssegur, *Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts*. *Oncogene*, 1994. **9**(11): p. 3379-87.
47. Cowley, S., et al., *Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells*. *Cell*, 1994. **77**(6): p. 841-52.
48. Mansour, S.J., et al., *Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase*. *Science*, 1994. **265**(5174): p. 966-70.
49. Roy, H.K., et al., *AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(1): p. 201-5.
50. Iino, H., et al., *DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer?* *J Clin Pathol*, 1999. **52**(1): p. 5-9.
51. Croizet, O., et al., *Follow-up of patients with hyperplastic polyps of the large bowel*. *Gastrointest Endosc*, 1997. **46**(2): p. 119-23.
52. Huang, E.H., et al., *Increased incidence of colorectal adenomas in follow-up evaluation of patients with newly diagnosed hyperplastic polyps*. *Surg Endosc*, 2001. **15**(7): p. 646-8.

CONCLUSION ET DISCUSSION

La place des polypes hyperplasiques dans la carcinogénèse colique est encore mal élucidée. Bien que plusieurs études aient suggéré que ces lésions pouvaient posséder un potentiel malin, elles sont encore considérées comme bénignes. Ainsi, selon les recommandations nationales, un patient ayant présenté un polype hyperplasique ne reçoit aucune prise en charge particulière. En d'autres termes, le risque de développer des lésions néoplasiques chez ces patients est considéré comme identique à celui de la population générale. En effet, les études ayant tenté d'associer un antécédent de polype hyperplasique à un risque augmenté de lésions néoplasiques coliques métachrones sont contradictoires (Rex, Cummings et al. 1996; Croizet, Moreau et al. 1997; Huang, Whelan et al. 2001). Ces différences de résultats peuvent s'expliquer en partie par l'hétérogénéité histologique mais aussi moléculaire de ces lésions. Par ailleurs, compte tenu de la prévalence estimée des polypes hyperplasiques, de l'ordre de 10% de la population générale occidentale, la majorité de ces lésions semblent évoluer lentement avant d'atteindre un stade suffisamment avancé pour être symptomatique ou modifier le pronostic vital des patients porteurs de polypes hyperplasiques typiques isolés. Ainsi, à l'heure actuelle, en termes de balance bénéfique/risque et de santé publique, le suivi coloscopique de ces patients semblent inapproprié, en l'absence de marqueur histo-clinique ou moléculaire prédictif associé à une évolution maligne.

Au cours de ce travail, une surexpression de la progastrine a été mise en évidence, pour la première fois, dans certains polypes hyperplasiques. Nous avons démontré que cette expression est associée à un risque augmenté de survenue d'adénomes métachrones de même localisation que le polype initial et à une réduction de la survie sans néoplasme. Parmi les lésions néoplasiques survenues au cours du suivi, aucune lésion festonnée n'a été observée, alors que certains auteurs suggèrent l'existence d'une séquence tumorale, polype hyperplasique → adénome festonné sessile → adénocarcinome festonné. Ce type de tumeurs étant plus rare, la taille de notre échantillon pourrait, en partie, expliquer ce résultat. Par ailleurs, l'association entre polype hyperplasique et adénome traditionnel a également été décrite (Croizet, Moreau et al. 1997; Imperiale, Wagner et al. 2000; Huang, Whelan et al. 2001) et plusieurs éléments suggèrent que les polypes hyperplasiques pourraient être impliqués dans la voie de carcinogénèse traditionnelle. En effet, l'observation de polypes mixtes hyperplasiques et adénomateux suggère un continuum lésionnel entre les polypes

hyperplasiques et les adénomes traditionnels (Iino, Jass et al. 1999). De plus, les patients présentant une polypose hyperplasique développent à la fois des adénomes festonnés et des adénomes traditionnels (Boparai, Dekker et al. 2011).

Dans la deuxième partie de ce travail, l'expression d'autres facteurs pro-oncogéniques, pY-STAT3 et p-ERK1/2, également impliqués dans la carcinogénèse colique a été mise en évidence dans certains polypes hyperplasiques. Ces facteurs sont régulés par la progastrine (Ferrand, Bertrand et al. 2005). Dans notre échantillon de polypes hyperplasiques, l'expression de la progastrine et de p-ERK1/2 étaient corrélées. La distribution du pourcentage de cellules marquant ces différents facteurs était toutefois assez dispersée et étendue au sein de notre échantillon. Par ailleurs, ces lésions présentaient une expression des différents facteurs, intermédiaire entre le colon normal et les lésions néoplasiques. Ainsi, certains polypes hyperplasiques présentaient un profil proche du colon normal (sans ou avec une faible expression) et d'autres un profil plus comparable à celui des adénomes ou adénocarcinomes colorectaux. Ces résultats confirment l'hétérogénéité des polypes hyperplasiques d'un point de vue moléculaire. Il est intéressant de noter que ces différents profils d'expression ne se traduisaient pas par un phénotype histologique particulier (microvésiculaire ou riche en cellules caliciformes).

L'ensemble de nos résultats suggèrent qu'une sous-population de polypes hyperplasiques pourrait être des lésions préneoplasiques impliquées également dans la voie de carcinogénèse classique. Jusqu'à présent, l'absence de marqueur histomorphologique ou moléculaire permettant d'identifier les HP à risque d'évolution maligne ne permettait pas d'envisager un suivi autre que clinique des patients porteurs de HP. Nous montrons ici que l'analyse d'expression de certains facteurs pro-oncogéniques, comme la progastrine et/ou p-ERK1/2 pourraient aider à mieux identifier les polypes à risque d'évolution maligne et donc adapter le suivi des patients.

Ces résultats nécessitent, toutefois, une validation complémentaire. En effet, notre échantillon était relativement réduit. Afin d'avoir un suivi suffisant, d'une dizaine d'années, nous n'avons étudié que les polypes diagnostiqués en 2000 et 2001. Les patients diagnostiqués avant 2000 n'ont pas été inclus, d'une part en raison de la moindre robustesse de leur données cliniques (récupération des antécédents et du suivi, définition histologique des lésions différentes, en particulier, pas de distinction entre les adénomes sessiles festonnées et

les polypes hyperplasiques) et des différences de fixateurs employés avant 2000 pouvant modifier le marquage des facteurs étudiés.

D'autre part, afin d'éliminer les principaux facteurs de confusion, les patients présentant des antécédents personnels ou familiaux de tumeurs colorectales, des antécédents personnels de pathologies inflammatoires chroniques ou des lésions néoplasiques synchrones ont également été exclus. De plus, afin d'étudier la survenue d'événements néoplasiques après un polype hyperplasique initial, nous avons inclus dans notre étude uniquement les patients ayant fait l'objet d'un suivi coloscopique, les formes asymptomatiques de lésions tumorales pouvant induire un biais de classement. Ce dernier critère d'inclusion explique en grande partie le faible nombre de sujets inclus dans notre étude, compte tenu des recommandations actuelles qui ne conseillent pas de suivi des patients porteurs de polypes hyperplasiques typiques. De plus, afin de vérifier que notre échantillon restait représentatif de la population cible de l'étude, malgré l'exclusion des patients avec un suivi clinique simple, nous avons comparé les données cliniques et immunohistologiques des patients exclus à notre échantillon d'étude. Aucune différence significative entre les deux groupes n'a été mise en évidence. Ce critère d'inclusion n'aurait donc pas induit de biais de sélection.

Au total, seuls 10% des polypes hyperplasiques diagnostiqués dans le service d'anatomopathologie de Ranguel ont été inclus après lecture des dossiers médicaux des patients. Malgré cet échantillon réduit, mais *a priori* non biaisé, une association significative entre l'expression de la progastrine dans les polypes hyperplasiques et la survenue de lésions néoplasiques a pu être mise en évidence. Une étude à plus grande échelle et multicentrique (en raison du faible nombre de patients recevant un suivi coloscopique, non recommandé) permettrait de confirmer ces résultats et d'estimer de façon plus précise la force de cette association (avec des intervalles de confiance plus réduits).

Dans notre étude, nous avons observé 41% d'adénomes tubulo-villeux au cours du suivi des patients porteurs de polypes hyperplasiques. Cependant, aucun adénocarcinome colorectal n'a été détecté chez ces patients. Cela peut s'expliquer par leur suivi coloscopique ayant permis la détection et l'exérèse précoce des adénomes. En effet, il a été démontré que la prise en charge précoce de ces lésions préneoplasiques permettait de réduire le risque de développer un cancer colorectal (Muller and Sonnenberg 1995; Citarda, Tomaselli et al. 2001).

Notre étude était basée sur une cohorte historique de patients. Bien que l'analyse des données soit longitudinale, leur recueil était rétrospectif et pose les problèmes liés à ce genre de schéma d'étude (données manquantes, fiabilité des données recueillies pouvant induire de multiples biais). Nos résultats donnent cependant des éléments permettant d'envisager une

étude prospective, à niveau de preuve plus élevé mais imposant un suivi coloscopique non recommandé à l'heure actuelle. Ainsi, en identifiant un sous groupe plus à risque (polypes hyperplasiques surexprimant la progastine) notre travail permet de réévaluer la balance bénéfique/risque liée à ce suivi invasif et de proposer une étude, qui deviendrait éthiquement envisageable. Une telle étude permettrait de valider l'utilisation de la progastine comme marqueur prédictif d'évolution néoplasique des polypes hyperplasiques.

Une autre perspective à ce travail serait de mettre en relation l'expression de la progastine et des ERKs 1/2 au profil KRAS et BRAF des polypes hyperplasiques afin de mieux comprendre la corrélation observée entre ces deux facteurs. Des mutations sur ces 2 gènes codant pour des kinases en amont de la voie ERKs sont fréquentes dans les polypes hyperplasiques. Cependant, aucune étude n'a relié la présence de ces mutations à une activation des ERKs dans les polypes hyperplasiques. De plus, les souris transgéniques KRAS mutées présentent des phénotypes variables en fonction de la mutation, et des terrains génétiques, allant de l'absence de survenue de lésions néoplasiques sans activation des ERKs à la survenue d'adénomes ou d'adénocarcinomes colorectaux avec activation des ERKs (Kim, Roth et al. 1993; Coopersmith, Chandrasekaran et al. 1997; Janssen, el-Marjou et al. 2002; Guerra, Mijimolle et al. 2003; Tuveson, Shaw et al. 2004; Sansom, Meniel et al. 2006; Haigis, Kendall et al. 2008). Ainsi, les conséquences d'une mutation de KRAS pourraient être modulées par des signaux extracellulaires et l'activation d'autres voies. Les interactions entre les différentes voies de signalisation sont rarement linéaires et unidirectionnelles, ainsi alors que la progastine est connue pour activer les ERKs (Ferrand, Bertrand et al. 2005; Umar, Sarkar et al. 2008), il a également été montré que Kras pouvait réguler l'expression du gène de la progastine par une voie ERK dépendante (Nakata, Wang et al. 1998). L'interprétation de la corrélation observée entre progastine et p-ERK1/2 dans les polypes hyperplasiques nécessiterait la caractérisation de leur profil KRAS et BRAF. Dans une vision plus large, déterminer le rôle de la progastine dans la voie RAS/RAF/MER/ERKs serait également particulièrement intéressante, dans le cadre des thérapies anti-EGFR. En effet, tout comme la présence de mutation KRAS ou BRAF constitutive a été associée à une efficacité moindre de cette thérapeutique, une activation des effecteurs de cette voie, en aval de Ras/Raf pourraient également modifier ses effets antitumoraux.

En conclusion, en l'absence de modèles expérimentaux disponibles, la détermination de la place des polypes hyperplasiques dans les différentes voies moléculaires de la carcinogénèse colique repose sur des études sur tissus humains permettant seulement

d'étudier des associations statistiques indirectes. Ainsi, l'hypothèse de l'existence d'une sous-population de polypes hyperplasiques à risque d'évolution maligne ne pourra être confirmée que par un faisceau d'arguments, auquel les résultats de ce travail participent. Par ailleurs sur la base du test prédictif reposant sur la progastrine et l'âge, il permet de proposer aux patients porteurs de ces lésions, un suivi optimal prenant en compte leur risque de développer des lésions néoplasiques métachrones. Un brevet vient d'être déposé sur ce concept.

ANNEXES :

**ARTICLES EN
COLLABORATION**

A gastrin precursor, gastrin-gly, upregulates VEGF expression in colonic epithelial cells through an HIF-1-independent mechanism

Claudine Bertrand¹, Aline Kowalski-Chauvel¹, Catherine Do¹, Cécile Résa¹, Souad Najib¹, Laurence Daulhac², Timothy C. Wang³, Audrey Ferrand¹ and Catherine Seva¹

¹Cancer Department, INSERM U.858, (I2MR) Institute of Molecular Medicine, Toulouse Cedex 4, France

²Laboratoire de Pharmacologie, INSERM U.766, Université Clermont 1, Faculté de Pharmacie, Clermont-Ferrand, France

³Department of Medicine, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY

One of the major angiogenic factor released by tumor cells is VEGF. Its high expression is correlated with poor prognosis in colorectal tumors. In colon cancer, gastrin gene expression is also upregulated. In these tumors, gastrin precursors are mainly produced and act as growth factors. Recently, a study has also shown that the gastrin precursor, G-gly induced *in vitro* tubules formation by vascular endothelial cells suggesting a potential proangiogenic role. Here, we demonstrate that stimulation of human colorectal cancer cell lines with G-gly increases the expression of the proangiogenic factor VEGF at the mRNA and protein levels. In addition, blocking the progastrin autocrine loop leads to a downregulation of VEGF. Although HIF-1 is a major transcriptional activator for VEGF our results suggest an alternative mechanism for VEGF regulation in normoxic conditions, independent of HIF-1 that involves the PI3K/AKT pathway. Indeed we show that G-gly does not lead to HIF-1 accumulation in colon cancer cells. Moreover, we found that G-gly activates the PI3K/AKT pathway and inhibition of this pathway reverses the effects of G-gly observed on VEGF mRNA and protein levels. In correlation with these results, we observed *in vivo*, on colon tissue sections from transgenic mice overexpressing G-gly, an increase in VEGF expression in absence of HIF-1 accumulation. In conclusion, our study demonstrates that gastrin precursors, known to promote colon epithelial cells proliferation and survival can also contribute to the angiogenesis process by stimulating the expression of the proangiogenic factor VEGF *via* the PI3K pathway and independently of hypoxia conditions.

Angiogenesis is essential for tumor growth and metastasis. It is initiated by tumor cells releasing angiogenic factors that induce growth of new blood vessels. Indeed recruitment of new blood vessels by the tumor provides nutrients and oxygen and facilitates dissemination of cancer cells that will give rise to metastasis. This complex process involves basement membrane degradation, endothelial cell migration, proliferation and tubule formation. One of the major angiogenic factor released by tumor cell is VEGF. Its high expression levels have been correlated with poor prognosis in colorectal tumors.¹

Colorectal cancer (CRC) remains the second most common cause of cancer-related death worldwide. Once metastasis has occurred in CRC, a complete cure of the cancer is unlikely. In

patients with advanced colon cancer, wherein the tumor has penetrated beyond the bowel wall and there is evidence of metastasis to distant organs, the 5-year survival rate is less than 10%. As a consequence, it is important to identify the factors involved in the development, the survival but also the spreading of colon cancer cells toward the body through the blood vessels.

The hormone gastrin (Gamide) is known as a potent stimulant of gastric acid secretion.² In gastrointestinal cancers and more particularly in colon cancer, gastrin gene expression is upregulated. Indeed this gene is a target of oncogenic pathways frequently activated in these cancers such as APC/beta-catenin or Ras pathways.³⁻⁵ However, in these tumors, gastrin is incompletely matured and gastrin precursors, such as G-gly, are mainly produced. High concentrations of gastrin precursors, including G-Gly, have been observed in colon tumors and in blood of patients with colorectal cancer. These precursors represent 90 to 100% of the gastrin peptides produced by colon tumor while they are absent from healthy tissue.⁶ Interestingly, the resection of the colorectal tumor induces a decrease in the concentration of the precursors in the blood suggesting that the tumor is the source of the peptides. In addition, clinical studies have reported that hypergastrinemia is associated with an increased risk of colorectal cancer.

G-gly has been reported to promote the proliferation of human gastrointestinal tumor cells.⁷⁻¹⁰ The trophic effects of

Key words: colon cancer, gastrin, intracellular signaling, VEGF

DOI: 10.1002/ijc.25001

History: Received 28 Apr 2009; Accepted 15 Oct 2009; Online 28 Oct 2009

Claudine Bertrand and Aline Kowalski-Chauvel contributed equally to this work.

Correspondence to: Catherine Seva, Cancer Department, INSERM U.858, (I2MR) Institut de Medecine Moleculaire de Rangueil, 1 avenue J. Poulhes, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France, Tel.: 33-5-61-32-24-08, Fax: 33-5-61-32-24-03, E-mail: Cathy.seva@inserm.fr

ORIGINAL ARTICLE

A ‘DNA replication’ signature of progression and negative outcome in colorectal cancer

M-J Pillaire^{1,7}, J Selves^{2,7}, K Gordien², P-A Gouraud³, C Gentil³, M Danjoux², C Do³, V Negre⁴, A Bieth¹, R Guimbaud², D Trouche⁵, P Pasero⁶, M Méchali⁶, J-S Hoffmann¹ and C Cazaux¹

¹Genetic Instability and Cancer Group, Department Biology of Cancer, Institute of Pharmacology and Structural Biology, UMR5089 CNRS, University of Toulouse, University Paul Sabatier, Toulouse, France; ²INSERM U563, Federation of Digestive Cancerology and Department of Anatomic-pathology, University of Toulouse, University Paul Sabatier, Toulouse, France; ³Service of Epidemiology, INSERM U558, Faculty of Medicine, University of Toulouse, University Paul Sabatier, Allées Jules Guesde, Toulouse, France; ⁴aCGH GSO Canceropole Platform, INSERM U868, Val d'Aurelle, Montpellier, France; ⁵Laboratory of Cellular and Molecular Biology of Cell Proliferation Control, UMR 5099 CNRS, University of Toulouse, University Paul Sabatier, Toulouse, France and ⁶Institute of Human Genetics UPR1142 CNRS, Montpellier, France

Colorectal cancer is one of the most frequent cancers worldwide. As the tumor-node-metastasis (TNM) staging classification does not allow to predict the survival of patients in many cases, additional prognostic factors are needed to better forecast their outcome. Genes involved in DNA replication may represent an underexplored source of such prognostic markers. Indeed, accidents during DNA replication can trigger ‘replicative stress’, one of the main features of cancer from earlier stages onward. In this study, we assessed the expression of 47 ‘DNA replication’ genes in primary tumors and adjacent normal tissues from a homogeneous series of 74 patients. We found that genes coding for translesional (TLS) DNA polymerases, initiation of DNA replication, S-phase signaling and protection of replication forks were significantly deregulated in tumors. We also observed that the overexpression of either the MCM7 helicase or the TLS DNA polymerase POLQ (if also associated with a concomitant overexpression of firing genes) was significantly related to poor patient survival. Our data suggest the existence of a ‘DNA replication signature’ that might represent a source of new prognostic markers. Such a signature could help in understanding the molecular mechanisms underlying tumor progression in colorectal cancer patients.

Oncogene (2010) 29, 876–887; doi:10.1038/nc.2009.378; published online 9 November 2009

Keywords: DNA replication; S-phase checkpoint; colorectal cancer; genetic instability; prognosis markers

Introduction

DNA replication in normal cells is regulated by an ‘origin licensing’ mechanism that ensures that it occurs just once per cycle. Once cells enter the S-phase, the stability of DNA replication forks must be preserved to avoid susceptibility to DNA lesions or non-B DNA conformation. The requirement of faithful genome duplication in dividing cells makes DNA replication an important factor in cancer by limiting cancer risk through preservation of genome integrity (Kunkel, 2003; Hanawalt, 2007). Owing to this cardinal importance of DNA replication in cancer, many anticancer drugs target various aspects of DNA replication.

The key role of DNA replication in tumor proliferation is illustrated by many observations. Indeed, hereditary forms of colon, breast, ovary and skin cancers can be caused by mutations in DNA replication genes, such as translesion synthesis (for example, *POLH*), intra-S-phase signaling (for example, *BRCA1/2*) or mismatch repair genes (for example, *hMLH1*) (Sancar, 1994; Marra and Boland, 1995; Bertwistle and Ashworth, 1998; Masutani *et al.*, 1999). In somatic cancers, such early mutations probably become ‘diluted’ during the progression of the disease, making the relationship less obvious. However, many studies show that an alteration of genes involved in genome replication or supervision promotes or favors ‘acquired’ cancers (for reviews, see Kunkel, 2003; Mitchell *et al.*, 2003). In mice, perturbation of the catalytic activity of the replicative DNA polymerase δ increases genomic instability and accelerates tumorigenesis (Venkatesan *et al.*, 2007). In addition, mouse fibroblasts expressing variable levels of MCM proteins, which are involved in DNA replication firing, or of the MCM loader Cdt1 show numerous chromosomal abnormalities and form tumors in nude mice (Arentson *et al.*, 2002; Honeycutt *et al.*, 2006).

Colorectal cancer is one of the most frequent cancers worldwide, with genetic instability having a driving role in this neoplasia. To clarify the importance of DNA replication in colorectal adenocarcinomas, we analysed the variation of expression of 47 DNA replication genes

Correspondence: Professor C Cazaux, Institute of Pharmacology and Structural Biology, IPBS UMR5089, CNRS University of Toulouse, University Paul Sabatier, 205 route de Narbonne, Toulouse, cedex 4, Midi Pyrenees 31300, France.

E-mail: cazaux@ipbs.fr

C Cazaux and JS Hoffmann share the leadership of the Genetic Instability and Cancer Group.

⁷These authors have equally contributed.

Received 20 August 2008; revised 15 July 2009; accepted 5 October 2009; published online 9 November 2009

Anaplastic Lymphoma Kinase–Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Rare Clinicopathologic Entity With Poor Prognosis

Camille Laurent, Catherine Do, Randy D. Gascoyne, Laurence Lamant, Loïc Ysebaert, Guy Laurent, Georges Delsol, and Pierre Brousset

From L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U.563, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan; Université Paul-Sabatier; Service d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Toulouse, France; Laboratoire d'Anatomie Pathologique, and British Columbia Cancer Agency, Vancouver, British Columbia, Canada.

Submitted December 11, 2008; accepted March 11, 2009; published online ahead of print at www.jco.org on July 27, 2009.

G.D. and P.B. share senior authorship of this article.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest and author contributions are found at the end of this article.

Corresponding author: Pierre Brousset, MD, PhD, Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, place Baylac, Toulouse, F-31300 France; e-mail: brousset.p@chu-toulouse.fr.

The Acknowledgment is included in the full-text version of this article, available online at www.jco.org. It is not included in the PDF version (via Adobe® Reader®).

© 2009 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/09/2725-4211/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2008.21.5020

A B S T R A C T

Purpose

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) –positive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a rare variant of DLBCL that has been described only in small case reports. To shed more light on the clinical and pathologic features and outcome of these tumors, we reviewed data from 38 patients.

Patients and Methods

We retrospectively analyzed 38 patients with ALK-positive DLBCL treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone (CHOP) or CHOP-like regimens from different institutions to better define the presenting features, clinical course, and response to treatment.

Results

The histologic findings in all patients were similar. All patients expressed ALK fusion proteins, but virtually all were CD30 and CD20 negative. The median age was 43 years with a 5:1 ratio of males to females. Most patients (60%) followed an aggressive clinical course with advanced stage at diagnosis, frequent marrow infiltration, and poor outcome. Overall survival was 20.3 months (95% CI, 12.2 to 42.6 months). Of note, the median survival was only 12.2 months (95% CI, 9.1 to 32.5 months) in patients with advanced-stage disease.

Conclusion

ALK-positive DLBCLs display clinicopathologic features that distinguish them from common DLBCL. Conventional therapy, as used for typical DLBCL, is of limited efficacy. Recognition of this new entity and the characteristic lack of CD20 expression are paramount. Novel front-line intensive chemotherapy regimens should be evaluated in this group of patients.

J Clin Oncol 27:4211-4216. © 2009 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

In 1997 we described a distinct type of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) expressing the anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein which, at that time, was thought to be restricted to T-null anaplastic large-cell lymphoma (ALCL) associated with t(2;5)(p23;q35) and variants.¹⁻³ Characteristically, this lymphoma showed a sinusoidal growth pattern and was composed of a monomorphic population of large immunoblast-like cells sometimes with plasmablastic features. This tumor superficially resembled ALCL but lacked expression of the CD30 antigen. Similar to ALCL, tumor cells expressed the epithelial membrane antigen (EMA) did not express mature B-cell antigens; cells did contain single light-chain cytoplasmic immunoglobulin A (IgA) and were also positive for plasma cell antigens such as CD138. Interestingly, lymphoma cells were strongly positive for ALK protein with a restricted cytoplas-

mic staining pattern. In 2003, Gascoyne et al⁴ and De Paeppe et al⁵ reported six and three patients, respectively, who had ALK-positive DLBCL with similar morphologic features and a restricted granular cytoplasmic ALK staining pattern. These reports clearly demonstrated that ALK-positive DLBCL harbors t(2;17)(p23;q23) fusing the clathrin heavy-chain gene (*CLTC*) at chromosome 17q23 to the *ALK* gene at chromosome 2p23, creating a fusion gene *CLTC-ALK*. Onciu et al⁶ and Adam et al⁷ reported, respectively, two patient cases and one patient case of ALK-positive DLBCL associated with t(2;5)(p23;q35) and expressing the NPM-ALK fusion protein as seen in T-null ALCL.

On the basis of the small number of reported patient cases, most associated with *CLTC-ALK* gene rearrangement,⁸⁻¹³ ALK-positive DLBCL appears to be an infrequent lymphoma subgroup with less than 40 total patient cases reported to date. In this study, we reviewed 38 patient cases from

blood

Prepublished online August 19, 2011;
doi:10.1182/blood-2011-04-345777

Distribution, function and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue imaging study

Camille Laurent, Sabina Müller, Catherine Do, Talal Al-Saati, Sophie Allart, Luigi Maria Larocca, Stefan Hohaus, Sophie Duchez, Anne Quillet-Mary, Guy Laurent, Pierre Brousset and Salvatore Valitutti

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Advance online articles have been peer reviewed and accepted for publication but have not yet appeared in the paper journal (edited, typeset versions may be posted when available prior to final publication). Advance online articles are citable and establish publication priority; they are indexed by PubMed from initial publication. Citations to Advance online articles must include the digital object identifier (DOIs) and date of initial publication.

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.
[Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.](#)



C. LAURENT *et al.*

CTL IN FOLLICULAR LYMPHOMA

Regular Article

IMMUNOBIOLOGY

Distribution, function and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue imaging study

Authors: Camille Laurent,^{1,2,3} Sabina Müller,^{1,2} Catherine Do,⁴ Talal Al-Saati,⁵ Sophie Allart,⁶ Luigi Maria Larocca,⁷ Stefan Hohaus,⁸ Sophie Duchez,^{1, 2} Anne Quillet-Mary,^{2,9} Guy Laurent,^{2,9,10} Pierre Brousset,^{2,3} Salvatore Valitutti^{1,2}

Addresses: ¹INSERM, U1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Section Dynamique Moléculaire des Interactions Lymphocytaires, Toulouse, F-31300 France; ²Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, F-31400 France; ³Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Toulouse, France; ⁴INSERM, U858, Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, F-31400 France; ⁵Plateau technique d'histopathologie expérimentale, CHU Purpan, Toulouse, France; ⁶Plateau technique imagerie cellulaire, CHU Purpan, Toulouse, France; ⁷Istituto di Anatomia Patologica e ⁸Ematologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italy; ⁹INSERM, U1037, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Immunité innée et hémopathies malignes, Toulouse, F-31300 France ; ¹⁰Service d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Toulouse, France.

Keywords: Cytotoxic T lymphocytes, follicular lymphoma, immunological synapse

Correspondence: Salvatore Valitutti (salvatore.valitutti@inserm.fr), INSERM U1043, CHU Purpan, 31059 Toulouse Cedex 3, France, Phone (33) 562 74 83 66 FAX (33) 562 74 45 58;

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alrawi, S. J., M. Schiff, et al. (2006). "Aberrant crypt foci." *Anticancer Res* **26**(1A): 107-19.
- Amos-Landgraf, J. M., L. N. Kwong, et al. (2007). "A target-selected Apc-mutant rat kindred enhances the modeling of familial human colon cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(10): 4036-41.
- Aust, D. E. and G. B. Baretton (2010). "Serrated polyps of the colon and rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas, traditional serrated adenomas, and mixed polyps)-proposal for diagnostic criteria." *Virchows Arch* **457**(3): 291-7.
- Baldwin, G. S., F. Hollande, et al. (2001). "Biologically active recombinant human progastrin(6-80) contains a tightly bound calcium ion." *J Biol Chem* **276**(11): 7791-6.
- Berclaz, G., H. J. Altermatt, et al. (2001). "EGFR dependent expression of STAT3 (but not STAT1) in breast cancer." *Int J Oncol* **19**(6): 1155-60.
- Beresford, S. A., K. C. Johnson, et al. (2006). "Low-fat dietary pattern and risk of colorectal cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial." *JAMA* **295**(6): 643-54.
- Bertrand, C., A. Kowalski-Chauvel, et al. "A gastrin precursor, gastrin-gly, upregulates VEGF expression in colonic epithelial cells through an HIF-1-independent mechanism." *Int J Cancer* **126**(12): 2847-57.
- Bertrand, C., A. Kowalski-Chauvel, et al. (2010). "A gastrin precursor, gastrin-gly, upregulates VEGF expression in colonic epithelial cells through an HIF-1-independent mechanism." *Int J Cancer* **126**(12): 2847-57.
- Binquet, C. (1998). "Major statistical Software usable in epidemiology." *Rev Epidemiol Sante Publique* **46**: 329-36.
- Binquet, C., C. Verret, et al. (1998). "[Major statistical software usable in epidemiology]." *Rev Epidemiol Sante Publique* **46**(4): 329-36.
- Boland, C. R. and A. Goel (2010). "Microsatellite instability in colorectal cancer." *Gastroenterology* **138**(6): 2073-2087 e3.
- Bond, J. H. (2000). "Polyp guideline: diagnosis, treatment, and surveillance for patients with colorectal polyps. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology." *Am J Gastroenterol* **95**(11): 3053-63.
- Boparai, K. S., E. Dekker, et al. (2011). "A Serrated Colorectal Cancer Pathway Predominates over the Classic WNT Pathway in Patients with Hyperplastic Polyposis Syndrome." *Am J Pathol* **178**(6): 2700-7.
- Boparai, K. S., E. Dekker, et al. (2008). "Hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas as a phenotypic expression of MYH-associated polyposis." *Gastroenterology* **135**(6): 2014-8.
- Boparai, K. S., E. M. Mathus-Vliegen, et al. (2010). "Increased colorectal cancer risk during follow-up in patients with hyperplastic polyposis syndrome: a multicentre cohort study." *Gut* **59**(8): 1094-100.
- Boparai, K. S., J. B. Reitsma, et al. (2010). "Increased colorectal cancer risk in first-degree relatives of patients with hyperplastic polyposis syndrome." *Gut* **59**(9): 1222-5.
- Bosman, F. T., C. F., et al. (2010). "WHO Classification of Tumours of the Digestive System." *IARC: Lyon*.
- Botteri, E., S. Iodice, et al. (2008). "Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis." *JAMA* **300**(23): 2765-78.
- Bowman, T., R. Garcia, et al. (2000). "STATs in oncogenesis." *Oncogene* **19**(21): 2474-88.
- Breiman, L. (1998). "Arcing classifiers." *Ann Statist* **26**: 801-824.
- Bromberg, J. F., C. M. Horvath, et al. (1998). "Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src." *Mol Cell Biol* **18**(5): 2553-8.

- Bromberg, J. F., M. H. Wrzeszczynska, et al. (1999). "Stat3 as an oncogene." *Cell* **98**(3): 295-303.
- Brown, D., U. Yallampalli, et al. (2003). "pp60c-Src Kinase mediates growth effects of the full-length precursor progastrin1-80 peptide on rat intestinal epithelial cells, in vitro." *Endocrinology* **144**(1): 201-11.
- Brunet, A., G. Pages, et al. (1994). "Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts." *Oncogene* **9**(11): 3379-87.
- Burke, W. M., X. Jin, et al. (2001). "Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells." *Oncogene* **20**(55): 7925-34.
- Calle, E. E., C. Rodriguez, et al. (2003). "Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults." *N Engl J Med* **348**(17): 1625-38.
- Campbell, S. L., R. Khosravi-Far, et al. (1998). "Increasing complexity of Ras signaling." *Oncogene* **17**(11 Reviews): 1395-413.
- Chakladar, A., A. Dubeykovskiy, et al. (2005). "Synergistic activation of the murine gastrin promoter by oncogenic Ras and beta-catenin involves SMAD recruitment." *Biochem Biophys Res Commun* **336**(1): 190-6.
- Chan, A. O., R. R. Broaddus, et al. (2002). "CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum." *Am J Pathol* **160**(5): 1823-30.
- Chan, T. L., W. Zhao, et al. (2003). "BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas." *Cancer Res* **63**(16): 4878-81.
- Chan, T. O., S. E. Rittenhouse, et al. (1999). "AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation." *Annu Rev Biochem* **68**: 965-1014.
- Chang, D. K., D. Metzgar, et al. (2001). "Microsatellites in the eukaryotic DNA mismatch repair genes as modulators of evolutionary mutation rate." *Genome Res* **11**(7): 1145-6.
- Cheng, L. and M. D. Lai (2003). "Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer." *World J Gastroenterol* **9**(12): 2642-9.
- Cho, E., S. A. Smith-Warner, et al. (2004). "Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies." *Ann Intern Med* **140**(8): 603-13.
- Chung, J., E. Uchida, et al. (1997). "STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation." *Mol Cell Biol* **17**(11): 6508-16.
- Chupreta, S., M. Du, et al. (2000). "EGF stimulates gastrin promoter through activation of Sp1 kinase activity." *Am J Physiol Cell Physiol* **278**(4): C697-708.
- Ciccotosto, G. D., A. McLeish, et al. (1995). "Expression, processing, and secretion of gastrin in patients with colorectal carcinoma." *Gastroenterology* **109**(4): 1142-53.
- Citarda, F., G. Tomaselli, et al. (2001). "Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence." *Gut* **48**(6): 812-5.
- Clark, J. C., Y. Collan, et al. (1985). "Prevalence of polyps in an autopsy series from areas with varying incidence of large-bowel cancer." *Int J Cancer* **36**(2): 179-86.
- Clarke, A. R., M. C. Cummings, et al. (1995). "Interaction between murine germline mutations in p53 and APC predisposes to pancreatic neoplasia but not to increased intestinal malignancy." *Oncogene* **11**(9): 1913-20.
- Cleary, S. P., M. Cotterchio, et al. (2009). "Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: a multisite case-control study." *Gastroenterology* **136**(4): 1251-60.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." *Cell* **127**(3): 469-80.
- Cobb, S., T. Wood, et al. (2004). "Intestinal expression of mutant and wild-type progastrin significantly increases colon carcinogenesis in response to azoxymethane in transgenic mice." *Cancer* **100**(6): 1311-23.
- Colnot, S., M. Niwa-Kawakita, et al. (2004). "Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers." *Lab Invest* **84**(12): 1619-30.

- Coopersmith, C. M., C. Chandrasekaran, et al. (1997). "Bi-transgenic mice reveal that K-rasVal12 augments a p53-independent apoptosis when small intestinal villus enterocytes reenter the cell cycle." *J Cell Biol* **138**(1): 167-79.
- Corvinus, F. M., C. Orth, et al. (2005). "Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth." *Neoplasia* **7**(6): 545-55.
- Cowley, S., H. Paterson, et al. (1994). "Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells." *Cell* **77**(6): 841-52.
- Croizet, O., J. Moreau, et al. (1997). "Follow-up of patients with hyperplastic polyps of the large bowel." *Gastrointest Endosc* **46**(2): 119-23.
- David, M., E. Petricoin, 3rd, et al. (1995). "Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins." *Science* **269**(5231): 1721-3.
- Davis, R. J. (1993). "The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." *J Biol Chem* **268**(20): 14553-6.
- DiSario, J. A., P. G. Foutch, et al. (1991). "Prevalence and malignant potential of colorectal polyps in asymptomatic, average-risk men." *Am J Gastroenterol* **86**(8): 941-5.
- Donehower, L. A., M. Harvey, et al. (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours." *Nature* **356**(6366): 215-21.
- Downward, J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **3**(1): 11-22.
- Dubeykovskiy, A., T. Nguyen, et al. (2008). "Flow cytometric detection of progastrin interaction with gastrointestinal cells." *Regul Pept* **151**(1-3): 106-14.
- Duval, A. and R. Hamelin (2002). "Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability." *Cancer Res* **62**(9): 2447-54.
- East, J. E., B. P. Saunders, et al. (2008). "Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management." *Gastroenterol Clin North Am* **37**(1): 25-46, v.
- Efron, B. (1979). "Bootstrap methods: Another look at the jackknife." *Ann Statist* **7**: 1-26.
- Egashira, Y., T. Yoshida, et al. (2004). "Analysis of pathological risk factors for lymph node metastasis of submucosal invasive colon cancer." *Mod Pathol* **17**(5): 503-11.
- Fearnhead, N. S., J. L. Wilding, et al. (2002). "Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis." *Br Med Bull* **64**: 27-43.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-67.
- Ferlay, J., D. M. Parkin, et al. (2010). "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008." *Eur J Cancer* **46**(4): 765-81.
- Ferlay, J., H. R. Shin, et al. (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." *Int J Cancer* **127**(12): 2893-917.
- Ferrand, A., C. Bertrand, et al. (2005). "Signaling pathways associated with colonic mucosa hyperproliferation in mice overexpressing gastrin precursors." *Cancer Res* **65**(7): 2770-7.
- Ferrand, A., M. S. Sandrin, et al. (2009). "Expression of gastrin precursors by CD133-positive colorectal cancer cells is crucial for tumour growth." *Biochim Biophys Acta* **1793**(3): 477-88.
- Ferrand, A. and T. C. Wang (2006). "Gastrin and cancer: a review." *Cancer Lett* **238**(1): 15-29.
- Fodde, R., W. Edelmann, et al. (1994). "A targeted chain-termination mutation in the mouse Apc gene results in multiple intestinal tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19): 8969-73.
- Fodde, R., J. Kuipers, et al. (2001). "Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability." *Nat Cell Biol* **3**(4): 433-8.
- Fogt, F., T. Brien, et al. (2002). "Genetic alterations in serrated adenomas: comparison to conventional adenomas and hyperplastic polyps." *Hum Pathol* **33**(1): 87-91.
- Ford, D., D. F. Easton, et al. (1994). "Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium." *Lancet* **343**(8899): 692-5.

- Fu, X., J. Li, et al. (2009). "Hypermethylation of APC promoter 1A is associated with moderate activation of Wnt signalling pathway in a subset of colorectal serrated adenomas." *Histopathology* **55**(5): 554-63.
- Gillen, C. D., R. S. Walmsley, et al. (1994). "Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis." *Gut* **35**(11): 1590-2.
- Goldstein, N. S., P. Bhanot, et al. (2003). "Hyperplastic-like colon polyps that preceded microsatellite-unstable adenocarcinomas." *Am J Clin Pathol* **119**(6): 778-96.
- Grabowska, A. M., J. Hughes, et al. (2007). "Use of interfering RNA to investigate the role of endogenous gastrin in the survival of gastrointestinal cancer cells." *Br J Cancer* **96**(3): 464-73.
- Groden, J., A. Thliveris, et al. (1991). "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." *Cell* **66**(3): 589-600.
- Gryfe, R., C. Swallow, et al. (1997). "Molecular biology of colorectal cancer." *Curr Probl Cancer* **21**(5): 233-300.
- Guerra, C., N. Mijimolle, et al. (2003). "Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context." *Cancer Cell* **4**(2): 111-20.
- Haigis, K. M., K. R. Kendall, et al. (2008). "Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon." *Nat Genet* **40**(5): 600-8.
- HAS (2004). "Endoscopie digestive basse: indications en dehors du dépistage en population." *Haute Autorité de Santé*.
- He, T. C., A. B. Sparks, et al. (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." *Science* **281**(5382): 1509-12.
- Hinoi, T., A. Akyol, et al. (2007). "Mouse model of colonic adenoma-carcinoma progression based on somatic Apc inactivation." *Cancer Res* **67**(20): 9721-30.
- Hollande, F., D. J. Lee, et al. (2003). "Adherens junctions and tight junctions are regulated via different pathways by progastrin in epithelial cells." *J Cell Sci* **116**(Pt 7): 1187-97.
- Hoshino, R., Y. Chatani, et al. (1999). "Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors." *Oncogene* **18**(3): 813-22.
- Houlston, R. S. and I. P. Tomlinson (2001). "Polymorphisms and colorectal tumor risk." *Gastroenterology* **121**(2): 282-301.
- Howard, J. C., V. M. Varallo, et al. (2003). "Elevated levels of beta-catenin and fibronectin in three-dimensional collagen cultures of Dupuytren's disease cells are regulated by tension in vitro." *BMC Musculoskelet Disord* **4**: 16.
- Howell, G. M., B. L. Ziober, et al. (1995). "Regulation of autocrine gastrin expression by the TGF alpha autocrine loop." *J Cell Physiol* **162**(2): 256-65.
- Huang, C. S., J. O'Brien M, et al. (2004). "Hyperplastic polyps, serrated adenomas, and the serrated polyp neoplasia pathway." *Am J Gastroenterol* **99**(11): 2242-55.
- Huang, E. H., R. L. Whelan, et al. (2001). "Increased incidence of colorectal adenomas in follow-up evaluation of patients with newly diagnosed hyperplastic polyps." *Surg Endosc* **15**(7): 646-8.
- Hyman, N. H., P. Anderson, et al. (2004). "Hyperplastic polyposis and the risk of colorectal cancer." *Dis Colon Rectum* **47**(12): 2101-4.
- Iino, H., J. R. Jass, et al. (1999). "DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer?" *J Clin Pathol* **52**(1): 5-9.
- Imperiale, T. F., D. R. Wagner, et al. (2000). "Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings." *N Engl J Med* **343**(3): 169-74.
- Issa, J. P., L. Shen, et al. (2005). "CIMP, at last." *Gastroenterology* **129**(3): 1121-4.
- Itoh, N., S. Semba, et al. (2002). "Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma." *Cancer* **94**(12): 3127-34.
- Jacks, T., L. Remington, et al. (1994). "Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice." *Curr Biol* **4**(1): 1-7.

- Jang, K. S., Y. S. Song, et al. (2010). "Clinicopathological significance of nuclear PTEN expression in colorectal adenocarcinoma." *Histopathology* **56**(2): 229-39.
- Janssen, K. P., F. el-Marjou, et al. (2002). "Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice." *Gastroenterology* **123**(2): 492-504.
- Jarvinen, H. J. (1985). "Time and type of prophylactic surgery for familial adenomatosis coli." *Ann Surg* **202**(1): 93-7.
- Jass, J. R. (2004). "Hyperplastic polyps and colorectal cancer: is there a link?" *Clin Gastroenterol Hepatol* **2**(1): 1-8.
- Jass, J. R. (2007). "Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features." *Histopathology* **50**(1): 113-30.
- Jass, J. R., V. L. Whitehall, et al. (2002). "Emerging concepts in colorectal neoplasia." *Gastroenterology* **123**(3): 862-76.
- Jass, J. R., J. Young, et al. (2000). "Hyperplastic polyps and DNA microsatellite unstable cancers of the colorectum." *Histopathology* **37**(4): 295-301.
- Jeevaratnam, P., D. S. Cottier, et al. (1996). "Familial giant hyperplastic polyposis predisposing to colorectal cancer: a new hereditary bowel cancer syndrome." *J Pathol* **179**(1): 20-5.
- Jen, J., S. M. Powell, et al. (1994). "Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions." *Cancer Res* **54**(21): 5523-6.
- Jiang, Y., E. T. Kimchi, et al. (2009). "Assessment of K-ras mutation: a step toward personalized medicine for patients with colorectal cancer." *Cancer* **115**(16): 3609-17.
- Karnoub, A. E. and R. A. Weinberg (2008). "Ras oncogenes: split personalities." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(7): 517-31.
- Katso, R., K. Okkenhaug, et al. (2001). "Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer." *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 615-75.
- Kawasaki, Y., T. Senda, et al. (2000). "Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling." *Science* **289**(5482): 1194-7.
- Khwaja, A., P. Rodriguez-Viciano, et al. (1997). "Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway." *EMBO J* **16**(10): 2783-93.
- Kim, S. H., K. A. Roth, et al. (1993). "Transgenic mouse models that explore the multistep hypothesis of intestinal neoplasia." *J Cell Biol* **123**(4): 877-93.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." *Cell* **87**(2): 159-70.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(4): 820-3.
- Koh, T. J., C. J. Bulitta, et al. (2000). "Gastrin is a target of the beta-catenin/TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis." *J Clin Invest* **106**(4): 533-9.
- Kolodner, R. D. (1995). "Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility." *Trends Biochem Sci* **20**(10): 397-401.
- Kongkanunt, R., V. J. Bubb, et al. (1999). "Dysregulated expression of beta-catenin marks early neoplastic change in Apc mutant mice, but not all lesions arising in Msh2 deficient mice." *Oncogene* **18**(51): 7219-25.
- Kruhoffer, M., J. L. Jensen, et al. (2005). "Gene expression signatures for colorectal cancer microsatellite status and HNPCC." *Br J Cancer* **92**(12): 2240-8.
- Kuroki, M. and J. T. O'Flaherty (1999). "Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)-dependent and ERK-independent pathways target STAT3 on serine-727 in human neutrophils stimulated by chemotactic factors and cytokines." *Biochem J* **341** (Pt 3): 691-6.
- Kusaba, T., T. Nakayama, et al. (2006). "Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer." *Oncol Rep* **15**(6): 1445-51.
- Kusaba, T., T. Nakayama, et al. (2005). "Expression of p-STAT3 in human colorectal adenocarcinoma and adenoma; correlation with clinicopathological factors." *J Clin Pathol* **58**(8): 833-8.

- Le Marchand, L. (2009). "Genome-wide association studies and colorectal cancer." *Surg Oncol Clin N Am* **18**(4): 663-8.
- Leach, F. S., N. C. Nicolaidis, et al. (1993). "Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *Cell* **75**(6): 1215-25.
- Lee, E. J., C. Choi, et al. (2005). "Tracing origin of serrated adenomas with BRAF and KRAS mutations." *Virchows Arch* **447**(3): 597-602.
- Lee, S. H., J. W. Lee, et al. (2004). "Colorectal tumors frequently express phosphorylated mitogen-activated protein kinase." *APMIS* **112**(4-5): 233-8.
- Leevers, S. J. and C. J. Marshall (1992). "Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein." *EMBO J* **11**(2): 569-74.
- Leggett, B. and V. Whitehall (2010). "Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis." *Gastroenterology* **138**(6): 2088-100.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1998). "Genetic instabilities in human cancers." *Nature* **396**(6712): 643-9.
- Lewis, J. D., K. Ng, et al. (2003). "Detection of proximal adenomatous polyps with screening sigmoidoscopy: a systematic review and meta-analysis of screening colonoscopy." *Arch Intern Med* **163**(4): 413-20.
- Li, F. P., J. F. Fraumeni, Jr., et al. (1988). "A cancer family syndrome in twenty-four kindreds." *Cancer Res* **48**(18): 5358-62.
- Lieberman, D. A., S. Prindiville, et al. (2003). "Risk factors for advanced colonic neoplasia and hyperplastic polyps in asymptomatic individuals." *JAMA* **290**(22): 2959-67.
- Lieberman, D. A., D. G. Weiss, et al. (2000). "Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. Veterans Affairs Cooperative Study Group 380." *N Engl J Med* **343**(3): 162-8.
- Lin, L. I. (1989). "A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility." *Biometrics* **45**(1): 255-68.
- Lubbe, S. J., M. C. Di Bernardo, et al. (2009). "Clinical implications of the colorectal cancer risk associated with MUTYH mutation." *J Clin Oncol* **27**(24): 3975-80.
- Lynch, H. T. and J. F. Lynch (2005). "What the physician needs to know about Lynch syndrome: an update." *Oncology (Williston Park)* **19**(4): 455-63; discussion 463-4, 466, 469.
- Lynch, H. T., P. M. Lynch, et al. (2009). "Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications." *Clin Genet* **76**(1): 1-18.
- Ma, X. T., S. Wang, et al. (2004). "Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma." *World J Gastroenterol* **10**(11): 1569-73.
- Madamanchi, N. R., S. Li, et al. (2001). "Thrombin regulates vascular smooth muscle cell growth and heat shock proteins via the JAK-STAT pathway." *J Biol Chem* **276**(22): 18915-24.
- Makinen, M. J. (2007). "Colorectal serrated adenocarcinoma." *Histopathology* **50**(1): 131-50.
- Mansour, S. J., W. T. Matten, et al. (1994). "Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase." *Science* **265**(5174): 966-70.
- Mao, Y. L., Z. W. Li, et al. (2011). "Phospho-STAT5 expression is associated with poor prognosis of human colonic adenocarcinoma." *Pathol Oncol Res* **17**(2): 333-9.
- Markowitz, S. (2000). "DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers." *J Clin Oncol* **18**(21 Suppl): 75S-80S.
- Markowitz, S., J. Wang, et al. (1995). "Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability." *Science* **268**(5215): 1336-8.
- Marrero, M. B., B. Schieffer, et al. (1995). "Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor." *Nature* **375**(6528): 247-50.
- Martinez, M. E., R. S. McPherson, et al. (1997). "A case-control study of dietary intake and other lifestyle risk factors for hyperplastic polyps." *Gastroenterology* **113**(2): 423-9.
- Miller, A. J., S. D. Dudley, et al. (2008). "Tractable Cre-lox system for stochastic alteration of genes in mice." *Nat Methods* **5**(3): 227-9.

- Minoo, P., K. Baker, et al. (2006). "Extensive DNA methylation in normal colorectal mucosa in hyperplastic polyposis." *Gut* **55**(10): 1467-74.
- Morimoto, L. M., P. A. Newcomb, et al. (2002). "Risk factors for hyperplastic and adenomatous polyps: evidence for malignant potential?" *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(10 Pt 1): 1012-8.
- Morin, P. J., B. Vogelstein, et al. (1996). "Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15): 7950-4.
- Morrison, E. E., B. N. Wardleworth, et al. (1998). "EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle." *Oncogene* **17**(26): 3471-7.
- Moser, A. R., H. C. Pitot, et al. (1990). "A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse." *Science* **247**(4940): 322-4.
- Muller, A. D. and A. Sonnenberg (1995). "Prevention of colorectal cancer by flexible endoscopy and polypectomy. A case-control study of 32,702 veterans." *Ann Intern Med* **123**(12): 904-10.
- Muto, T., H. J. Bussey, et al. (1975). "The evolution of cancer of the colon and rectum." *Cancer* **36**(6): 2251-70.
- Nagasaka, T., H. Sasamoto, et al. (2004). "Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation." *J Clin Oncol* **22**(22): 4584-94.
- Nakata, H., S. L. Wang, et al. (1998). "Oncogenic ras induces gastrin gene expression in colon cancer." *Gastroenterology* **115**(5): 1144-53.
- Nascimbeni, R., V. Villanacci, et al. (1999). "Aberrant crypt foci in the human colon: frequency and histologic patterns in patients with colorectal cancer or diverticular disease." *Am J Surg Pathol* **23**(10): 1256-63.
- Nemeth, J., B. Taylor, et al. (1993). "Identification of progastrin derived peptides in colorectal carcinoma extracts." *Gut* **34**(1): 90-5.
- Neufeld, K. L., F. Zhang, et al. (2000). "APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export." *EMBO Rep* **1**(6): 519-23.
- Nichols, K. E., D. Malkin, et al. (2001). "Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**(2): 83-7.
- Noffsinger, A. E. (2009). "Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy." *Annu Rev Pathol* **4**: 343-64.
- O'Brien, M. J., S. Yang, et al. (2004). "Hyperplastic (serrated) polyps of the colorectum: relationship of CpG island methylator phenotype and K-ras mutation to location and histologic subtype." *Am J Surg Pathol* **28**(4): 423-34.
- O'Brien, M. J., S. Yang, et al. (2006). "Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points." *Am J Surg Pathol* **30**(12): 1491-501.
- Oshima, M., H. Oshima, et al. (1995). "Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4482-6.
- Ottewell, P. D., A. Varro, et al. (2005). "COOH-terminal 26-amino acid residues of progastrin are sufficient for stimulation of mitosis in murine colonic epithelium in vivo." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**(3): G541-9.
- Ottewell, P. D., A. J. Watson, et al. (2003). "Progastrin stimulates murine colonic epithelial mitosis after DNA damage." *Gastroenterology* **124**(5): 1348-57.
- Pannequin, J., C. Bonnans, et al. (2009). "The wnt target jagged-1 mediates the activation of notch signaling by progastrin in human colorectal cancer cells." *Cancer Res* **69**(15): 6065-73.
- Pannequin, J., N. Delaunay, et al. (2007). "Beta-catenin/Tcf-4 inhibition after progastrin targeting reduces growth and drives differentiation of intestinal tumors." *Gastroenterology* **133**(5): 1554-68.

- Papadopoulos, N., N. C. Nicolaides, et al. (1994). "Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer." *Science* **263**(5153): 1625-9.
- Park, Y., D. J. Hunter, et al. (2005). "Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies." *JAMA* **294**(22): 2849-57.
- Pelletier, S., F. Duhamel, et al. (2003). "Rho family GTPases are required for activation of Jak/STAT signaling by G protein-coupled receptors." *Mol Cell Biol* **23**(4): 1316-33.
- Phelps, R. A., T. J. Broadbent, et al. (2009). "New perspectives on APC control of cell fate and proliferation in colorectal cancer." *Cell Cycle* **8**(16): 2549-56.
- Potter, J. D. (1999). "Colorectal cancer: molecules and populations." *J Natl Cancer Inst* **91**(11): 916-32.
- Quilliam, L. A., R. Khosravi-Far, et al. (1995). "Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins." *Bioessays* **17**(5): 395-404.
- Rafter, J. and B. Glinghammar (1998). "Interactions between the environment and genes in the colon." *Eur J Cancer Prev* **7 Suppl 2**: S69-74.
- Raptis, L., R. Arulanandam, et al. (2011). "The R(h)oads to Stat3: Stat3 activation by the Rho GTPases." *Exp Cell Res* **317**(13): 1787-95.
- Rehfeld, J. F. (1998). "The new biology of gastrointestinal hormones." *Physiol Rev* **78**(4): 1087-108.
- Renaut, A. J., P. R. Douglas, et al. (2002). "Hyperplastic polyposis of the colon and rectum." *Colorectal Dis* **4**(3): 213-215.
- Rex, D. K., O. W. Cummings, et al. (1996). "5-year incidence of adenomas after negative colonoscopy in asymptomatic average-risk persons [see comment]." *Gastroenterology* **111**(5): 1178-81.
- Rex, D. K., D. A. Johnson, et al. (2009). "American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]." *Am J Gastroenterol* **104**(3): 739-50.
- Rodrigues, N. R., A. Rowan, et al. (1990). "p53 mutations in colorectal cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(19): 7555-9.
- Rosenberg, D. W., S. Yang, et al. (2007). "Mutations in BRAF and KRAS differentially distinguish serrated versus non-serrated hyperplastic aberrant crypt foci in humans." *Cancer Res* **67**(8): 3551-4.
- Rothwell, P. M., M. Wilson, et al. (2010). "Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials." *Lancet* **376**(9754): 1741-50.
- Roy, H. K., B. F. Olusola, et al. (2002). "AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis." *Carcinogenesis* **23**(1): 201-5.
- Rubinfeld, B., I. Albert, et al. (1996). "Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly." *Science* **272**(5264): 1023-6.
- Ruijs, M. W., S. Verhoef, et al. (2010). "TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes." *J Med Genet* **47**(6): 421-8.
- Ruzzo, A., F. Graziano, et al. "Molecular predictors of efficacy to anti-EGFR agents in colorectal cancer patients." *Curr Cancer Drug Targets* **10**(1): 68-79.
- Ruzzo, A., F. Graziano, et al. (2010). "Molecular predictors of efficacy to anti-EGFR agents in colorectal cancer patients." *Curr Cancer Drug Targets* **10**(1): 68-79.
- Saglam, O., C. R. Garrett, et al. (2007). "Activation of the serine/threonine protein kinase AKT during the progression of colorectal neoplasia." *Clin Colorectal Cancer* **6**(9): 652-6.
- Samuels, Y., L. A. Diaz, Jr., et al. (2005). "Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells." *Cancer Cell* **7**(6): 561-73.
- Sansom, O. J., V. Meniel, et al. (2006). "Loss of Apc allows phenotypic manifestation of the transforming properties of an endogenous K-ras oncogene in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(38): 14122-7.
- Sansom, O. J., K. R. Reed, et al. (2004). "Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration." *Genes Dev* **18**(12): 1385-90.
- Sartore-Bianchi, A., M. Martini, et al. (2009). "PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies." *Cancer Res* **69**(5): 1851-7.

- Sasai, H., M. Masaki, et al. (2000). "Suppression of polypogenesis in a new mouse strain with a truncated Apc(Delta474) by a novel COX-2 inhibitor, JTE-522." *Carcinogenesis* **21**(5): 953-8.
- Semba, S., N. Itoh, et al. (2002). "The in vitro and in vivo effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenylchromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells." *Clin Cancer Res* **8**(6): 1957-63.
- Shao, H., H. Y. Cheng, et al. (2003). "Identification and characterization of signal transducer and activator of transcription 3 recruitment sites within the epidermal growth factor receptor." *Cancer Res* **63**(14): 3923-30.
- Shen, L., M. Toyota, et al. (2007). "Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(47): 18654-9.
- Sheng, H., J. Shao, et al. (2003). "Phosphatidylinositol 3-kinase mediates proliferative signals in intestinal epithelial cells." *Gut* **52**(10): 1472-8.
- Shtutman, M., J. Zhurinsky, et al. (1999). "The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10): 5522-7.
- Siddheshwar, R. K., J. C. Gray, et al. (2001). "Plasma levels of progastrin but not amidated gastrin or glycine extended gastrin are elevated in patients with colorectal carcinoma." *Gut* **48**(1): 47-52.
- Sierra, J., T. Yoshida, et al. (2006). "The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes." *Genes Dev* **20**(5): 586-600.
- Singh, P., X. Lu, et al. (2003). "Progastrin1-80 stimulates growth of intestinal epithelial cells in vitro via high-affinity binding sites." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**(2): G328-39.
- Singh, P., A. Owlia, et al. (1996). "Gastrin gene expression is required for the proliferation and tumorigenicity of human colon cancer cells." *Cancer Res* **56**(18): 4111-5.
- Singh, P., M. Velasco, et al. (2000). "Progastrin expression predisposes mice to colon carcinomas and adenomas in response to a chemical carcinogen." *Gastroenterology* **119**(1): 162-71.
- Singh, P., H. Wu, et al. (2007). "Annexin II binds progastrin and gastrin-like peptides, and mediates growth factor effects of autocrine and exogenous gastrins on colon cancer and intestinal epithelial cells." *Oncogene* **26**(3): 425-40.
- Singh, P., Z. Xu, et al. (1994). "Incomplete processing of progastrin expressed by human colon cancer cells: role of noncarboxyamidated gastrins." *Am J Physiol* **266**(3 Pt 1): G459-68.
- Smith, A. M. and S. A. Watson (2000). "Gastrin and gastrin receptor activation: an early event in the adenoma-carcinoma sequence." *Gut* **47**(6): 820-4.
- Snover, D. C. (2011). "Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma." *Hum Pathol* **42**(1): 1-10.
- Sparks, A. B., P. J. Morin, et al. (1998). "Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer." *Cancer Res* **58**(6): 1130-4.
- Steelman, L. S., S. L. Abrams, et al. (2008). "Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia." *Leukemia* **22**(4): 686-707.
- Su, L. K., K. W. Kinzler, et al. (1992). "Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene." *Science* **256**(5057): 668-70.
- Suehiro, Y. and Y. Hinoda (2008). "Genetic and epigenetic changes in aberrant crypt foci and serrated polyps." *Cancer Sci* **99**(6): 1071-6.
- Takayama, T., S. Katsuki, et al. (1998). "Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer." *N Engl J Med* **339**(18): 1277-84.
- Takayama, T., M. Ohi, et al. (2001). "Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis." *Gastroenterology* **121**(3): 599-611.
- Torlakovic, E., E. Skovlund, et al. (2003). "Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps." *Am J Surg Pathol* **27**(1): 65-81.
- Torlakovic, E. and D. C. Snover (1996). "Serrated adenomatous polyposis in humans." *Gastroenterology* **110**(3): 748-55.

- Torlakovic, E. E., J. D. Gomez, et al. (2008). "Sessile serrated adenoma (SSA) vs. traditional serrated adenoma (TSA)." *Am J Surg Pathol* **32**(1): 21-9.
- Toyota, M., N. Ahuja, et al. (1999). "CpG island methylator phenotype in colorectal cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8681-6.
- Turkson, J., T. Bowman, et al. (1999). "Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein." *Mol Cell Biol* **19**(11): 7519-28.
- Tuveson, D. A., A. T. Shaw, et al. (2004). "Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects." *Cancer Cell* **5**(4): 375-87.
- Umar, S., S. Sarkar, et al. (2008). "Activation of NF-kappaB is required for mediating proliferative and antiapoptotic effects of progastrin on proximal colonic crypts of mice, in vivo." *Oncogene* **27**(42): 5599-611.
- Umar, S., S. Sarkar, et al. (2009). "Functional cross-talk between beta-catenin and NFkappaB signaling pathways in colonic crypts of mice in response to progastrin." *J Biol Chem* **284**(33): 22274-84.
- Van Solinge, W. W., F. C. Nielsen, et al. (1993). "Expression but incomplete maturation of progastrin in colorectal carcinomas." *Gastroenterology* **104**(4): 1099-107.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, et al. (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *N Engl J Med* **319**(9): 525-32.
- Wang, T. C., T. J. Koh, et al. (1996). "Processing and proliferative effects of human progastrin in transgenic mice." *J Clin Invest* **98**(8): 1918-29.
- Warner, A. S., M. E. Glick, et al. (1994). "Multiple large hyperplastic polyps of the colon coincident with adenocarcinoma." *Am J Gastroenterol* **89**(1): 123-5.
- Watanabe, T., S. Wang, et al. (2004). "Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration." *Dev Cell* **7**(6): 871-83.
- Watson, S. A., K. E. Robinson, et al. (2000). "Transforming growth factor-alpha-mediated growth pathways in human gastro-intestinal cell lines in relation to the gastrin autocrine pathway." *Int J Cancer* **87**(1): 20-8.
- Wen, Z., Z. Zhong, et al. (1995). "Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation." *Cell* **82**(2): 241-50.
- Whitehall, V. L., M. D. Walsh, et al. (2001). "Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability." *Cancer Res* **61**(3): 827-30.
- Wick, M. R., J. L. Vitsky, et al. (2005). "Sporadic medullary carcinoma of the colon: a clinicopathologic comparison with nonhereditary poorly differentiated enteric-type adenocarcinoma and neuroendocrine colorectal carcinoma." *Am J Clin Pathol* **123**(1): 56-65.
- Winawer, S. J., A. G. Zauber, et al. (2006). "Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society." *Gastroenterology* **130**(6): 1872-85.
- Wolin, K. Y., Y. Yan, et al. (2009). "Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis." *Br J Cancer* **100**(4): 611-6.
- Wu, H., A. Owlia, et al. (2003). "Precursor peptide progastrin(1-80) reduces apoptosis of intestinal epithelial cells and upregulates cytochrome c oxidase Vb levels and synthesis of ATP." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**(6): G1097-110.
- Wu, J. M., E. A. Montgomery, et al. (2008). "Frequent beta-catenin nuclear labeling in sessile serrated polyps of the colorectum with neoplastic potential." *Am J Clin Pathol* **129**(3): 416-23.
- Xiong, H., W. Y. Su, et al. (2009). "Inhibition of STAT5 induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human colorectal cancer cells." *Lab Invest* **89**(6): 717-25.
- Zhang, X., J. Blenis, et al. (1995). "Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes." *Science* **267**(5206): 1990-4.

RESUME

Les polypes hyperplasiques (PH) constituent les lésions colorectales les plus fréquentes. Ces lésions ont pendant longtemps été considérées comme des lésions sans potentiel malin et le suivi coloscopique des patients ayant développé des PH n'est pas recommandé. Récemment, plusieurs études suggèrent qu'une partie de ces polypes pourrait constituer des précurseurs de certains cancers colorectaux sporadiques. Cependant, aucun biomarqueur permettant de détecter les PH à risque d'évolution maligne n'a pu être identifié. La progastrine est une prohormone impliquée dans la carcinogénèse colique. Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de la progastrine dans des PH provenant de 74 patients sans antécédent de pathologie colorectale et avons mis en évidence une surexpression de la prohormone dans 40% des cas. Dans un sous-échantillon composé de 39 patients pour lesquels un suivi coloscopique avait été réalisé, 41% des patients ayant présenté un PH ont développé des polypes adénomateux métachrones. Nous avons pu montrer une association significative entre l'expression de la progastrine et la survie sans néoplasme ($p=0.001$). En effet, la survie sans néoplasme à 5 ans était de 38% chez les patients présentant une forte surexpression de progastrine alors qu'elle était de 100% chez les patients avec une faible expression. Par ailleurs, nous avons démontré qu'un test prédictif composite basé sur le marquage de la progastrine et l'âge des patients permettraient de prédire la survenue d'un événement néoplasique métachrone chez les patients ayant développé un PH avec une sensibilité de 100% (Intervalle de confiance à 95% : 79%-100%) et une spécificité de 74% (51%-90%).

La progastrine peut activer plusieurs voies pro-oncogéniques dans les cancers colorectaux. Certaines d'entre elles, en particulier les voies JAK/STAT ou ERK n'ont pas encore été explorées dans les polypes hyperplasiques. Afin de mieux caractériser les polypes exprimant la progastrine, nous avons, dans un second temps, étudié l'activation de STAT3 et ERK dans un deuxième échantillon de 49 polypes hyperplasiques. Le pourcentage de cellules marquées par des anticorps spécifiques anti-progastrine, anti-phospho-STAT3 et anti-phospho-ERK étaient en moyenne de 31% (écart-type : 35), 10% (23) et 34% (30%), respectivement et étaient significativement augmentée dans les PH par rapport aux tissus normaux contrôles pour la progastrine et P-ERK ($p=0,0008$ et 0.0003). De plus, l'augmentation progressive de l'expression de ces deux marqueurs entre le tissu normal, les PH, les adénomes de dysplasie légère, modérée et sévère étaient significative ($p<0.0001$ pour la progastrine et $p=0.001$ pour P-ERK) et suggèrent une activation de ces deux facteurs dans les PH intermédiaire entre le colon normal et les adénomes. Nous avons également montré, dans ces lésions, que l'expression de la progastrine était corrélée à celle de P-ERK ($p=0,0184$). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la progastrine pourrait être associée à un sous-type de PH à risque d'évolution maligne et permettre de l'identifier.