



UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS
ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du vivant
INSERM U 966 MAVIVH
UNIVERSITÉ CHEIKH Anta DIOP DE DAKAR
ÉCOLE DOCTORALE SEV

THÈSE en cotutelle présentée par :
Fatou DIALLO AGNE

Soutenue le : 02 Juillet 2013

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

et de : **Docteur de l'université CHEIKH Anta Diop de Dakar**

Discipline/Spécialité : Sciences de la vie et de la santé / Biochimie et Biologie Moléculaire

Relations entre l'infiltrat lymphocytaire et les caractéristiques moléculaires de 135 patients présentant un cancer colorectal : Prévalence de la délétion du locus Apobec 3

THÈSE dirigée par :

M. Pagès Jean-Christophe Professeur, Université François -Rabelais-Tours - France

M. Touré Meïssa Professeur, Université Cheikh Anta Diop- Dakar - Sénégal

RAPPORTEURS :

M. Darlix Jean-Luc Professeur, Université de Strasbourg - France

M. Fall Babacar Professeur, Université Cheikh Anta Diop-Dakar- Sénégal

JURY :

M. Darlix Jean-Luc Professeur, Université de Strasbourg - France

M. Diatta Alassane Professeur, Université Assane Seck - Ziguinchor -Sénégal

M. Fall Babacar Professeur, Université Cheikh Anta Diop - Dakar- Sénégal

M. Pagès Jean-Christophe Professeur, Université François - Rabelais – Tours – France

M. Touré Meïssa Professeur, Université Cheikh Anta Diop - Dakar- Sénégal

Remerciements

A ma mère et à mon père, ce travail est le fruit de tous vos efforts.

A mon mari Atoumane AGNE pour ton amour et tes encouragements.

A ma petite Salla, pour avoir accepté et supporté mes longues absences et à Néné AGNE.

A ma sœur Aissatou pour ton soutien constant.

A la famille Gueye de Tours, Tafsir, sa femme Naty et les petites Fatou et Léna, pour les bons moments passés ensemble.

A ma famille de Dakar et de Saint-Louis.

A mes amies de toujours.

Au Pr Jean-Christophe PAGES, merci de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ce voyage palpitant à travers le génome. J'aurais voulu y consacrer beaucoup plus de temps pour pouvoir apprendre davantage. Merci également pour vos encouragements dans les moments d'incertitude.

Au Pr Meissa TOURE, merci de m'avoir orientée vers la biochimie et de m'avoir encadrée.

Aux Prs. Jean-Luc DARLIX, Babacar FALL, Alassane DIATTA, merci d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs et membres du jury.

A Mme Christine COLLIN, j'ai beaucoup appris à tes côtés.

A Mme Elsa TAVERNIER, pour la disponibilité, l'aide apportée à l'analyse statistique de nos résultats.

A toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à ce travail.

Résumé

Le cancer colorectal est une affection multifactorielle qui conjugue des anomalies épigénétiques et des altérations moléculaires à une déstabilisation du génome. En dehors de deux processus bien établis, l'instabilité des microsatellites et l'instabilité des chromosomes, la déstabilisation du génome peut être consécutive à la réexpression d'éléments génétiques mobiles, HERV et LINEs-1. Les HERVs ont un potentiel de modulation de l'immunité qui pourrait contrôler les réactions de l'hôte dans le processus de la carcinogenèse. Compte tenu du rôle que pourrait jouer les HERV, nous avons voulu déterminer la relation entre l'infiltrat lymphocytaire intratumoral et les différentes caractéristiques moléculaires des tumeurs. L'infiltrat lymphocytaire intratumoral a été évalué pour trois marqueurs (CD3, CD8 et CD45RO). Les marqueurs moléculaires analysés ont été : les mutations des gènes B-raf, k-ras et Pi3K, le statut des microsatellites, la méthylation de MLH1 et des LINEs-1, un polymorphisme de C-met et de HLA-G. Ces marqueurs ont été comparés à la prévalence de la délétion du locus Apobec 3 pour 135 patients porteurs de cancer colorectal.

L'infiltrat lymphocytaire est inversement lié à la délétion du gène Apobec 3, ($p=0,01230$) pour CD3, ($p=0,0392$) pour CD8. Il n'y a pas de significativité pour CD45RO. Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre l'infiltrat lymphocytaire et la déméthylation des HERV et des LINEs-1 ou le polymorphisme de HLA-G. Nous observons une association entre l'infiltrat lymphocytaire et le stade II de la tumeur ($p=0,0035$) pour CD3, ($p=0,0142$) pour CD8 et ($p=0,0011$) pour CD45RO. Les marqueurs CD3, CD8 sont associés à la localisation droite de la tumeur ($p=0,0296$) pour CD3 et ($p=0,0110$) pour CD8. Les tumeurs infiltrées, étaient associées au statut MSI-H, à une méthylation du gène MLH1 et inversement corrélées à la mutation de K-ras. L'association entre la mutation B-raf et l'infiltrat lymphocytaire CD45RO n'est pas démontrée.

Notre étude met en évidence pour la première fois un lien entre la délétion du locus Apobec 3 et l'importance de l'infiltrat lymphocytaire observé dans les tumeurs colorectales, ce qui incite à développer une investigation sur un échantillonnage plus important.

Mots-clés : cancer colorectal, infiltrat lymphocytaire, marqueurs moléculaires, Apobec 3, HERVs

Summary

Colorectal cancer is a multifactorial disease associated to epigenetic abnormalities and molecular alterations inducing a destabilization of the cellular genome. Besides two well-established processes, microsatellite instability and chromosome instability, the destabilization of the genome may follow mobilisation of endogenous mobile genetic elements, such as HERV or LINEs-1.

HERV have a potential to modulate immune response, which suggests that they could contribute to the process of carcinogenesis. We thus wanted to determine the relationship between intratumoral lymphocytic infiltration and the different molecular characteristics of tumours, taking into account factors that could influence the expression of HERV, such as the frequently observed deletion of a locus on 22q13 containing the Apobec 3 gene family.

The intratumoral lymphocytic infiltration was assessed for three markers (CD3, CD8 and CD45RO). The molecular markers analysed were: the mutations of B-raf, K-ras and Pi3K genes, the instability status of microsatellites, the methylation of MLH1 and LINEs-1, a polymorphism in C-met and in HLA-G. These markers were linked to the deletion of the locus containing Apobec 3 genes, in 135 colorectal cancer patients.

Our results show that the lymphocytic infiltrate was inversely associated to the deletion of Apobec 3 ($p=0.01230$) for CD3, ($p=0.0392$) for CD8, CD45RO infiltrate being not statistically significant. We observed no correlation between the lymphocytic infiltrate and the demethylation of HERV or LINEs-1 and a polymorphism linked to HLA-G expression. An association between the lymphocytic infiltrate, expressing the three markers, and stage II tumours, ($p=0.0035$) for CD3, ($p=0.0142$) for CD8 and ($p=0.0011$) for CD45RO. This was also the case for the right location of the tumour, ($p=0.0296$) for CD3 and ($p=0.0110$) for CD8. The tumour-infiltrating lymphocytes were associated with a MSI-H status, a methylation of MLH1 promoter, and inversely correlated with K-ras mutation. No association was noted with the sex, mucinous differentiation, the staging, vascular invasion or Pi3K gene mutation.

In conclusion, our study suggests, for the first time, a correlation between the deletion of the locus containing the Apobec 3 genes and the lymphocytic infiltrate observed in colorectal tumours. This investigation needs to be confirmed through the study of a larger population.

Key words: colorectal cancer, immune infiltrate, molecular markers, Apobec 3, HERVs.

Table des matières

| | |
|---|----|
| Abréviations | 11 |
| Introduction | 15 |
| Rappels Bibliographiques | 18 |
| Généralités sur le cancer colorectal..... | 19 |
| 1) Epidémiologie du Cancer colorectal | 19 |
| a) Prévalence du cancer colorectal dans le monde | 19 |
| b) Les facteurs de risque du Cancer colorectal | 22 |
| Evénements moléculaires et transformation: le cancer colorectal..... | 24 |
| 1) Evolution naturelle du cancer colorectal | 24 |
| 2) Les modifications de l'épithélium colique | 26 |
| 3) Les anomalies génétiques | 26 |
| a) La Voie APC – β Caténine | 27 |
| b) Les gènes K-ras/ B-raf /Pi3K..... | 29 |
| c) Les gènes de réparation des mésappariements (MMR) | 32 |
| d) Les gènes MMR chez l'homme | 33 |
| e) Les fonctions des gènes MMR..... | 35 |
| f) Les conséquences du déficit des gènes MMR | 37 |
| 4) L'Instabilité génomique..... | 39 |
| a) L'Instabilité des microsatellites..... | 39 |
| 1) <i>La Distribution des microsatellites</i> | 39 |
| 2) <i>Nature des microsatellites</i> | 40 |
| 3) <i>Mécanisme de l'instabilité des microsatellites</i> | 42 |
| 4) <i>Les conséquences de l'instabilité des microsatellites</i> | 44 |
| b) L'instabilité chromosomique | 45 |
| 1) <i>Les mécanismes de l'instabilité chromosomique</i> | 45 |
| <u>Les gènes de contrôle du fuseau mitotique</u> | 46 |
| <u>Les gènes de contrôle des lésions de l'ADN</u> | 47 |
| <u>La régulation par le centrosome</u> | 48 |
| 2) <i>Les télomères et la télomérase</i> | 48 |

| | |
|--|----|
| 3) <i>Instabilité des microsatellites/Instabilité chromosomique</i> | 49 |
| c) La méthylation de l'ADN..... | 51 |
| 1) <i>Mécanisme de la méthylation</i> | 52 |
| 2) <i>Distribution de la méthylation</i> | 53 |
| 3) <i>Le rôle de la méthylation</i> | 55 |
| 4) <i>Hypométhylation et Cancer</i> | 56 |
| <u>Activation des oncogènes</u> | 57 |
| <u>Activation des éléments génétiques mobiles</u> | 57 |
| <u>Instabilité chromosomique</u> | 58 |
| 5) <i>Hyperméthylation et Cancer</i> | 59 |
| Le modèle du cancer colorectal | 60 |
| 1) Les formes cliniques du Cancer colorectal..... | 60 |
| a) Diagnostic du cancer colorectal | 60 |
| b) Les différentes formes de cancer colorectal..... | 61 |
| 1) <i>Le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC ou syndrome de Lynch)</i> 61 | |
| 2) <i>Le cancer colorectal sporadique</i> | 62 |
| 3) <i>La polypose Adénomateuse familiale (FAP)</i> | 62 |
| 4) <i>Autres formes héréditaires de cancer héréditaire</i> | 63 |
| 1) <i>Les Stratégies thérapeutiques</i> | 66 |
| 2) <i>Surveillance du cancer colorectal</i> | 69 |
| 2) Réaction de l'hôte dans le cancer colorectal | 70 |
| a) L'infiltrat lymphocytaire | 70 |
| b) Immunité innée..... | 72 |
| 1) <i>Le locus et les produits des gènes Apobec 3</i> | 72 |
| <u>Structure et Mécanisme Catalytique</u> | 72 |
| 2) <i>Apobec 3 et VIH</i> | 76 |
| 3) <i>Apobec 3 et séquences endogènes</i> | 78 |
| 4) <i>Apobec et rétrotransposons non LTR (séquences LINEs-1)</i> | 79 |
| 5) <i>Apobec 3 et rétrovirus endogènes</i> | 80 |
| Objectifs de l'étude | 84 |
| Méthodologie | 86 |

| | |
|---|-----|
| Structures de recherche | 87 |
| Matériels et Méthodes..... | 87 |
| 1) Patients | 87 |
| 2) Extraction de l'ADN génomique..... | 87 |
| 3) Gamme d'étalonnage de la courbe standard | 88 |
| 4) Mise en évidence de la délétion du gène Apobec par <i>PCR</i> quantitative..... | 89 |
| 5) Etude de la stabilité des microsatellites et du polymorphisme de C-met..... | 90 |
| 6) Recherche des mutations des gènes B-raf, Kras et Pi3K..... | 93 |
| 7) Etude de la méthylation du gène MLH1, des Lines-1 et de HERVH..... | 95 |
| 8) Séquençage des différents produits PCR..... | 101 |
| 9) Marquage immunologique des lymphocytes CD-4, CD-8 et CD-45RO | 103 |
| 10) Analyse Statistique des résultats | 104 |
| Résultats | 106 |
| Caractéristiques démographiques et anatomo-cliniques | 107 |
| Le résultat de l'analyse des marqueurs moléculaires | 108 |
| Résultat des profils de méthylation de MLH1, HERV-H et Lines-1..... | 109 |
| Résultats du marquage immunohistochimique | 109 |
| Résultat de l'Analyse des Correspondances Multiples (ACM) : | 111 |
| Relations entre Infiltrat lymphocytaire et les autres caractéristiques de l'étude | 112 |
| Discussion | 116 |
| Conclusions et perspectives | 123 |
| Bibliographie | 125 |
| Annexes | 147 |
| Annexe 1 :..... | 148 |
| Annexe 2 :..... | 149 |
| Annexe 3 :..... | 150 |
| Annexe 4 :..... | 152 |
| Annexe 5 :..... | 155 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau I : Les facteurs de risques du cancer colorectal | 22 |
| Tableau II : Le système de réparation des mésappariements | 32 |
| Tableau III : Les fonctions des microsatellites | 41 |
| Tableau IV : Les principales voies affectées par la méthylation de l'ADN | 60 |
| Tableau V : Le traitement du cancer colorectal | 65 |
| Tableau VI : La surveillance du cancer colorectal | 69 |
| Tableau VII : Les caractéristiques démographiques et anatomocliniques | 107 |
| Tableau VIII : Les données sur les marqueurs moléculaires | 108 |
| Tableau IX : Infiltrat lymphocytaire et caractéristiques démographiques et anatomocliniques | 112 |
| Tableau X : Infiltrat lymphocytaire et les marqueurs moléculaires | 113 |
| Tableau XI : Infiltrat lymphocytaire et les facteurs régulateurs de l'immunité | 114 |
| Tableau XII : Infiltrat lymphocytaire et C-met | 115 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Les caractéristiques anatomo-pathologiques des tumeurs colorectales | 16 |
| Figure 2 : Modèle de transformation de l'épithélium colique | 25 |
| Figure 3 : La voie de signalisation Wnt | 28 |
| Figure 4 : La voie de signalisation B-raf/Kras/Pi3K | 31 |
| Figure 5 : Phylogénie et évolution de MutS | 34 |
| Figure 6 : Rôle des différentes enzymes du système MMR | 36 |
| Figure 7 : Nature et sites de mutations de deux gènes du système MMR | 38 |
| Figure 8 : Conséquences de l'inactivation du système MMR | 38 |
| Figure 9 : Les gènes de régulation des différentes phases du cycle cellulaire | 46 |
| Figure 10 : Processus de l'instabilité des microsatellites | 51 |
| Figure 11 : Action des ADN méthyltransférases | 53 |
| Figure 12 : La distribution génomique des îlots CpG | 54 |
| Figure 13 : Les voies moléculaires de la carcinogenèse colique | 64 |
| Figure 14 : Traitement du cancer colorectal selon le stade | 66 |
| Figure 15 : Le traitement du cancer colorectal métastatique | 67 |
| Figure 16 : Le traitement du cancer colorectal avec métastases non réséquables | 68 |
| Figure 17 : Les marqueurs de différenciation ou « clusters » de différenciation des lymphocytes T | 71 |
| Figure 18 : La réaction de désamination oxydative de la cytidine en uridine | 74 |
| Figure 19 : Organisation en cluster des gènes de la famille de Apobec 3 | 74 |
| Figure 20 : Structure catalytique des protéines de la famille de Apobec | 75 |
| Figure 21 : Domaine d'organisation des protéines de la famille de Apobec | 75 |
| Figure 22 : Structure du site catalytique de Apobec 3G | 76 |
| Figure 23 : Mécanisme de restriction du génome du VIH par Apobec 3 | 78 |
| Figure 24 : Structure des séquences endogènes | 80 |
| Figure 25 : Droite de calibration Apobec 3G, 3B et Albumine | 88 |
| Figure 26 : Mise en évidence de la délétion du gène Apobec 3 sur les patients | 90 |
| Figure 27 : Exemple d'analyse des microsatellites d'une tumeur stable/instable | 92 |
| Figure 28 : Résultat de mutation des gènes B-raf/Kras/Pi3K par HRM | 94 |
| Figure 29 : Profil de méthylation de MLH1 par pyroséquençage | 97 |

| | |
|--|-----|
| Figure 30 : Profil de séquence LINEs-1 méthylée | 99 |
| Figure 31 : Profil de séquence LINEs-1 déméthylée | 100 |
| Figure 32 : Exemple de mutation par séquençage du gène B-raf | 102 |
| Figure 33 : Résultat du marquage immunohistochimique | 104 |
| Figure 34 : Résultat de la méthylation des gènes MLH1, HERV-H et LINEs-1 | 109 |
| Figure 35 : Résultat de l'infiltrat lymphocytaire | 110 |
| Figure 36 : Répartition des tumeurs suivant les marqueurs étudiés | 110 |
| Figure 37 : Présentation des données par ACM | 111 |

Liste des annexes

| | |
|---|-----|
| Annexe 1 : Critères d'Amsterdam. | 148 |
| Annexe 2 : Classification TNM. | 149 |
| Annexe 3 : Liste des amorces pour la PCR. | 150 |
| Annexe 4 : Technique du pyroséquençage. | 152 |
| Annexe 5 : Technique HRM. | 155 |

Abréviations

AAV : Adeno-Associated Virus

ACE: Antigen Carcino-Embryonnaire

ACM : Analyse des Correspondances Multiples

ADNc: Acide désoxyribonucléotique complémentaire

ADNMT1/3A/3B: AND methyl transferase 1/3A/3B

AID: Activated-Induced Cytidine Deaminase

APC: Adénomatoze Polypose Colique

APC/C: Anaphase Promoting Complex/Cyclosome

Apobec (1, 2, 3, 4): Apolipoprotein B Editing Catalytic polypeptide

ARN: Acide ribonucléotique

AR: Androgen- Receptor

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

BAX: Bcl2-Associated-X- protein

BMPR1A: Bone Morphogenetic Receptor type 1A

B-raf: V-raf murine sarcoma oncogene homolog B1

BRCA1/2: Breast Cancer1/2

BUB: Budding Uninhibited by benomyl

hBUB1/hBUBR1: human Budding Uninhibited by benomyl 1/Receptor 1

CCR: cancer colorectal

CD2/3/4/8/28/45RO/45RA/25/56/57/69 : Clusters de différenciation

C/EBP β : CCAAT/ Enhancing Binding Protein β

CGH-array: Comparative Genomic Hybridization –array

CIN: Chromosomal Instability

CTCF: CCCTC Binding factor

DAP-kinase: Death –associated Protein kinase

D128K: Acide aspartique 128 Lysine

DMAP1: DNA methyltransferase 1 associated protein 1
dNTP: désoxy-Nucleotide Tri- Phosphate
EDTA: Ethyl diamine tétra-acétique
EGFR: Epidermal Growth factor Receptor
ERK: Extracellular signal-regulated kinases
ES: Embryonic Stem cells
FAP: Familial Adenomatose Polyposis
FMP: Facteurs de mauvais pronostic
Fos: Feline Osteosarcoma virus
GDP: Guanidine Di-Phosphate
G6PD: Glucose 6 Phospho deshydrogenase
GSK3 β : glycogene synthétase kinase 3 β
GST λ : Glutathione-S-Transferase λ
GTP: Guanidine Tri-Phosphate
HD: Hungtinton Disease
HDAC2: Histone Deacetylase 2
HERV: Human Endogenous Retrovirus
HGF/SF: Hepatocyte Growth Factor/
HLA-G: Human Leucocyte Antigen-G
HNPCC: Hereditary Non Polyposis Cancer Colorectal
HPRT: Hypoxanthine-Guanine phosphoribosyltransferase
H-ras: Harvey Rat Sarcoma viral oncogene Homolog
HRM: High Resolution Melting
HTLV: Human T- lymphotropic Virus
IGFIIR: Insuline Growth Factor II Receptor
IMC: Indice de Masse Corporelle
INCa : Institut National du Cancer
IRM: Imagerie par Résonance Magnétique
K-ras: Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene Homolog
LEF: Lymphoid Enhancing Factor

LINEs: Long Interspersed Nuclear Elements

LKB1/STK11: Serine/threonine protein Kinase

LOH: Loss of Heterozygosity

LTR: Long Terminal Repeat

MAD/hMAD2: Mitotic Arrest Deficiency / human Mitotic Arrest Deficiency 2

MAGE: Melanoma Antigen

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MDR1/2: Multi Drug Resistance 1

MHC I/II: Complexe majeur d'histocompatibilité

MLH1/3: Human MutL homolog1/3

MLV: Murine Leukemia Virus

MMR: Mismatch Repair

MSH1/2/3/4/5/6: Human Mut S homolog 1/2/3/4/5/6

MSI- H/L: Microsatellite Instability-High/Low

MSS: Microsatellite Stable

MutH: Mutator H

MutL: Mutator L

MutS: Mutator S

MYOD: Myogenic Differentiation

NF1: Neurofibromin 1

NK: Natural Killer

N-ras: Neuroblastoma ras viral oncogene homolog

O⁵MGMT: O⁵méthyl guaninyl methyl transférase

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

PCR: Polymerase Chain Reaction

PGK1: Phosphoglycerate Kinase 1

Pi3K: Phosphatidy- inositol 3 Kinase

PMS1/2: Post Meiotic Segregation 1 or 2

RAR β 2: Retinoic Acid Receptor β 2

Rb: Rétinoblastome

Rft1: Requiring Fifty three 1 Homolog
RPA: Replication Protein A
SAM: S-adénosyl-méthionine
SCA: Spinocerebellar Ataxia
SMAD4: Mothers against decapentaplegic homolog 4
S. cerevisiae: Saccharomyces Cerevisiae
SERPINB5: Serine Protease Inhibitor B5
SINs: Short Interspersed Nuclear Elements
SIV: Simian Immunodeficiency Virus
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SSB: Single- Stranded DNA -Binding Protein
STK15: Serine/Threonine Kinase 15
TCF: T-cell factor
TDM: Tomodensitométrie
TEP scan: Tomographe à Emission de Positron
TGFβIIIR: Transforming Growth Factor β type II Receptor
TIMP3: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3
TNM: Taille (Taille de la tumeur) N (Node ou ganglion lymphatique) M (Metastases)
VIF: Viral Infectivity Factor
VIH: Virus de l'immunodéficience Humaine
Wnt: Wingless-type mouse mammary tumour virus integration site
Xist: X-inactive Specific Transcript

Introduction

Le cancer colorectal est une maladie génétiquement hétérogène, en progression croissante dans les pays occidentaux. En France, il occupe la troisième place des cancers chez l'homme et deuxième chez la femme. Le pronostic du cancer colorectal reste sombre avec un taux de survie à 5 ans de 56 % tous stades confondus (INCa, 2011).

En 1990, Volgestein et Fearon ont proposé un modèle du processus de transformation de l'épithélium colique normal en adénocarcinome, aux anomalies épigénétiques, il associe des altérations moléculaires et la déstabilisation du génome cellulaire (Volgestein B et al, 1990).

L'instabilité du génome survient soit par la voie de l'instabilité des microsatellites, soit par celle de l'instabilité chromosomique (CIN). La voie de l'instabilité chromosomique, qui est caractérisée par une variabilité de nombre et de structure des chromosomes est retrouvée dans la majorité des cancers colorectaux. L'instabilité des microsatellites résulte de l'inactivation germinale ou somatique des gènes de réparation des mésappariements, elle est retrouvée dans 15 % de cancers colorectaux (Kanthan R et al, 2012).

Ces caractéristiques moléculaires sont associées à des caractéristiques anatomocliniques particulières (figure 1). La majorité des tumeurs CIN prédomine dans le colon distal et latéral gauche, les patients ont un taux de survie faible. Les tumeurs MSI sont de localisation proximale, faiblement différenciées, de phénotype mucineux et de meilleur pronostic. Cette issue favorable des tumeurs MSI est associée à une importante infiltration lymphocytaire péri- et intra-tumorale (Nosho K et al, 2010). L'instabilité des microsatellites induirait la production de protéines anormales ou néo-antigènes qui contribueraient à stimuler une réponse immune de l'hôte (Nosho K et al 2010; Deschoolmeester V et al, 2010).

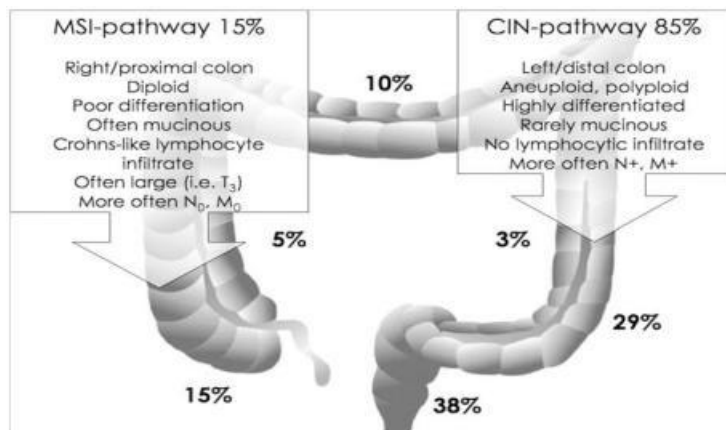


Figure 1 : Les caractéristiques anatomo - pathologiques des tumeurs colorectales (Soreide K et al, 2009)

Les caractéristiques pathologiques des tumeurs avec une instabilité des microsatellites (MSI) et celles avec une instabilité chromosomique (CIN). Les pourcentages indiquent la distribution anatomique du cancer colorectal (TNM renvoie au stade de la tumeur).

Plus largement, l'abondance de l'infiltrat lymphocytaire est associée à un meilleur pronostic clinique chez les patients atteints de cancer colorectal (Nosho K et al 2010 ; Mlecnik B et al, 2011). Cette amélioration de la survie globale et l'absence de récurrence, reflète un diagnostic à un stade précoce de la maladie, une réduction du potentiel métastatique (Pagès F et al, 2005 ; Nosho K et al 2010 ; Mlecnik B et al, 2011). L'infiltrat lymphocytaire semble donc être corrélé aux altérations moléculaires spécifiques associées (Nosho K et al 2010).

Sur le plan mécanistique, la déstabilisation du génome pourrait être secondaire à la mobilisation de séquences endogènes, notamment des LINEs-1 et des rétrovirus endogènes (Nelson PN et al, 2003 ; Mullins CS et al, 2012 ; Cegolon L et al, 2013).

Au décours de l'endogénéisation des séquences génétiques mobiles, outre l'acquisition et la sélection de fonctions nouvelles qui ont contribué à l'évolution de l'hôte, ces séquences mobiles pourraient aussi participer au développement du cancer (Mullins CS et al, 2012). Parmi les mécanismes on retiendra l'activation des oncogènes ou l'inactivation des gènes

suppresseurs de tumeurs dans leur site d'intégration, mais aussi la dérégulation de l'expression des gènes.

En outre, certains HERV, en particulier ceux codant une enveloppe rétrovirale, possèdent des propriétés immunosuppressives permettant aux cellules tumorales d'échapper à la réponse immune de l'hôte (Nelson PN et al, 2003 ; Mullins CS et al, 2012). L'expression inappropriée de ces HERV, comme des LINES-1, peut être régulée par mutation délétionnelle, déméthylation (Mullins CS et al, 2012).

Les Apobec 3 appartiennent à la famille des Cytidines désaminases, de structure apparentée à celle de l'Apobec 1, première protéine identifiée et responsable de l'édition de l'ARNm de l'apolipoprotéine B. La famille du locus Apobec 3 est composée de sept gènes organisés en un cluster sur le chromosome 22q (Bulliard Y et al, 2011). Chaque protéine Apobec 3 possède un domaine catalytique renfermant une séquence consensus nécessaire à l'activité Cytidine désaminase. Par cette dernière, les Apobec 3 induisent une hypermutation sur le brin complémentaire du génome du VIH -1 en l'absence de la protéine Vif (Chiu YL et al, 2009) ce qui minimise la propagation de l'infection virale.

Une délétion sur le chromosome 22 (22q13) a été décrite dans plusieurs types histologiques de cancers (Castells A et al, 2000 ; Zhou CZ et al, 2002 ; Zheng HT et al, 2005 ; Burns MB et al 2013) dont les cancers colorectaux. Le rôle des Apobec 3 dans le contrôle des séquences endogènes et la récente description de l'activité Apobec 3B dans le cancer du sein, nous a incités à étudier cette délétion en relation à la réponse immune, dans le cancer colorectal.

Nous avons voulu déterminer la relation entre les différents marqueurs moléculaires couramment utilisés, notamment la stabilité des microsatellites, les mutations des gènes B-raf, K-ras et Pi3K, la méthylation de MLH1 et des LINES-1, avec l'infiltrat lymphocytaire. Ensuite, nous avons étudié la prévalence de la délétion du locus Apobec 3 en 22q13 et confirmé sa relation avec l'infiltrat lymphocytaire. Il reste alors à comprendre le rôle de cette délétion dans la modulation de l'immunité, peut être au travers de l'expression des rétrovirus endogènes. Tels sont les objectifs pour cette présente étude portant sur 135 patients porteurs d'un cancer colorectal.

Rappels Bibliographiques

Généralités sur le cancer colorectal

1) Epidémiologie du Cancer colorectal

a) Prévalence du cancer colorectal dans le monde

Le cancer colorectal touche chaque année plus d'un million de la population mondiale avec une lourde mortalité qui avoisine 500 000 décès par an (Boyle P et al, 2002 ; Benson AL B, 2007). C'est une affection commune à tous les pays quelque soit leur niveau de développement. Il s'agit du troisième cancer de par sa prévalence et du quatrième de par le nombre de décès par cancer dans le monde (Weitz J et al, 2005).

En effet, en 2000 498 754 nouveaux cas sont diagnostiqués chez l'homme et 445 963 chez la femme avec un taux d'incidence standardisé de 19,1 pour 100 000 chez l'homme et 14,4 pour 100 000 chez la femme (Boyle P et al, 2002).

Selon Boyle et collaborateurs (Boyle P et al, 2002), le taux d'incidence le plus faible est rapporté chez l'homme en Afrique dans une région d'Algérie (0,4 /100 000), alors que ce taux dépasse les (30 /100 000) en Amérique du nord, au Canada, au Japon et en Nouvelle Zélande.

Chez la femme, l'incidence la plus élevée autour de 25/100 000 est retrouvée également en Nouvelle Zélande et en Amérique du nord et le taux le plus faible est rapporté en Algérie et en Inde. La majorité des patients vont développer des métastases hépatiques avec un taux de survie entre 24 et 40 mois après résection (Benson AL B, 2007).

Aux Etats-Unis : Aux Etats-Unis, le CCR vient en 3^e position parmi les cancers les plus fréquents tous sexes confondus (Jemal A et al, 2007). Il survient autour de la quarantaine et son incidence augmente avec l'âge. Ainsi, 92% des cas sont diagnostiqués chez les plus de 50 ans (Benson AL B, 2007).

En 2009, (Jemal A et al, 2009) près de 1 479 350 nouveaux cas de cancer ont été observés avec plus d'un demi-million de décès. Cependant, le taux d'incidence totale des cancers décroît entre 2001 et 2005 de 1,8% chez l'homme et 0,6 % chez la femme alors que le taux de mortalité par cancer décroît de 19,2% chez l'homme de 1991 à 2005 et 11,4% chez la

femme de 1990 à 2005. Deuxième cause de décès par cancer, la mortalité par CCR baisse ainsi de 17% chez l'homme et de 24% chez la femme.

En Europe : En 2012 en Europe (Malvezzi M et al 2012), près de 1 283 000 décès estimés par cancer sont enregistrés dans la population (717 000 hommes et 566 000 femmes). Un taux de mortalité standardisé par cancer de 138,7/100 000 hommes et 84,7/100 000 femmes est rapporté soit une baisse estimée de la mortalité par cancer de 18% chez l'homme et 13% chez la femme par rapport aux données de 2000. Le nombre de décès estimés pour le CCR est de 13% de l'ensemble des cancers (163 106 dont 89 117 hommes et 73 989 femmes) avec un taux de mortalité standardisé de 16,51 pour 100 000 hommes et de 9,37 pour 100 000 femmes. Entre 2007 et 2012, une tendance à la baisse de la mortalité par cancer colorectal de – 7% pour l'homme et – 11% pour la femme est retrouvée, derrière le cancer de l'estomac (-20% /-23%) et les leucémies (-11% /-12%).

En France : En 2011 en France (INCa, 2011), le nombre de nouveaux cas de cancers diagnostiqués est de 365 500 (207 000 hommes et 158 500 femmes). Le taux standardisé est de 382,7 et 268,5 respectivement pour 100 000 hommes et 100 000 femmes. Le nombre de décès par cancer est de 147 500 cas estimés (84 500 hommes et 63 000 femmes) soit un taux standardisé de 138,6 et 77,6 pour 100 000 respectivement chez l'homme et la femme.

Le CCR occupe le 3^e rang des cancers chez l'homme avec 21 500 nouveaux cas estimés, après le cancer de la prostate et du poumon. Il se positionne à la 2^e place chez la femme avec 19 000 nouveaux cas estimés, après le cancer du sein. Le taux d'incidence standardisé est de 36,4 pour 100 000 chez les hommes et 24,7 pour 100 000 femmes.

Le CCR est aussi la deuxième cause de mortalité par cancer tous sexes confondus avec (9 200 nouveaux cas) de décès estimés chez l'homme et chez la femme (8 300 nouveaux cas). Un taux de mortalité standardisé est de 13,8 pour 100 000 hommes et 8,2 pour 100 000 femmes. De 2000 à 2012, il a été observé une tendance à la baisse de la mortalité plus marquée chez l'homme (21%) que chez la femme (11- 12%) (Malvezzi M et al 2012).

Le taux de survie à 5 ans des patients atteints de CCR est de 56% tous stades confondus (INCa, 2011).

En Afrique : L'Afrique est le continent le moins affecté par le cancer dans sa présentation colorectale avec un taux d'incidence standardisé inférieur à 10 malgré les disparités suivant les régions. En effet, En Afrique du Nord, le cancer colorectal vient en troisième position avec un taux standardisé de 9,2 pour 100 000 hommes après le cancer du poumon et de la vessie et 6,9 pour 100 000 femmes après le cancer du sein et de la vessie. En Afrique subsaharienne, le cancer colorectal vient loin derrière les cancers de la prostate, du foie, de l'estomac et de l'œsophage chez l'homme avec un taux standardisé de 5,7 et de 4,6 pour 100 000 femmes après les cancers du col de l'utérus, du sein, du foie et de l'estomac (Globocan, 2000).

Cependant, cette incidence faible contraste avec le nombre en progression croissante des consultations pour cancer en général et cancer colorectal en particulier. L'insuffisance des ressources économiques, la place privilégiée de la pharmacopée traditionnelle, l'accès difficile aux structures de soin et l'absence quasi-totale d'outils diagnostiques dans certaines, sont autant de circonstances qui sous-estiment les données réelles sur le cancer colorectal (Ndao A.B, 2005).

b) Les facteurs de risque du Cancer colorectal

Le cancer colorectal est une affection multifactorielle qui associe des facteurs génétiques, épigénétiques mais également des facteurs environnementaux. Le tableau I regroupe les principaux facteurs de risque du cancer colorectal.

Tableau I : Facteurs de risque du cancer colorectal

Données biomorphologiques

Age avancé

Sexe male

Facteurs environnementaux

Régime riche en viande et graisses, pauvre en fibres, folates et calcium

Inactivité physique

Obésité

Tabac et alcool

Exposition aux radiations

Histoire personnelle ou familiale de maladie inflammatoire ou de polypes

Maladie de Crohn

Colite ulcéraire

Cholécystectomie

Histoire familiale de polypes

Histoire familiale de cancer digestif

Antécédents gynécologiques

Nulliparité, ménopause précoce, l'âge tardif de la première grossesse

Un régime riche en gras, pauvre en fibres, légumes et fruits augmente aussi le risque de cancer colorectal (Boyle P et al, 2002 ; Weitz J et al, 2005 ; Benson AL B, 2007 ; INCa, 2007). A l'inverse, le risque de CCR est diminué par des mesures de prévention, reposant sur ces facteurs de risques liés essentiellement à l'alimentation et au mode de vie.

L'étude récente de (Gong J et al, 2012) met en évidence l'impact du tabac, de l'IMC et de la consommation de fruits dans la genèse du CCR. Une augmentation de 5kg/m² de l'IMC était corrélée à un risque de CCR de l'ordre de 15% pour une population d'obèse de 8-17% (INCa, 2007).

La chimioprévention par l'administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiens et/ou d'inhibiteurs de l'isoenzyme-2 de la cyclooxygénase a une action sur les CCR. En effet, la prise régulière d'aspirine ou d'un autre anti-inflammatoire non stéroïdien réduit de 40% à 50% la mortalité par CCR (Benson AL B, 2007). Des suppléments à base de vitamines (A, C, D, E), de β - carotène ou de calcium semblent bénéfiques pour diminuer le risque de CCR et/ou prévenir l'apparition des polypes (Boyle P et al, 2002).

Evénements moléculaires et transformation: le cancer colorectal

1) Evolution naturelle du cancer colorectal

Le développement du cancer colorectal est la résultante de l'accumulation progressive des modifications génétiques et épigénétiques qui conduisent à la transformation de l'épithélium colique normal en un adénocarcinome colique (Kinzler KW, 1996 ; Vogelstein B et al, 1988 ; Vogelstein B et al, 1990 ; Grady W.M, 2004). C'est en 1990, que Vogelstein et Fearon (Vogelstein B et al, 1990) ont proposé un modèle (figure 2) résumant l'histoire naturelle du cancer colorectal. Malgré l'homogénéité de la présentation anatomoclinique de la tumeur colorectale sous la forme d'un adénocarcinome, l'instabilité génétique sous jacente s'observe à deux niveaux, au niveau nucléotidique et chromosomique. L'instabilité nucléotidique est le résultat de mutations par délétion, insertion ou substitution de quelques nucléotides alors que l'instabilité chromosomique elle, observée dans la majorité des cancers s'accompagne de perte ou gain de chromosomes qui peuvent affecter le chromosome dans sa totalité ou en partie (Lengauer C et al, 1998).

La compréhension de ces différents mécanismes a contribué largement à l'émergence de nouvelles molécules thérapeutiques dans la prise en charge du CCR.

Selon Grady (Grady W.M, 2004), la genèse de ces anomalies moléculaires peut être divisée en trois étapes successives :

La progression moléculaire et morphologique des anomalies

Les anomalies génétiques et épigénétiques

La perte de la stabilité génomique

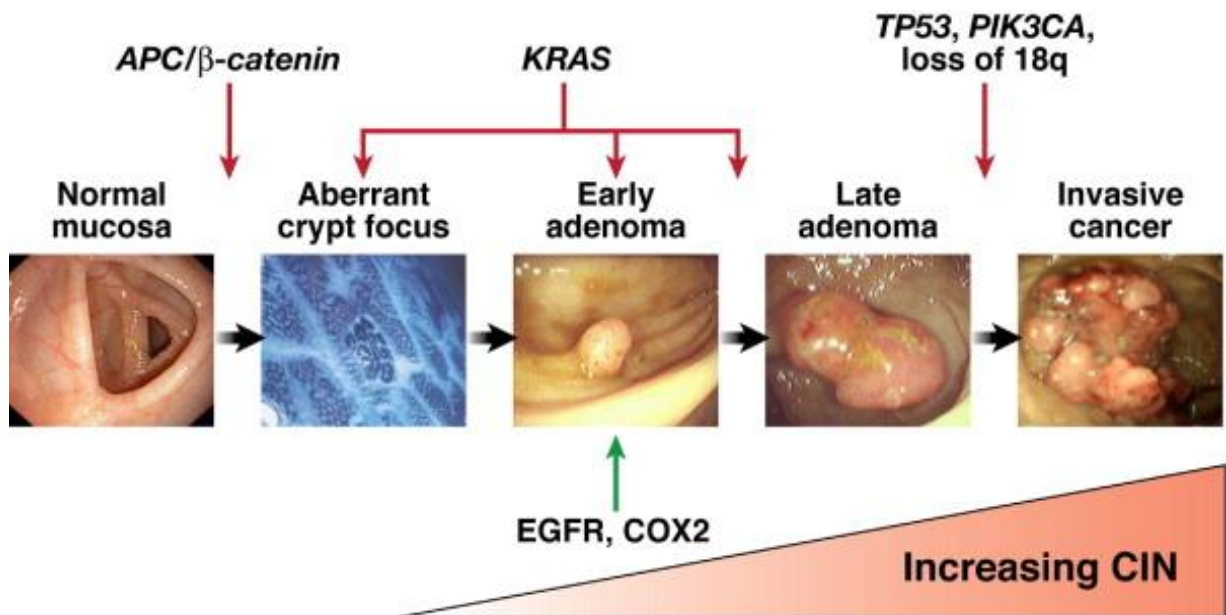


Figure 2 : Modèle de transformation de l'épithélium colique (Pino MS et al, 2010)

Exemple d'un modèle de transformation en plusieurs étapes de la cancérogenèse colorectale. La première étape est la formation de foyers de cryptes aberrantes (ACF) à partir de l'épithélium normal. L'activation de la voie de signalisation Wnt peut se produire à ce stade en raison de mutations dans le gène APC. La progression des adénomes en carcinomes précoces nécessite des mutations activatrices des proto-oncogène KRAS, des mutations de la protéine p53 et la perte d'hétérozygotie du chromosome 18q. L'activation mutationnelle de Pi3K se produit à la fin de la séquence adénome-cancer dans une petite proportion de cancers colorectaux. L'instabilité chromosomique est observée dans les adénomes bénins puis augmente avec la progression tumorale.

2) Les modifications de l'épithélium colique

La transformation de l'épithélium colique normal en adénocarcinome se traduit par des remaniements histologiques secondaires à des altérations génétiques et épigénétiques (figure 2). Ce processus survient après plusieurs décennies suivant deux voies : la voie de l'instabilité microsatellite et celle de l'instabilité chromosomique. Ces altérations offrent un avantage de croissance qui conduit à la prolifération de clones de cellules altérées, suite à une perte d'inhibition de contact (Grady WM, 2004).

La première lésion préneoplasique identifiable est l'apparition de foyers de cryptes aberrantes (Luo L et al, 2006 ; Alrawi S J et al, 2006). Il s'agit de petites surfaces circonscrites de la muqueuse colique avec des cryptes hypertrophiées par rapport à la muqueuse normale environnante. Ces lésions au microscope comprennent des cryptes surélevées au dessus de la muqueuse normale, associées à un épaissement excessif de l'épithélium et à une obstruction de la lumière luminale, circonscrite autour de cryptes adjacentes normales.

Ces lésions ont été observées pour la première fois chez des souris traitées par des carcinogènes spécifiques du colon et des observations similaires ont été notées avec des modèles animaux et chez des sujets à haut risque de développer un cancer du colon sporadique et non héréditaire (Rudolph R E et al, 2005 ; Pretlow T P et al 1991).

Les foyers de cryptes aberrantes sont plus fréquemment observés dans le colon distal de l'animal et de l'homme, correspondant à la distribution anatomique préférentielle du CCR.

La transformation des cryptes en polypes et par la suite en cancer s'accompagne de modifications biochimiques, génétiques et épigénétiques par lesquelles un certain nombre de cryptes évoluent vers le cancer. En particulier, les foyers de cryptes aberrantes dysplasiques portent fréquemment des mutations du gène APC et possèdent un potentiel élevé de progresser vers le cancer du colon (Grady WM, 2004).

3) Les anomalies génétiques

Les altérations génétiques sont à type de mutation activatrices des oncogènes ou inhibitrices des gènes suppresseurs de tumeurs, par méthylation, mutation ou perte d'hétérozygotie (Grady WM, 2004). Ainsi, l'inactivation du gène APC conduit à l'hyperactivation de la voie de signalisation de Wnt qui initie la formation de tumeur dans le colon.

a) La Voie APC – β Caténine

Le gène APC est précocement et fréquemment muté dans le CCR, on parle de gardien de la différenciation du génome (Kinzler KW et al, 1996 ; Polakis P, 1999 ; Polakis P, 2012). Il est localisé en 5q21, contient 15 exons et code une protéine qui comporte 2 843 acides aminés. La protéine APC possède plusieurs domaines fonctionnels par lesquels, elle entre en liaison avec une variété de protéines intracellulaires comme la β -caténine, la γ -caténine, la glycogène synthétase kinase-3 β (GSK-3 β), l'axine et la tubuline entre autres (Kinzler KW et al, 1996) (figure 3). La protéine APC semble impliquée dans l'adhésion cellulaire par liaison à la β -caténine à travers d'autres complexes cellulaires comme la cadhérine. Elle forme aussi avec la β -caténine un complexe macromoléculaire dans lequel intervient, la glycogène synthétase kinase 3 β . Dans cette voie appelée voie Wingless/Wnt, la glycogène synthétase kinase 3 β (GSK3 β) favorise la liaison de la β -caténine à APC par phosphorylation. La β -caténine ainsi modifiée est dégradée et inactivée à travers sa liaison avec APC qui agit de concert avec la GSK3 β pour inhiber l'activité transcriptionnelle de la β -caténine.

Les mutations du gène de la β -caténine ou du gène APC empêchent l'association des deux molécules et par conséquent favorisent l'accumulation de la β -caténine et l'activation non régulée de la voie de signalisation Wnt. Ainsi, par ces mutations, sans que le peptide Wnt ne se lie à son récepteur et n'émette un signal qui inactive la glycogène synthétase kinase 3 β , la phosphorylation de la β -caténine n'est pas activée. La β -caténine s'accumule alors et active les facteurs de transcription Tcf/lef (*T-cell factor/lymphoid enhancing factor*) qui favorisent la surexpression de gènes de croissance cellulaire, comme la cycline D1 et c-myc (Kinzler KW et al, 1996 ; Polakis P et al, 1999 ; Polakis P, 2012).

Les mutations du gène APC, identifiées dans certaines cryptes aberrantes, sont associées au syndrome de polypose adénomateuse familiale (FAP) (Siu IM et al, 1997). Ces mutations somatiques permettent d'expliquer plus de 80% des cas des formes sporadiques de cancer du colon (Polakis P, 1999). Les mutations par délétion s'observent dans une séquence répétée de 20 acides aminés et conduisent à la formation d'une protéine tronquée avec perte de sites de liaison de la β -caténine (Polakis P, 1999).

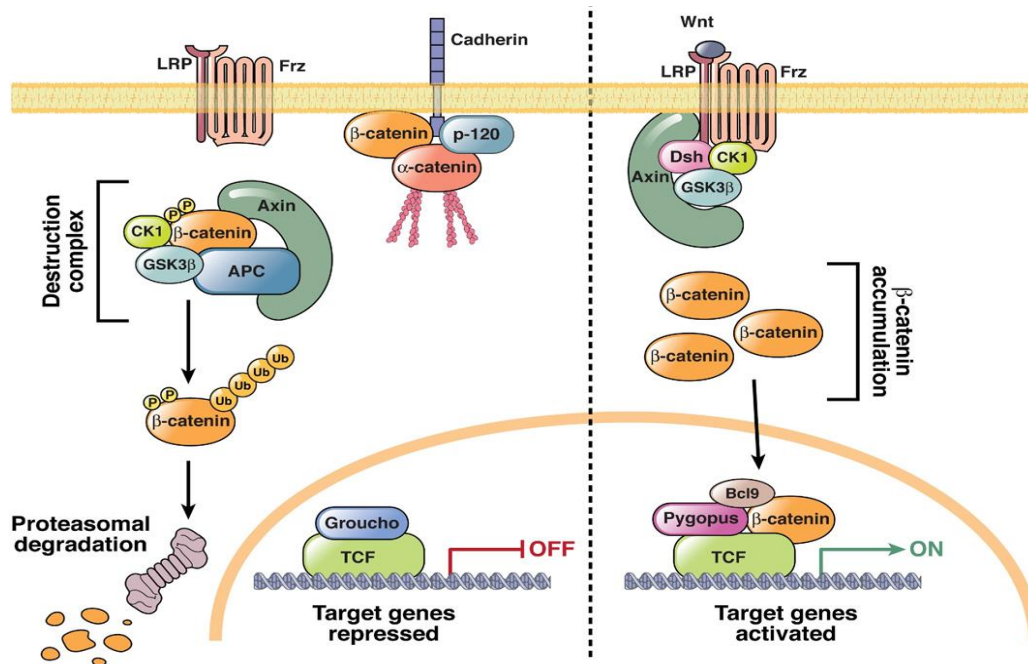


Figure 3 : La voie de signalisation Wnt (Pino MS et al, 2010)

"OFF" : en l'absence d'un signal Wnt, la destruction du complexe APC contenant la glycogène synthase kinase 3 β (GSK-3 β) et la caséine kinase 1 α (CK1 α) sur un axin-conductin cible la dégradation cytoplasmique de la β -caténine par le protéasome. Dans le noyau, les gènes cibles de Wnt restent silencieux sous l'action du répresseur Groucho qui interagit avec le facteur de lymphocytes T liée à l'ADN (TCF).

"ON" : en présence d'un ligand Wnt, l'interaction des récepteurs Frizzled et du corécepteur de la protéine apparentée au récepteur des lipoprotéines de basse densité (LRP) déclenche la phosphorylation de la queue cytoplasmique de LRP par CK1 et GSK-3 β ainsi que le recrutement (Dsh) dépendant de l'axine sur LRP phosphorylée. La phosphorylation de la β -caténine ne se produit plus, et l'augmentation des niveaux cytoplasmiques de β -caténine favorise sa translocation vers le noyau, où la transcription de plusieurs gènes est initiée par le déplacement de Groucho et l'interaction de β -caténine avec TCF / facteur activateur de lymphoïde (LEF) de la famille des facteurs de transcription.

b) Les gènes K-ras/ B-raf /Pi3K

Le gène K-ras (Grady WM et al, 2002) est le principal proto-oncogène de la famille des gènes Ras impliqué dans le cancer du colon. Les gènes de la famille Ras codent des protéines hautement conservées de 21 kDa, impliquées dans la transduction du signal. L'organisation génétique de l'homologue murin (H-MSV) montre une séquence de 1,0 Kb hautement conservée du génome du rat, qui code la p21 spécifique, nécessaire pour la transformation induite par le virus. Chaque virus du sarcome murin (Ha-MSV et Ki-MSV) semble avoir son origine dans un événement de recombinaison entre le type de virus C d'aide indépendant et un virus de rat endogène défectif pour la réplication. Les gènes K-VSM et H-VSM partagent une homologie de séquence, cependant la séquence supplémentaire de K-VSM n'a pas de potentiel de transformation. La pathogénicité de ces deux virus est associée à l'acquisition des séquences génétiques chez le rat et peut être à la recombinaison avec des séquences de souris à l'extrémité 3' de l'ARN viral. La transformation cellulaire est dépendante d'une séquence génétique définie, sous le contrôle d'un répresseur dont l'activité peut être réprimée par des facteurs génétiques de l'hôte ou des facteurs environnementaux (Huebner RJ et al, 1969 ; Shih TY et al, 1978 ; DeFeo D et al, 1981).

Une des fonctions majeures de la protéine de la famille Ras est son couplage à la protéine Raf, protéine qui active la voie MAP (*mitogen-activated protein*) kinase, voie de transduction du signal qui favorise l'expression de gènes du cycle cellulaire et du métabolisme (Bokoch GM et al, 1993). Le gène K-ras reste le plus affecté des gènes de la famille Ras dans le cancer du colon, cependant des mutations du gène N-ras sont aussi observées avec un faible pourcentage (Fearon ER, 1995). Le gène K-ras comporte quatre exons et code une protéine de 188 ou 189 acides aminés selon que le 4^e exon est alternativement épissé ou pas (Barbacid M, 1987). Le produit du gène K-ras, la p21 est une GTPase qui stimule la prolifération cellulaire. Cette activité de la protéine p21 passe par sa liaison avec une molécule de GTP, forme active. Une fois le signal transmis, la protéine p21 devient inactive par hydrolyse du GTP donnant du GDP (Grady WM et al, 2002 ; Arends JW, 2000).

Les mutations du gène K-ras inactivent l'activité GTPase de la protéine et la maintiennent en permanence dans un état actif (Barbacid M, 1987 ; Bos JL, 1987). Les principales mutations observées dans les pathologies cancéreuses intéressent le plus souvent les codons 12, 13 et

61, codons qui correspondent au domaine de liaison de la molécule Guanosine tri ou diphosphate à la protéine (Grady WM et al, 2002). Le codon 12 est le plus affecté dans le cancer colorectal (Vogelstein B et al, 1988).

Les mutations du gène K-ras sont présentes dans 37 à 41% des carcinomes coliques et s'observent au stade précoce de la formation du cancer (Arber N et al, 2000 ; Bos JL et al, 1987). Selon (Vogelstein B et al, 1988) 58% des adénomes de plus de 1cm présentent des anomalies de K-ras et seulement 9% des adénomes lorsque la taille fait moins de 1 cm. Les anomalies du gène K-ras semblent survenir après celles du gène APC et sont associées à des lésions adénomateuses avancées (Grady WM et al, 2002). C'est ce que laissent apparaître certaines études qui montrent que 20% de petits adénomes présentent des mutations du gène APC et K-ras alors que 50% d'adénomes à un stade avancé présentent une mutation K-ras (Powell SM et al, 1992 ; Tsao J et al, 1994). Il convient donc de retenir que les mutations du gène K-ras s'observent fréquemment dans les cancers du colon, et augmentent au fur et à mesure de leur progression ((Vogelstein B et al, 1988 ; Shibata D et al, 1993).

Les anomalies du gène K-ras semblent promouvoir la formation précoce du cancer du colon au stade d'adénome–carcinome mais ne s'avèrent pas nécessaire à sa transformation en adénocarcinome (Grady WM et al, 2002). Par ailleurs, le gène K-ras est impliqué dans la voie EGFR-Ras-Raf-Erk-Jun/Fos, (figure 4), qui active les voies de signalisation et peut aussi inhiber l'apoptose par phosphorylation de la pro-caspase-9 (Arends JW, 2000).

Le gène B-raf, qui est aussi un proto-oncogène très proche du gène K-ras, se trouve dans la même voie de signalisation (figure 4). Les mutations activatrices de B-raf et K-ras sont mutuellement exclusives dans le cancer du colon. B-raf est muté dans 6% des cancers colorectaux. Par contre, les mutations du gène Pi3K (phosphatidylinositol-3'-kinase), fréquemment muté dans les cancers du colon, peuvent coexister avec une mutation soit du gène B-raf, soit du gène K-ras (figure 4).

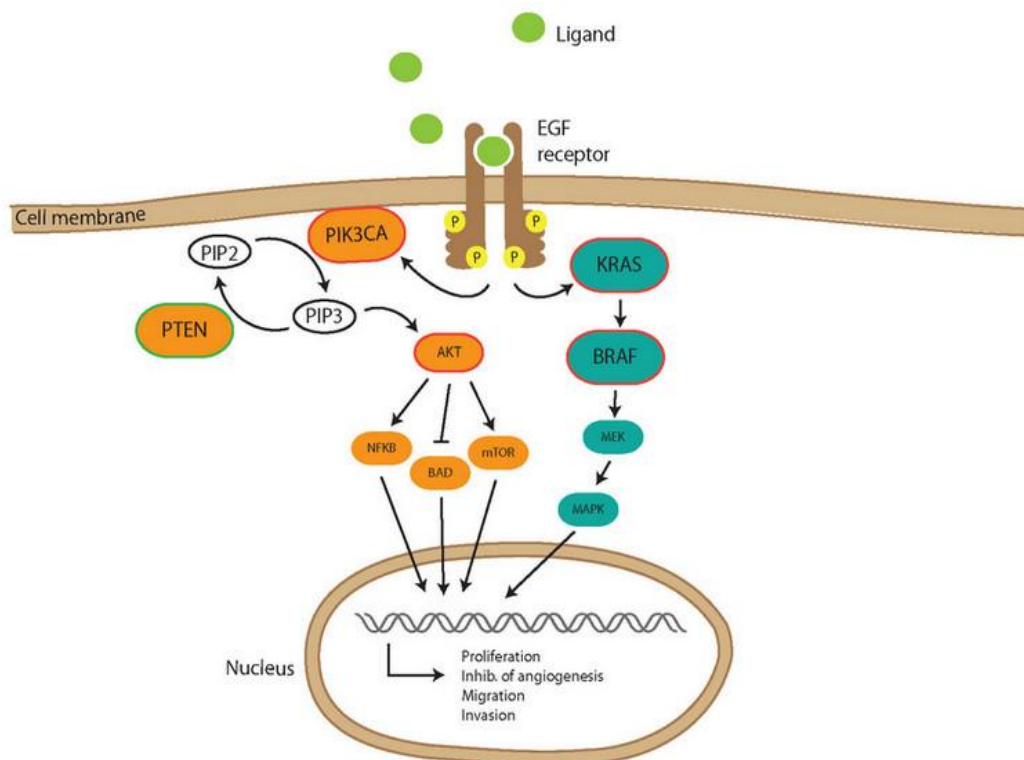


Figure 4: La Voie de signalisation B-raf/Kras/Pi3K (Berg M et al, 2012)

Le ligand se lie au domaine extracellulaire du récepteur et entraîne la dimérisation du récepteur et la phosphorylation des domaines intracellulaires. EGFR activé conduit à l'activation de l'oncogène K-ras, qui active à son tour active l'oncogène BRAF, puis la kinase activée par le mitogène (MEK), et la protéine kinase activée par le mitogène (MAPK), et conduit à l'expression de gènes favorisant la croissance. En plus de l'activation de KRAS, EGFR active l'oncogène Pi3K qui phosphoryle le phosphatidylinositol-2-phosphate (PIP 2) en phosphatidylinositol-3-phosphate (PIP 3), qui à son tour active AKT et plusieurs effecteurs en aval, ce qui conduit à la synthèse de protéines de la croissance et de la survie des cellules, de la prolifération, de la migration et de l'angiogénèse.

c) Les gènes de réparation des mésappariements (MMR)

Le système de réparation des mésappariements ou *mitsmach repair* (système MMR) fut caractérisé chez la bactérie au début des années 1990 (Boland CR et al, 2010). C'est un système très conservé de la bactérie aux mammifères qui contrôle la fidélité de la réplication de l'ADN à la phase S du cycle cellulaire. L'intégrité de l'information génétique dépend de cette fidélité de la réplication de l'ADN mais aussi de l'efficacité d'une variété de mécanismes de réparation de l'ADN.

Pour tous ces mécanismes de réparation de l'ADN, le procédé général consiste à la reconnaissance et à la correction des erreurs de substitutions et d'insertions ou de délétions de bases. Les principales protéines impliquées dans ce système de réparation des mésappariements de la bactérie aux mammifères sont résumées dans le **tableau II**.

Tableau II : Le système de réparation des mésappariements (Kunkel TA et al, 2005).

| Protéines d'E. coli | Homologues Humains | Fonctions |
|-----------------------------|--|--|
| MutS | MSH2-MSH6 (MutS α) | Réparation d'une seule base ou insertion/délétion 1-2 bases |
| | MSH2-MSH3 (MutS β) | Réparation et insertion d'une ou/plus de 2 bases |
| MutL | MLH1-PMS2 (MutL α) | Réparation des décalages liaison avec les homologues de MutS pour la réparation de l'ADN synthétisé. |
| | MLH1 –PMS1 (MutL β) | Suppression des boucles insertion/délétion |
| | MLH1 –MLH3 (MutL γ) | Participe à la mutagenèse et Participe à la méiose |
| γ - δ complex | Complexe RCF | Fonction inconnue, lie le PCNA et module la polarité de l'excision |
| β -clamp | PCNA | Interagit avec MutS et MutL homologues Recrute les protéines MMR pour les mésappariements |
| Helicase II | | Augmente la spécificité de liaison de MSH2-MSH6 Participe à l'excision et probablement à la signalisation |
| ExoI | Exonucléase 1 (Rft1) | Participe à la synthèse de réparation de l'ADN |
| ExoX | 3' exo of Pol δ 3' exo of Pol ϵ | Excision des mésappariements dans les deux sens |
| RecJ ExoVII | | Excision de l'ADN simple brin Synergique mutateur avec Exo 1 |
| DNA-pol III | DNA pol δ | Resynthèse de l'ADN |
| SSB | RPA | Participe à l'excision et à la synthèse de l'ADN |
| DNA ligase | DNA ligase | Lie les extrémités de l'ADN |

d) Les gènes MMR chez l'homme

Le système de réparation des mésappariements des eucaryotes est semblable à celui de *Escherichia Coli* mais les protéines impliquées dans le mécanisme de réparation peuvent différer suivant la nature de l'erreur mais aussi suivant la base à enlever (Modrich P et al, 1996 ; Kolodner RD et al, 1999 ; Buermeyer AB et al, 1999 ; Harfe BD et al, 2000 ; Jiricny J et al, 2003 ; Kunkel TA et al, 2005). C'est une famille d'enzymes composée de trois protéines principales chez la bactérie : MutS, MutL et MutH. Chez les mammifères, il existe 5 homologues de MutS (MSH2–MSH6), 4 homologues de MutL (MLH1, MLH3, PMS1 et PMS2) et pas d'homologie connue pour MutH.

Chacun de ces gènes a divergé des séquences d'origine de MutS et MutL et est associé à des fonctions spécifiques de réparation de l'ADN nucléaire durant la méiose ou de l'ADN mitochondrial (Boland CR et al, 2010). Le fonctionnement du système n'est pas totalement connu chez les eucaryotes, par contre contrairement aux procaryotes, les équivalents de MutS et MutL fonctionnent sous la forme d'hétérodimères et non d'homodimères. MSH2 peut former des hétérodimères avec MSH6 ou MSH3, donnant respectivement MutS α et MutS β . Ces hétérodimères reconnaissent différemment les mésappariements, MutS α est principalement responsable de la correction des erreurs dues à une seule base tandis que MutS β , reconnaît les erreurs introduisant un décalage de lecture avec insertion ou délétion de plus d'une dizaine de nucléotides supplémentaires sur un brin, toutefois les deux complexes se partagent la correction des erreurs d'insertion/délétion d'une seule base (Kunkel TA et al, 2005 ; Boland CR et al, 2010).

D'autres homologues de MutS existent mais non représentés dans le tableau II, notamment MSH1 retrouvé dans la mitochondrie, nécessaire à la stabilité du génome mitochondrial mais également MSH4 et MSH5 impliqués dans la recombinaison méiotique (Modrich P et al, 1996 ; Kolodner RD et al, 1999 ; Kunkel TA et al, 2005). La phylogénie et l'évolution de MutS (figure 5) montrent que les protéines de la famille MutS dérivent d'un ancêtre mitochondrial MSH1, lui-même descendant d'un précurseur eucaryote primitif (Culligan KM et al, 2000). Les homologues de MutL (PMS1, PMS2) encore appelés *post-meiotic segregation-1 or-2* (ségrégation 1 ou 2 post-méiotique) sont identifiés chez la levure (Hamelin R et al, 2008). Les différents homologues de MutL forment également des hétérodimères : MutL α (MLH1-PMS2) humain intervient dans la correction de plusieurs erreurs, MutL β humain n'a pas de

fonction connue alors que MutLy participe à la fois à la correction de certaines erreurs dues à des délétions/insertions et à la recombinaison méiotique (Modrich P et al, 1996 ; Kolodner RD et al, 1999 ; Kunkel TA et al, 2005). Selon Kunkel (Kunkel TA et al, 2005), on n'a pas à ce jour démontré le rôle de l'hélicase dans la réparation des erreurs lors de la réplication de l'ADN. D'autres protéines telles que l'ADN polymérase δ , l'exonucléase 1, le *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) et des ligases sont également impliqués dans ce processus (Kolodner RD et al, 1999 ; Kunkel TA et al, 2005).

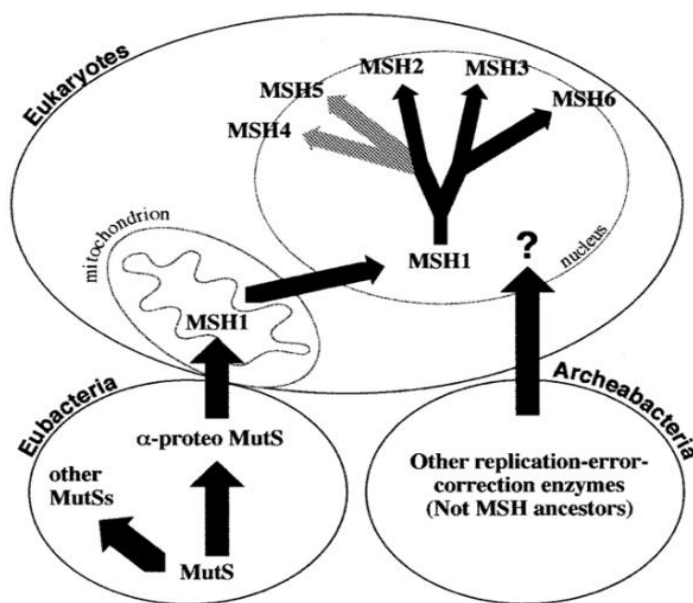


Figure 5 : Phylogénie et évolution de MutS (Culligan KM et al, 2000)

Les gènes MutS ont surgi et évolué dans les eubacteries, un gène mutS est transféré aux eucaryotes par des événements endosymbiotiques mitochondriales. Ce gène MSH1 est ensuite transféré au noyau lieu et est précurseur de tous les gènes eucaryotes MSH. Il n'y a pas de gènes MutS provenant des archéobactéries chez l'homme.

e) Les fonctions des gènes MMR

Le système de réparation des mésappariements (système MMR) contrôle les erreurs survenues lors de la réplication (surtout les mésappariements entre le nouveau brin et le brin parental de l'ADN). Ce système est illustré dans la figure 5 et fait intervenir plusieurs protéines (tableau II). La reconnaissance des mésappariements est assurée principalement par MutS α qui est présent à des taux plus importants que MutS β . Les mésappariements d'une seule base sont réparés par MutS α , la réparation d'insertions /délétions de plus de 10 bases est assurée par MutS β et les deux interviennent dans la correction des erreurs d'insertion/délétion d'une seule base (Kunkel TA et al, 2005 ; Boland CR et al, 2010).

La redondance partielle de MSH3 et MSH6 sur la réparation des erreurs de type insertion/délétion a des conséquences sur l'instabilité des microsatellites, et constitue l'un des traits phénotypiques clé des tumeurs MMR déficientes. MutL α agit avec les protéines de MutS dans l'excision des erreurs lors de la réplication, MutL β humain n'a pas de fonction connue alors que MutL γ participe à la fois à la correction de certaines erreurs dues à des délétions/insertions et à la recombinaison méiotique (Modrich P et al, 1996 ; Kolodner RD et al, 1999 ; Buermeyer AB et al, 1999 ; Kunkel TA et al, 2005). La perte du gène MLH1 entraîne une inactivation totale du système de réparation des mésappariements tandis que la perte de PMS2 peut être partiellement compensée par MLH3 (Boland CR et al, 2010).

En plus de son rôle dans la réparation des mésappariements lors de la phase S de réplication de l'ADN, le système MMR reconnaît certaines lésions de l'ADN consécutives aux radicaux libres oxygénés générés par les métabolismes intracellulaires (Kunkel TA et al, 2005) aux agents physiques et à certains polluants chimiques de l'environnement, y compris certaines drogues thérapeutiques (Kaina B, 2003 ; Karran P et al, 2003 ; Lee DF et al, 2004). Par conséquent, il est capable d'activer les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et le signal vers l'apoptose (Kaina B, 2003). Le système MMR participe aussi au blocage de l'expansion de la répétition des triplets chez la levure, à la suppression des recombinaisons, à la correction des erreurs de l'ADN double brin, et à l'intervention à différentes étapes de la méiose (Modrich P et al, 1996 ; Harfe BD et al, 2000). Paradoxalement, l'inactivation des gènes

MMR dans des modèles murins confère par hypermutation somatique et recombinaison de commutation aux cellules B un avantage dans l'évolution et la diversité des gènes d'immunoglobines (Harfe BD et al, 2000 ; Kunkel TA et al, 2005).

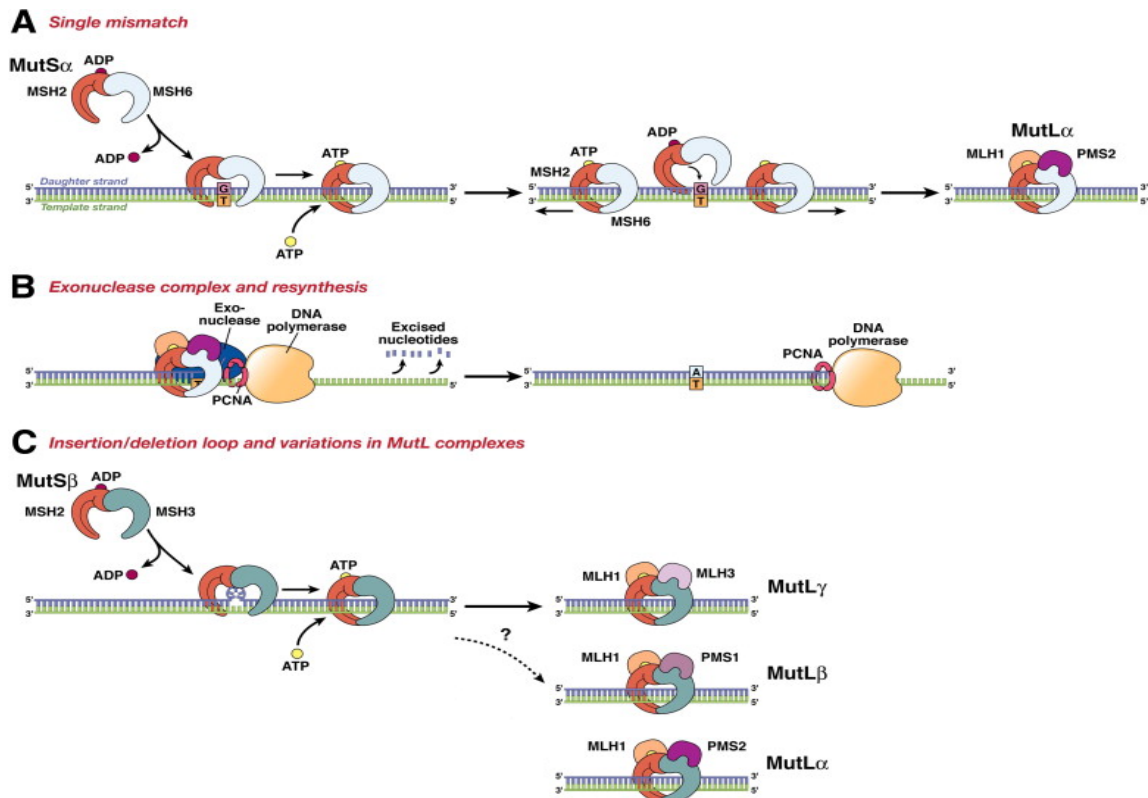


Figure 6 : Rôle des différentes enzymes du système MMR (Boland CR et al, 2010)

Le système fonctionne de MMR d'ADN à travers une série d'étapes. (A) MSH2-MSH6 (MutS α) reconnaît simples décalages de paires de bases, dans lequel l'ADN polymérase a été calqué sur la mauvaise base (G) avec le T sur le modèle (indiqué sur la gauche), et crée une boucle reconnue par MutL α

B : l'exonucléase agit avec le *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) et des ligases dans la synthèse du brin réparé

C : MutS β , reconnaît les erreurs introduisant un décalage avec insertion ou délétion de base

L'inactivation du système MMR peut être permanente ou transitoire, transitoire lorsque l'activité de réplication inexacte des protéines est limitée dans un temps relativement court, ou lorsque les cellules subissent un stress et ou sont en phase stationnaire. Cette inactivation (figure 7) peut se faire par plusieurs processus et peut entraîner des conséquences biologiques qui peuvent être bénéfiques ou néfastes (Kunkel TA et al, 2005). L'inactivation du système MMR se fait par délétion ou insertion d'une ou deux paires de bases dans une répétition codante. Il s'agit de mutations constitutionnelles qui affectent 90% des patients présentant un HNPCC. L'accumulation des mutations dans les séquences répétées codantes peut conduire à un décalage du cadre de lecture et à la formation de protéines tronquées. L'autre voie d'inactivation retrouvée dans les tumeurs somatiques est la perte d'expression du gène MLH1 secondaire à la méthylation de sa région promotrice (Peltomaki P, 1997 ; Hamelin R et al, 2008 ; Boland CR et al, 2010). Les mutations constitutionnelles ou acquises de ces gènes confèrent aux tumeurs une instabilité au niveau des séquences hautement répétées du génome, les microsatellites, ouvrant la voie à l'instabilité microsatellite.

f) Les conséquences du déficit des gènes MMR

Une des conséquences est l'augmentation du taux de mutation dans le génome consécutive à une accumulation des erreurs non réparées. Lors de la réplication de l'ADN, surtout la réplication des longues séquences répétitives telles les microsatellites, le glissement de séquences répétées crée une boucle qui peut être reconnue et réparée par le système. Lorsque le système est déficient, l'erreur persiste. Si l'erreur consiste en un seul nucléotide, il s'agit d'une mutation ponctuelle alors qu'une boucle peut entraîner un décalage du cadre de lecture qui habituellement conduit à une mutation non sens en aval de l'erreur. La conséquence serait la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle à la base de l'instabilité des microsatellites (Hamelin R et al, 2008 ; Boland CR et al, 2010) (figure 8). Cette instabilité des microsatellites peut conduire à des maladies humaines, principalement des maladies neurologiques et des cancers (Li YC et al, 2004).

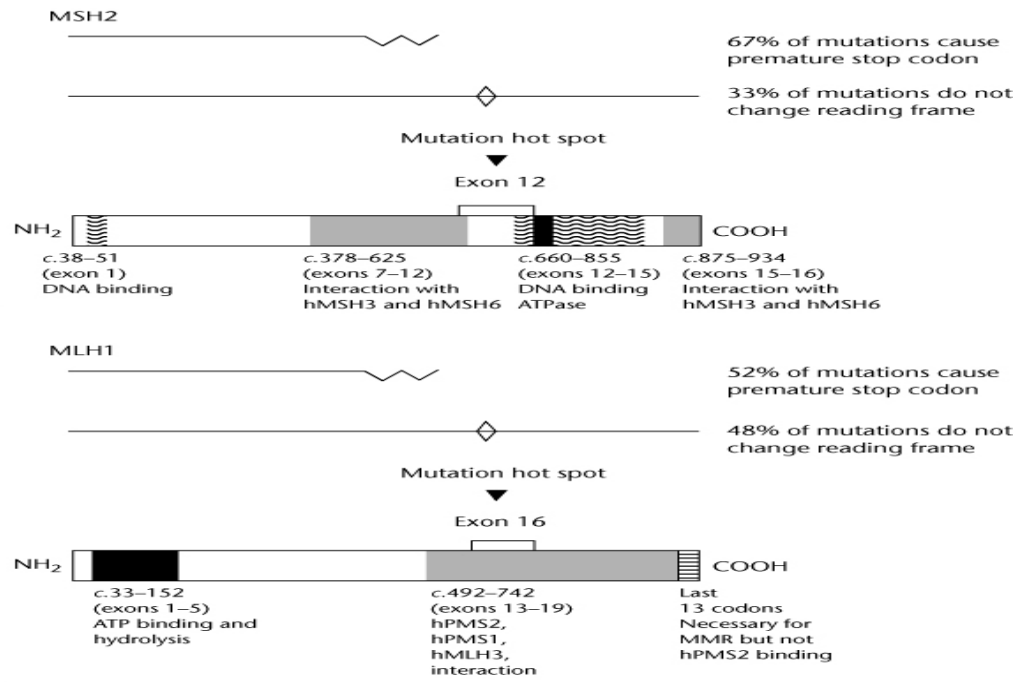


Figure 7 : Mutations de deux gènes du système MMR (Peltomaki P et al, 1997)

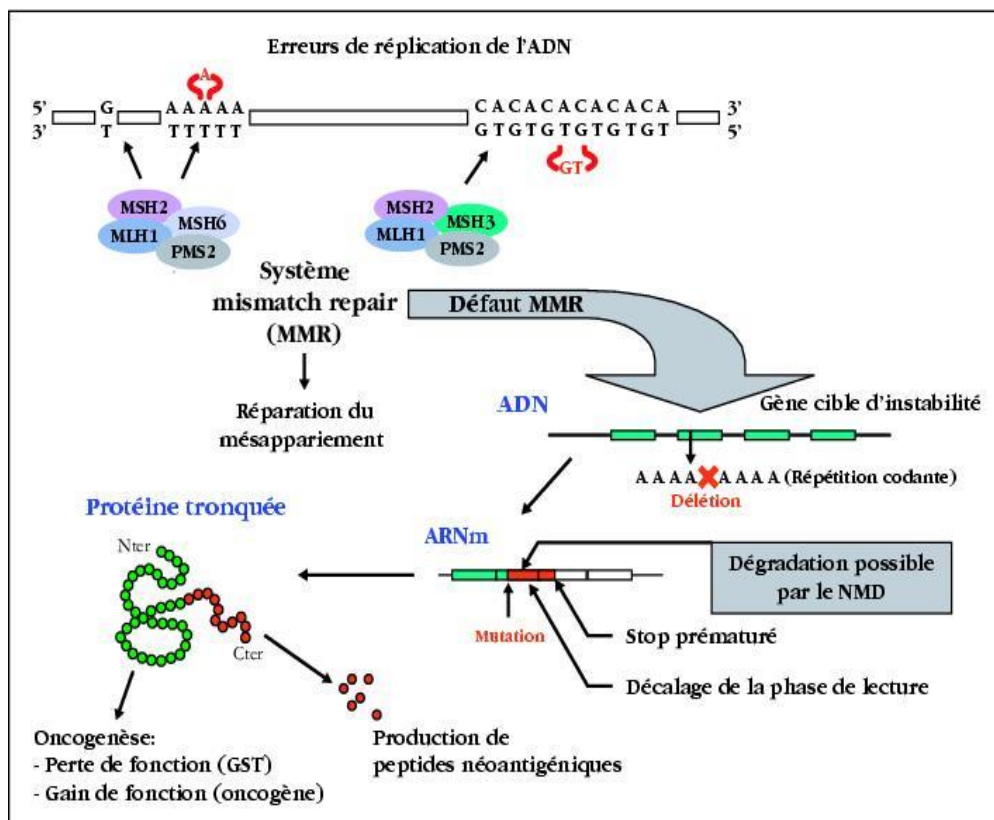


Figure 8 : Conséquences de l'inactivation du système MMR (Hamelin R et al, 2008)

Du fait de l'implication du système MMR dans les lésions de l'ADN secondaires à des agressions aussi bien endogènes qu'exogènes (stress oxydatif, agents physiques et chimiques), l'inactivation du système va se traduire aussi par une baisse de l'entrée des cellules lésées en apoptose, une augmentation de la survie cellulaire et une résistance aux agents de chimiothérapie (Karran P et al, 2003 ; Kaina B, 2003 ; Bignami M et al 2003).

Par ailleurs, cette incapacité du système à réparer les erreurs issues des lésions de l'ADN ou des mésappariements augmente le potentiel mutagène des cellules ayant un déficit du système MMR (Kunkel TA et al, 2005) qui selon Fishel (Fishel R, 2001) contribue à un avantage sélectif de croissance de ces dernières lors du processus de la carcinogénèse.

Les altérations du système MMR peuvent entraîner des phénomènes de réarrangements, l'élongation des télomères par un mécanisme indépendant de la télomérase, favoriser l'échange de séquences partiellement homologues et l'infertilité (Kunkel TA et al, 2005).

Paradoxalement, des études ont montré que chez des souris déficientes en MSH2, MSH3 et PMS2, la fréquence de l'expansion des triplets CAG diminue.

4) L'Instabilité génomique

La perte de la stabilité génomique semble être une étape importante qui se produit au début du processus du développement du cancer et tend à créer un environnement permissif pour la survenue d'altérations de gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes (Grady WM, 2004). Cette perte de stabilité du génome est consécutive à une instabilité chromosomique et/ou à une instabilité des microsatellites.

a) L'Instabilité des microsatellites

1) La Distribution des microsatellites

Les microsatellites sont de petites séquences d'ADN répétées dispersées à travers le génome. Le microsatellite le plus fréquent chez l'homme est une répétition de dinucléotides de type adénine-cytosine (CA)_n dispersée sur plusieurs milliers de sites (Soreide K et al, 2009). Selon Li (Li YC et al, 2004), la distribution génomique des microsatellites est non aléatoire en raison probablement de leur rôle dans l'organisation de la chromatine, la régulation de l'activité des gènes, la réplication de l'ADN, le cycle cellulaire et le système

MMR entre autres. La fréquence accrue de répétitions de triplets au dépend des mono et dinucléotides dans les séquences codantes de beaucoup d'organismes est le témoin aussi d'une sélection probable de ces triplets (Toth G et al, 2000 ; Wren JD et al, 2000 ; Cordeiro GM et al, 2001). Cependant leur présence dans les régions codantes ne semble pas perturber le cadre de lecture (Li YC et al, 2004) d'abord du fait que plus de 92 % des polymorphismes des microsatellites attendus dans les régions codantes sont des multiples de trois, ensuite les répétitions dans les exons sont surtout des triplets et des hexanucléotides. Toutefois, la répétition des triplets est deux fois plus fréquente dans les exons que dans les régions introniques et intergéniques, sauf sur le chromosome Y (Subramanian S et al, 2003). Une telle fréquence peut s'expliquer par la suppression des répétitions autres que des triplets dans les régions codantes (Metzgar D et al, 2000).

2) Nature des microsatellites

La présence des séquences répétées présente aussi un biais suivant la composition des nucléotides. Ainsi, les répétitions de type AT sont plus fréquentes (11,8%) que celles GC (0,7%) parmi 45 425 séquences codantes de l'homme (Li YC et al, 2004).

La fréquence de répétitions de certains triplets dépend aussi des espèces, ainsi chez les mammifères, la répétition du triplet CAG est semblable chez la levure, cependant le triplet AAT est fréquent chez la levure mais ne l'est pas chez le mammifère où prédomine le triplet GGC (Stallings RL, 1994).

Chez l'homme, les séquences répétées des régions 5' et 3' non traduites des gènes, sont plus sous forme de monomères et dimères que celles des séquences codantes (Wren JD et al, 2000). Cependant, la région 5' présente plus de triplets que la région 3' (31,1% /4,6%) et sur 136 triplets répétés identifiés dans l'ADNc de l'homme les 100 sont de nature CGG ou CCG (Wren JD et al, 2000).

Les séquences introniques ont un motif de répétition identique à l'ADN génomique, qui se présente sous forme de monomères et /ou de dimères chez différentes espèces (Li YC et al, 2004). La composition en bases présente également un biais, une répétition monomérique (A/T)_n, un motif dimérique AC/GT de 46%-67,5% chez plusieurs espèces.

L'explication à cette sélection reste méconnue (Li YC et al, 2004). Le triplet ACG est complètement absent chez toutes les espèces dont les mammifères de même que le motif (CCG/CGG)_n qui lui est présent chez les champignons (Toth G et al, 2000). L'absence de ces

triplets dans les introns peut s'expliquer par la présence d'une fréquente mutation du dinucléotide CG au sein de ces motifs, ou encore de leur recrutement ou leur compétition lors de l'épissage pouvant conduire à un épissage anormal (Li YC et al, 2004).

En plus, le motif CCG a un potentiel élevé pour former des complexes en épingles à cheveux et boucles et peut influencer la structure secondaire du messager primaire, interférer sur la précision et l'efficacité de l'épissage et ainsi moduler la formation de l'ARN mature (Toth G et al 2000).

Les microsatellites des séquences non transcrites comme les microsatellites des séquences exprimées présentent un taux élevé de mutation (Li YC et al, 2004). Cette observation est due au fait que le polymorphisme le plus fréquent rencontré dans les gènes humains est un polymorphisme de répétition de longueur (allongement et ou raccourcissement de séquences) indiquant qu'un tel processus découle d'événements importants de l'évolution moléculaire qui par ailleurs tend à accroître la complexité biologique, témoin de l'évolution (Li YC et al, 2004).

Tableau III : Les Fonctions des Microsatellites

| Homme | Séquences répétées | Gènes | Fonction | Maladie |
|-------|--------------------|--|---|---|
| Codon | (CAG) _n | HD | Expansion triplets | Maladie de Huntington |
| | (CAG) _n | KR | Expansion triplets | Atrophie spino bulbomusculaire |
| | (CAG) _n | SCA | Expansion triplets | Ataxie spinoceérébelleuse |
| | (A) _n | Gènes MMR hMSH2, hMLH1, hMSH6, hPMS1,hPMS2 | Inactivation MMR Décalage + modifications taille des répétitions | genes Cancers colon, gastrique, langue et endomètre |
| | (A) _n | Gènes MMR MBD4/MED1 | Inactivation MMR Décalage + modifications taille des répétitions | genes Cancers colon, endomètre, pancréas et gastrique |

3) Mécanisme de l'instabilité des microsatellites

L'inactivation du système MMR est due principalement à un décalage de la répétition nucléotidique de type (A)_n localisé dans les exons des gènes du système MMR (Duval A et al, 2002). Lors de la réplication de l'ADN, les erreurs de réplication par glissement de la polymérase, les mésappariements dus à l'incorporation de base anormale ou absence d'une ou de plusieurs bases sont corrigés par le système réparateur de mésappariements, le système MMR. Néanmoins, un déficit quelconque de ce mécanisme de réparation par inactivation conduit à une variation dans la taille de ces microsatellites à l'origine d'une instabilité, et peut entraîner la survenue de cancer ou d'autres pathologies. (Tableau III) (Li Y C et al, 2004).

Il est probable que les gènes contenant des séquences répétées peuvent être mutés au sein de ces répétitions et conduire à des mutations de décalage (Duval A et al, 2002) et les protéines de ces gènes suppresseurs de tumeurs représentent des cibles privilégiées de la voie de mutation associée à la carcinogenèse (Li YC et al, 2004).

La présence de telles anomalies semble être le mécanisme par lequel les cellules MSI-H accumulent des changements avec d'éventuels effets oncogènes. Ces mutations se produisent à des fréquences variables dans les gènes dont les produits sont impliqués dans la transduction du signal, les facteurs de croissance, l'apoptose, et le système MMR (Li YC et al, 2004). Une simple variation dans la taille des séquences codantes, ou non codantes, comme des régions régulatrices de ces gènes, peut affecter l'activité du gène normal et donc le produit du gène et peut avoir une traduction phénotypique (Li YC et al, 2004) (Tableau III). Beaucoup d'études ont montré que les répétitions situées dans les introns et les régions non transcrites peuvent réguler l'expression des gènes (Kashi Y et al, 1997 ; Li YC et al, 2004 ; Trifonov EN et al, 2003). La conservation des séquences répétées dans les régions non transcrites est inversement proportionnelle à leur longueur, les longues répétitions sont plus polymorphes que les courtes (Suraweera N et al, 2001). Les séquences répétées des régions non transcrites sont fréquemment délétées dans les tumeurs MSI-H, et la longueur moyenne de la séquence supprimée est corrélée à la longueur des répétitions mononucléotidiques de ces régions (Suraweera N et al, 2001).

- Dans la région 5' non transcrite, les séquences répétées peuvent :
 - Réguler l'expression de certains gènes : le gène de la calmoduline humaine contient une répétition stable dans la région 5' non transcrite (CAG)⁷ qui réduit de 45% l'expression du gène lorsqu'elle est délétée (Toutenhoofd SL et al, 1998).
 - Servir de sites de liaison aux facteurs de la transcription, permettant ainsi de réguler la traduction des gènes et la fonction des protéines. Les études expérimentales ont montré que le facteur de transcription C/EBP β dispose de séquences répétées entre deux sites d'initiation de la traduction qui pourraient réguler par épissage alternatif, la production de plusieurs isoformes du C/EBP β (Calkhoven CF et al, 1994).
 - Favoriser certaines pathologies humaines, notamment la maladie de l'X fragile. L'expansion de la répétition (CGG) ≥ 200 est associée à une absence de la protéine qui conduit à la maladie avec un retard mental chez les porteurs est négativement corrélée avec le nombre de répétitions (Kenneson A et al, 2001).
 - Au sein de la région 3' du gène, la présence de répétitions peut :
 - Favoriser l'apparition de maladies humaines telles que la dystrophie myotonique de type 1 qui est une maladie neuromusculaire à transmission autosomique dominant causée par la répétition de triplets de type CTG dans la région 3' du gène (Ranum et al, 2002). L'expansion de la répétition en 3' est un régulateur négatif sur la synthèse de la protéine et peut-être considérée comme responsable de l'absence de la différenciation neuronale (Quintero MML et al, 2002).
 - Dans les introns, les séquences répétées peuvent (Li YC et al, 2004) :
 - Affecter le taux d'expression des gènes et conduire à des pathologies humaines comme l'ataxie de Friedreich ou le cancer du sein
 - Moduler le mécanisme de l'épissage, la répétition GT de l'intron 2 du gène NCX1 est impliqué dans l'activation de l'épissage
 - Empêcher l'exportation du produit du gène vers le cytoplasme
 - Dans les séquences codantes, l'inactivation des séquences répétées des gènes conduit à la production d'une protéine anormale qui peut se traduire par un tableau clinique neurologique ou un cancer.

4) *Les conséquences de l'instabilité des microsatellites*

Les désordres neurologiques et les cancers chez l'homme secondaires à des variations de ces séquences ont été décrits :

➤ **Les troubles neurologiques**

L'instabilité et l'expansion des triplets est à l'origine de beaucoup de pathologies humaines à prédominance neurologique. Le motif répété le plus en cause est le triplet CAG qui code la glutamine. Les maladies héréditaires dominent avec entre autres la maladie de Huntington, l'atrophie spino-bulbo-musculaire et l'ataxie spino-cérébelleuse. Ce sont des maladies progressives, survenant à la quarantaine, un dysfonctionnement neuronal progressif avec habituellement une perte neuronale 10 à 20 ans après le début des symptômes. Une caractéristique de ces maladies est le phénomène d'anticipation de la maladie avec un début d'apparition de plus en plus précoce en rapport avec le degré de sévérité de la maladie et une répétition exponentielle particulièrement marquée en cas de transmission paternelle (Li YC et al, 2004). L'instabilité peut résulter d'une mutation somatique ou germinale.

➤ **Autres pathologies liées au triplet CAG**

Des mutations impliquant le triplet CAG au niveau du récepteur de l'androgène est associé au risque de carcinome hépatocellulaire dû au virus de l'hépatite B, du cancer de la prostate et à la maladie de Kennedy entre autres.

➤ **L'Inactivation des gènes MMR**

Les variations dans les régions codantes des microsatellites inactivent les gènes du système MMR et sont à l'origine de beaucoup de tumeurs instables. L'inactivation mutationnelle résulte principalement du décalage au niveau de la répétition (A)_n localisé dans les exons des gènes MMR (Duval A et al, 2002). Chez l'homme, toute inactivation des gènes MMR pourrait être à l'origine d'une instabilité des microsatellites et se traduire par des tumeurs ou d'autres pathologies (Li YC et al, 2004). L'instabilité des microsatellites survient chez 90% des cancers héréditaires non polyposiques (HNPCC). Pour 15% des cancers sporadiques du colon, une autre voie d'inactivation des gènes MMR est nécessaire c'est la voie épigénétique qui résulte de la méthylation de la région promotrice du gène MLH1 (Yanagisawa Y et al, 2000). Certains gènes avec des séquences répétitives sont fréquemment altérés dans les tumeurs instables. Comme les gènes MMR, la présence de répétitions de type (A)_n dans les régions codantes de ces gènes conduit à un décalage dans les cellules déficientes en MMR.

Les produits codés par ces gènes dits gènes suppresseurs de tumeurs représentent des cibles privilégiés dans la carcinogenèse (Schwartz S et al, 1999).

Plusieurs tumeurs MSI-H présentent des mutations de décalage dans un ou plus de ces gènes hMSH3, hMSH6, BAX, IGFIIR, TGFbétalIR, E2F4 et BRCA2 (Li YC et al, 2004).

b) L'instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique (CIN) est l'une des voies qui mène à l'instabilité génomique dans les tumeurs du colon. Elle est caractérisée par une aneuploidie (perte ou gain de chromosomes) des cellules et des pertes alléliques fréquentes (Grady WM, 2004). L'instabilité chromosomique tend à favoriser la formation de la tumeur par perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs ou gain de fonction pour les oncogènes aux stades d'adénome-carcinome (Grady WM, 2004). Les bases moléculaires à l'origine d'une instabilité chromosomique restent mal connues dans la plupart des cancers humains (Lengauer C et al, 1998), elles viennent juste de se dessiner avec les études sur les microorganismes.

1) Les mécanismes de l'instabilité chromosomique

Le mécanisme de CIN a pu être élucidé pour la première fois à travers une étude sur les organismes unicellulaires comme la levure, présentant un système MMR déficient. Cette étude s'est intéressée à des gènes candidats qui interviennent comme régulateurs du fuseau mitotique ou de la réplication de l'ADN (Lengauer C et al, 1998 ; Grady WM, 2004 ; Grady WM et al, 2008) (figure 9). L'inactivation de ces gènes semble déterminante dans la survenue de l'instabilité chromosomique.

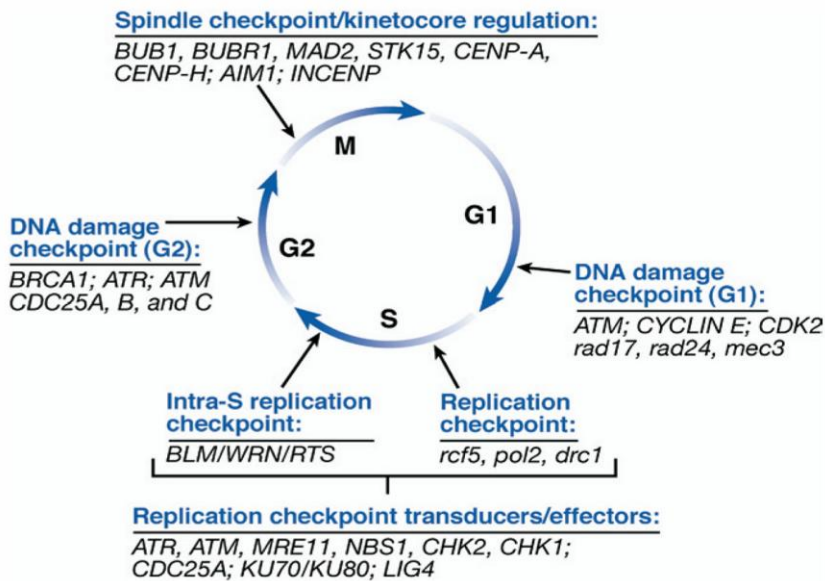


Figure 9 : Les gènes de régulation des différentes phases du cycle cellulaire (Grady WM et al, 2008)

Les différents points de contrôle du cycle cellulaire par rapport aux phases du cycle cellulaire. Les points de contrôle de dommage de l'ADN, de la réplication et de la mitose/ du fuseau et du kinétochore sont schématisés avec une liste de gènes du génome humain et du saccharomyces cerevisiae. Les protéines de la transduction du signal et les protéines effectrices sont affichées au niveau de la phase S. Les protéines listées au niveau des autres points de contrôle sont des protéines réceptrices, transductrices ou effectrices du signal.

Les gènes de contrôle du fuseau mitotique

Le point de contrôle du fuseau mitotique ou (*spindle checkpoint*) assure la fidélité de la transmission des chromosomes. Il surveille l'alignement correct des chromosomes sur le fuseau, inhibe leur répartition en chromatides et bloque la mitose en métaphase en cas d'anomalie (Amon A, 1999). Des études chez les organismes unicellulaires ont pu établir la relation entre instabilité chromosomique et les gènes de contrôle du fuseau mitotique (Lengauer C et al, 1998 ; Grady WM, 2004 ; Grady WM et al, 2008, Cahill DP et al, 1998). Certains gènes de ce point de contrôle, MAD ou BUB, identifiés chez la levure puis mutés dans certaines tumeurs du colon chez l'homme suggèrent une forte conservation (Grady WM et al, 2008). Les produits de ces gènes imposent l'arrêt du cycle par inhibition de l'activité ubiquitine ligase d'un complexe protéique appelé *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome* (APC/C) qui ubiquitinye certaines protéines dont la dégradation est nécessaire à l'entrée en anaphase (Amon A, 1999). Chez la levure, un défaut de contrôle du fuseau n'empêche pas la ségrégation de chromosomes anormaux à l'origine d'une instabilité

chromosomique. D'autre part, la sensibilité aux antagonistes de contrôle du fuseau et une entrée en phase S prématurée, traduisent l'incapacité des lignées CIN à déclencher l'arrêt du cycle (Cahill DP et al, 1998). Par ailleurs, l'expression du gène hMAD2 chez l'homme est diminuée dans les cancers du sein, alors que des mutations somatiques de hBUB1 et hBUBR1 sont observées dans les cancers colorectaux (Cahill DP et al, 1998). En outre, le gène hMAD1 est la cible de la protéine Tax, qui l'inactive dans la leucémie d'origine virale (Lengauer C et al, 1998).

Les gènes de contrôle des lésions de l'ADN

Le rôle de ce point de contrôle des lésions de l'ADN (DNA-damage checkpoint) est d'empêcher l'entrée en mitose à toute cellule présentant des lésions de l'ADN. Ce système de contrôle se distingue en système de contrôle des lésions secondaires aux agents génotoxiques endogènes comme exogènes et en système de contrôle de la fidélité de la réplication (Grady WM et al, 2008). Les produits de ces gènes sont spécialisés soit dans la reconnaissance des lésions, soit dans la transmission d'un signal aux protéines effectrices, ou alors sont régulateurs de l'arrêt ou de la progression du cycle et de la réparation de l'ADN (Grady WM et al, 2008).

Une inactivation des gènes de contrôle conduit à une recombinaison mitotique accrue et à une ségrégation chromosomique aberrante chez la levure alors qu'une ségrégation aberrante prédomine largement en cas de perte de contrôle du fuseau (Hartwell LH, 1985). Des gènes de contrôle de réparation des lésions de l'ADN identifiés chez la levure sont aussi incriminés dans des tumeurs de l'homme.

Dans leur majorité, les gènes identifiés réparent les lésions de l'ADN (la p53, BRCA1, BRCA2, ATM, ART) appartiennent à une famille de protéines kinases. Ils vont ainsi phosphoryler des protéines effectrices chargées de corriger les lésions avec la coopération d'autres facteurs au site de la lésion.

Les gènes chargés du contrôle de la réplication entraînent soit l'arrêt de la réplication ou permettent une faible réplication lorsqu'une erreur est détectée (Grady WM et al, 2008). Il est à noter toutefois que de tous les points de contrôle identifiés, le rôle de la p53 a été largement démontré dans le cancer du colon ainsi que sa participation en faveur de l'instabilité chromosomique (Grady WM et al, 2008).

La régulation par le centrosome

Il semble bien établi qu'en plus du dispositif de contrôle du fuseau, le centrosome joue un rôle important dans la ségrégation des chromosomes lors de la mitose. Ainsi, toute amplification ou surexpression du centrosome conduit à une augmentation de mitoses anormales et à une ségrégation chromosomique aberrante, voir une aneuploïdie (Grady WM et al, 2008). L'analyse des gènes du locus 20q13 montre un centrosome fréquemment amplifié à l'origine d'une instabilité chromosomique dans plusieurs types de cancers (Zhou M et al, 1998). Aussi, des études du gène STK15, un centrosome associé à une thréonine kinase qui assure la maturation du centrosome, du fuseau et la ségrégation des chromosomes chez la drosophile et *S. cervicae*, (Doxsey S, 1998 ; Glover DM et al, 1995), est surexprimé dans des lignées cellulaires de cancers du sein et du colon. Cette surexpression du gène STK15 peut induire l'aneuploidie dans les cellules cancéreuses (Zhou M et al, 1998 ; Bischoff JR et al, 1998). Par ailleurs une certaine association entre aneuploidie, anomalie de nombre de centrosomes et sévérité clinique de la maladie semble établie dans des cancers de la prostate et du sein (Grady WM et al, 2008). Enfin, dans des fibroblastes d'embryons de souris, l'inactivation de la p53 entraîne l'apparition de nombreux centrosomes (Fukasawa K et al, 1996).

2) Les télomères et la télomérase

Les télomères sont des structures spécialisées de la chromatine dont le rôle est de protéger l'extrémité des chromosomes de la dégradation et de la recombinaison, contrôlant ainsi la prolifération cellulaire et la stabilité et l'intégrité chromosomique (Bailey SM et al, 2006). C'est pourquoi, la perte de l'activité des télomères est une des voies principales de survenue des anomalies du chromosome à l'origine de l'instabilité chromosomique au tout début du processus tumoral (Hackett JA et al, 2001 ; Stewenius Y et al, 2005).

L'ADN télomérique chez l'homme est composé d'un hexanucléotide TTAGGG répété en tandem qui se raccourcit à chaque division cellulaire. Ce raccourcissement des télomères est impliqué dans les pathologies liées à l'âge, à la mort cellulaire et au cancer (Blasco MA, 2005).

Le dysfonctionnement des télomères fait suite à une altération des protéines associées aux télomères qui coiffent et protègent l'extrémité des chromosomes ou encore à des anomalies qui favorisent la perte progressive de la séquence répétée nécessaire pour maintenir l'intégrité du chromosome (Blasco MA, 2005 ; Bailey SM et al, 2006).

Dans le cancer, l'instabilité chromosomique secondaire à l'instabilité des télomères se traduit par la fusion des chromatides qui conduit à des amplifications, à de larges délétions, à des translocations et réarrangements des chromosomes (Bailey SM et al, 2006 ; Stewenius Y et al, 2005), alors qu'un tel état d'instabilité télomérique devait induire un arrêt de la division cellulaire. Ce qui suggère que l'inactivation des mécanismes de contrôle des dommages de l'ADN s'associe à cette instabilité télomérique. La longueur des télomères est stabilisée par l'activation de la télomérase dans les cellules tumorales (Kim NW et al, 1994 ; Frias C et al, 2009) ce qui par ailleurs entretient la progression tumorale.

Dans les cancers tout comme le cancer colorectal coexistent des télomères courts et des télomères longs (Cui Y et al, 2012) en rapport avec une activité importante de la télomérase (Engelhardt M et al, 1997 ; Frias C et al, 2009) qui augmente en fonction de la progression de la tumeur (Engelhardt M et al, 1997) et peut être considérée selon Frias (Frias C et al, 2009) comme marqueur de mauvais pronostic.

La recherche de l'instabilité chromosomique peut se faire grâce à des marqueurs notamment par l'analyse de la perte d'hétérozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH). Cette approche manque toutefois de standardisation. Plus récemment, l'Hybridation Génomique Comparative ou array-based comparative genomic hybridization (CGH-array) et le polymorphisme d'un simple nucléotide ou single nucleotide polymorphism (SNP) sont utilisés pour l'étude du nombre de gain/perte de copies ou la perte d'hétérozygotie. Le couplage des deux techniques présente une haute résolution pour l'étude de tout le génome (Ogino S et al, 2008) avec cependant une exigence de coût et de qualité de l'ADN étudié.

3) Instabilité des microsatellites/Instabilité chromosomique

Le cancer colorectal évolue selon deux voies distinctes, mutuellement exclusives, la voie de l'instabilité microsatellite et celle de l'instabilité chromosomique. Si la caractérisation de tumeurs MSI est devenue de plus en plus aisée grâce à une approche consensuelle sur la détermination de l'instabilité, le profil des 15% des tumeurs présentant une instabilité des microsatellites est ainsi bien structuré sur le plan clinique, évolutif et thérapeutique. Pour la

majorité des tumeurs présentant une instabilité chromosomique, les approches sont différentes et ne permettent pas de définir un phénotype CIN (Hamelin R et al, 2008). Alors existe-il une évolution parallèle ou croisée des deux voies ?

L'étude de certains gènes suppresseurs de tumeurs comme APC et p53 fréquemment mutés dans les cancers colorectaux avec une instabilité chromosomique le sont rarement dans les cancers MSI (figure 10). L'étude de Fang (Fang DC et al, 1999) sur des tumeurs gastriques renforce cette idée, il n'a pas retrouvé de perte allélique sur les tumeurs MSI-H, alors que les tumeurs MSI-L et MSS relevaient de ce mécanisme au niveau de 5q et 18q. Par contre, l'oncogène K-ras se trouve muté à la fois dans les tumeurs MSI et MSS et l'est davantage dans les tumeurs MSS. En effet, les tumeurs MSS sont en majorité caractérisées par des pertes et délétions de régions chromosomiques (1p, 5q, 8p, 14, 15, 17p, 18) ou de gains de chromosomes (7, 8q, 13q, 20q) par opposition aux tumeurs MSI généralement considérées comme diploïdes (Hamelin R et al, 2008 ; Douglas EJ et al, 2004). Toutefois, un gain de chromosome semble commun aux tumeurs MSI et laisse penser comme Hamelin le suggère (Hamelin R et al, 2008) que les tumeurs MSI présentent dans leur majorité une instabilité chromosomique modérée. Cette thèse est confirmée par l'étude de Muleris (Muleris M et al, 2008) qui a retrouvé dans des tumeurs MSI soit un caryotype normal soit un gain de chromosome alors que des tumeurs MSS présentaient les deux profils.

Il ressort de l'étude de (Goel A et al, 2003) que plus de la moitié de tumeurs MSS étudiées ne présentaient pas de perte allélique laissant penser à un chevauchement des voies MSI et CIN ou une entité de MSS à part. En revanche, la mutation de certains gènes tels que l'oncogène B-raf utilisé comme outil diagnostique dans la recherche de cancer héréditaire est muté dans 35% des cancers MSI. La présence d'une telle mutation exclut un cancer de type HNPCC et confirme la nature sporadique de la tumeur MSI. Alors que la β -caténine mutée, impliquée dans la voie APC- β -caténine-TCF s'associe plus aux tumeurs HNPCC qu'aux tumeurs MSI sporadiques. Enfin, avec des techniques de fusion et de transfection, CIN apparaît comme un trait dominant négatif pouvant résulter de mutations de gain de fonction (Cahill DP et al, 1998 ; Grady WM et al, 2008).

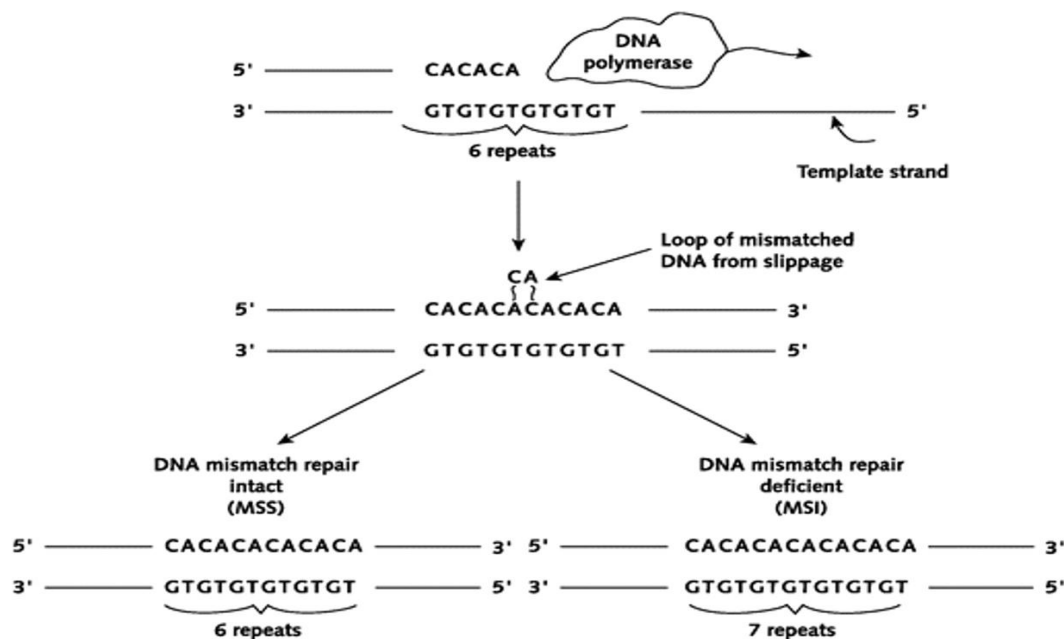


Figure 10 : Processus de l'instabilité des microsatellites (Chung DC et al, 2003)

L'ADN polymérase ajoute les bases complémentaires sur le brin complémentaire. Le glissement peut survenir au niveau des séquences microsatellites. Sur cet exemple, il y'a six répétitions CA, en raison d'un glissement une répétition CA supplémentaire est insérée résultant en une boucle. L'erreur est corrigée si le système MMR est intact et le microsatellite stabilisé, cependant si le système est déficient il n'y a pas de correction et l'instabilité des microsatellites s'installe.

c) La méthylation de l'ADN

La méthylation de la cytosine est la seule modification épigénétique identifiée chez les mammifères. Elle est présente dans tous les organismes, de la bactérie à l'homme. Elle est impliquée dans la régulation de plusieurs processus cellulaires. En effet, des cellules souches embryonnaires déficientes en enzymes de méthylation ne sont plus viables au stade de la différenciation, de même, la délétion d'une des enzymes de la méthylation chez la souris lui est fatale (Costello JF et al, 2001 ; Robertson KD, 2005).

1) Mécanisme de la méthylation

La méthylation est une réaction enzymatique d'addition d'un méthyle à l'extrémité 5' d'une cytosine située dans un dinucléotide CpG (Costello JF et al, 2001 ; Robertson KD, 2005). La méthylation est catalysée par les ADN méthyltransférases qui maintiennent les profils de méthylation en association avec des protéines liant les méthyl-CpG.

Le processus de la méthylation de l'ADN est assuré par des enzymes ADN méthyltransférases au nombre de trois : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B et débute précocement durant la période embryonnaire. Ils assurent le transfert d'un méthyle de la 5 S-adenosyl méthionine vers le 5' d'une cytosine située dans un dinucléotide CpG (Costello JF et al, 2001 ; Robertson KD, 2005 ; Szyf M, 2006) (figure 11).

Les trois enzymes possèdent cette activité de méthylation mais ont cependant une certaine spécificité de substrat. Ainsi, l'ADNMT1 ou méthylase d'entretien est ubiquitaire ; elle a pour cible l'ADN hémiméthylé et copie le modèle de méthylation de l'ADN parental au brin nouvellement synthétisé ; alors que les deux autres assurent la méthylation de novo quelque soit l'état de méthylation du brin parental. Il convient d'après les expériences de retenir que l'absence totale de la méthylation de novo nécessite la suppression de l'activité aussi bien de DNMT3B et DNMT1, suggérant bien l'implication de ce dernier dans le processus.

Les antagonistes de ces enzymes ou déméthylases sont aussi nécessaires lors de certains processus du développement, comme la réplication de l'ADN (Costello JF et al, 2001 ; Szyf M, 2006 ; D'Alessio AC et al, 2006).

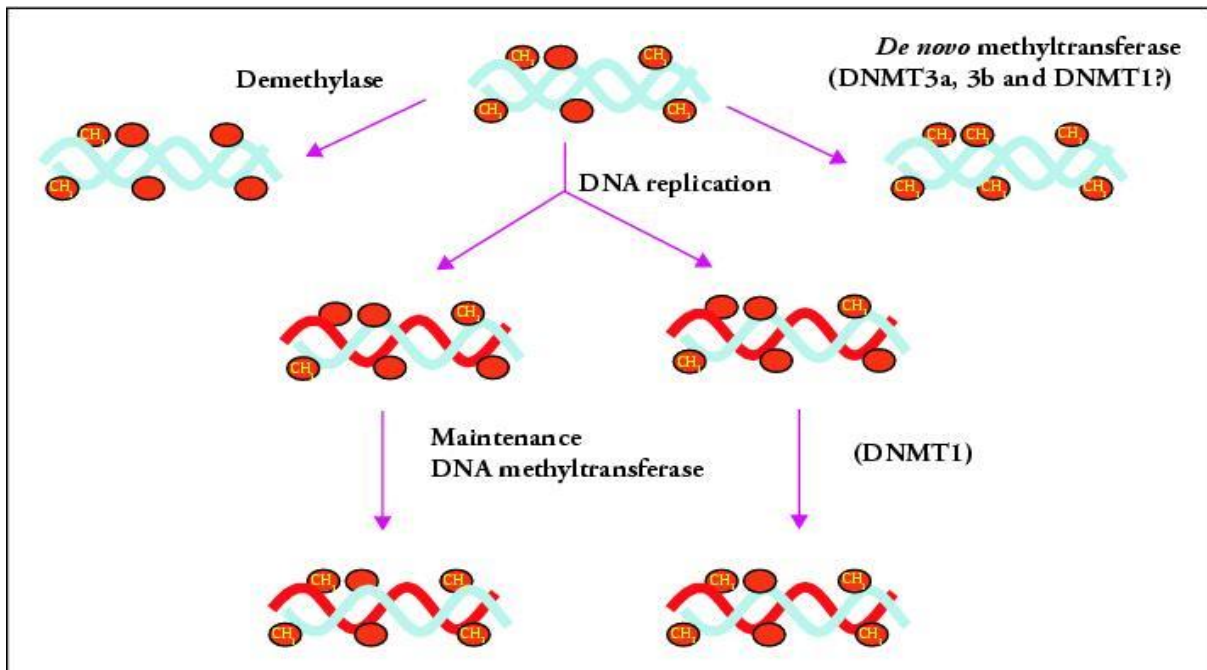


Figure 11 : L'action des ADN méthyltransférases (Szyf M, 2006)

Les ADN méthyltransférases catalysent le transfert de groupes méthyl sur l'ADN. Les méthyltransférases de Novo introduisent des groupes méthyl sur des sites CpG (indiqué par un cercle) qui n'ont pas été précédemment méthylés sur les brins matrices parentales de l'ADN. Tous les ADN possèdent une activité de méthylation de novo cependant, l'ADN méthyltransférase1 (DNMT1) est inefficace dans la méthylation de novo. Les déméthylases suppriment des groupes méthyles pour créer des sites CG non méthylés. Une fois que le motif de méthylation de l'ADN est assuré par les methyltransferases de novo et les déméthylases, il est maintenu lors de la réplication de l'ADN par de l'ADN méthyltransférase d'entretien. L'enzyme recopie le motif de méthylation de l'ADN à partir du brin matrice.

2) Distribution de la méthylation

Dans les cellules normales, la méthylation de l'ADN prédomine dans les séquences répétées du génome notamment l'ADN satellite, les séquences LINES et SINES et les rétrovirus endogènes. La méthylation des régions pauvres en gènes comme celle de l'hétérochromatine péricentromérique semble nécessaire à la conformation et à l'intégrité du chromosome. Elle est aussi présente dans les régions codantes (exons, introns) et les régions intergéniques.

Les îlots CpG représentent 1-2% du génome soit un total de 29 000 îlots répartis sur le génome prédominant surtout au niveau de la région promotrice des gènes et/ou des exons (Costello JF et al, 2001). La plupart des îlots sont des sites d'initiation de la transcription, représentent un domaine conservé de la souris à l'homme, le reste est distribué à l'intérieur et entre les gènes (Deaton AM et al, 2011) (figure 12). Dans l'organisme, environ 50- 60% des gènes contiennent des îlots CpG en dehors des gènes soumis à une empreinte ou encore des gènes situés sur le chromosome X inactif de la femme.

Les îlots CpG surtout ceux situés dans les régions promotrices sont généralement non méthylés (Robertson KD, 2005), dans leur majorité même s'ils sont inactifs, seuls 5% des îlots CpG sont méthylés (Weber M, 2008). Il est à noter que cette méthylation n'est présente que dans les cellules somatiques. Ce qui suggère que l'un des déterminants de la méthylation est le contrôle du programme de l'expression génique (Weber M, 2008).

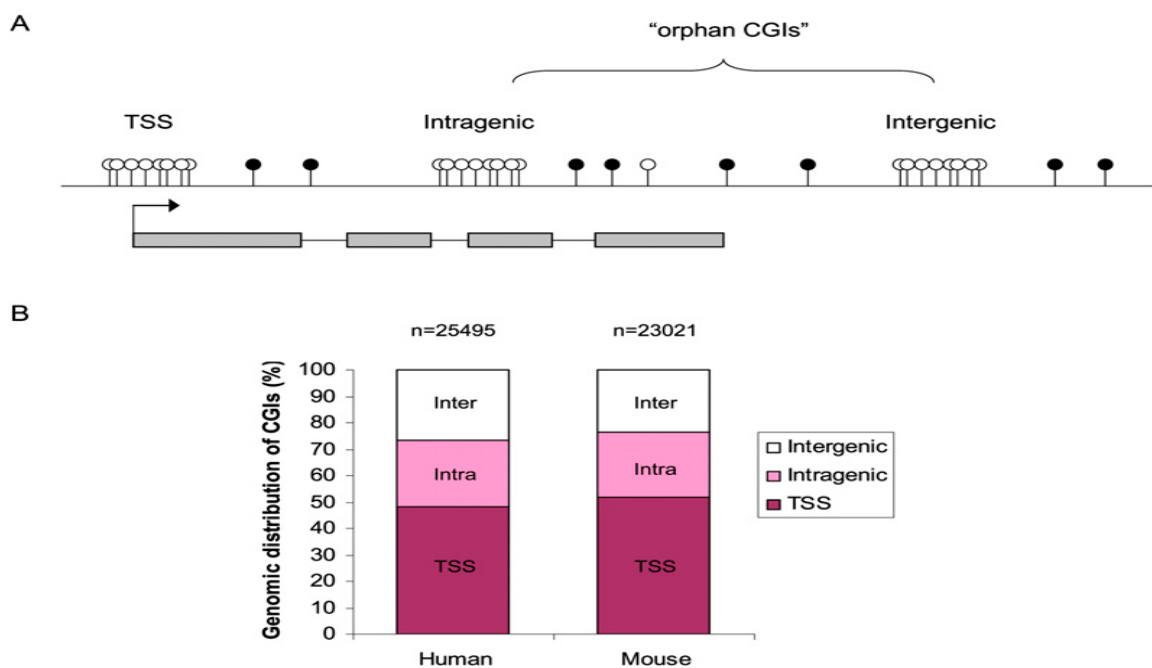


Figure 12 : La distribution génomique des îlots CpG (Deaton AM et al, 2011)

A : Les îlots CpG peuvent être situés au niveau des sites d'initiation de la transcription (TSS), au sein des gènes (intragéniques), ou entre les gènes (intergéniques). Les CpG intra et intergéniques de fonction inconnue sont considérés comme orphelins (Orphan CGIs) Cercles vides : CpG non méthylés Cercles pleins : CpG méthylés.

B : La distribution génomique des CpG dans le génome humain et le génome de la souris. Le nombre total de CpG est donné en haut de chaque graphique.

3) Le rôle de la méthylation

Il semble que la répression de la transcription passe par deux mécanismes soit directement en empêchant les facteurs de transcription spécifiques de se fixer à leurs sites de liaison CpG, soit par le recrutement de protéines ou complexes protéiniques qui indirectement vont se fixer sur les CpG méthylés pour ensuite empêcher leur liaison avec les facteurs de transcription en limitant l'accès des facteurs de régulation (Costello JF et al, 2001). L'effet inhibiteur de ces protéines réside dans leur capacité à recruter des histones déacétylases qui ont pour cible les résidus lysines des extrémités N-terminales des histones. Cet état favorise les interactions entre histones adjacentes qui tendent à former une chromatine répressive à la transcription (Rountree MR et al, 2001 ; Costello JF et al, 2001 ; D'Alessio AC et al, 2006). D'autres protéines possédant des domaines de liaison avec les méthyls semblent participer à ce rôle d'inhibition de l'expression mais leur rôle reste encore à déterminer. Ainsi, le DNMT1 interagit avec PCNA dans la fourche de réplication mais aussi avec un complexe protéique formé de HDAC2 (Histone Deacetylase2) et DMAP1 (protéine associée à une ADNMT1) pour réguler la répression de la transcription. Deux exemples de cette répression génique par la méthylation sont fournis par les gènes soumis à l'empreinte et les gènes du chromosome X inactif (Costello JF et al, 2001).

La plupart des promoteurs des gènes du chromosome X et certains gènes domestiques comme le gène HPRT, le G6PD, et le PGK1 sont inactivés par méthylation pour probablement maintenir un taux d'expression équivalent chez l'homme et chez la femme. L'expression du gène spécifique de X inactif, Xist (X inactive specific transcript) est corrélée avec le statut de la méthylation de son promoteur parce que le gène non méthylé, s'exprime sur l'X inactif alors que sur l'X actif il ne s'exprime pas par méthylation. Par contre, des cellules souches embryonnaires délétées de l'ADNMT1 expriment le gène Xist normalement silencieux sur le chromosome X actif de l'homme (Costello JF et al, 2001).

L'expression monoallélique des gènes soumis à l'empreinte impliquerait la méthylation des îlots CpG associés à ces gènes par des processus qui restent à élucider.

Toutefois, des études récentes ont mis en évidence l'implication d'une protéine CTCF en 11 doigts de zinc qui se lie uniquement à l'allèle parental non méthylé dans la région de contrôle de l'empreinte et permettre ainsi l'expression monoallélique du gène (Costello JF et al, 2001 ; Robertson KD, 2005).

Le lien entre la méthylation de l'ADN et le cancer a été démontré pour la première fois dans les cellules cancéreuses en 1983 (Robertson KD, 2005). Un déséquilibre dans la méthylation de la cytosine est fréquemment observé dans les cancers sporadiques chez l'homme et ce déséquilibre rend compte d'une hypométhylation globale du génome et d'une hyperméthylation aberrante à des sites CpG spécifiques.

Selon Szyf (Szyf M, 2006) les facteurs qui déterminent le profil de méthylation de l'ADN dans les cellules cancéreuses et l'hypométhylation globale contribuent de manière indépendante au cancer. Quoiqu'il en soit l'hypométhylation comme l'hyperméthylation semblent précéder la transformation cancéreuse et se produire à des sites spécifiques ou distincts du génome de la tumeur (Costello JF et al, 2001).

4) Hypométhylation et Cancer

Les différences de méthylation entre l'ADN tumoral et l'ADN des cellules normales ont été l'une des premières anomalies épigénétiques identifiées chez l'homme. Cette perte de méthylation des séquences d'ADN répétées, et la déméthylation des régions transcrites de l'ADN est à l'origine de la production d'une variété d'ARNm.

Le degré de l'hypométhylation augmente avec le stade d'évolution de la tumeur suggérant que l'hypométhylation peut être considérée comme un biomarqueur de pronostic des cellules cancéreuses (Costello JF et al, 2001 ; Esteller M, 2008). Néanmoins, des études sur des cellules sans aucune malignité de gastrite et de colite ont pu mettre en évidence une hypométhylation et même une hypométhylation comparable entre polypes bénins et polypes malins du colon. Ces résultats rendent peu probables la notion de l'hypométhylation comme biomarqueur (Costello JF et al, 2001).

L'hypométhylation participerait au développement de la carcinogenèse à travers plusieurs mécanismes dont la réactivation des éléments mobiles transposables, la génération d'instabilité chromosomique et l'activation des oncogènes (Costello JF et al, 2001 ; Robertson KD, 2005 ; Esteller M, 2008).

Activation des oncogènes

L'hypométhylation des oncogènes c-myc et H-ras, ainsi que dans d'autres oncogènes, a été observée dans plusieurs tumeurs primitives. Cependant, l'hypométhylation n'est pas le seul mécanisme de la dérégulation de l'expression des oncogènes (Costello JF et al, 2001 ; Szyf M, 2006). Cette hypométhylation ne serait probablement que le reflet de la réduction globale du taux de méthylation dans les cellules cancéreuses.

L'activation de l'expression de certains gènes situés sur le chromosome X comme les gènes MAGE, GAGE est tributaire de l'hypométhylation dans des tumeurs chez l'homme.

L'étude de la région promotrice du gène MAGE suggère que la déméthylation du gène serait consécutive à l'hypométhylation globale du génome qui favorise l'expression du gène dans les cellules cancéreuses. Cette expression va induire la production d'antigènes reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques et pourrait ainsi favoriser l'élimination des cellules cancéreuses (Costello JF et al, 2001).

L'expression accrue de certains gènes induite par la déméthylation a été observée aussi pour le gène de la protéine S100 liant le calcium A4 ou S100 calcium binding protein A4 (S100A4) et le gène inhibiteur de la sérine protéase (SERPINB5) dans le cancer gastrique (Robertson KD, 2005).

Activation des éléments génétiques mobiles

L'hypométhylation dans les tumeurs touche aussi les séquences répétées des éléments génétiques mobiles conduisant à une instabilité du génome (Robertson KD, 2005 ; Rountree MR et al, 2001). Ces éléments génétiques mobiles comme l'ADN satellite, les longues séquences d'ADN dispersées (LINES) transposables et les courtes séquences d'ADN dispersées (SINES) sont pour la plupart inactifs en raison de mutations, de réarrangements, mais aussi de la méthylation de leur promoteur. Si ces éléments mobiles sont transcrits, grâce à leur activité transcriptase inverse, ils peuvent intégrer le génome, favoriser des événements de recombinaison aberrante et perturber la régulation de gènes proches du site de leur intégration (Costello JF et al, 2001 ; Robertson KD, 2005).

L'absence ou la perte de la méthylation de la région promotrice des LINES-1 et l'activation de leur expression ont été rapportées dans beaucoup de cancers sporadiques. Ainsi, la dérégulation des gènes comme APC et p53 par les LINES-1 est observée dans des cellules

tumorales de cancers du colon et du pancréas (Costello JF et al, 2001 ; Ting DT et al, 2011). Des mutations induites par l'insertion de séquences Alu aussi ont été observées dans les gènes BRCA1, BRCA2 dans des familles à risque de développer le cancer du sein et de l'ovaire et aussi dans le gène MLH1 pour les sujets avec prédisposition héréditaire au cancer du colon (Costello JF et al, 2001). Toutefois, l'activation de la transcription relevant de l'hypométhylation peut aussi s'exercer sur d'autres retrotransposons comme les rétrovirus endogènes qui conservent leur région 5'LTR, sachant que les LINEs-1 dans leur majorité ont leur région promotrice réduite (Costello JF et al, 2001).

Instabilité chromosomique

Il semble bien établi que l'hypométhylation contribue au développement du cancer par perturbation de régions chromosomiques et /ou par effet génique consécutive à une perte ou à un gain de chromosomes. En effet, l'hétérochromatine péricentromérique des chromosomes 1 et 16 est fortement méthylée dans les cellules somatiques normales alors qu'elle est hypométhylée et instable dans les tumeurs du sein, de l'ovaire et de Wilms. De même, les anomalies chromosomiques sur le 1 et le 16 relevant de l'hypométhylation sont reproduites après un traitement de cellules normales avec la 5- azacytidine ou la 5 -aza -2 désoxycytidine.

Ces mêmes anomalies à une fréquence accrue sont observées après stimulation des lymphocytes de patients présentant le syndrome ICF, une maladie héréditaire causée par une mutation de l'ADN méthyltransférase (ADNMT3B). Des études sur les cellules somatiques de patients souffrant de cette affection ont montré une hypométhylation anormale de l'hétérochromatine péricentromérique des chromosomes 1 et 16. Toutes ces observations rendent compte de la relation entre l'hypométhylation et l'instabilité chromosomique. Enfin, des cellules ES de souris avec une délétion homozygote de l'ADNMT1, normalement euploïdes présentent une instabilité génomique (Costello JF et al, 2001).

5) *Hyperméthylation et Cancer*

L'hyperméthylation des îlots CpG est un événement fréquent qui contribue au développement des tumeurs lorsqu'elle survient dans la région promotrice de gènes suppresseurs de tumeurs. La méthylation des îlots CpG des promoteurs peut inactiver les deux allèles ou encore agir avec le concours d'événements génétiques impliquant des mutations ou des délétions (Costello JF et al, 2001). Cette méthylation de l'ADN, favorise la modification de la chromatine inactive en chromatine acétylée active (Rountree MR et al, 2001 ; Szyf M, 2006). En effet, les complexes des protéines de liaisons aux domaines des méthyl-CpG (MDB)/HDAC et l'ADNMT/HDAC supportent la répression de la transcription par la méthylation. La réactivation des gènes P16, TIMP3 et MLH1 dans des lignées cellulaires de cancer du colon après traitement par des inhibiteurs de HDAC (trichostatine A) et ADNMT (5-aza-désoxycytidine), confirme l'action de ces complexes (Rountree MR et al, 2001).

Ainsi, le concept de phénotype méthylé d'îlots CpG ou CpG-island methylator phenotype (CIMP) a été défini dans les cancers chez l'homme. La méthylation est donc une composante incontournable dans la classification (Feinberg AP et al, 2004 ; Robertson KD, 2005) des cancers. Cette méthylation confère un avantage de croissance aux cellules tumorales, une instabilité génétique accrue et une progression rapide vers les métastases. Lorsque la méthylation se limite à l'allèle non muté, les agents déméthylants sont capables de restaurer l'activité du gène et la fonction d'un gène suppresseur de tumeur dans des cellules tumorales en culture (Costello JF et al, 2001 ; Rountree MR et al, 2001).

Cette observation suggère qu'une réactivation de la fonction du gène par chimiothérapie serait possible comme thérapeutique pour les tumeurs solides et en hématologie (Costello JF et al, 2001). L'hyperméthylation peut affecter plusieurs gènes, tous impliqués dans le développement du cancer (tableau IV). (Costello JF et al, 2001 ; Rountree MR et al, 2001; Robertson KD, 2005 ; Esteller M, 2008).

Tableau IV: Les principales voies affectées par la méthylation de l'ADN

| Processus affecté | Gènes responsables |
|--|----------------------------------|
| Contrôle du cycle cellulaire | Rb, p14 ARF, p15, p16INK4 |
| Réparation de l'ADN | MLH1, O ⁶ MGMT, BRCA1 |
| Résistance aux médicaments et détoxification | GSTл, MDR1 |
| Différentiation | MYOD, RARβ2 |
| Inhibition de l'apoptose | DAP-kinase, Caspase-8 |
| Invasion tumorale | E-cadhérine, TIMP-3, |

Il est largement démontré que la méthylation contribue à la malignité à travers les résultats comparables obtenus avec des modèles de souris après carcinogénèse induite (Costello JF et al, 2001) et dans certains cancers comme le cancer du colon, la méthylation est présente dans les lésions précancéreuses et non secondaire à des anomalies génétiques (Robertson KD, 2005).

Selon Rountree (Rountree MR et al, 2001), la mise en place d'une méthylation aberrante au cours de la carcinogénèse s'explique par plusieurs mécanismes, la perte d'un facteur protecteur des îlots CpG, la surexpression et la perturbation de l'assemblage de l'ADNMT et la perturbation de la synchronisation de la réplication. Si des expériences dans des lignées cellulaires ou chez des souris ont pu démontrer l'implication de telles hypothèses, des études seront nécessaires pour étayer la succession ou l'action coordonnée dans les différentes étapes de développement du cancer.

Le modèle du cancer colorectal

1) Les formes cliniques du Cancer colorectal

a) Diagnostic du cancer colorectal

Selon l'Inca (Inca, 2008) le diagnostic du cancer repose sur des données cliniques et des symptômes non spécifiques ou fulminants :

- Rectorragies
- Troubles digestifs (à type de trouble du transit, douleurs abdominales)
- Masse abdominale ou rectale
- Obstruction intestinale
- Anémie ferriprive sans cause évidente
- Dans le cadre d'un dépistage
- Dans le cadre de surveillance des sujets à risque avec antécédents personnels ou familiaux de pathologie colique à risque.

Examens complémentaires préconisés pour assurer le diagnostic et le suivi :

Biologie : ACE

Imagerie : - Coloscopie couplée à des biopsies permet de faire le diagnostic définitif

- Lavement baryté pour localiser les petites tumeurs ou rechercher des Lésions synchrones
- Tomodensitométrie thoraco-abdominopelvienne
- Echographie abdominopelvienne
- Imagerie par Résonance Magnétique
- Dans le cas du rectum : échoendoscopie rectale et IRM rectale
- TEP Scan pour un bilan d'opérabilité en seconde intention.

b) Les différentes formes de cancer colorectal

Les fréquences des différentes formes de cancer sont représentées sur la (figure 13).

1) Le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC ou syndrome de Lynch)

Le HNPCC représente 5 à 10% du CCR, c'est une maladie autosomique dominante avec une pénétrance de 70 à 80%. Les sujets HNPCC ont une prédisposition héréditaire de développer le CCR, qui survient à un âge relativement jeune 20 - 30 ans. Son diagnostic repose sur la réunion de trois critères d'Amsterdam revus et élargis en 2004 (Tableau Annexe 1).

L'anomalie moléculaire responsable est une mutation constitutionnelle des gènes de réparation des mésappariements dans 60% des patients (MLHI/MSH2 ou MSH6/PMS2).

Dans certains cas, aucune altération génétique n'est identifiée. L'altération constitutionnelle est associée à un phénotype d'instabilité des microsatellites. Cette forme associe des mutations du gène K-ras, de la β -caténine et non B-raf et un pronostic meilleur que les tumeurs non MSI (Boland CR et al, 2010). Cette forme de cancer est de localisation proximale et caractérisée par sa localisation extracolique, plus rare affectant les voies urinaires, les ovaires, le pancréas, les tumeurs cérébrales ainsi que des proliférations bénignes (Lynch HT et al, 2006 ; Flemings M et al, 2012).

La surveillance des sujets avec une prédisposition au HNPCC repose sur la réalisation de coloscopies tous les deux ans dès l'âge de 20 ans, mais aussi sur l'échographie associée ou non à l'hystérocopie tous les ans à partir de 30 ans. La colectomie prophylactique est également suggérée.

2) Le cancer colorectal sporadique

Le cancer sporadique associe une instabilité des microsatellites dans 12 à 17% des CCR. Les sujets avec cancer colorectal sporadique ont un âge plus avancé que ceux porteurs de la maladie HNPCC. La perte d'expression du gène MLH1 dans les tumeurs sporadiques fait suite à l'inactivation biallélique par méthylation de sa région promotrice, avec absence des protéines MLH1 et PMS2. La perte d'expression du gène MLH1 augmente avec l'âge, cette perte est d'environ 50% chez les patients de plus de 90 ans porteurs de CCR.

Cette forme de cancer associe fréquemment des mutations du gène B-raf et semble de meilleur pronostic (Boland CR et al, 2010 ; Flemings M et al, 2012).

Les tumeurs sporadiques MSI sont de localisation droite, peu différenciées, mucineuses, largement nécrosées avec un abondant infiltrat tumoral lymphocytaire (Hamelin R et al, 2008). Cependant, certaines tumeurs sporadiques sont MSS et utilisent la voie CIN ou des voies non encore élucidées.

3) La polypose Adénomatoase familiale (FAP)

C'est un syndrome rare, autosomique dominant caractérisé par le développement rapide de centaines de milliers de polypes. L'évolution vers le CCR est inéluctable vers l'âge de 35-40 ans avec une tendance à développer les polypes dans des organes autre que le colon. Ce syndrome résulte de mutations germinales du gène APC sur l'exon 15 qui conduit à une activation non contrôlée de la voie de signalisation Wnt de la tumorigénèse.

Cependant, l'évolution de ces polypes vers une dysplasie de haut grade ou un carcinome invasif est faible (Fleming M et al, 2012). La chirurgie prophylactique avec proto-colectomie restauratrice est recommandée pour la majorité des patients.

Deux variantes de FAP existent : le syndrome de Gardner qui associe des kystes dermoïdes, des anomalies dentaires et tumeurs dermoïdes et le syndrome de Turcot qui associe lui des tumeurs du cerveau.

4) Autres formes héréditaires de cancer héréditaire

- **Le syndrome de Peutz-Jeghers**

C'est un syndrome héréditaire à transmission autosomique dominante, caractérisé par des polypes hamartomateux dans le tractus gastro-intestinal, des lésions cutanéomuqueuses pigmentées, un risque accru de tumeurs malignes gastro-intestinales et extragastro-intestinales. La transformation dysplasique de ces polypes est extrêmement rare et le risque cumulé de cancer colorectal est de 40%. L'anomalie moléculaire responsable est une mutation germinale du gène LKB1/STK11 (Fleming M et al, 2012).

- **Le syndrome de polypose juvénile**

Il s'agit d'un syndrome héréditaire à transmission autosomique dominante. Le diagnostic est posé dans un contexte de 5 polypes juvéniles dans le rectum ou des polypes juvéniles dans le tractus gastro-intestinal ou encore de tout nombre de polypes juvéniles et des antécédents familiaux de polypose juvénile. Il est semblable au syndrome de Peutz-Jeghers puisque le risque de développer un cancer colorectal est également de 40% mais dans ce contexte la dysplasie est fréquente. La plupart des sujets porteurs de ce syndrome ont des mutations germinales dans les gènes SMAD4 ou BMPR1A (Fleming M et al, 2012).

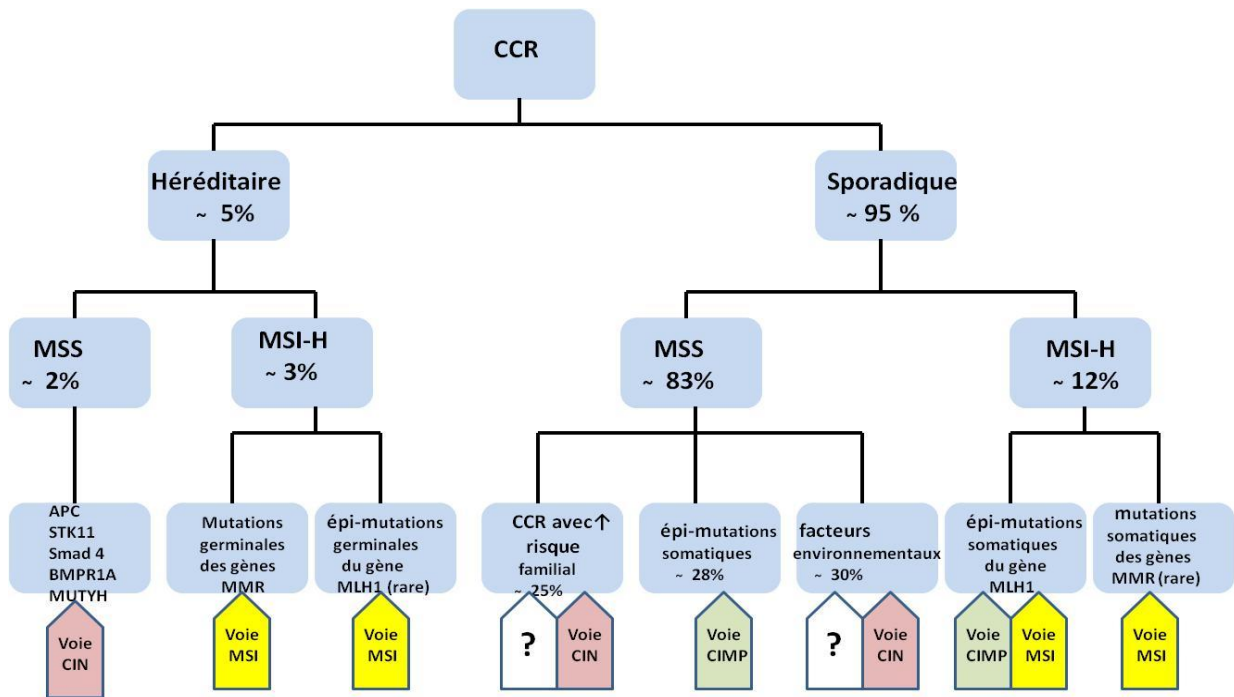


Figure 13 : Les voies moléculaires de la cancérogenèse colique (Flemings M et al, 2012)

CCR : le cancer colorectal; MSS : microsatellite stable; MSI-H : l'instabilité des microsatellites de haut niveau; FAP : la polypose adénomateuse familiale; AFAP : FAP atténuée ; PJS : le syndrome de Peutz-Jeghers ; JPS : le syndrome de polypose juvénile; MAP : polypose MUTYH associée; CIN : voie de l'instabilité chromosomique, MSI : voie de l'instabilité microsatellite; CIMP : CpG island Methylateur phénotype ;?: les voies encore non définies.

c) Le traitement du cancer colorectal

Le traitement se fait en fonction de la classification TNM (Annexe 2) et du stade (**Tableau V**) et doit tenir compte des facteurs pronostiques classiques:

L'étendue de l'infiltration de la paroi abdominale

L'invasion contigüe d'organes adjacents

L'envahissement ganglionnaire

Le nombre de ganglions envahis

Le nombre de ganglions prélevés et la présence de métastases au moment du bilan préopératoire (Adenis A et al, 2001).

La chirurgie associe une résection colique et un curage ganglionnaire ou une colostomie dans 30% des cas.

| Tableau V : Le traitement du cancer colorectal | | | | | |
|---|-----------------------|----------------|-----|----------------------------------|------------------|
| | Colon sans métastases | | | Colon métastatique | Cancer du rectum |
| | I | II | III | | |
| Chirurgie | Oui | Oui | Oui | | Oui |
| Chimiothérapie | | Oui Si FMP* | Oui | Oui 2 -3 mois avant chirurgie | |
| Radiothérapie | | | | | Palliative |

- Si métastases synchrones non résécables : concertation avant l'exérèse du cancer colique.

- Si métastases hépatiques ou pulmonaires : exérèse, si l'exérèse complète est possible.

- Chimiothérapie : elle est évaluée après 2 -3 mois de traitement.

- *FMP : Facteurs de Mauvais Pronostique.

1) Les Stratégies thérapeutiques

Les figures (14, 15 et 16) et le tableau VI illustrent les stratégies thérapeutiques et sont issues de la publication de Conray et collaborateurs (Conray T et al, 2004).

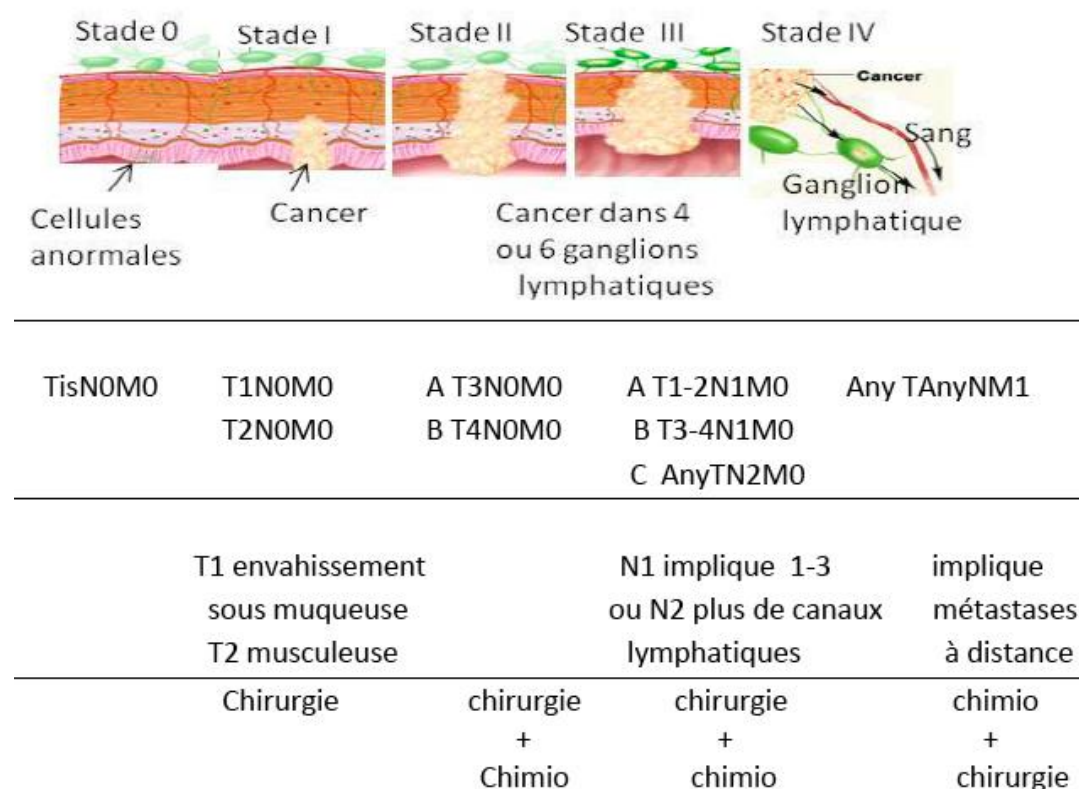


Figure 14: Traitement du cancer colorectal selon le stade

Le traitement se fait suivant le stade d'évolution de la maladie. Il tient compte de l'envahissement local et régional de la tumeur. Le traitement chirurgical se fait en première intention et associe la chimiothérapie sauf au stade 4.

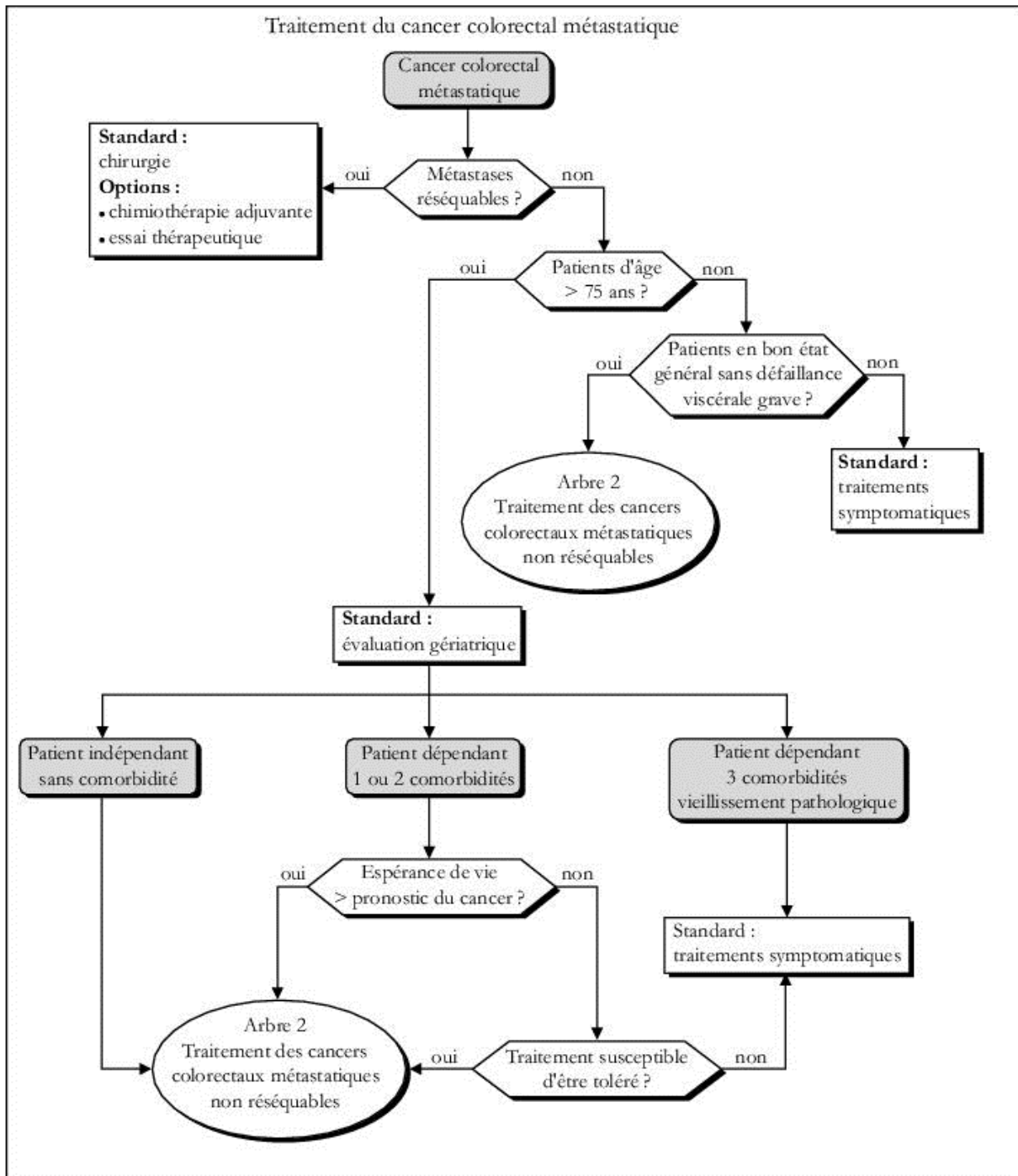


Figure 15: Le traitement du cancer colorectal métastatique

Le protocole tient compte de la réséquabilité des métastases et de différents critères que sont l'âge, l'état général du patient et d'autres facteurs de comorbidités associés.

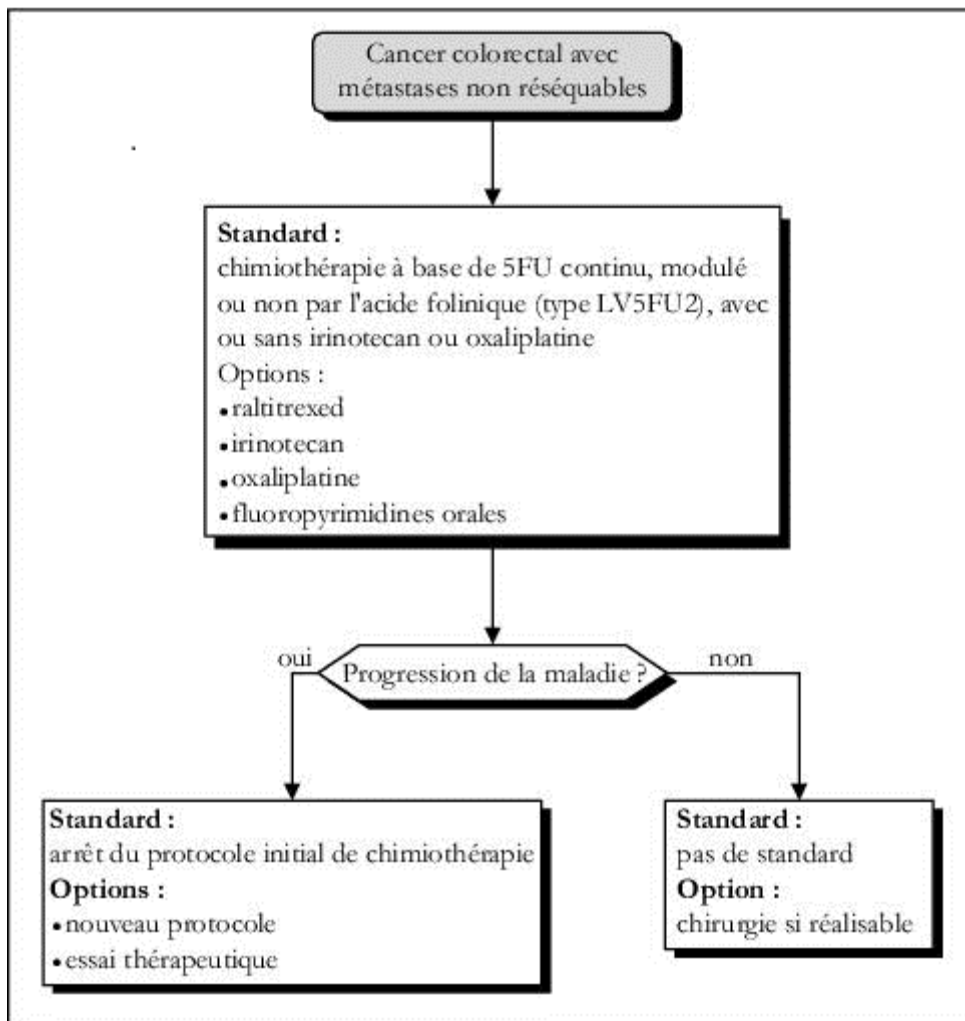


Figure 16 : Le traitement du cancer colorectal avec métastases non résectables

Le protocole thérapeutique se fait en première intention avec la chimiothérapie puis l'évaluation de l'évolution de la maladie déterminera la conduite à tenir.

2) Surveillance du cancer colorectal

Tableau VI : La surveillance du cancer colorectal

| | Modalités |
|--------------------------------|--|
| Clinique | Tous les 3 mois pendant 3 ans Puis tous les 6 mois pendant 2 ans |
| Coloscopie | Contrôle à 2 ans, 3 ans puis tous les 5 ans |
| TDM thoracoabdominopelvienne | Tous les 3 à 6 mois pendant 2 ans Puis renouvellement pendant 3 ans |
| Echographie abdomino-pelvienne | Si TDM impossible |
| ACE | Stade I et II tous les 3 mois pendant les 2 premières années Puis tous les 6 mois la 3 ^e année |
| IRM hépatique | Si difficultés avec TDM |
| TEP Scan | En cas d'augmentation de l'ACE et négativité du bilan |

La surveillance (tableau VI) peut relever aussi de la biologie moléculaire par l'étude de C-met, un proto-oncogène qui est associé à la progression du cancer colorectal. Le gène C-met code le récepteur du facteur de croissance des hépatocytes (HGF/SF). L'activation de la voie tyrosine kinase de C-met par HGF/SF est un des facteurs qui influent sur la progression tumorale parce que C-met active les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la motilité, l'adhésion et l'invasion des cellules tumorales.

La surexpression de C-met est corrélée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein, de l'estomac, du foie, de l'endomètre et du nasopharynx. Dans le cancer colorectal primitif, la surexpression de C-met peut être considéré comme un marqueur prédictif pour l'invasion régionale à un stade précoce de la maladie (Takeuchi H et al, 2003 ; Resnick MB et al, 2004).

2) Réaction de l'hôte dans le cancer colorectal

a) L'infiltrat lymphocytaire

La progression du cancer dépend des interactions entre l'hôte et la tumeur, lesquelles interactions sont liées à la réponse immunitaire de l'hôte. L'importance de l'infiltration lymphocytaire intratumorale est considérée comme marqueur pronostic plus discriminant que la classification TNM (Broussard EK et al, 2011). Cet infiltrat lymphocytaire est évalué à travers plusieurs marqueurs que sont : CD3, CD4, CD8, CD45RO (figure 17).

Les marqueurs CD3 sont exprimés par tous les lymphocytes, ils interviennent dans la transduction du signal et sont utilisés comme marqueurs génériques des lymphocytes T.

Au cours de la différenciation thymique, les thymocytes se différencient en lymphocytes T exprimant les molécules CD4 (dans 60% des lymphocytes T matures) et CD8 (dans 30% des lymphocytes T matures). Les lymphocytes T cytotoxiques qui expriment CD8 reconnaissent les antigènes endogènes se liant aux molécules de la classe I du MHC alors que les lymphocytes exprimant CD4 sont appelés les lymphocytes T auxiliaires. Ces lymphocytes T auxiliaires nécessitent le traitement et la présentation de l'antigène en association avec des molécules de classe CMH II par des cellules présentatrices d'antigènes (Roxburgh CSD et al, 2012). Après une stimulation antigénique, les lymphocytes T expriment des marqueurs d'activation CD25 et CD69. Certains des lymphocytes naifs CD45RA, stimulés deviennent des lymphocytes mémoires caractérisés par le changement de l'isoforme CD45RA en CD45RO. D'autres marqueurs sont indispensables à l'activation du lymphocyte T : le CD2 et le CD28.

Une sous population régule l'activation des lymphocytes T, ce sont les T régulateurs qui expriment fortement CD25. Les lymphocytes cytotoxiques Natural Killer expriment CD56 et CD57. Ces derniers peuvent être inhibés par HLA-G (Human Leucocyte Antigen-G), une molécule de classe I non classique, essentiellement exprimée dans l'interface foeto-maternel durant la grossesse et confère ainsi une immunotolérance au fœtus. HLA-G peut aussi inhiber les lymphocytes T cytotoxiques CD8. HLA-G est aussi exprimé dans le sein, le colon, le cancer de la langue et dans les lymphocytes infiltrant les tumeurs.

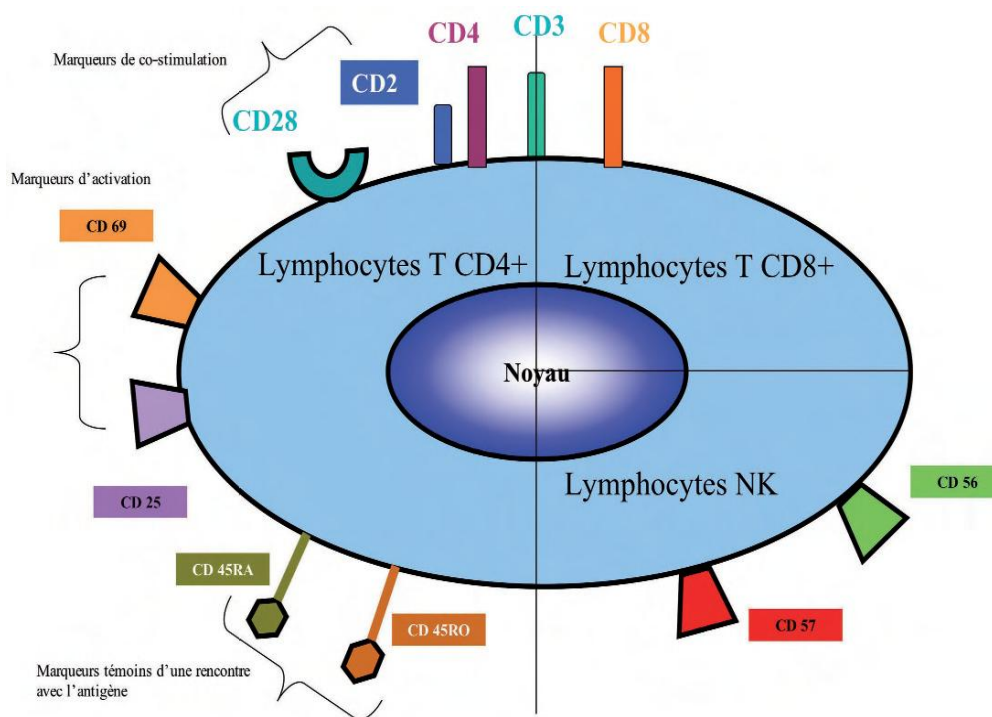


Figure 17: Les marqueurs de différenciation ou « clusters de différenciation » des lymphocytes T.

La valeur pronostique de l'infiltrat lymphocytaire décrite par toutes les études (Pagès F et al, 2005 ; Nosho K et al 2010 ; Mlecnik B et al, 2011) repose sur :

- l'amélioration de la survie
- la réduction des récurrences
- la diminution du potentiel métastatique
- et la réponse à la chimiothérapie.

b) Immunité innée

1) Le locus et les produits des gènes Apobec 3

Structure et Mécanisme Catalytique

Les protéines Apobec (*Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic polypeptide*) font partie de la famille des Cytidines desaminases, capables de générer des mutations sur l'ADN ou l'ARN par désamination de la cytidine en uridine (figure 18) appelé « editing » ou édition (Holmes RK et al, 2007 ; Furukawa A et al, 2009). Le gène Apobec 1 fut le premier identifié de la famille des cytidines desaminases, son expression restreinte aux cellules intestinales conduit à partir du pré-messager à la production de l'Apo B48, transcrit court par introduction d'un codon stop, impliqué dans le métabolisme du cholestérol (Anant S et al, 2002 ; Wedekind JE et al, 2003 ; Holmes RK et al, 2007 ; Gaur-Goila R et al, 2008).

Le gène Apobec 2 localisé sur le chromosome 6 est exprimé uniquement dans les muscles squelettique et cardiaque (Jarmuz A et al, 2002), il n'a pas d'activité enzymatique reconnue (Furukawa A et al, 2009) et Apobec 4 a été récemment identifié sur le chromosome 1.

Un autre locus, AID (*activated- induced cytidine deaminase*), a pour substrat l'ADN du locus des immunoglobulines et participe ainsi à la diversité des anticorps générés, essentiels à l'adaptation du système immunitaire (Holmes RK et al, 2007 ; Furukawa A et al, 2009).

La famille des gènes Apobec 3 est localisée en un cluster sur le chromosome 22 (3A- H) (figure 19) et grâce à son activité cytidine desaminase sur l'ADN a un potentiel de restreindre l'accès du génome aux virus et aux séquences endogènes (Bulliard Y et al, 2011). Toutes les protéines de la famille Apobec s'expriment entre autres dans les leucocytes, présentent une homologie de structure (figure 20) et disposent d'un ou de deux domaines catalytiques. Chaque protéine possède un domaine court en hélices α suivi d'un domaine catalytique puis une courte séquence peptidique de liaison et enfin un domaine pseudocatalytique.

Chaque domaine catalytique contient une séquence consensus (H-X-E- (X)₂₃₋₂₈ -P-C-(X)₂₋₄ -C) en doigt à zinc dans laquelle les résidus Histidine et cystéine coordonnent le zinc et le résidu glutamique intervient dans la navette du proton lors de la réaction de déamination. Cette région d'intérêt (linker peptide) qui rapproche la région d'intérêt et le site pseudocatalytique de tous les Apobec 1 et 3 sont codés par l'exon 3 en dehors des derniers résidus (figure 21). En dehors de l'Apobec 3B, un seul des domaines catalytiques participe à la désamination oxydative alors que l'autre est impliqué dans la liaison avec l'ADN. Les protéines Apobec 3B, 3F et 3G et 3D et 3E présentent aussi une duplication entière de leur domaine catalytique (Jarmuz A et al, 2002 ; Gaur-Goila R et al, 2008 ; Chui YL et al, 2009 ; Kitamura S et al, 2011). L'apobec 3D et l'apobec 3E forment la région N et C terminale d'une seule protéine appelée 3DE (Holmes RK et al, 2007).

La structure tridimensionnelle du site catalytique actif de Apobec 3 G, la seule à être déterminée grâce à la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (figure 22) montre une structure formée de 5 hélices α (α 1- α 5) et 5 feuillets β (β 1- β 5) (Huthoff H et al, 2005 ; Holmes RK et al, 2007 ; Huthoff H et al, 2008 ; Gaur-Goila R et al, 2008 ; Furukawa A et al, 2009 ; Kitamura S et al, 2011) montrant les résidus clés du site actif et la position de la cytidine proche de la position des résidus E259 et H257 qui lui coordonne le zinc.

Il semble établi que la réaction se déroule préférentiellement dans une séquence consensus - CCCA - de l'ADN antisens, et intéresse la troisième cytidine plus que les deux autres (Furukawa A et al, 2009). Cette réaction se fait dans la direction 5' vers 3' de l'ADN cible, est complète au bout de 24 heures et n'intéresse que les deux derniers résidus cytidine. La conséquence de la réaction est une mutation de type G vers A à l'origine d'un codon stop TAG ou TAA (Furukawa A et al, 2009).

Les protéines Apobec3 participent au dispositif de l'immunité cellulaire innée dans la lutte contre la propagation de l'infection virale et la mobilité des séquences endogènes (Sire J et al, 2008).

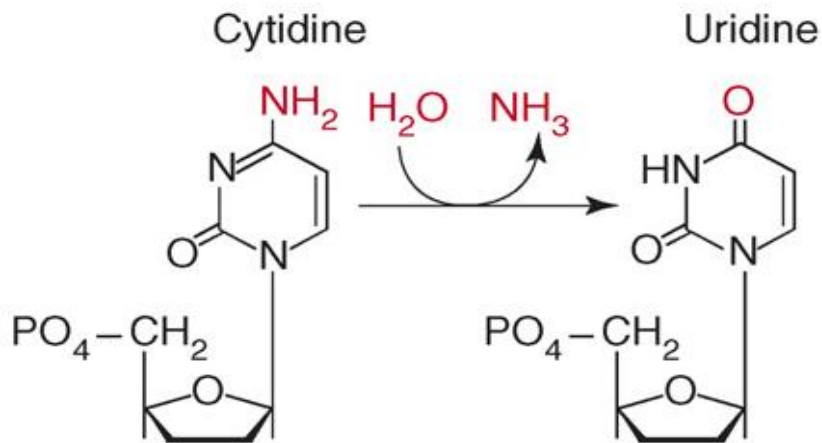


Figure 18 : La réaction de déamination oxydative de la Cytidine en Uridine est catalysée par les protéines Apobec. (Holmes RK et al, 2007)

La cytidine est convertie en uridine par addition d'eau et élimination du groupe aminé sous forme d'ammoniac.

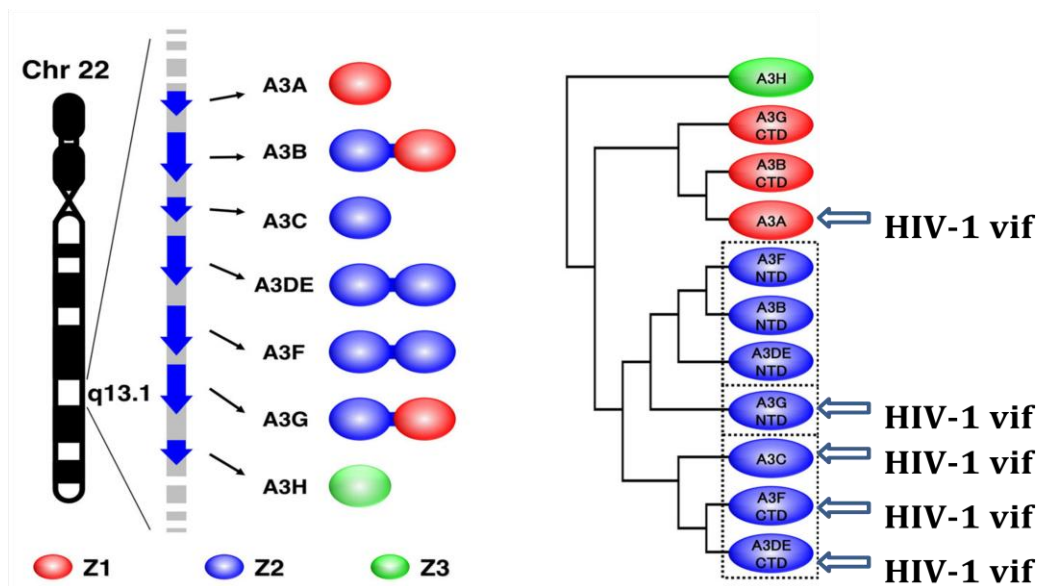


Figure 19: Organisation en cluster des gènes de la famille de Apobec 3 (Kitamura S et al, 2011) **modifiée**

Les Sept protéines de la famille Apobec 3 humaine, situées sur le chromosome humain 22. Elles sont constituées d'un ou de deux domaines Z, dont chacun est phylogénétiquement regroupé en trois catégories distinctes: Z1, Z2, et Z3. Trois sous-groupes des domaines Z2 sont regroupés avec des lignes pointillées sur l'arbre phylogénétique. Les flèches indiquent les domaines d'interaction VIH-1 avec Vif.

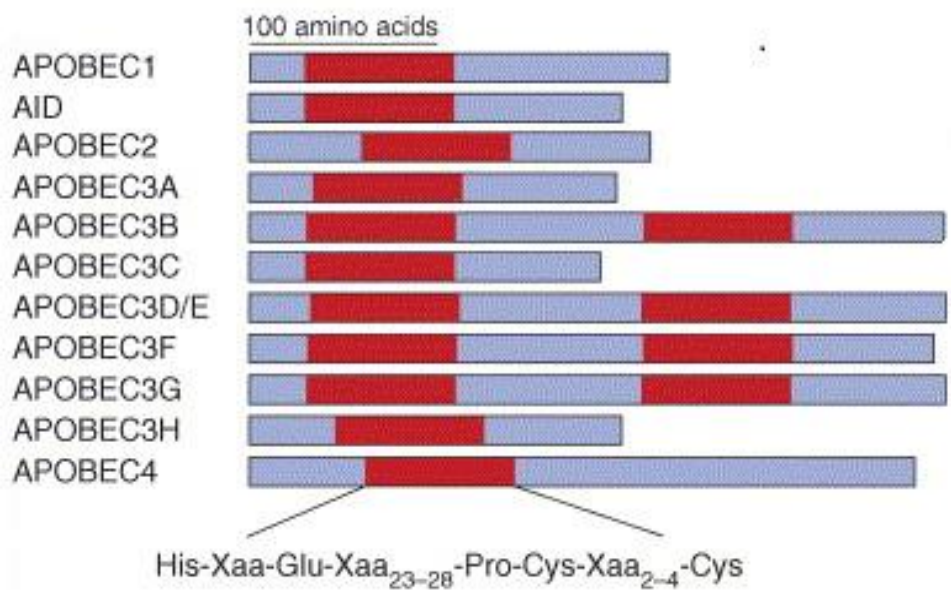


Figure 20 : Le domaine d'organisation des protéines de la famille de Apobec 3 (Holmes RK et al, 2007)

Le domaine en rouge indique le motif de la cytidine désaminase de chaque protéine.

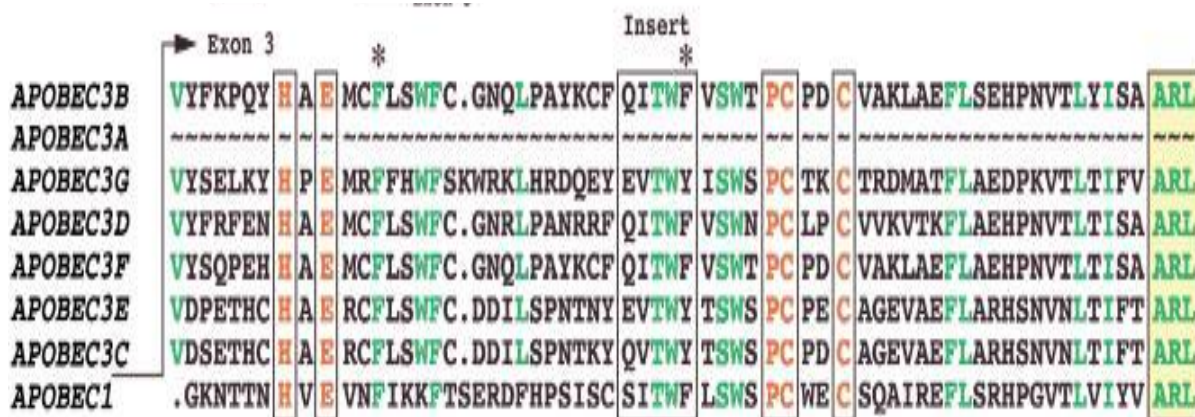


Figure 21 : Domaine d'organisation des protéines de la famille de Apobec (Jarmuz A et al, 2002)

Organisation des protéines de la famille Apobec 3 par rapport à APOBEC1
Le domaine du site actif est codé par l'exon 3 et la séquence en aval de cet exon est commune à tous les gènes APOBEC.

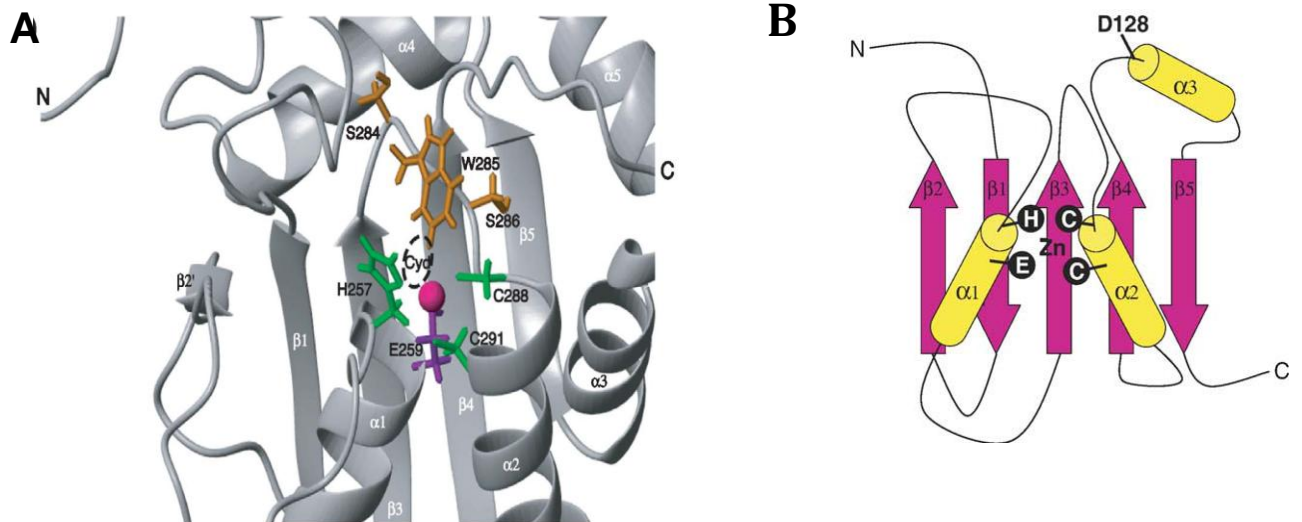


Figure 22: Structure du site actif catalytique de Apobec 3G (Furukawa A et al, 2009) B (Huthoff H et al, 2005)

A : Les nucléotides du site catalytique montrent un motif consensus $\beta 1\beta 2 \alpha 1 \beta 3\alpha 2 \beta 4 \beta 5$ motif qui forme un feuillet mixte qui soutient le bon positionnement des hélices alpha qui contiennent les résidus catalytiques et de coordination du zinc.

B : Les protéines Apobec 3 contiennent toutes un insert entre $\beta 4$ et $\beta 5$ qui est prévu pour se plier dans une structure en hélice α ($\alpha 3$). Dans Apobec 3G, cette hélice est adjacente au résidu 128 qui est associé à l'interaction spécifique de l'espèce à la protéine Vif.

2) Apobec 3 et VIH

Le mécanisme antiviral des protéines Apobec 3 à travers Apobec 3G résulte de son activité catalytique de désaminase sur l'ADN rétroviral nouvellement synthétisé (Sire J et al, 2008 ; Gaddis NC et al, 2004 ; Chiu YL et al, 2009 ; Berger G et al, 2011) après son incorporation dans les particules du virion dans les cellules productrices de virus. Ce processus a une spécificité de substrat, puisque Apobec 3G reconnaît les dinucléotides CC, Apobec 3F et 3B les dinucléotides TC, alors que les Apobec 3DE ont une spécificité de substrats pour les dinucléotides GC (Sire J et al, 2008 ; Holmes RK et al, 2007). Les Apobec 3 H n'ont pas d'effet restrictif sur le génome du HIV (Gaur-Goila R et al, 2008 ; Bulliard Y et al, 2011) (figure 23).

La réaction de désamination se produit après l'entrée des protéines Apobec 3 contenant la particule virale lors de la synthèse du cDNA du VIH-1 par la reverse transcriptase sur le brin néosynthétisé. Les mutations induites par la protéine Apobec 3 sont soumises à l'action de l'Uracile glycosylase puis des endonucléases conduisant à sa dégradation. Le produit de synthèse obtenu peut servir de matrice pour la synthèse du brin complémentaire (Mariani R

et al, 2003 ; Priet S et al, 2006 ; Sire J et al, 2008 ; Chiu YL et al, 2009). Il s'ensuit une hypermutation G>A du génome viral (Chiu YL et al, 2009 ; Mariani R et al, 2003) avec production d'une séquence aberrante et défaut d'intégration de l'hôte. Cependant, l'activité antivirale de Apobec 3A vise les lentivirus des primates dans les cellules myéloïdes durant les premières phases de l'infection par déplétion de la quantité d'ADN viral synthétisée (Berger G et al, 2011).

La restriction de l'infection rétrovirale peut survenir par un mécanisme non enzymatique. Elle découle de la liaison de l'ARN viral par le domaine pseudocatalytique à l'extrémité N-terminale de la protéine Apobec3, induisant une baisse de l'activité de la transcriptase inverse (Newman E NC et al, 2005 ; Holmes RK et al, 2007 ; Bishop KN et al, 2006 ; Holmes RK et al, 2007 ; Chiu YL et al, 2009 ; Huthoff H et al, 2008).

La protéine Vif (viral infectivity factor) permet l'exclusion de la protéine Apobec 3 des virions, par interaction de la protéine en favorisant son ubiquitynilation et sa dégradation par la voie du protéasome (Mariani R et al, 2003 ; Xu H et al, 2004 ; Priet S et al, 2006 ; Holmes RK et al, 2007 ; Gaur-Goile R et al, 2008 ; Malim MH, 2009). Cette interaction est compromise par une seule substitution de type D128K de l'Apobec 3 qui résiste à l'action de Vif (Xu H et al, 2004 ; Santa-Marta M et al, 2005 ; Priet S et al, 2006 ; Furukawa A et al, 2009). Outre ce mécanisme, Vif peut entraîner la modification de la structure de Apobec 3G qui affecte son incorporation dans les particules du virion dans l'infection à VIH-1 (Berger G et al, 2011). Toutefois, l'absence de la protéine Vif n'a pas empêché la réplication de deux virus SIV déficientes en protéines Vif dans une lignée de cellules T humaines qui expriment Apobec 3G et 3F. De même, des études ont montré que les protéines Vif de plusieurs virus de SIV non pathogènes chez l'homme, ne sont pas des inhibiteurs efficaces des protéines Apobec 3G ou 3F. L'interaction Vif - Apobec comme mécanisme efficace pour limiter la transmission potentielle de virus entre les espèces reste encore à élucider (Gaddis NC et al, 2004). En plus du VIH, l'activité cytidine désaminase des protéines Apobec 3 affecte d'autres rétrovirus (SIV, MLV, HTLV), et virus (le virus de l'hépatite B et l'AAV) (Holmes RK et al, 2007 ; Sire J et al, 2008). Par ailleurs, des études ont montré l'action des protéines Apobec 3 sur la mobilisation des séquences endogènes du génome (Holmes RK et al, 2007 ; Sire J et al, 2008 ; Chiu YL et al, 2009).

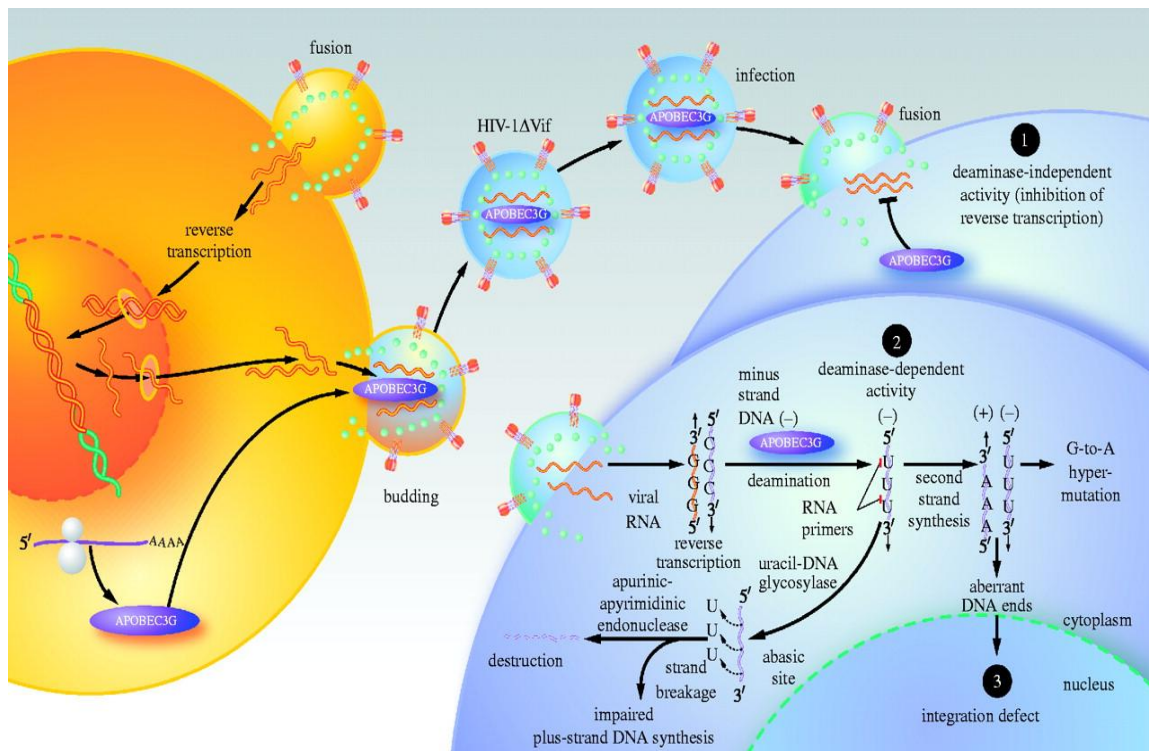


Figure 23 : Mécanisme de restriction du génome du VIH par Apobec 3 (Chiu YL et al, 2009)

En l'absence de Vif, A3G est incorporée dans les virions dans les cellules cibles, et peut agir comme un inhibiteur de la réplication du VIH.

1 : A3G lié à l'ARNm du VIH-1 peut inhiber l'action de la transcriptase inverse sur l'ARNm viral par un mécanisme indépendant de l'activité désaminase. Toutefois, cette inhibition est souvent incomplète, et le brin complémentaire de l'ADN viral est généré.

2 : A3G cause des mutations par désamination des résidus dC en dU sur brin néosynthétisé par la reverse transcriptase du VIH, cette action de A3G est suivie de deglycosylation par l'uracile ADN glycosylase qui conduit à une fragmentation du génome viral

3 : Une partie des mutations induites par A3G conduit à un défaut d'intégration de la séquence du génome viral

3) Apobec 3 et séquences endogènes

Les séquences endogènes représentent environ 45% du génome humain et comprennent les transposons à ADN, les rétrotransposons non autonomes et les rétrotransposons autonomes (Cegolon L et al, 2013). Ces derniers sont mobilisés par un ARN intermédiaire et sous l'action d'une transcriptase inverse « ré-intègrent » le génome. Parmi les rétrotransposons autonomes certains se distinguent par la présence de longues séquences répétées à

l'extrémité terminale : long terminal repeats (LTR), les autres n'en possèdent pas (non LTR) (Kazazian HH, 1998) (figure 24).

4) Apobec et rétrotransposons non LTR (séquences LINEs-1)

Les séquences LINEs-1 constituent la composante la plus active des rétrotransposons autonomes du génome. Ils sont dépourvus de LTR, contiennent une queue poly A et codent deux protéines dont l'une possède à la fois une activité endonucléase et une transcriptase inverse. Elles représentent 17% du génome humain mais peu sont capables de transposer en raison des mutations fréquentes de leur génome (Ostertag EM et al, 2001 ; Pavlicek A et al, 2002). Malgré la rareté des événements de rétrotransposition chez l'homme, des insertions de LINEs-1 ont été identifiées, par exemple dans la région codante du gène du facteur VIII responsable de l'hémophilie A, dans le cancer du sein et aussi dans le cancer du colon par dérégulation du gène APC (Lower R et al, 1996 ; Kazazian HH, 1998 ; Ostertag EM et al, 2001). Ces mutations insertionnelles des LINEs-1 seraient associées à une instabilité du génome (Kazazian HH et al, 2002) mais également chez l'homme (Han K et al, 2008 ; Lee J et al, 2008).

Cependant, l'hypométhylation globale de l'ADN est un des facteurs de réactivation des LINEs-1 dans les cancers, réactivation suivie de rétrotransposition à l'origine de la dérégulation des gènes proches de leur site d'insertion et d'une l'instabilité chromosomique (Pavlicek A et al, 2002, Antelo M et al, 2012). Le degré de méthylation des LINEs-1 est le reflet de la méthylation globale de l'ADN et une baisse de leur méthylation est considérée comme marqueur indépendant de pronostic dans le cancer colorectal (Antelo M et al, 2012). En outre, les LINEs -1 seraient soumises à l'action des protéines Apobec3 qui inhiberaient leur rétrotransposition par un mécanisme indépendant de l'activité cytidine désaminase (Esnault C et al, 2005 ; Stenglein MD et al, 2006 ; Bogerd HP et al, 2006 Muckenfuss H et al, 2006 ; Holmes RK et al, 2007 ; Sire J et al, 2008 ; Chiu YL et al, 2009 ; Bulliard Y et al, 2011).

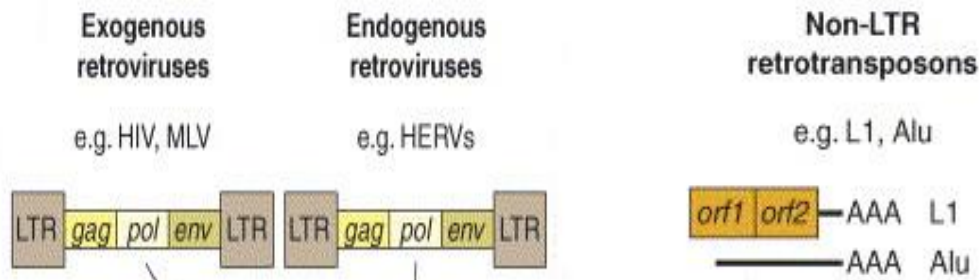


Figure 24 : Structure des séquences endogènes et des rétrovirus exogènes (Holmes RK et al, 2007)

La structure des rétrovirus exogènes comme des rétrovirus endogènes contient les séquences *Long Terminal Repeats* (LTR) ou longues répétitions terminales et présentent une similitude structurale. Les séquences LINE-s comme les séquences Alu ne possèdent pas de séquences LTR.

5) *Apobec 3 et rétrovirus endogènes*

Les rétrovirus endogènes constituent la classe la plus abondante des rétrotransposons à LTR, ils présentent une similitude structurale avec les rétrovirus exogènes (Kazazian HH, 1998 ; Blond JL et al, 2001 ; Lower R et al, 1996) et se distinguent des rétrotransposons par la présence du gène *env* qui code les protéines virales membranaires. Ils constituent très probablement des signatures d'infections anciennes dans les cellules germinales (Lower R et al, 1996) et représentent environ 8% du génome (Mullins CS et al, 2012). Le génome de presque tous les rétrovirus endogènes est défectif mais peut conserver un potentiel de rétrotransposition (Lower R et al, 1996). La région codante est composée de trois gènes *gag*, *pol* et *env*, délimitée par de longues répétitions terminales (LTR) aux deux extrémités. Les motifs des répétitions des LTR sont nécessaires à l'expression du génome du rétrovirus.

Le gène *gag* code la capsid virale et le gène *env*, l'enveloppe. C'est le gène *env* qui détermine l'infectiosité du rétrovirus notamment sa capacité de se propager, le gène *pol* code les enzymes nécessaires à la réplication virale, à l'intégration et au clivage des protéines (Nelson PN et al, 2003 ; Lower R et al, 1996). Cependant, la plupart des rétrovirus sont défectifs par inactivation suite à des délétions, perte préférentielle du gène *env*, à des recombinaisons entre les deux LTR, à des insertions (Mullins CS et al, 2012 ; Cegolon L et al, 2013) et probablement à la présence de protéines régulatrices comme *Apobec3* (Lee YN et

al, 2008 ; Cegolon L et al, 2013). En effet, de par la similitude des séquences des HERV et celle des rétrovirus exogènes, les protéines Apobec 3 peuvent exercer leur activité cytidine désaminase (Esnault C et al, 2005 ; Bogerd HP et al, 2006 ; Esnault C et al, 2006 ; Holmes RK et al, 2007 ; Chiu YL et al, 2009). Par ailleurs, les mécanismes épigénétiques notamment la méthylation contribuent aussi à l'inactivation des HERV (Mullins CS et al, 2012). En revanche, la présence des rétrovirus endogènes en nombre important, semble être un avantage sélectif pour l'hôte par un dispositif de régulation à un niveau post-transcriptionnel. Alors, la notion de parasites souvent utilisés pour les rétrovirus endogènes devra être reconsidérée, leur présence au sein du génome aidant à l'acquisition de nouvelles fonctions, à la diversité et à l'évolution de l'espèce (Mullins CS et al, 2012).

Certains processus biologiques et pathologiques restent influencés par des familles de HERV biologiquement actifs soit par leurs transcrits d'ARN soit par les mutations générées lors de leur rétrotransposition (Cegolon L et al, 2013).

En effet, les rétrovirus endogènes, en particulier murins confèrent une résistance contre les infections par des rétrovirus exogènes présentant la même spécificité superantigénique par l'expression d'un superantigène, tel le SAg des LTR de MMTV qui passe par l'élimination de clones réactifs de cellules T. Outre, ce mécanisme immunitaire, la résistance à l'infection peut se faire par compétition entre des rétrovirus endogènes et exogènes au niveau des récepteurs (Blond JL et al, 2001). Ce phénomène de résistance aux infections définit un mécanisme d'interférence pour prévenir la cellule d'une infection par un virus en mémoire. Le gène murin Fv-4, qui correspond à un provirus endogène type MLV défectif code une glycoprotéine d'enveloppe (gp 70). Cette dernière est apparentée à des protéines env de MLV et grâce à son allèle de résistance, compromet par interférence à la surface de la cellule, l'entrée des virus exogènes MLV écotropes qui utilisent tous le même récepteur. De même, le gène murin Fv-1 confère une résistance à l'infection MLV par expression d'une protéine de la capsidie apparentée à la protéine Gag de MLV. La séquence du gène Fv-1 présente une homologie de 60% avec l'homologue humain de MLV, le HERV-L. Le produit du gène Fv-1 interagit avec la capsidie virale du virus infectieux après son entrée dans la cellule perturbant ainsi l'importation vers le noyau et l'intégration du provirus (Blond JL et al, 2001 ; Nethe M et al, 2005).

Aussi, le gène env de trois rétrovirus (ERV-3, HERV-W et HERV-FRD) semble impliqué dans la formation du syncytiotrophoblaste placentaire et HERV-FRD serait à l'origine du dispositif de protection du fœtus contre l'immunité maternelle (Cegolon L et al, 2013). Des séquences de ERV-9 LTR ont été décrites chez les primates supérieurs au cours de leur évolution et chez l'homme où l'activité du régulateur a été retrouvée à un taux plus important dans les cellules embryonnaires que dans les cellules hématopoïétiques. De même, HERV-E est un stimulateur des gènes du récepteur de l'endothélium B et de l'apolipoprotéine C-I (Mullins CS et al, 2012). Mais, plusieurs mécanismes conduisant à l'expression incontrôlée des rétrovirus peuvent être responsables de divers processus pathologiques notamment les maladies autoimmunes et le cancer (Mullins CS et al, 2012).

Un des mécanismes par lesquels les HERV conduiraient à la transformation serait la déméthylation ou l'hypométhylation des HERV permettant leur réexpression (Blond JL et al, 2001 ; Mullins CS et al, 2012). Il a été également démontré que l'insertion de novo ou la translocation de rétroéléments dans le génome pouvait inactiver un gène suppresseur de tumeurs, favoriser l'expression des proto-oncogènes et moduler les gènes du système majeur d'histocompatibilité (HLA) (Blond JL et al, 2001 ; Mullins CS et al, 2012 ; Cegolon L et al, 2013). L'expression de HERV-K a été révélée dans des cellules de tératocarcinome et des cellules tumorales de cancer du sein (Blond JL et al, 2001), expression qui serait consécutive à un défaut des points de contrôle de l'ADN et à des mutations du gène p53 (Mullins CS et al, 2012). En outre, une mutation insertionnelle dans un cadre de lecture peut conduire à une perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeur, alors que l'insertion dans un promoteur d'oncogène peut éventuellement contribuer au développement tumoral (Lower R et al, 1996). Par ailleurs, l'expression des produits des ERVH habituellement silencieux peut stimuler une réponse immunitaire cellulaire ou humorale contre les propres cellules ERVH (Wentzensen N et al, 2007) ou une immunotolérance. Cette immunotolérance induite semble déterminante dans certains processus physiologiques comme la grossesse (Blond JL et al, 2001) et pourrait soustraire les cellules cancéreuses du rejet du système immunitaire. Enfin, l'expression des protéines d'édition dans des lignées de cellules tumorales, comme dans une variété de tumeurs dont le cancer colorectal et l'édition du gène suppresseur de tumeur NF1 responsable du neurofibromatose laissent supposer un rôle probable des protéines Apobec 3 dans la transformation néoplasique (Castells A et al, 2000 ; Jarmuz A et

al, 2002 ; Zhou CZ et al, 2002 ; Wedekind JE et al, 2003 ; Anant S et al, 2003 ; Zheng HT et al, 2005 ; Komatsu A et al, 2008 ; Burns MB et al, 2013).

Plus récemment, le séquençage de génome de cancers a relevé des régions d'hypermutation localisées représentant des *hots spots* comparables à celles induites par une désaminase hypermutagène (Lada AG et al, 2012) chez la levure. Mieux, la présence de ces mutations presque exclusivement sur des résidus cytidine précédés de thymidine sur le même brin suggère l'implication plus que probable des protéines Apobec 3 et l'étude de Taylor (Taylor B JM et al, 2013) met en évidence que l'Apobec 3 B plus que les autres est responsable de l'hypermutation observée dans le cancer du sein.

Objectifs de l'étude

Ce travail a pour objectif de déterminer les facteurs modulateurs de l'infiltrat lymphocytaire par l'étude de 135 patients porteurs de cancer colorectal. Plus spécifiquement, l'identification des facteurs modulateurs passe par le contrôle de l'expression du rétrovirus endogène (HERV-H) et la délétion du locus Apobec3 en 22q13. L'étude a recherché aussi les corrélations entre l'infiltrat lymphocytaire et les différents marqueurs moléculaires couramment étudiés, notamment la stabilité des microsatellites, les mutations des gènes B-raf, k-ras et Pi3K, la méthylation de MLH1 et des LINEs-1.

Méthodologie

Structures de recherche

Le laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire du CHRU Trousseau de Tours a servi de cadre d'étude. Il constitue un centre de référence en matière de cancer colorectal et fait partie du pôle de biologie des cancers. L'étude a concerné des pièces biopsiques de tissus sains et tissus tumoraux de patients opérés de cancer colorectal à Tours (France).

Matériels et Méthodes

1) Patients

Nous avons travaillé sur la banque de tumeurs du laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire du CHRU de Trousseau de Tours. Tous les échantillons d'ADN proviennent de patients opérés à Trousseau entre 2007 et 2008. L'ADN a été extrait à partir de 270 pièces biopsiques de tissus sains (n= 135) et de tissus tumoraux (n= 135). L'étude a concerné 73 hommes et 62 femmes avec un sexe ratio de 1,18. 73% de la population de l'étude avaient plus de 65 ans et une moyenne d'âge de 72 ans. Tous les patients qui ont participé à l'étude ont donné leur consentement après avis éclairé.

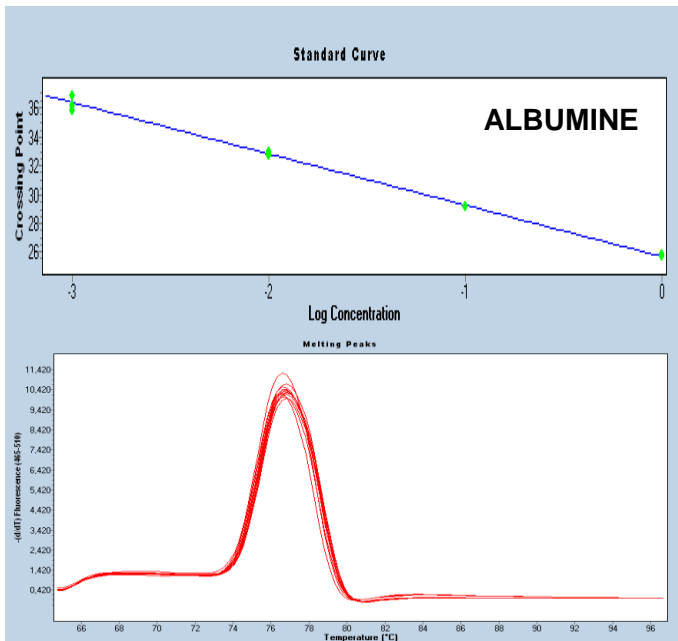
2) Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique (ADNg) a été extrait sur des prélèvements de tissus congelés à -80°C provenant du service d'anatomopathologie, à l'aide du kit QIAGEN QIAamp DNA Micro kit (Qiagen). En présence de Proteinase K, le prélèvement est mis dans un tampon de lyse puis incubé toute une nuit à 56°C. Ensuite, un second tampon est ajouté pour terminer la lyse. Après centrifugation, le lysat est transféré sur une colonne de silice pour fixer l'ADN. Enfin, l'ADN est élué dans de l'eau puis récupéré après centrifugation à grande vitesse. La quantité de l'ADN est mesurée au spectrophotomètre (Cary100Scan, Varian) puis l'ADN est conservé à -20°C pour servir aux différents dosages.

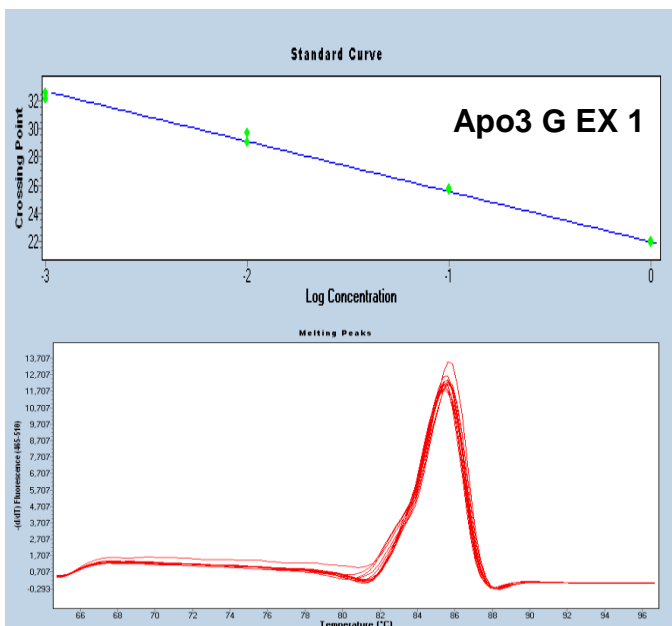
Les échantillons d'ADN sont analysés par *PCR* quantitative à la recherche d'une éventuelle délétion du gène *Apobec3*. Nous avons ensuite étudié une série de marqueurs moléculaires (stabilité des microsatellites, mutations de gènes, profil de méthylation *MLH1*, *ERVH* et infiltrat lymphocytaire).

3) Gamme d'étalonnage de la courbe standard

Nous avons réalisé une gamme d'étalonnage des gènes Apobec 3G et 3B par rapport au gène de l'albumine, gène de référence. L'ADN standard utilisé est extrait du sang total d'un sujet indemne de cancer colorectal. Cet ADN à 25ng/ml est utilisé pur, puis dilué au 1/10, au 1/100 et au 1/1000. De l'eau a été utilisée comme contrôle négatif. Le test est effectué en triplicate.



Error: 0,0141
Efficiency: 1,910
Slope: -3,559
YIntercept:
25,74
Link: 0,000



Error: 0,0143
Efficiency: 1,915
Slope: -3,544
YIntercept:
22,03
Link: 0,000

Figure 25: Droite de calibration

A : albumine/ B : Apobec3G

La réaction PCR portant sur les 3 gènes (**Tableaux Annexe 3A-1**) a utilisé les conditions suivantes à l'aide du kit LightCycler^R 480 SYBR green I master (Roche) : Master Mix 1X amorce sens 0,5µM, amorce antisens 0,5µM, 50ng de l'ADNg pour un volume réactionnel de 20µl. La plaque PCR est recouverte d'un film adhésif transparent, centrifugée 2 minutes à 500g et ensuite déposée sur l'appareil LightCycler^R 480 II Roche®. L'amplification par PCR quantitative est effectuée à une température d'hybridation de 60° C et 45 cycles. Le protocole d'amplification est le suivant : 95°C pendant 5 minutes suivi de 45 cycles à 95°C 10 sec, 60°C 10 sec et 72°C 10 sec puis d'une phase de refroidissement. Les données sont analysées à l'aide du logiciel LightCycler^R 480 SW 1.5.

4) Mise en évidence de la délétion du gène Apobec par PCR quantitative

Une fois la courbe d'étalonnage établie, les gènes Apobec 3G et 3B sont testés sur les échantillons d'ADN de tissus sain et tumoral de chaque patient, ramenés à 25ng/ml. Sur la même plaque, de l'eau est utilisée pour vérifier la qualité de la manipulation, il en est de même du calibrateur à 25ng/ml et du calibrateur dilué au 1/100°. Tous les échantillons sont testés en double. Les conditions PCR restent inchangées. L'analyse des résultats va faire appel à la courbe standard déjà établie. La présomption d'une délétion du gène du locus Apobec 3 par PCR quantitative est déterminée par la valeur du rapport tissu sain sur tissu tumoral du même patient. Tout ratio de valeur > à 1,5 est considéré comme indicateur d'une délétion du gène Apobec 3 concerné.

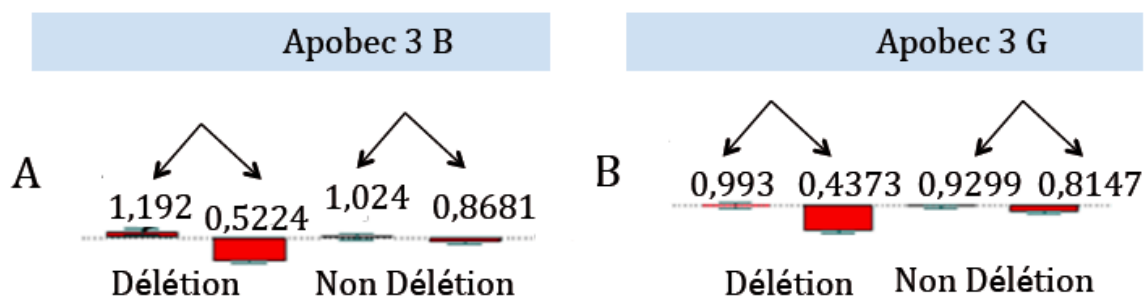


Figure 26 : Mise en évidence de la Déletion du gène Apobec 3B et 3G sur les mêmes patients

A : exemple de déletion et de non déletion: $TS/TT=1,192/0,5224=2,28 > 1,5$;

$TS/TT= 1,024/0,8681=1,18$ (TS: tissu sain ; TT : tissu tumoral)

B : exemple de déletion et de non déletion: $TS/TT=0,993/0,4373=2,27 > 1,5$;

$TS/TT= 0,9299/0,8147=1,14$

5) Etude de la stabilité des microsatellites et du polymorphisme de C-met

Parallèlement, la recherche de la stabilité des microsatellites a été réalisée par PCR multiplexe fluorescente et consiste en une amplification simultanée de 6 loci dans une seule réaction PCR. Les 6 loci (**Tableau Annexe 3A-2**) concernent les couples d'amorces des marqueurs NR 21, NR 24-25, Bat 25-26 et Cat25. L'analyse par PCR a été effectuée sur un thermocycleur 2720 (Applied Biosystems) et a nécessité les conditions suivantes : 200 ng d'ADNg, tampon Ampli Taq Gold (1X), 1,5mM de MgCl₂, 200μM de dNTP, 0,5μM de chaque primer, 1U de l'Ampli Taq Gold polymerase et 3μl de solution Q dans un volume final de 20μl. Le programme d'amplification est effectué après 95°C pendant 10 mn suivi de 35 cycles à 94°C 45 sec, 54°C à 45sec et 72°C 15min en 35 cycles puis une extension finale à 72°C 15 min. Les produits PCR générés sont dénaturés avant l'analyse des fragments sur le séquenceur capillaire 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems). La dénaturation utilise 1μl du produit de PCR auquel on ajoute 18,5 μl de formamide (Applied Biosystems) et 0,5 μl de marqueur de taille GeneScan™ 500 LIZ^R (Applied Biosystems) puis le mélange est dénaturé 5 min à 96°C. Les résultats sont interprétés à l'aide du logiciel GeneMapper (Applied Biosystems). Ainsi, trois profils peuvent être obtenus lors de l'analyse :

- microsatellite stable (MSS) : pas d'instabilité

- instabilité de microsatellite basse (MSI-L) : moins de 2 instabilités
- instabilité de microsatellite forte (MSI-H) : au moins 2 instabilités

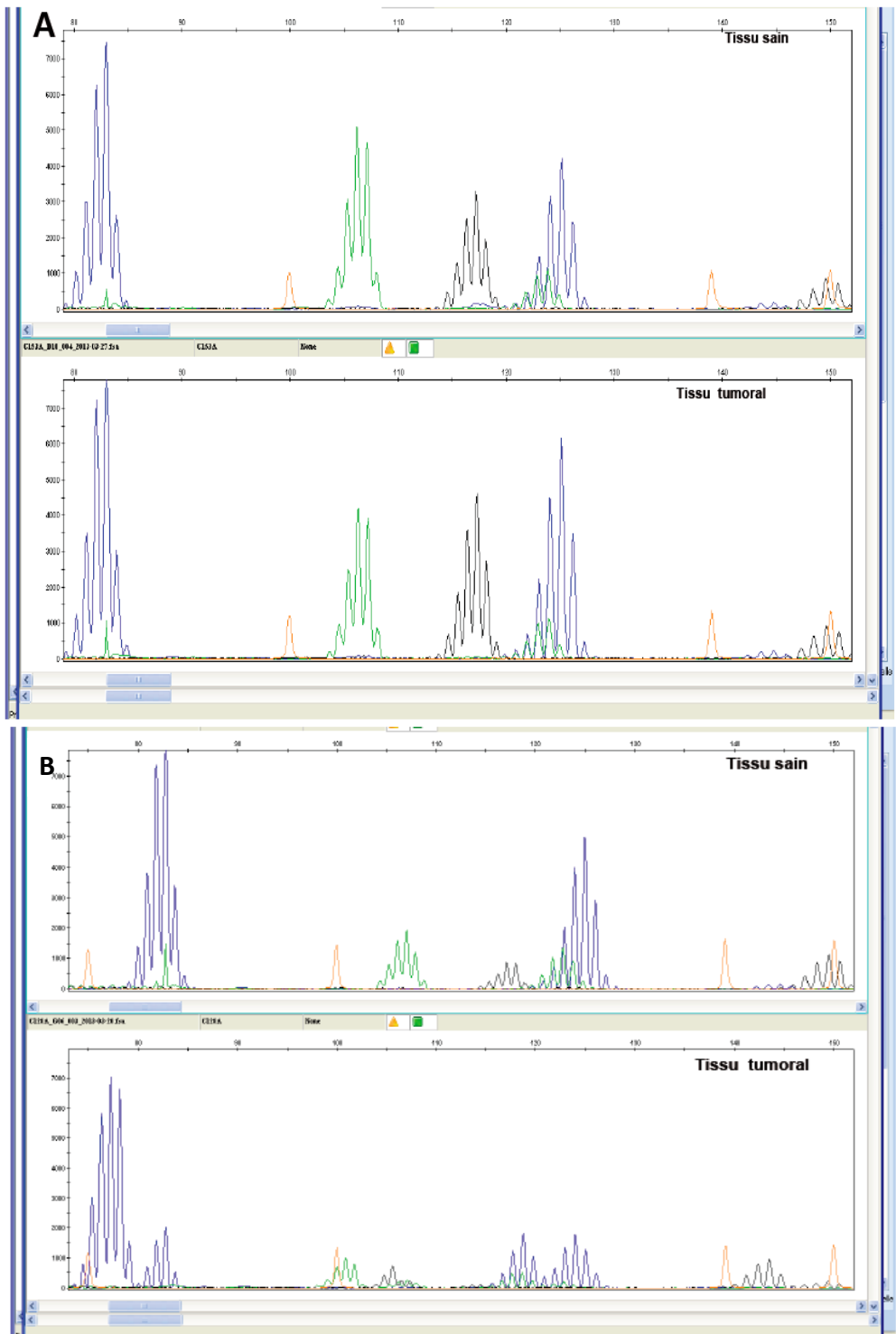
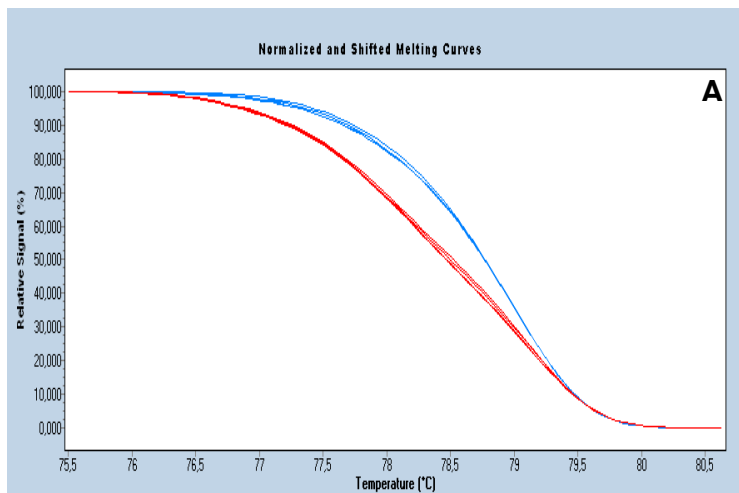


Figure 27 : Exemple d'analyse des microsatellites d'une tumeur.
 A : stable / B : instable

6) Recherche des mutations des gènes B-raf, Kras et Pi3K

La recherche de mutations a été réalisée à l'aide du kit (Light Cycler 480 II HRM master Roche®). Tous les échantillons d'ADN ont été ramenés à 15ng/ml par dilution avec de l'eau pure. Le mélange réactionnel pour un tube comprend : 30 ng d'ADNg, Master Mix 1X (contenant la Taq polymérase, les dNTPs et l'agent intercalant fluorescent), 3mM de MgCl₂, 0,2μM d'amorce sens et d'amorce antisens dans un volume final de 20μl. Le volume est mélangé par pipetages et adapté au nombre d'échantillons à analyser. Le mélange réactionnel est ensuite distribué suivant le plan de plaque. La qualité de la manipulation a été appréciée avec de l'eau, un contrôle positif et un contrôle négatif parallèlement à ces échantillons d'ADN. L'analyse est faite en double. La plaque est ensuite recouverte de film transparent puis centrifugée 2min à 500g et déposée sur le light Cycler 480 II Roche®. La recherche de mutation de l'exon 15 du gène B-raf, des codons 12 et 13 de Kras au niveau de l'exon 2 et des exons 20 et 9 de Pi3K (**Tableau Annexe 3A-3**) a utilisé la technique High Resolution Melting ou (*HRM*), nécessitant une *PCR* de 50 cycles pour une température d'hybridation de 68°C.

Les produits *PCR* générés ont été détectés par mesure de la fluorescence de l'agent intercalant. L'analyse des courbes de fusion a été réalisée avec le logiciel Light Cycler 480 software release 1.5.0 Roche®. Le résultat permet d'apprécier la présence ou non d'une mutation, résultat qui lorsqu'il est positif est confirmé par séquençage.



Muté 

Non muté 

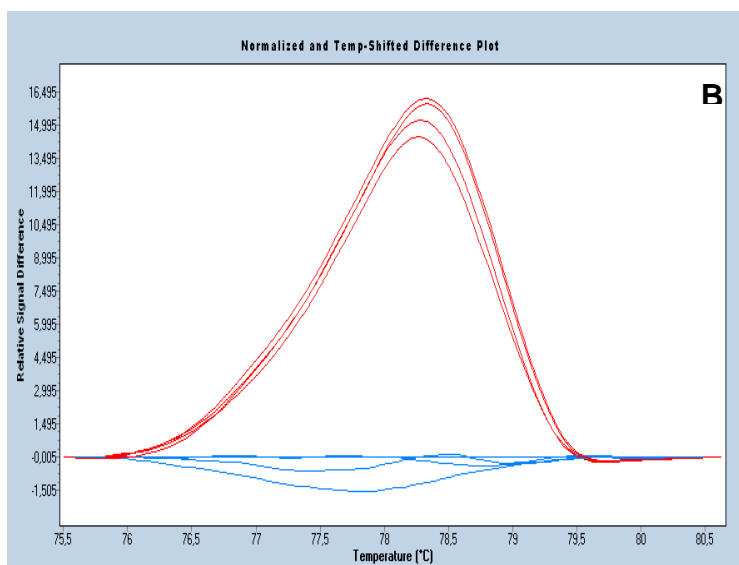


Figure 28: Résultat de mutation des gènes B-raf, K-ras et Pi3K par HRM

A : courbe de fusion : l'échantillon muté a une température moyenne de fusion plus basse que l'échantillon non muté

B : différence de Plot : une dérivation des courbes de fusion montre une modification de la séquence de l'amplicon analysé par une déviation significative par rapport à la ligne horizontale (qui correspond au contrôle non muté)

7) Etude de la méthylation du gène MLH1, des Lines-1 et de HERVH

L'étude de la méthylation a débuté avec la méthylation de l'ADN témoin puis la conversion des échantillons d'ADN avant leur analyse par pyroséquençage ou par séquençage classique.

➤ Méthylation de l'ADN témoin

Tout d'abord, la préparation d'un témoin méthylé à 100%. Cette méthylation a été réalisée à l'aide du Kit Zymo Research®. L'ADN témoin provient du sang d'un sujet indemne de tout CCR. La méthylation a été réalisée suivant le protocole du kit avec une légère modification selon le schéma suivant: CpG tampon 1X, S-adenosylmethionyl 1X, 600ng d'ADN servant de témoin, 1U d'enzyme CpG méthylase et de l'eau pour un volume suffisant à 20µL.

Le mélange réactionnel est porté à 30°C pendant deux heures dans le thermocycleur. Pour avoir une méthylation complète, au bout de deux heures, nous avons ajouté de nouveau 1U d'enzyme et l'incubation est prolongée toute la nuit à 30°C. L'ADN témoin méthylé est ainsi conservé à - 20°C et utilisé pour les différents dosages.

➤ Conversion des échantillons d'ADN

L'étude de la méthylation se poursuit avec la conversion des ADN, réalisée à l'aide du kit de conversion de Zymo Research® (EZ DNA Methylation-Gold™ kit). La conversion au bisulfite va convertir tous les cytosines non méthylés en uracile dans un dinucléotide CG tandis que les cytosines méthylés restent inchangés. Les échantillons d'ADN, de même que l'ADN témoin méthylé à 100% et l'ADN témoin non méthylé ont été ramenés à 300 ng. La réaction de conversion nécessite 300 ng d'ADNg et 130 µl de réactif de Conversion dans un tube PCR. Le tube est ensuite incubé au thermocycler à 98°C pendant 10 minutes puis 64°C pendant 2,5 heures et stabilisé à 4°C. Après l'incubation, l'échantillon est placé dans une colonne (Zymo-Spin™ IC Column) à laquelle on ajoute 600µl de M-Binding Buffer. Puis, le mélange est centrifugé à grande vitesse pendant 30 secondes. Ensuite, la colonne est lavée avec 100 µl de M-Wash Buffer et centrifugée à grande vitesse pendant 30 secondes.

L'étape de désulphonation nécessite 200 µl de tampon de M-Desulphonation déposé sur la colonne, suivi d'une incubation de 20 minutes et 30 secondes de centrifugation à grande vitesse. Puis, la colonne est lavée deux fois de suite avec 200 µl de tampon de M-Wash et centrifugée à grande vitesse pendant 30 secondes.

L'ADN converti est élué dans 10µl d'eau et conservé à -20°C pour la recherche de la méthylation.

➤ Evaluation du degré de méthylation

L'analyse de la méthylation des différents gènes est faite par pyroséquençage (MLH1 et LINEs) et par séquençage classique (HERV-H).

Etude du degré de méthylation du gène MLH1

L'analyse a été réalisée par la technique *HRM* utilisant le kit (Light Cycler 480 II HRM master Roche®). La taille du produit attendu est de 140 pb avec les couples d'amorces: l'amorce sens MLH1meth-S: 5'-tgttttattggttgatat-3' et l'amorce antisens: MLH1meth-AS: 5'-tctcttcgtccctccctaaa-3'.

Le mélange réactionnel comprend le Master Mix 1X, 4mM de MgCl₂, 0,3µM d'amorce sens et antisens. De l'ADNg (60ng) est ajouté au mélange réactionnel puis homogénéisé par retournements du tube, et distribué sur la plaque d'échantillons. Pour apprécier la qualité de l'analyse, nous avons utilisé aussi comme échantillons, de l'eau, de l'ADN méthylé 100% et de l'ADN non méthylé. L'amplification est effectuée à une température d'hybridation de 50°C pour 50 cycles. Les produits *PCR* sont détectés par mesure de l'intensité du signal de la fluorescence. Les résultats ont été analysés suivant le comportement des témoins méthylé ou non. Tous les résultats méthylés ont été quantifiés par pyroséquençage. La quantification est effectuée à l'aide des kits PyroMark Q24 CpG MLH1 et PyroMark Gold Q24 reagents de Qiagen suivant les recommandations du fournisseur. L'analyse des résultats est réalisée à l'aide du logiciel PyroMark Q24 Software de Qiagen. La moyenne des pourcentages obtenus pour les cinq sites CpG permet d'obtenir le degré de méthylation.

MLH1

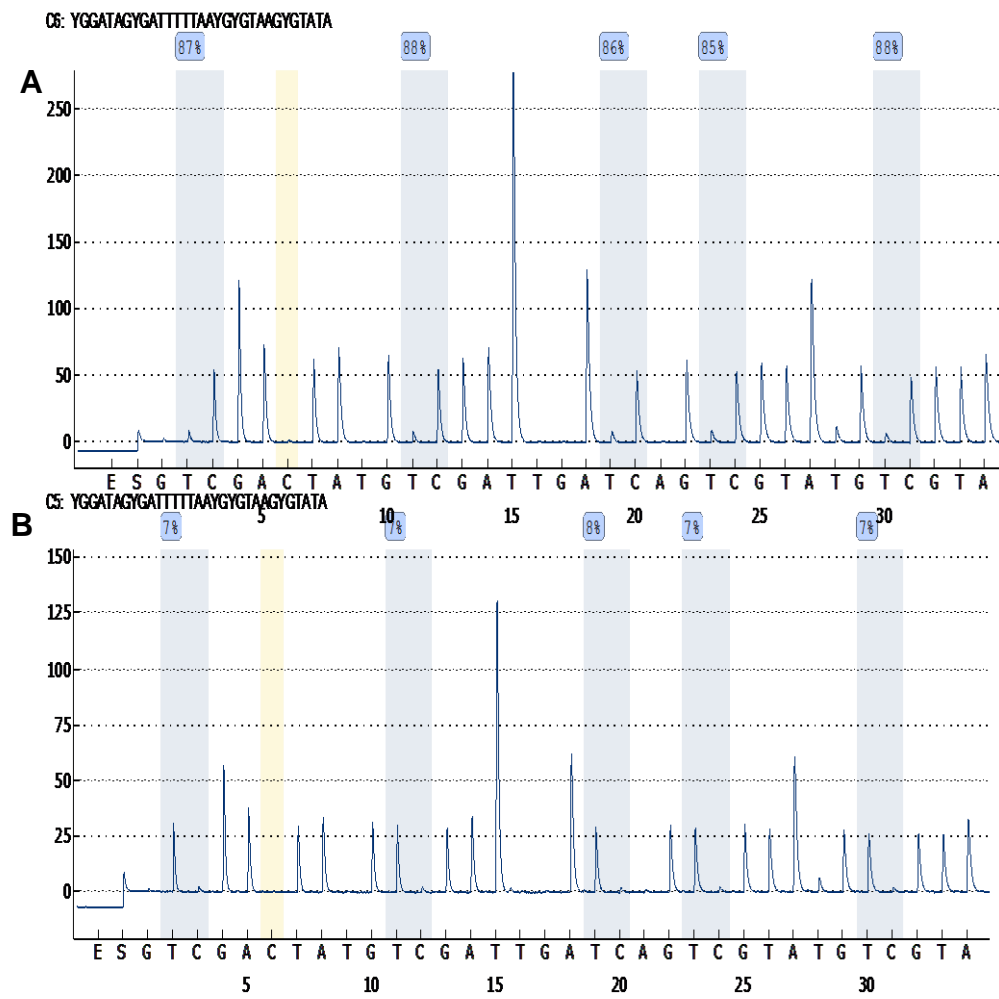


Figure 29: Profil de méthylation du gène MLH1 d'un patient

A : tissu tumoral méthylé/ B : tissu sain déméthylé

- **Etude du degré de méthylation des LINEs-1**

Le degré de méthylation des sites CpG des LINEs-1 est le reflet du niveau de méthylation globale du génome humain. L'étude de la méthylation des LINEs-1 a été réalisée par Pyroséquençage. Il s'agit d'un séquençage direct et séquentiel d'une courte séquence d'ADN qui permet d'avoir rapidement le profil de méthylation. Si le nucléotide incorporé est celui attendu dans le brin en cours de synthèse, du pyrophosphate est libéré. Ce dernier, grâce à une ATP sulfurylase va donner de l'ATP. Sous l'action d'une luciférase, l'ATP va donner un signal lumineux qui va se traduire sur le pyrogramme sous la forme d'un pic.

Les ADN convertis ont été amplifiés à 50°C pendant 40 cycles dans les conditions suivantes : 1X de tampon de la polymérase, 1,5mM de MgCl₂, 2mM de dNTPs, 0,2µM amorce sens et amorce antisens, 1U de Taq gold (5u/µl), 30ng d'ADNg dans un volume final de 25µl.

L'analyse a été effectuée suivant le protocole du kit PyroMark[®] Q24 CpG LINEs-1 de Qiagen et PyroMark Gold Q24 reagents de Qiagen selon les instructions du fournisseur. Les données sont analysées à l'aide du logiciel PyroMark Q24 Software (Qiagen). Le pourcentage de méthylation de trois sites CpG de la séquence (TTYGTGGTGYGTYGTTT) à analyser est affiché sur le pyrogramme permettant de classer les résultats suivant leur degré de méthylation pour chaque échantillon (tissu sain et tissu tumoral). La moyenne des pourcentages obtenus pour les trois sites CpG de chaque échantillon est calculée. Nous avons considéré qu'une déméthylation est présente lorsque la différence des moyennes entre le tissu sain et le tissu tumoral est supérieure ou égale à 20.

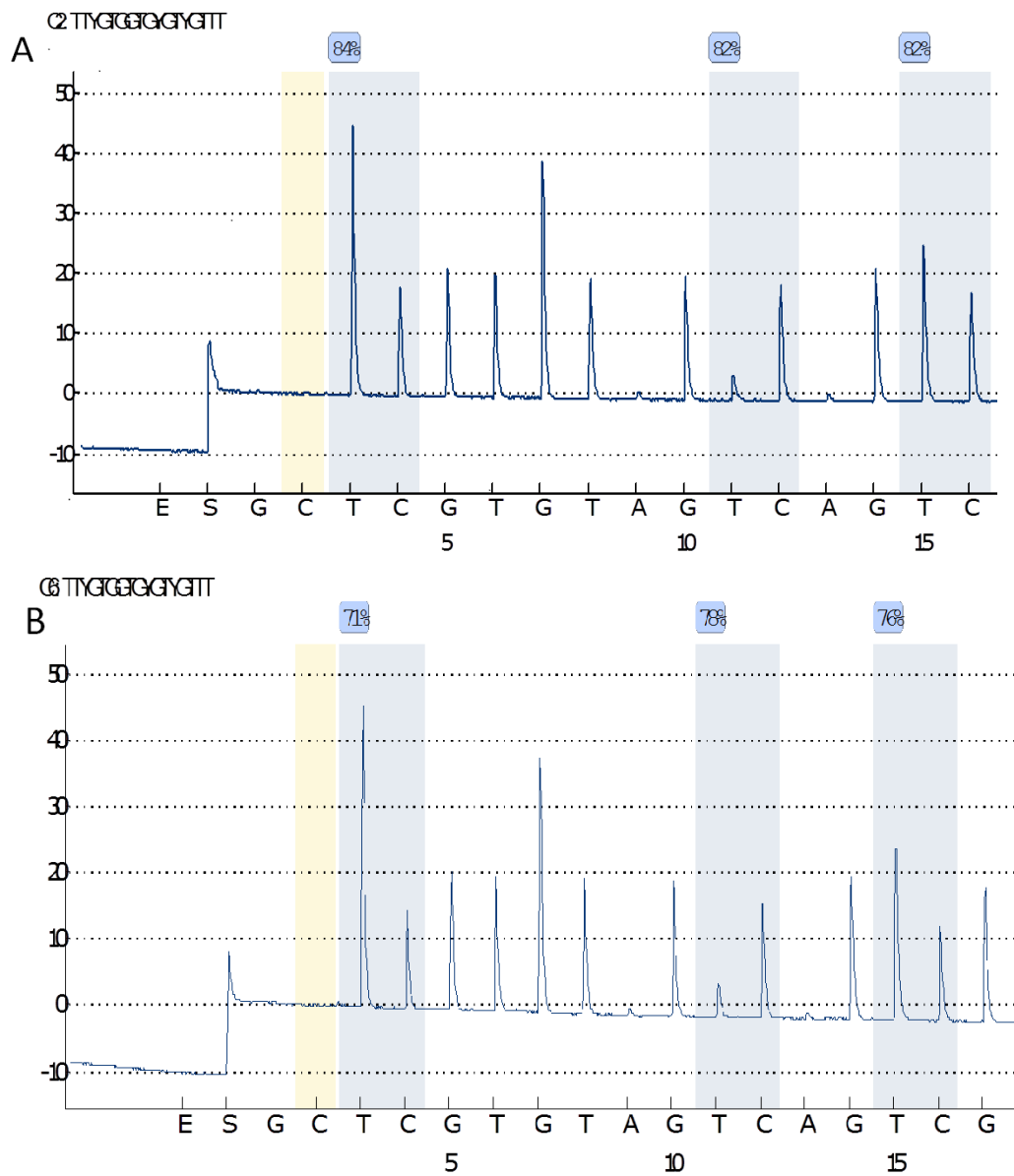


Figure 30 : Profil de séquence LINEs méthylé :

A : tissu sain (83%) / B : tissu tumoral (75%)

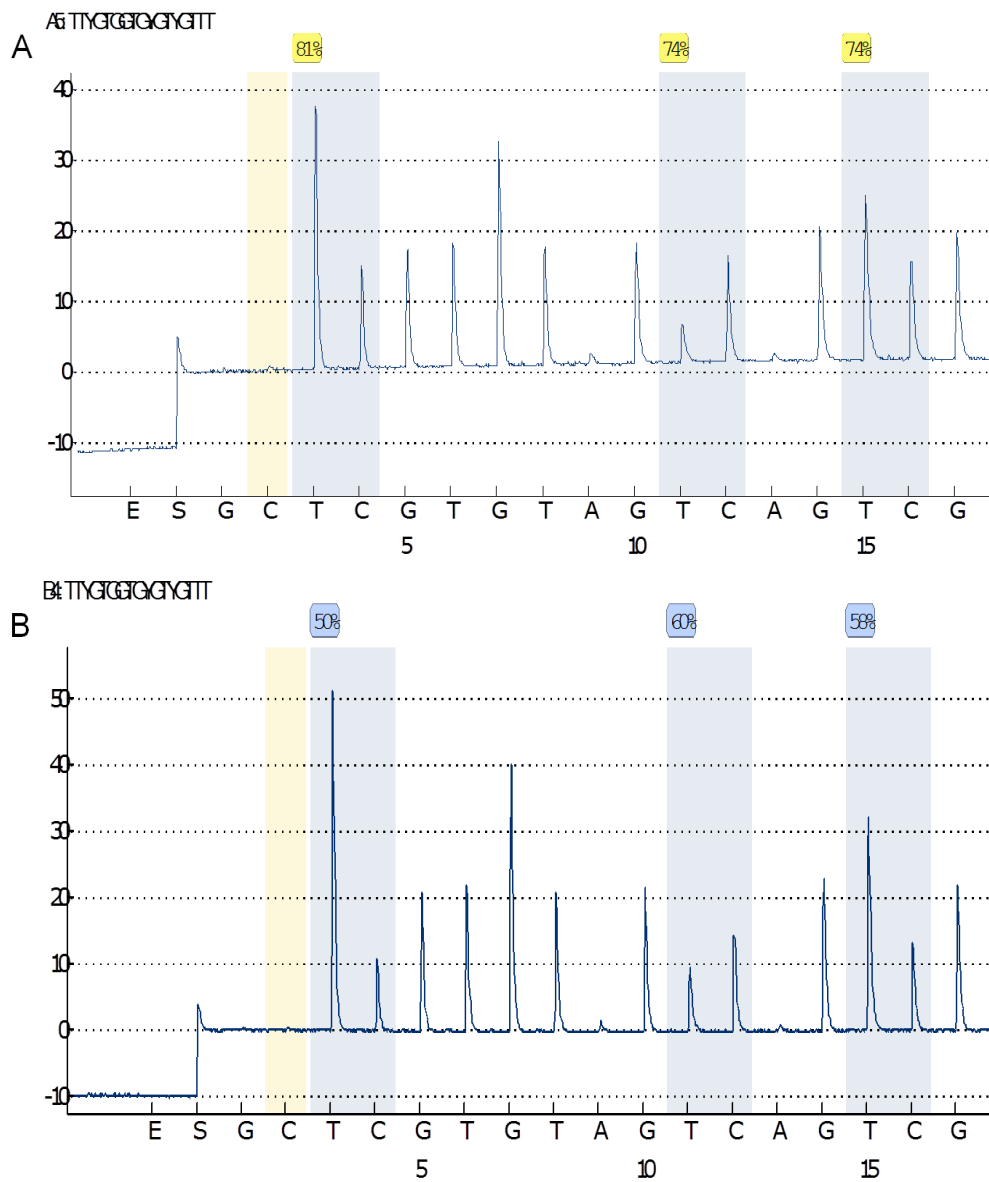


Figure 31 : Profil de séquence LINEs déméthylé

A : tissu sain (76%) / B : tissu tumoral (56%)

- **Etude du degré de méthylation du rétrovirus endogène (ERVH-H)**

La recherche de méthylation des rétrovirus endogène (ERVH-H) est effectuée par amplification de l'ADN converti suivie de séquençage classique.

L'amplification pour ERVH-H s'effectue à 55°C et 40 cycles et utilise les couples HERVH2 meth-S: 5'-atatgaggatatagagtaggttat-3' et HERVH2meth-AS :

5'-taattcttcaattacttcaaacca-3'. La taille du produit attendu est de 114pb. La séquence du HERV-H étudiée est obtenue de l'étude de (Wentzensen N et al, 2007).

L'amplification a nécessité les conditions suivantes : 19 µl de mix qui comprend du tampon 1X, 1,5 mM de MgCL₂, 2mM de dNTPs, 0,5µM d'amorce sens, 0,5µM d'amorce antisens et 30 ng de l'ADNg dans un volume final de 20 µl. Les produits *PCR* obtenus sont conservés à -20°C avant d'être séquencer.

Le degré de méthylation de HERVH2 (séquence comprenant deux sites CpG de méthylation) est effectué par le calcul de la hauteur des pics des C et des T pour les deux sites CpG présents dans la séquence. Le calcul prend en compte le pourcentage que représente chaque base C et T par rapport à la hauteur du pic. Nous avons fait la moyenne des pourcentages obtenus pour les C, pour tous les échantillons et nous avons considéré que l'échantillon est déméthylé lorsque la différence entre le tissu sain et le tissu tumoral est supérieure ou égale à 20.

8) Séquençage des différents produits PCR

Le séquençage débute par la purification des produits obtenus par *PCR* ou *HRM*. Cette purification est effectuée suivant le mode opératoire utilisant l'Exosap-it. Certains gènes nécessitent des couples d'amorces spécifiques pour le séquençage (**Tableau Annexe 3A-4**). Les produits *PCR* sont mélangés à raison de 1,3 µl d'Exosap-it pour 10 µl de produit *PCR*. Après homogénéisation et centrifugation, le mélange est incubé au thermocycleur à 37°C de dénaturation pendant 15 mn et 80°C d'hybridation pendant 15 mn. Il s'ensuit la réaction de séquençage réalisée à l'aide du kit de séquençage Big Dye terminator V3.1 (Applied Biosystems) qui utilise le tampon de séquençage 1X, 0,4 µM d'amorce, 1 µl de mix Big Dye dans un volume final de 10 µl. Le mélange est réparti sur la plaque *PCR* et amplifié selon le

programme suivant : 1 mn à 96°C pour la dénaturation, 96°C d'élongation à 20 sec, 50°C d'hybridation à 15 sec et 4 mn pour l'élongation à 60°C pendant 30 cycles.

La réaction de séquençage est ensuite purifiée à l'aide du kit de purification Big Dye® XTerminator™ V3.1 de Applied Biosystems. Pour 10 µl réaction de séquençage sont ajoutés, 45 µl de tampon SAM™ et 10 µl de billes Big Dye® XTerminator™. La plaque est recouverte d'un film adhésif et placée sur l'agitateur pendant 30mns. Après homogénéisation, la plaque est centrifugée pendant 2mns à 1 000g et est prête pour l'analyse des séquences sur l'appareil capillaire 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Les résultats visualisés à l'aide de fluorochromes peuvent rendre compte de la présence ou non d'une mutation ou d'une méthylation. Les données de séquençage sont analysées par le logiciel Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems).

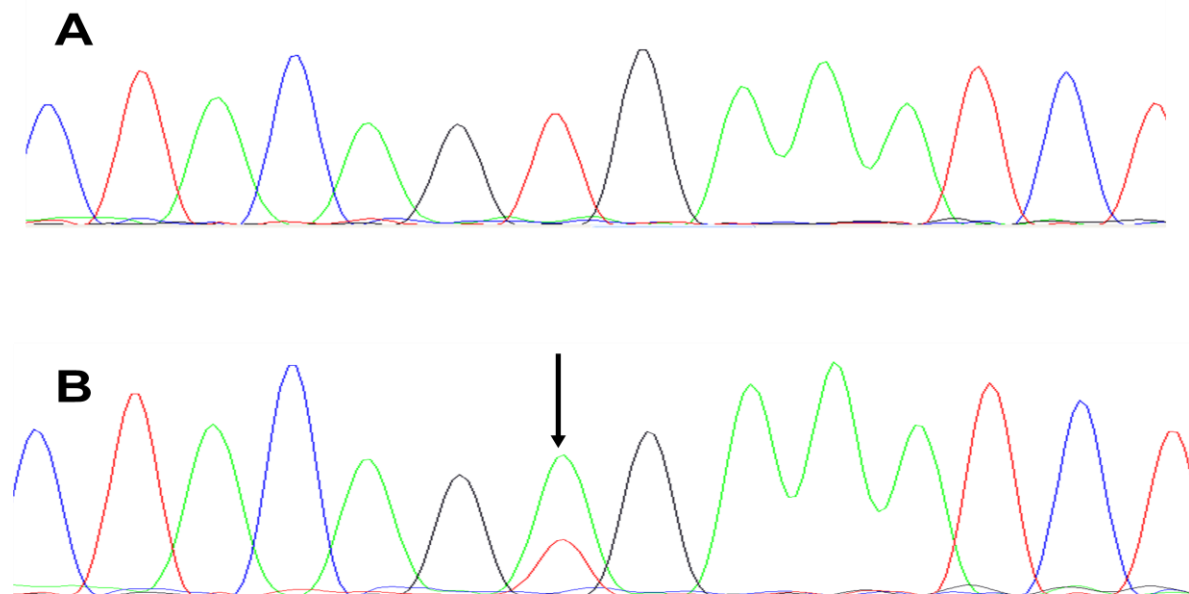


Figure 32 : Exemple de mutation de séquençage du gène B-raf

A : séquence non mutée B : séquence mutée B-raf A > T V600E

9) Marquage immunologique des lymphocytes CD-4, CD-8 et CD-45RO

- **Préparation et la fixation des lames**

Les échantillons ont été étalés sur des lames en coupes de 4µm. La technique a été réalisée après déparaffinage et démasquage antigénique par la chaleur dans une solution d'EDTA. La révélation a été réalisée avec un kit ultraview universal DAB (Ventana) utilisant une technique avec un anticorps secondaire multimère sur lequel la peroxydase est directement conjuguée, sans biotine. Les anticorps suivants utilisés provenaient de Dako, Danemark : CD3 monoclonal (clone F7.2.38, dilution 1:200, incubation de l'anticorps 32 minutes), CD8 monoclonal (clone C8/144B, dilution 1:50, incubation de l'anticorps 20 minutes) et CD45RO monoclonal (clone UCHL1, dilution 1:2000, incubation de l'anticorps 20 minutes). Une contre-coloration par l'hématoxyline était appliquée. La technique a été réalisée sur un automate Benchmark XT.

- **Quantification des lymphocytes**

Chaque section de la tumeur a été évaluée pour l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale au grossissement $\times 100$ (objectif $\times 10$) pour choisir la zone d'infiltration lymphocytaire la plus élevée. Ensuite, le nombre de lymphocytes infiltrant les nids de cellules tumorales (lymphocytes intra-épithéliaux) a été évalué dans 3 champs au grossissement $\times 200$, ce qui correspondait à une surface totale de 1,19 mm²/champ. La moyenne des 3 champs a été calculée. Le degré d'infiltration lymphocytaire a été classé en utilisant la moyenne, comme suit: nulle ou légère: 0-19, modérée: 20-49 et sévère: ≥ 50 cellules positives. Le comptage des lymphocytes a été effectué par un pathologiste, en aveugle des données de la biologie moléculaire.

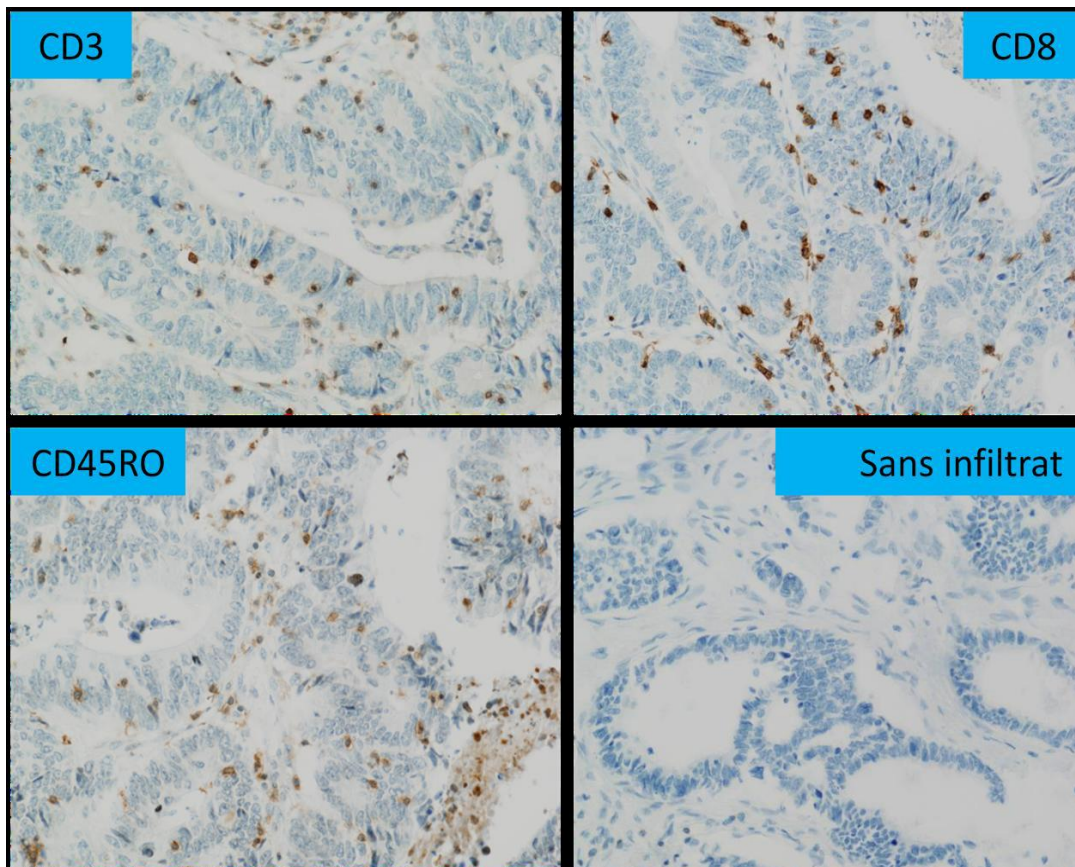


Figure 33 : Résultat du marquage immunohistochimique

Les tumeurs infiltrées avec les marqueurs CD3, CD8 et CD45RO sont identifiées par des tâches brunâtres par comparaison avec la tumeur sans infiltrat

10) Analyse Statistique des résultats

Les données sont obtenues par le calcul de la moyenne des différents paramètres et de leur pourcentage. Pour étudier les associations entre les modalités des variables et dégager des profils d'individus, nous avons utilisé l'Analyse des Correspondances Multiples (ACM) à l'aide du logiciel R et du package *FactoMineR*.

Nous mettons en actif les huit variables suivantes : la délétion, la méthylation (*MLH1*, *LINE1*, *HERVH2*) et l'infiltration lymphocytaire (*CD3*, *CD8* et *CD45RO*). Seules ces variables participent à la construction des axes de l'ACM. Aucune modalité de ces variables n'a une fréquence inférieure à 5%.

Nous ajoutons en variables supplémentaires toutes les autres variables qualitatives: Sexe, Local, Stade, TNM, pTNM, différenciation, invasion.vasculaire, Statut.MSI, BRAF, KRAS, PI3K, C-Met, mucineux, HLA.G.TS ainsi que l'âge.

L'analyse de la variance sur les coordonnées des individus sur l'axe établi suivant le critère de Kaiser en fonction de la variable qualitative permet de retenir la direction des axes.

Les analyses complémentaires sont réalisées par un test d'indépendance du khi-deux, ou un test exact de Fisher (une alternative au test de Chi-deux lorsque les échantillons sont petits) pour chaque variable CD3, CD8 et CD45RO (dont on a regroupé les modalités "infiltrée" et "moyennement infiltrée") avec une valeur de p significative ($<0,05$) au test du Khi² ou test de Fisher exact.

Résultats

Caractéristiques démographiques et anatomo-cliniques

Les caractéristiques de la population d'étude montrent que les hommes sont plus représentés (54%) que les femmes (46%) avec un sexe ratio de 1,18. La majorité de la population d'étude a plus de 65 ans (73%) avec une moyenne d'âge de 72 ans. Ces données ne font que confirmer les connaissances déjà établies sur le cancer colorectal (Benson Al B, 2007 ; Boyle P et al, 2010) en fait l'âge avancé comme le sexe masculin font partie des facteurs de risque. Les tumeurs analysées étaient surtout aux stades II et III (69%) et de localisation droite (40%). L'invasion vasculaire est retrouvée dans (43%) des cas et les métastases dans (30%). Les tumeurs étaient de type mucineux dans seulement 9% des cas. L'ensemble des informations est résumé dans le tableau VII.

Tableau VII : Les caractéristiques démographiques et anatomo-cliniques

| Caractéristiques | Effectif 135 | Pourcentage |
|----------------------------------|--------------|-------------|
| Sexe | | |
| Femmes | 62 | 46% |
| Hommes | 73 | 54% |
| Age | | |
| < 65 | 37 | 27% |
| ≥ 65 | 98 | 73% |
| moy: 72 | | |
| localisation de la tumeur | | |
| Col dt | 54 | 40% |
| col gche | 37 | 27% |
| Sigmoïde | 40 | 30% |
| Rectum | 4 | 3% |
| Stade | | |
| I | 12 | 9% |
| II | 50 | 37% |
| III | 43 | 32% |
| IV | 30 | 22% |
| Métastases | | |
| Oui | 41 | 30% |
| Non | 94 | 70% |
| Mucineux | | |
| Oui | 12 | 9% |
| Non | 123 | 91% |
| Invasion vasculaire | | |
| Oui | 58 | 43% |
| Non | 77 | 57% |

Le résultat de l'analyse des marqueurs moléculaires

L'étude des marqueurs moléculaires met en évidence une délétion du gène Apobec3 dans 24% de la population d'étude. Les tumeurs sont stables dans leur majorité : (83%) de tumeurs MSS. Les mutations K-ras (33%) sont plus fréquentes que les autres B-raf (14%) et Pi3K (12%). Le polymorphisme HLA G 14-/14-, associé à la stabilité des ARNm et à l'augmentation de l'expression de HLA-G est retrouvé dans (12%) de la population ; ce qui suggère que l'expression de HLA-G est faible dans cette étude et ne semble pas contribuer au développement de ces tumeurs. Le polymorphisme de C-met, associé à l'invasion tumorale est faible. Toutes ces données sont regroupées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Les données sur les marqueurs moléculaires

| Caractéristiques | Effectif | 135 | Pourcentage |
|-----------------------|----------|-----|-------------|
| Statut MSI | | | |
| MSS/MSI-L | 112 | | 83% |
| MSI-H | 23 | | 17% |
| Apobec 3 | | | |
| délétion | 32 | | 24% |
| non délétion | 103 | | 76% |
| B-raf mutation | | | |
| oui | 19 | | 14% |
| non | 116 | | 86% |
| K-ras mutation | | | |
| Oui | 44 | | 33% |
| Non | 91 | | 67% |
| Pi3K mutation | | | |
| oui | 16 | | 12% |
| Non | 119 | | 88% |
| C-met | | | |
| < 227 | 100 | | 74% |
| 229 -231 | 19 | | 14% |
| >231 | 16 | | 12% |
| HLA-G | | | |
| 14-/14- | 17 | | 12% |
| 14-/14+ | 71 | | 52% |
| 14+/14+ | 47 | | 35% |

Résultat des profils de méthylation de MLH1, HERV-H et Lines-1

La figure 32 montre un gène MLH1 méthylé à 12%, une déméthylation de HERV-H à (32,5%), cette déméthylation est faible pour les LINES-1 (6%).

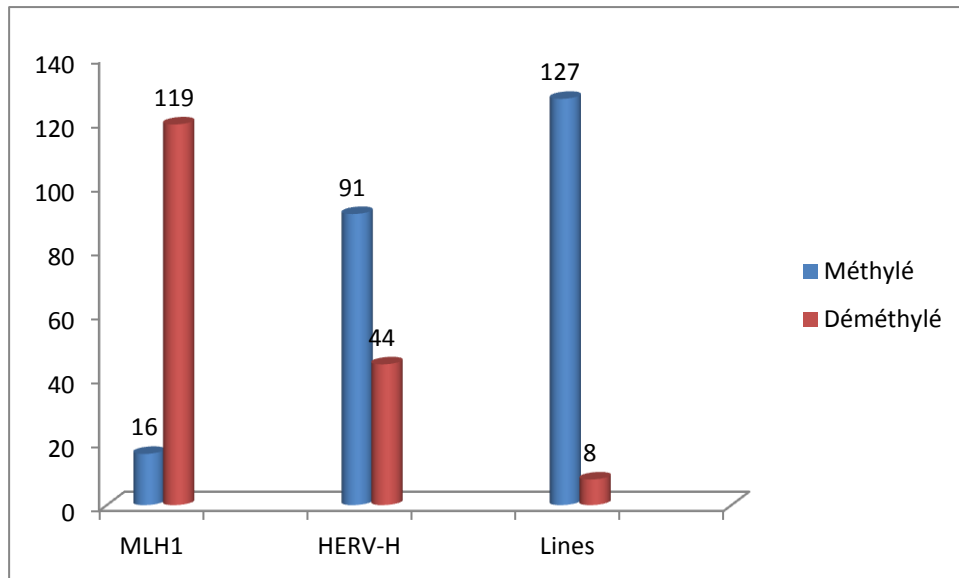


Figure 34 : Résultat de la méthylation de MLH1, HERV-H et LINES-1

Résultats du marquage immunohistochimique

L'infiltration lymphocytaire intra-tumoral est classée suivant la « densité » en cellules infiltrées, nulle, modérée ou sévère. L'infiltrat lymphocytaire intra-tumoral d'intensité modérée et sévère était retrouvé dans 48 tumeurs pour le CD3 et CD8 (35,5%) et 46 pour le CD45RO (34,07%).

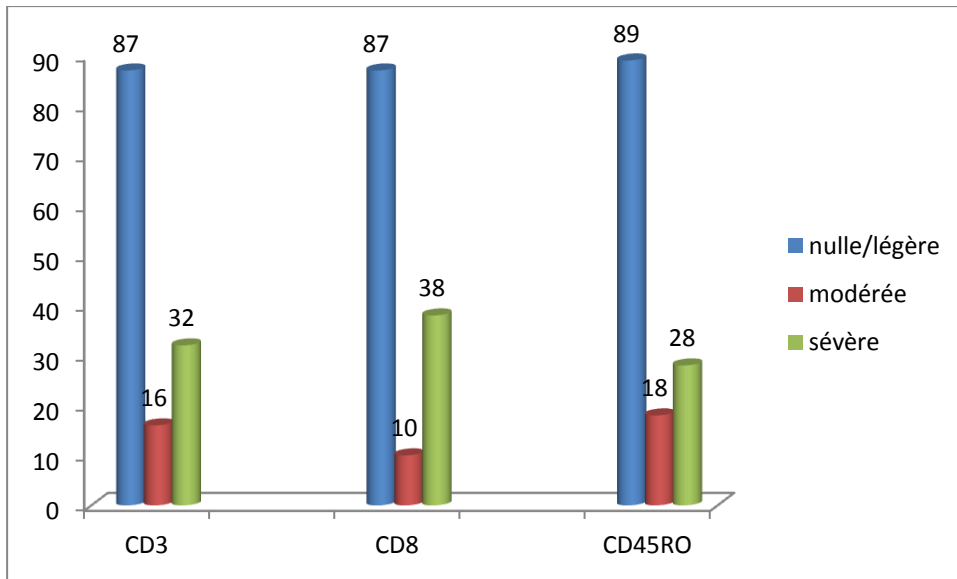


Figure 35 : Résultat de l'infiltrat lymphocytaire

Cependant les tumeurs peuvent être marquées avec un seul, deux ou les trois marqueurs utilisés comme le montre la figure 34. Les marqueurs CD3 et CD8 sont retrouvés dans 48 tumeurs, parmi les 46 tumeurs marquées CD45RO, 33 sont aussi marquées par CD3 et CD8, 2 tumeurs sont marquées au CD3 et non CD8 et 2 aussi sont marquées au CD8 et non CD3.

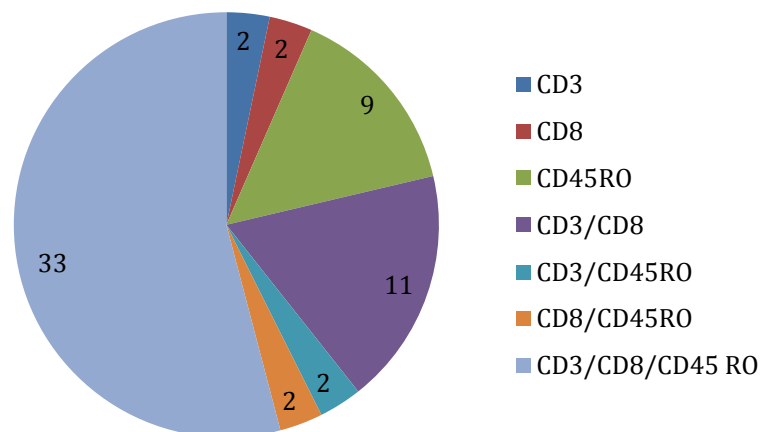


Figure 36 : Répartition des tumeurs suivant les marqueurs étudiées

Le deuxième axe permet d'expliquer 15.07% du tableau total. Cet axe est fortement caractérisé par les variables CD8 et CD3 étant moyennement infiltrées, puis par (Délétion = non délété , MétMLH1 = non méthylé , MÉLINE1 = non méthylé et le Statut.MSI = MSS).

Les variables les plus éloignées des deux axes expliquent mieux les données. Les variables en rouge sont ceux mis en actif et le pourcentage des variables exprimé par R2 permet de chercher l'information dans les données disponibles au niveau des différents axes (plus le R2 est proche de 1, plus les coordonnées des individus sur l'axe sont expliqués par la variable).

Relations entre Infiltrat lymphocytaire et les autres caractéristiques de l'étude

Tableau IX : Infiltrat lymphocytaire et caractéristiques démographiques et anatomo-cliniques (Effectif=135)

| Variables | CD3 | | | CD8 | | | CD45RO | | |
|--------------------|--------------------------------|-----------------|----------------|--------------------------------|-----------------|----------------|--------------------------------|-----------------|----------------|
| | Infiltré moyen. Infiltré | Non infiltré | P-value | Infiltré moyen. Infiltré | Non infiltré | P-value | Infiltré moyen. Infiltré | Non infiltré | P-value |
| Sexe | 48 | 87 | 0.8694 | 48 | 87 | 0.3756 | 46 | 89 | 0.8916 |
| F | 23 | 39 | | 25 | 37 | | 21 | 41 | |
| M | 25 | 48 | | 23 | 50 | | 25 | 48 | |
| Site | | | 0.0296* | | | 0.0110* | | | 0.1647 |
| Cdt | 26 | 29 | | 27 | 28 | | 23 | 32 | |
| Cg | 22 | 58 | | 21 | 59 | | 23 | 57 | |
| Stade | | | 0.0035* | | | 0.0142* | | | 0.0011* |
| 1 | 4 | 8 | | 4 | 8 | | 6 | 6 | |
| 2 | 24 | 26 | | 24 | 26 | | 22 | 28 | |
| 3 | 17 | 26 | | 16 | 27 | | 16 | 27 | |
| 4 | 3 | 27 | | 4 | 26 | | 2 | 28 | |
| Différent° | | | 0.4174 | | | 0.2632 | | | 0.3437 |
| Bien | 4 | 10 | | 4 | 10 | | 4 | 10 | |
| Moyen peu | 30 14 | 60 17 | | 29 15 | 61 16 | | 28 14 | 62 17 | |
| Invas° vasc | | | 0.0628 | | | 0.2568 | | | 0.0535 |
| Non | 33 | 44 | | 31 | 46 | | 32 | 45 | |
| oui | 15 | 43 | 17 | 41 | 14 | 44 | | | |
| Mucineux | | | 0.7541 | | | 0.7541 | | | 0.2202 |
| Non | 43 | 80 | | 43 | 80 | | 44 | 79 | |
| Oui | 5 | 7 | 5 | 7 | 2 | 10 | | | |

L'analyse de la relation entre l'infiltrat lymphocytaire et les données ci-dessus montre, d'une part une association entre les trois marqueurs et le stade II de la tumeur ($p = 0,0035$) pour CD3, ($p=0,0142$) pour CD8 et ($p=0,0011$) pour CD45RO et d'autre part entre les marqueurs CD3, CD8 et la localisation droite de la tumeur ($p=0,0296$) pour CD3 et ($p=0,0110$) pour CD8. On a pas retrouvé d'association entre CD45RO et la localisation droite de la tumeur (**Tableaux X, XI et XII**). Cependant, aucune association n'est notée entre l'infiltrat lymphocytaire le sexe, la différenciation, le caractère mucineux et l'invasion vasculaire.

Tableau X : Infiltrat lymphocytaire et les marqueurs moléculaires (Effectif=135)

| Variables | CD3 | | | CD8 | | | CD45RO | | |
|---------------|--------------------------|--------------|----------------|--------------------------|--------------|--------------------|--------------------------|--------------|----------------|
| | Infiltré moyen. Infiltré | Non infiltré | P-value | Infiltré moyen. Infiltré | Non infiltré | P-value | Infiltré moyen. Infiltré | Non infiltré | P-value |
| Statut | 48 | 87 | 0.0001* | 48 | 87 | <0.0001* | 46 | 89 | 0.0012* |
| MSI-H | 16 | 7 | | 17 | 6 | | 15 | 8 | |
| MSI-L | 1 | 0 | | 1 | 0 | | 0 | 1 | |
| MSS | 31 | 80 | | 30 | 81 | | 31 | 80 | |
| B-raf | | | 0.0142* | | | 0.0005* | | | 0.1141 |
| Muté | 12 | 7 | | 14 | 5 | | 10 | 9 | |
| Non muté | 36 | 80 | | 34 | 82 | | 36 | 80 | |
| K-ras | | | 0.0184* | | | 0.0061* | | | 0.0119* |
| muté | 9 | 35 | | 8 | 36 | | 8 | 36 | |
| non muté | 39 | 52 | | 40 | 51 | | 38 | 53 | |
| Pi3K | | | 0.2234 | | | 0.2234 | | | 0.5928 |
| muté | 3 | 13 | | 3 | 13 | | 4 | 12 | |
| non muté | 45 | 74 | | 45 | 74 | | 42 | 77 | |
| MLH1 | | | 0.0002* | | | 0.0002* | | | 0.0046* |
| Méthylé | 13 | 3 | | 13 | 3 | | 11 | 5 | |
| Non méthylé | 35 | 84 | | 35 | 84 | | 35 | 84 | |

Parmi tous les marqueurs moléculaires étudiés, seule la mutation du gène Pi3K ne semble pas être associée à l'infiltrat moléculaire. Les tumeurs infiltrées CD3, CD8 et CD45RO avaient un statut MSI-H, et une méthylation du gène MLH1 et étaient inversement corrélée à la mutation de K-ras. Pour CD3, l'association entre le statut MSI-H est de ($p=0,0001$), la mutation k-ras ($p= 0,0184$) et la méthylation du gène MLH1 ($p=0,0002$). Par contre, l'infiltrat lymphocytaire CD3 et CD8 était associé seulement à la mutation du gène B-raf avec une valeur de ($p=0,0142$) pour CD3 et de ($p=0,0005$) pour CD8. Aucune association cependant entre l'infiltrat CD45RO et la mutation du gène B-raf.

Tableau XI : Infiltrat lymphocytaire et les facteurs régulateurs de l'immunité Effectif (135)

| Variables | CD3 | | | CD8 | | | CD45RO | | |
|----------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|----------------|--------------------------------|-----------------|---------|
| | Infiltré Moyen. Infiltré | Non infiltré | P-value | Infiltré moyen. Infiltré | Non infiltré | P-value | Infiltré moyen. Infiltré | Non infiltré | P-value |
| Apobec3 | 48 | 87 | 0.01230* | 48 | 87 | 0.0392* | 46 | 89 | 0.3047 |
| Déléte | 5 | 27 | | 6 | 26 | | 8 | 24 | |
| Non délete | 43 | 60 | | 42 | 61 | | 38 | 65 | |
| HERV-H | | | | | | | | | |
| Déméthylé | 15 | 29 | 0.6787 | 16 | 28 | 0.3072 | 12 | 32 | 0.5329 |
| Méthylé | 31 | 51 | | 31 | 51 | | 31 | 51 | |
| Lines-1 | | | | | | | | | |
| Déméthylé | 3 | 5 | 1 | 3 | 5 | 1 | 2 | 6 | 0.7909 |
| Méthylé | 41 | 75 | | 41 | 75 | | 41 | 75 | |
| HLA-G | | | | | | | | | |
| 14- /14- | 16 | 31 | 0.3102 | 17 | 30 | 0.3102 | 15 | 32 | 0.0839 |
| 14-/14+ | 23 | 48 | | 24 | 47 | | 21 | 50 | |
| 14+/14+ | 9 | 8 | | 7 | 10 | | 10 | 7 | |

L'analyse entre l'infiltrat lymphocytaire et marqueurs de l'immunité met en évidence une corrélation inversement proportionnelle entre l'infiltrat et la délétion du gène Apobec 3 ($p=0,01230$) pour CD3 et ($p=0,0392$) pour CD8. Par contre, l'infiltrat CD45RO n'est pas associé à la délétion du gène Apobec3. Il en est de même pour les HERV-H, les LINE-s et HLA-G pour les différents marqueurs utilisés. Parmi les 9 patients infiltrés après marquage au CD45RO seul, deux sont fortement infiltrés et le reste moyennement. Cependant, quatre sont porteurs de la délétion du locus Apobec 3 et les cinq ne le sont pas. Ces derniers ont tous une tumeur de nature MSS alors que ceux qui portent la délétion le sont sauf un qui a une tumeur MSI-H. De ce fait, l'importance de l'infiltrat lymphocytaire CD45RO, comme des autres marqueurs, relève des produits induits par l'instabilité des microsatellites qui favorisent la réponse immunitaire de l'hôte mais aussi probablement par les mutations induites par une activité cytidine désaminase de type Apobec 3.

Tableau XII : Infiltrat lymphocytaire et C-met Effectif (135)

| Variables | CD3 | | | CD8 | | | CD45RO | | |
|----------------|--------------------------------|-----------------|-------------------|--------------------------------|-----------------|-------------------|--------------------------------|-----------------|-------------------|
| | Infiltré moyen. Infiltré | Non infiltré | P-value | Infiltré moyen. Infiltré | Non infiltré | P-value | Infiltré moyen. Infiltré | Non infiltré | P-value |
| C-met | 48 | 87 | | 48 | 87 | | 46 | 89 | |
| <227 | 36 | 64 | 0.6786 | 36 | 64 | 0.6786 | 35 | 65 | 0.8154 |
| 229-231 | 8 | 10 | | 8 | 10 | | 7 | 11 | |
| >231 | 4 | 12 | | 4 | 12 | | 4 | 12 | |
| CD3 | | | | | | | | | |
| Infiltré | | | | 31 | 1 | | 26 | 6 | <0.0001 |
| Moyen infiltré | | | | 13 | 3 | <0.0001 | 9 | 7 | |
| Non infiltré | | | | 4 | 83 | | 11 | 76 | |
| CD8 | | | | | | | | | |
| Infiltré | 38 | 0 | <0.0001 | | | | 31 | 7 | <0.0001 |
| Moyen infiltré | 6 | 4 | | | | | 4 | 6 | |
| Non infiltré | 4 | 83 | | | | | 11 | 76 | |
| CD45RO | | | | | | | | | |
| Infiltré | 25 | 3 | <0.0001 | 26 | 2 | <0.0001 | | | |
| Moyen infiltré | 10 | 8 | | 9 | 9 | | | | |
| Non infiltré | 13 | 76 | | 13 | 76 | | | | |

L'infiltrat lymphocytaire était bien corrélé entre les trois marqueurs utilisés dans l'étude avec une valeur de $p < 0.0001$. Dans la littérature, l'importance de l'infiltrat présentant ces trois marqueurs est associée à un bon pronostic, point qui resterait à confirmer pour nos patients.

Dans notre étude, aucune association n'est retrouvée entre les marqueurs CD3, CD8 et CD45RO et le polymorphisme de C-met. Ceci ne remet pas en question nos résultats, puisque C-met agirait plutôt sur le potentiel métastatique et non la réaction immune. Dans la littérature, la surexpression de C-met est reconnue comme marqueur prédictif de mauvais pronostic en lien avec des métastases.

Discussion

Un cancer colorectal est le résultat d'un processus qui se « stabilise » à la suite d'une série d'anomalies génétiques et épigénétiques. Deux voies principales ont été décrites, la voie de l'instabilité des chromosomes, ou celle de l'instabilité des microsatellites. Cette dernière fait suite à une déficience des gènes de réparation des mésappariements et permet d'expliquer 15% des cancers colorectaux. En effet, il est généralement admis que les tumeurs MSI-H, qui sont de meilleur pronostic, présentent des caractéristiques cliniques et moléculaires bien définies (Jass JR, 1998 ; Boland CR et al, 2010 ; Kim JH et al 2013).

Notre étude met en évidence une population à prédominance masculine (54%) avec une moyenne d'âge de 72 ans. Ces données ne font que confirmer les connaissances déjà établies sur le cancer colorectal. L'âge avancé de même que le sexe masculin constituent des facteurs de risque avec une probabilité élevée de survenue de cancer colorectal (Benson Al B, 2007 ; Boyle P et al, 2002).

Les caractéristiques des tumeurs analysées montrent une prédilection des tumeurs à droite (40%) à un stade d'évolution précoce de la maladie, les stades I et II étant fortement représentées (46%). La localisation droite de la tumeur est une caractéristique des cancers MSI (Hamelin R et al, 2008 ; Svrcek M et al, 2011 ; Boland CR et al, 2010) par opposition à ceux de type CIN, qui prédominent à gauche. Les tumeurs MSI-H représentent 17% des tumeurs dans notre population d'étude, légèrement au dessus des 15% de la littérature (Jass JR, 1998 ; Boland CR et al, 2010).

Pour ces tumeurs MSI-H, l'âge avancé des patients permet d'évoquer un cancer sporadique plus qu'un cancer héréditaire. La cause moléculaire principale est une inactivation de l'activité de la protéine MLH1, secondaire à une hyperméthylation de son promoteur (Hamelin R et al, 2008 ; Svrcek M et al, 2011 ; Boland CR et al, 2010) et serait associé à un meilleur pronostic. Cette issue favorable des tumeurs MSI-H sporadiques pourrait être attribuée à la présence de lymphocytes intra-épithéliaux. En effet, l'importance de l'infiltrat lymphocytaire des tumeurs MSI-H du cancer colorectal (Salama P et al, 2009 ; Nosho K et al 2010 ; Deschoolmeester V et al, 2010 ; Dahlin AM et al, 2011) serait liée à la présence de peptides immunogènes induits par les mutations qui conduisent à l'instabilité des séquences codantes, comme celles contenant des microsatellites (Linnebacher M et al, 2001 ; Schwitalle Y et al, 2008)

Dans notre étude, nous avons trouvé un infiltrat lymphocytaire dans 35,5% des tumeurs infiltrées par des lymphocytes CD3 et CD8 et dans 34,07% pour les tumeurs colorectales infiltrées par des lymphocytes CD45RO, comme il a été rapporté dans d'autres études (Nosho K et al 2010 ; Roxburgh CSD et al, 2012 ; Mlecnik B et al, 2011 ; Deschoolmeester V et al, 2010). Cet infiltrat lymphocytaire est associé de manière significative au stade, 46-50% des tumeurs, au stade II avec une significativité de ($p=0,0035$) pour CD3 et ($p=0,0142$) pour CD8 et pour CD45RO ($p=0,0011$). Ce résultat reste proche de l'étude de Dahlin (Dahlin AM et al, 2011) qui retrouve un pourcentage de 49% avec le marqueur CD3 au stade II avec une valeur de $P<0,0001$ et 9% au stade IV.

L'étude menée par Mlecnik (Mlecnik B et al, 2011) a relevé un nombre plus important (60%) de tumeurs infiltrées pour les marqueurs CD8 et CD45RO dans les stades in situ et I de développement du cancer. En revanche, 18% des tumeurs au stade IV étaient infiltrées contre 6% dans notre étude. Cette différence dans nos résultats peut relever de l'échantillonnage beaucoup plus important des tumeurs analysées (599 tumeurs). Cependant, une valeur plus faible 34,4% au stade II dans l'étude de (Deschoolmeester V et al, 2010), a conduit à un cumul des stades II et III et a permis de retrouver une association avec le marqueur CD8 et le stade avec une significativité de $p=0,006$ mais non avec le marqueur CD3 ; alors que (Salama P et al, 2009) a retrouvé une corrélation significative ($p<0,0001$) avec les marqueurs CD8 et CD45RO pour le stade II. Il convient toutefois de souligner comme l'a relevé Mlecnick (Mlecnik B et al, 2011) que l'infiltrat lymphocytaire intratumoral diminue au fur et à mesure de la progression de la tumeur, exception faite du nombre peu important de cas que nous avons retrouvé au stade I.

Par ailleurs, le travail de Galon (Galon J et al, 2006) met en évidence que seule la forte réaction immunitaire est un facteur pronostique favorable indépendant de l'extension locale ou régionale de la tumeur et donc du stade. Par contre, nous n'avons pas retrouvé de relation entre l'infiltrat lymphocytaire CD45RO et la localisation droite de la tumeur qui elle reste corrélée avec le marqueur CD3 ($p=0,0296$) et CD8 ($p=0,0110$). Il est à noter toutefois, que beaucoup d'études n'ont pas retrouvé une association entre l'infiltrat lymphocytaire et la localisation tumorale (Salama P et al, 2009 ; Nosho K et al 2010 ; Mlecnik B et al, 2011 ; Deschoolmeester V et al, 2010). Cela est d'ailleurs partagé pour toutes les autres

caractéristiques que sont le sexe, l'âge (Salama P et al, 2009 ; Deschoolmeester V et al, 2010 ; Nosho K et al 2010), la différenciation et l'état mucineux.

La relation entre l'infiltrat lymphocytaire avec le statut MSI-H est significative pour les trois marqueurs CD3, CD8 et CD45RO respectivement avec une valeur de ($p=0,0001$, $<0,0001$ et $p=0,0012$) alors que Nosho (Nosho K et al 2010) dans son travail met seulement en exergue l'association avec la forte densité de CD45RO ($p<0,0001$) en dépit des autres marqueurs CD3, CD8 et FOXP3, Salama (Salama P et al, 2009) lui relève la relation avec CD8 et CD45RO avec une valeur de ($p<0,0001$) ; Deschoolmeester (Deschoolmeester V et al, 2010) parle de CD8 ($p<0,0001$) et non de CD3 qui lui est mentionné par Dahlin (Dahlin AM et al, 2011) avec ($p=0,003$).

Si ces résultats sont comparables pour l'étude du statut de MSI-H, ils diffèrent toutefois du fait que les caractéristiques du statut MSI-H en l'occurrence, la mutation du gène B-raf et la méthylation du gène MLH1 n'ont pas fait l'objet d'étude en dehors de celle de Nosho (Nosho K et al 2010) qui retrouve une association significative entre CD45RO et B-raf ($p=0,0006$).

Notre travail a retrouvé une relation significative entre la mutation B-raf et les marqueurs CD3 et CD8 respectivement $p=0,0142$ et $p=0,0005$ et non avec le marqueur CD45RO.

L'infiltrat lymphocytaire intratumoral est corrélé de façon significative avec la méthylation du gène MLH1, inversement associé avec la mutation du gène K-ras, mais non associé à la mutation du gène Pi3K pour les trois marqueurs (Tableau X). Dans son travail Nosho (Nosho K et al 2010) a retrouvé une corrélation inverse seulement entre CD45RO et K-ras ($p=0,0043$) et une relation positive entre CD8 et Pi3K ($p=0,033$).

L'association entre l'infiltrat lymphocytaire et ces caractéristiques moléculaires confère un pronostic meilleur (Nosho K et al 2010 ; Deschoolmeester V et al, 2010), qui pourrait relever de la présence de peptides tronqués induite par les mutations du déficit du système de réparation des mésappariements (Schwitalle Y et al, 2008) à l'origine de l'instabilité des microsatellites.

L'immunogénicité des tumeurs déficientes en système MMR contribuerait à la réaction du système immunitaire de l'hôte en rapport avec la réactivité des lymphocytes T (Schwitalle Y et al, 2008 ; Nosho K et al 2010). Ainsi, les mécanismes immunitaires peuvent jouer un rôle

important dans la prévention et éventuellement dans l'évolution des tumeurs MSI-H (Schwitalle Y et al, 2008) et servir de cibles stratégiques dans la lutte en carcinologie.

Toutefois, certaines études démontrent que l'importance de l'infiltrat lymphocytaire est un facteur pronostic indépendant du statut MSI (Deschoolmeester V et al, 2010 ; Nosho K et al 2010 ; Dahlin AM et al, 2011 ; Roxburgh CSD et al, 2012) puisque des tumeurs MSS fortement infiltrées ont un pronostic meilleur comparées à des tumeurs instables non infiltrées ($p=0,013$) (Dahlin AM et al, 2011).

Le cancer colorectal étant une maladie multifactorielle, ainsi des facteurs comme Apobec 3, les HERV-H ou les LINEs-1 pourraient contribuer aussi à la réaction immune à l'origine de l'infiltrat lymphocytaire intratumoral. Les formes actives des LINEs-1 comme les HERV-H sont soumises à l'action des protéines Apobec 3, qui induiraient une inhibition de leur rétrotransposition (Esnault C et al, 2005 ; Muckenfuss H et al, 2006 ; Holmes RK et al, 2007 ; Sire J et al, 2008 ; Chiu YL et al, 2009). Par ailleurs, l'expression de produits de certaines HERV-H peut induire une immunotolérance qui inhiberait le système immunitaire de l'hôte (Blond JL et al, 2001) ; expression secondaire à une déméthylation de leur séquence LTR. L'implication de tels facteurs peut se prêter par l'étude de la méthylation des HERV-H et des LINEs en présence de l'intégrité du locus Apobec 3.

Nous avons trouvé une prévalence de délétion du locus Apobec 3 de (24%) dans notre étude, une déméthylation de HERV-H à (32,5%) et une déméthylation des LINEs-1 à (6%).

Notre étude sur la délétion du locus Apobec 3 se rapproche de l'étude de Zhou (Zhou CZ et al, 2002), qui retrouvait une valeur de 28,38% et en deçà des 53% de Castells (Castells A et al, 2000) sur des échantillons respectifs de 83 et 36 tumeurs. Cette différence dans les résultats pourrait provenir des approches différentes utilisées dans la détermination de la délétion.

Notre contribution dans le déterminisme des mécanismes moléculaires de la carcinogenèse colorectale à rechercher une éventuelle association entre infiltrat lymphocytaire, Apobec3 et HERV-H met en évidence une corrélation inverse entre infiltrat lymphocytaire et la délétion du locus Apobec3 pour les deux marqueurs CD3 et CD8 respectivement avec $p=0.01230$ et $p=0.0392$, alors que la déméthylation des LINEs-1 comme celle du HERV-H n'est pas associée à l'infiltrat lymphocytaire. Cependant, une corrélation inverse entre l'hypométhylation des

LINEs-1 et la densité de CD45RO ($p=0,0013$) est relatée par la seule étude de 2010 de Nosho (Nosho K et al, 2010). Cette hypométhylation des LINEs-1 est le témoin de l'hypométhylation globale de l'ADN et de l'instabilité chromosomique qui lui est associée. Par conséquent, cette dernière rend compte de la régulation sur la réponse immunitaire de l'hôte. Ainsi, l'instabilité chromosomique pourrait contribuer à moduler l'expression des gènes de l'immunité par des mécanismes de contrôle épigénétiques.

L'hypométhylation faible de 6% de LINEs-1 de notre étude contrairement à 41% de (Nosho K et al, 2010) qui a travaillé sur une population cinq fois plus importante que la nôtre renforce notre conviction que l'infiltrat lymphocytaire intratumoral décelé est consécutif à l'instabilité des microsatellites dans les tumeurs MSI-H sporadiques.

Toutefois, il apparaît que les tumeurs infiltrées ne portent pas la délétion du locus Apobec 3, ce qui laisse supposer qu'il y'aurait une pression de sélection des cellules qui surexpriment Apobec 3. Ainsi, par l'effet mutagène de Apobec 3 les cellules tumorales acquièrent des mutations, les accumulent puis les délètent par pression de sélection pour diminuer le fardeau des mutations qui finissent par être délétères sur le plan évolutif (Salama P et al, 2009). Ce qui suggère que les tumeurs les plus évoluées ne portent pas la délétion de Apobec 3, mais n'exclue pas que la délétion soit secondaire et que les tumeurs expriment une Apobec3 puis, ensuite présentent une délétion. Lorsque nous observons la délétion en fonction du stade d'évolution du cancer, (54,5%) des tumeurs au stade II et III ne portent pas la délétion contre 7% au stade I et 16% au stade IV. Cette modification de la fréquence de délétions des Apobec 3 suivant la progression de la tumeur selon (Salama P et al, 2009), pourrait être le reflet de la pression de sélection exercée sur les mutations induites par sa surexpression. Cependant, il semble qu'il existe une corrélation positive entre le niveau d'expression de Apobec 3 et le taux de mutation accumulé (Burns MB et al, 2013). Selon Lada (Lada AG et al, 2012), l'activité cytidine désaminase est une source évolutive d'hypermutations localisées du génome comme en témoigne l'expression d'une désaminase hypermutagénique chez la levure. La nature des mutations induites par l'activité cytidine désaminase est comparable à celles observées dans les tumeurs du sein, où l'expression de Apobec 3B plus que les autres serait contributive (Lada AG et al, 2012 ; Taylor B JM et al, 2013).

Néanmoins, les tumeurs accumulant les mutations par surexpression de Apobec 3 seraient plus infiltrées et solliciteraient l'inactivation du gène p53, nécessaire pour permettre aux cellules tumorales d'échapper au système de contrôle des lésions de l'ADN provoquées par Apobec 3 (Burns MB et al, 2013). L'importance de l'infiltrat lymphocytaire intratumoral semble être une des caractéristiques liée à l'*immunoediting* du cancer prédisant ainsi un pronostic meilleur aux patients (Schreiber RD et al, 2011). L'*immunoediting* traduit le mécanisme double de protéger contre la tumeur mais aussi de favoriser la progression tumorale. Les tumeurs à un stade clinique ont acquis la capacité de contourner les mécanismes immunitaires des phases d'élimination et d'équilibre. La progression tumorale passe par des modifications de la population tumorale en réponse à des fonctions d'édition du système immunitaire (Schreiber RD et al, 2011).

La surexpression de HLA-G, un HLA non classique, susceptible de rendre la cellule tumorale résistante à la lyse des lymphocytes cytotoxiques (Rees RC et al, 1999) est un des mécanismes que nous avons étudié. L'expression de HLA-G est limitée principalement dans l'interface foeto-maternel mais peut se voir dans le cancer du sein, du colon et des lymphocytes infiltrant les tumeurs (Volz A et al, 2006). HLA-G peut induire une tolérance du fœtus contre l'immunité maternelle par inhibition des cellules NK qui entraînent la lyse des cellules fœtales et influencer la libération des cytokines ou encore par l'intermédiaire des cellules dendritiques (Blond JL et al, 2001 ; Le Bouteiller P et al, 1999 ; Volz A et al, 2006). Dans notre étude, l'infiltrat lymphocytaire n'est pas associé à la forme du polymorphisme HLA-G qui est supposée augmenter son expression, ces allèles ne sont retrouvés qu'à la fréquence de 12% contrairement à certaines tumeurs où elle peut atteindre 30-90% (Caigan DU et al, 2011) et rend peu probable son implication.

Enfin, la modification du microenvironnement de la tumeur pourrait être évoquée comme stratégie par laquelle la cellule tumorale peut échapper à la surveillance immunitaire de l'hôte (Schreiber RD et al, 2011; Ganss R et al, 1998). Le microenvironnement permet de supprimer l'extravasation des lymphocytes et/ou leur fonction à l'intérieur de la tumeur la rendant non permissive pour l'infiltration et la destruction par les lymphocytes antitumoraux probablement par le biais de facteurs modulateurs de l'angiogenèse (Ganss R et al, 1998). Ainsi, les cellules tumorales seraient moins immunogènes pour échapper à la surveillance immunitaire (Ganss R et al, 1998 ; Schreiber RD et al, 2011) contrairement aux lésions

précancéreuses pourvues d'infiltrat lymphocytaire (Ganss R et al, 1998). Une étude visant à la fois l'immunité de l'hôte et de la tumeur permettrait de comprendre le mécanisme de l'échappement à la surveillance immunitaire de l'hôte.

L'influence de l'infiltrat lymphocytaire sur la survie n'a pas fait l'objet d'évaluation dans notre présent travail. Cependant, beaucoup d'études ont montré la valeur pronostique positive de l'infiltrat lymphocytaire tumoral sur la survie et la réduction du potentiel métastatique (Galon J et al, 2006 ; Lee WS et al, 2010 ; Roxburgh CDS et al, 2012). Comme on pouvait s'y attendre, le polymorphisme de C-met comme l'invasion vasculaire, tous deux marqueurs de mauvais pronostic, ne sont pas associés à l'infiltrat lymphocytaire. Dans les cancers colorectaux, la surexpression de C-met a un potentiel métastatique et de progression de la tumeur qui en fait un marqueur de mauvais pronostic. Les métastases (30%) dans notre étude n'ont pas eu un impact négatif probablement du fait du mécanisme MSI-H des tumeurs analysées, associées à l'infiltrat lymphocytaire intratumoral (Benvenuti S et al, 2007).

Conclusions et perspectives

L'impact de cette étude est qu'elle a, en plus des caractéristiques moléculaires classiques, permis de rechercher les différents facteurs modulateurs de l'immunité à travers la délétion du locus Apobec3, les HERV et les séquences LINES-1.

Nous avons observé un infiltrat lymphocytaire pour les trois marqueurs utilisés : CD3, CD8 et CD45RO. Cet infiltrat était associé à certains marqueurs moléculaires, notamment le statut MSI, la mutation des gènes B-raf, K-ras, MLH1 comme rapporté dans beaucoup d'études. Nos résultats mettent en évidence une déméthylation faible aussi bien des HERV que des Lines-1 non associée à l'infiltrat lymphocytaire. La prévalence de la délétion du locus Apobec 3 présente dans 24% des tumeurs étudiées, était inversement corrélée à l'infiltrat lymphocytaire. Les tumeurs infiltrées étaient non délétées ce qui pourrait être expliqué par un plus grand nombre de mutations. A l'inverse, l'expression des Apobec3 favoriserait la progression du cancer par une pression de sélection naturelle due aux mutations accumulées. L'objet de notre étude n'était pas d'évaluer la survie des patients. Cela pourra être fait, de plus, un échantillonnage plus important pourrait déterminer l'influence vraie de

la délétion des Apobec 3 sur la survie. Des études fonctionnelles sont en cours pour établir l'expression de la protéine Apobec 3, dont l'augmentation pourrait expliquer l'importance de l'infiltrat dans ces tumeurs du fait de l'accumulation des mutations.

Cette étude contribue à établir pour la première fois une liaison entre le locus Apobec 3 et le cancer du colon. Les Apobec 3 auraient une action consécutive à une accumulation des mutations par l'activité désaminase. Les études à venir tenteront de déterminer la place de Apobec 3 dans le modèle proposé par Vogelstein et éventuellement de proposer des stratégies de prévention ciblées.

Bibliographie

Adenis, A., Conroy, T., Lasser, P., Merrouche, Y., Monges, G., Rivoire, M., Rougier, P., and Ruggieri-Pignon, S. (2001). Carcinoma of the colon. *Br J Cancer* *84 Suppl 2*, 65-68.

Alrawi SJ, S. M., Carroll RE, Dayton M, Gibbs JF, Kulavlat M, Tan D, Berman K, Stoler DL, Anderson GR. (2006). Aberrant crypt foci. *Anticancer Res* *26*, 107-119

Amon, A. (1999). The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* *9*, 69-75.

Anant, S., and Davidson, N. O. (2002). Identification and regulation of protein components of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme. A complex event. *Trends Cardiovasc Med* *12*, 311-317.

Anant, S., and Davidson, N. O. (2003). Hydrolytic nucleoside and nucleotide deamination, and genetic instability: a possible link between RNA-editing enzymes and cancer? *Trends Mol Med* *9*, 147-152.

Antelo, M., Balaguer, F., Shia, J., Shen, Y., Hur, K., Moreira, L., Cuatrecasas, M., Bujanda, L., Giraldez, M. D., Takahashi, M., *et al.* (2012). A high degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer. *PLoS One* *7*, e45357.

Arber, N., Shapira, I., Ratan, J., Stern, B., Hibshoosh, H., Moshkowitz, M., Gammon, M., Fabian, I., and Halpern, Z. (2000). Activation of c-K-ras mutations in human gastrointestinal tumors. *Gastroenterology* *118*, 1045-1050.

Arends, J. W. (2000). Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol* *190*, 412-416.

Bailey SM, M. J. (2006). Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res* 34, 2408-2417.

Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* 56, 779-827.

Benson AL B (2007). Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J Manag Care Pharm* 13, S5-18.

Benvenuti S; Comoglio PM (2007): The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis; *J. Cell. Physiol.* 213: 316–325.

Berg M, S. K. (2012). EGFR and Downstream Genetic Alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT Pathways in Colorectal Cancer- Implications for Targeted Therapy. *Discov Med* 14, 207-214.

Berger G ; Durand S ; Fargier G; Nguyen X N; Cordeil S ; Bouaziz S; Muriaux D; Darlix JL; Cimarelli A (2011) : APOBEC3A is a specific inhibitor of the early phases of HIV-1 infection in myeloid cells. *PLoS Pathogens*; 7, (9)

Bignami M; Casorelli I; Karran P (2003). Mismatch repair and response to DNA-damaging antitumor therapies. *European Journal of Cancer*, 39: 2142-2149.

Bischoff J R., Anderson L., Zhu Y., Mossie K., Ng, L., Souza B., Schryver B., Flanagan P., Clairvoyant F., Ginther C., *et al.* (1998). A homologue of *Drosophila aurora* kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Embo J* 17, 3052-3065.

Bishop KN; Holmes RK; Malim MH (2006). Antiviral Potency of APOBEC Proteins Does Not Correlate with Cytidine Deamination. *J. Virol*, 80: 8450–8458

Blasco MA. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6, 611-622.

Blond JL; Cheynet V., Mallet F (2001). Signification biologique des rétrovirus endogènes humains . *Virologie* 5, 91-11

Bogerd, H. P., Wiegand, H. L., Doehle, B. P., Lueders, K. K., and Cullen, B. R. (2006). APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res* 34, 89-95.

Bogerd, H. P., Wiegand, H. L., Hulme, A. E., Garcia-Perez, J. L., O'Shea, K. S., Moran, J. V., and Cullen, B. R. (2006). Cellular inhibitors of long interspersed element 1 and Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8780-8785.

Bokoch, G. M., and Der, C. J. (1993). Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. *Faseb J* 7, 750-759.

Boland, C. R., and Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2073-2087 e2073.

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B.(1987). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*.3; 327(6120): 293-7.

Boyle, P., and Leon, M. E. (2002). Epidemiology of colorectal cancer. *Br Med Bull* 64, 1-25.

Broussard, E. K., and Disis, M. L.(2011).TNM staging in colorectal cancer: T is for T cell and M is for memory. *J Clin Oncol* 29, 601-603.

Buermeyer, A. B., Deschenes, S. M., Baker, S. M., and Liskay, R. M. (1999). Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* 33, 533-564.

Bulliard, Y., Narvaiza, I., Bertero, A., Peddi, S., Rohrig, U. F., Ortiz, M., Zoete, V., Castro-Diaz, N., Turelli, P., Telenti, A., *et al.* (2011). Structure-function analyses point to a polynucleotide-accommodating groove essential for APOBEC3A restriction activities. *J Virol* 85, 1765-1776.

Burns, M. B., Lackey, L., Carpenter, M. A., Rathore, A., Land, A. M., Leonard, B., Refsland, E. W., Kotandeniya, D., Tretyakova, N., Nikas, J. B., *et al.* (2013). APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature* 494, 366 - 370.

Cahill DP, L. C., Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392, 300-303.

Caigan DU; Yuzhuo Wang. (2011). The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30, 1-10.

Calkhoven, C. F., Bouwman, P. R., Snippe, L., and Ab, G. (1994). Translation start site multiplicity of the CCAAT/enhancer binding protein alpha mRNA is dictated by a small 5' open reading frame. *Nucleic Acids Res* 22, 5540-5547.

Castells, A., Gusella, J. F., Ramesh, V., and Rustgi, A. K. (2000). A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers. *Cancer Res* 60, 2836-2839.

Cegolon, L., Salata, C., Weiderpass, E., Vineis, P., Palu, G., and Mastrangelo, G. (2013). Human endogenous retroviruses and cancer prevention: evidence and prospects. *BMC Cancer* 13, 4.

Chiu YL, and Greene, W. C. (2009). APOBEC3G: an intracellular centurion. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 689-703.

Chung DC; Rustgi AK. (2003). The Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Genetics and Clinical Implications. *Ann Intern Med.* 138 (7):560-570.

Conray T. et al (2004). Clinical practice guideline: 2003 Update of Standards, Options et Recommendations for first line palliative chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer (summary report). *Bull Cancer* 91,759-768.

Cordeiro, G.M., Casu, R., McIntyre, C. L., Manners, J. M., and Henry, R. J. (2001). Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. *Plant Sci* 160, 1115-1123.

Costello, J. F., and Plass, C. (2001). Methylation matters. *J Med Genet* 38, 285-303.

Cui Y; Cai Q; Qu S; Chow WH; Wen W; Xiang YB and al (2012). Association of Leukocyte Telomere Length with Colorectal Cancer Risk: Nested Case–Control Findings from the Shanghai Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* ; 21:1807-1813.

Culligan, K. M., Meyer-Gauen, G., Lyons-Weiler, J., and Hays, J. B. (2000). Evolutionary origin, diversification and specialization of eukaryotic MutS homolog mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Res* 28, 463-471.

Dahlin, A. M., Henriksson, M. L., Van Guelpen, B., Stenling, R., Oberg, A., Rutegard, J., and Palmqvist, R. (2011). Colorectal cancer prognosis depends on T-cell infiltration and molecular characteristics of the tumor. *Mod Pathol* 24, 671-682.

D'Alessio, A. C., and Szyf, M. (2006). Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol* 84, 463-476.

Deaton AM ; Bird A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.*; 25(10):1010-22.

Defeo D; Gondat MA; Yount HA; Chang EH; Lowyt DR; Scolnick EM; Ellis RW: (1981). Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus: *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 78, No. 6, pp. 3328-3332.

Deschoolmeester V, B. M., Van Marck E, Weyler J, Vermeulen P, Lardon F, Vermorken JB. (2010). Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol* 11, 1- 12.

Douglas EJ, F. H., Rowan A, Halford S, Bicknell DC, Bodmer W, Tomlinson IP, Carter NP. (2004). Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer Res* 64, 4817-4825.

Doxsey, S. (1998). The centrosome--a tiny organelle with big potential. *Nat Genet* 20, 104-106.

Duval, A., and Hamelin, R. (2002). Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers. *Ann Genet* 45, 71-75.

Engelhardt, M., Kumar, R., Albanell, J., Pettengell, R., Han, W., and Moore, M. A. (1997). Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 90, 182-193.

Esnault, C., Heidmann, O., Delebecque, F., Dewannieux, M., Ribet, D., Hance, A. J., Heidmann, T., and Schwartz, O. (2005). APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature* 433, 430-433. 130

Esnault, C., Millet, J., Schwartz, O., and Heidmann, T. (2006). Dual inhibitory effects of APOBEC family proteins on retrotransposition of mammalian endogenous retroviruses. *Nucleic Acids Res* 34, 1522-1531.

Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358, 1148-1159.

Fang DC, J. J., Wang DX, Zhou XD, Luo YH, Young J. (1999). Infrequent loss of heterozygosity of APC/MCC and DCC genes in gastric cancer showing DNA microsatellite instability. *J Clin Pathol* 52, 504-508.

Fearon, E. R. (1995). Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 768, 101-110.

Feinberg AP, T. B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4, 143-153.

Fishel, R. (2001). The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis. *Cancer Res* 61, 7369-7374.

Fleming M, R. S., Tatishchev SF, Wang HL. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 3, 153-173.

Frias, C., Moran, A., de Juan, C., Ortega, P., Fernandez-Marcelo, T., Sanchez-Pernaute, A., Torres, A. J., Diaz-Rubio, E., Benito, M., and Iniesta, P. (2009). Telomere function in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 1, 3-11.

Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S., and Vande Woude, G. F. (1996). Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271, 1744-1747.

Furukawa, A., Nagata, T., Matsugami, A., Habu, Y., Sugiyama, R., Hayashi, F., Kobayashi, N., Yokoyama, S., Takaku, H., and Katahira, M. (2009). Structure and real-time monitoring of the enzymatic reaction of APOBEC3G which is involved in anti-HIV activity. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 87-88.

Gaddis NC; Sheehy AM; Ahmad KM; Swanson CM; Bishop KN; Beer BE; Marx PA; Gao F; Bibollet-Ruche F; Hahn BH; Malim MH: (2004). Further investigation of simian immunodeficiency virus vif function in human cells. *J. Virol*; 78 (21):12041 - 12046

Galon J ; Costes A; Sanchez-Cabo F; Kirilovsky A; Mlecnik B et al. (2006). Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* 313, 1960-64

Ganss R; Douglas H. (1998). Tumor Microenvironment Can Restrict the Effectiveness of Activated Antitumor Lymphocytes. *Cancer Res* 58, 4673-4681.

Gaur-Goila R, Strebel. K. (2008). HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* 5, 5-51

Globocan.iarc.fr:2000

Glover DM; Leibowitz MH; McLean DA; Parry H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, 81(1):95-105.

Goel A, A. C., Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. (2003). Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* 63, 1608-1614.

Gong J, Hutter C, Baron JA, Berndt S, Caan B, Campbell PT, et al. (2012). A pooled analysis of smoking and colorectal cancer: timing of exposure and interactions with environmental factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 21(11):1974-85

Grady, W. M., and Markowitz, S. D. (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3, 101-128.

Grady, WM. (2004). Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23, 11-27. 131

Grady, W. M., and Carethers, J. M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 135, 1079-1099.

Hackett, J. A., Feldser, D. M., and Greider, C. W. (2001). Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* 106, 275-286.

Hamelin, R., Chalastanis, A., Colas, C., El Bchiri, J., Mercier, D., Schreurs, A. S., Simon, V., Svrcek, M., Zaanani, A., Borie, C., *et al.* (2008). Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers. *Bull Cancer* *95*, 121-132.

Han K, L. J., Meyer TJ, Remedios P, Goodwin L, Batzer MA. (2008). L1 recombination-associated deletions generate human genomic variation. *Proc Natl Acad Sci* *105*, 19366-19371.

Harfe, B. D., and Jinks-Robertson, S. (2000). DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet* *34*, 359-399.

Hartwell, L. H., and Smith, D. (1985). Altered fidelity of mitotic chromosome transmission in cell cycle mutants of *S. cerevisiae*. *Genetics* *110*, 381-395.

Holmes RK, M. M., Bishop KN. (2007). APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci* *32*, 118-128.

Huebner RJ; Todaro GJ (1969). Oncogenes or RNA tumor viruses as determinants of cancer; *microbiology*, *64*: 1087-1094.

Huthoff, H., and Malim, M. H. (2005). Cytidine deamination and resistance to retroviral infection: towards a structural understanding of the APOBEC proteins. *Virology* *334*, 147-153.

Huthoff H, Towers GJ.(2008).Restriction of retroviral replication by APOBEC3G/F and TRIM5alpha. *Trends Microbiol* ; *16*(12):612-9

INCa (2007). Nutrition et Prévention des cancers: Des connaissances scientifiques aux recommandations.

INCa (2008). Guide Affection longue durée: Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique. Cancer colorectal. 132

INCa (2011). La situation du cancer en France en 2011.

Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J., and Navaratnam, N. (2002). An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79, 285-296.

Jass, J. R. (1998). Diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Histopathology* 32, 491-497.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., and Thun, M. J. (2007). Cancer statistics, (2007). *CA Cancer J Clin* 57, 43-66.

Jemal A, Siegel R., Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ (2009). Cancer statistics *CA Cancer J Clin* 59,225-249

Jiricny, J., and Marra, G. (2003). DNA repair defects in colon cancer. *Curr Opin Genet Dev* 13, 61-69.

Kaina, B. (2003). DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol* 66, 1547-1554.

Kanthan R, J.-L. S., Kanthan SC (2012). Molecular Events in Primary and Metastatic Colorectal Carcinoma: A Review. *Pathology Research International* 1-14.

Karran, P., Offman, J., and Bignami, M. (2003). Human mismatch repair, drug-induced DNA damage, and secondary cancer. *Biochimie* 85, 1149-1160.

Kashi, Y., King, D., and Soller, M. (1997). Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet* 13, 74-78.

Kazazian HH Jr (1998). Mobile elements and disease. *Curr Opin Genet Dev* 8, 343-350.

Kazazian HH Jr, G. J. (2002). LINE drive. retrotransposition and genome instability. *Cell* 9, 277-280.

Kenneson, A., and Warren, S. T.(2001). The female and the fragile X reviewed. *Semin Reprod Med* 19, 159-165.

Kim JH, Rhee YY, Bae JM, Kwon HJ, Cho NY, Kim MJ, Kang GH.(2013). Subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers exhibit discordance between the CpG island methylator phenotype and MLH1 methylation status. *Mod Pathol*. 26(7):1013-22.

Kim NW, P. M., Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.

Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996). Life (and death) in a malignant tumour. *Nature* 379, 19-20.

Kitamura, S., Ode, H., and Iwatani, Y. (2011). Structural Features of Antiviral APOBEC3 Proteins are Linked to Their Functional Activities. *Front Microbiol* 2, 258.

Kolodner, R. D., and Marsischky, G. T. (1999). Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 9, 89-96.

Komatsu, A., Nagasaki, K., Fujimori, M., Amano, J., and Miki, Y. (2008). Identification of novel deletion polymorphisms in breast cancer. *Int J Oncol* 33, 261-270.

Kunkel, T. A., and Erie, D. A. (2005). DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 74, 681-710.

Lada AG ; Dhar A ; Boissy RJ ; Hirano M ; Rubel AA ; Rogozin IB ; Pavlov YI : (2012). AID/APOBEC cytosine deaminase induce genome –wide Kataegis; *Biology Direct* 7:47

Le Bouteiller P ; Solier C ; Proll J ; Aguerre-Girr M et al. (1999). Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Human Reproduction update*; 5: 223 -233

Lee DF, D. R., Pitsikas P, Rainbow AJ. (2004). Detection of an involvement of the human mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 in nucleotide excision repair is dependent on UVC fluence to cells. *Cancer Res* 64, 3865-3870.

Lee J, H. K., Meyer TJ, Kim HS, Batzer MA. (2008). Chromosomal inversions between human and chimpanzee lineages caused by retrotransposons. *PLoS One* 3, e4047.

Lee WS, P. S., Lee WY, Yun SH, Chun HK. (2010). Clinical impact of tumor-infiltrating lymphocytes for survival in stage II colon cancer. *Cancer* 116, 5188-5199.

Lee, Y. N., Malim, M. H., and Bieniasz, P. D. (2008). Hypermutation of an ancient human retrovirus by APOBEC3G. *J Virol* 82, 8762-8770.

Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.

Li YC, K. A., Fahima T, Nevo E. (2004). Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol* 21, 991-1007.

Linnebacher, M., Gebert, J., Rudy, W., Woerner, S., Yuan, Y. P., Bork, P., and von Knebel Doeberitz, M. (2001). Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int J Cancer* 93, 6-11.

Löwer R, L. J., Kurth R. (1996). The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci* 93, 5177-5184.

Luo L, S. G., Stiffler KA, Wang QK, Pretlow TG, Pretlow TP. (2006). Loss of heterozygosity in human aberrant crypt foci (ACF), a putative precursor of colon cancer. *Carcinogenesis* 27, 1153-1159.

Lynch HT, B. C., Gong G, Shaw TG, Lynch PM, Fodde R, Lynch JF, de la Chapelle A. (2006). Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *Eur J Hum Genet* 14, 390-402.

Malim, M. H. (2009). APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 675-687.

Malvezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C., and Negri, E. European cancer mortality predictions for the year 2012. (2012). *Ann Oncol* 23, 1044-1052.

Mariani R, Chen D, Schröfelbauer B, Navarro F, König R, Bollman B, Münk C, Nymark-McMahon H, Landau NR.(2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell*;114 (1):21-31.

Metzgar, D., Bytof, J., and Wills, C. (2000). Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Res* 10, 72-80.

Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T., Bruneval, P., Trajanoski, Z., Fridman, W. H., Pages, F., and Galon, J. (2011). Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 29, 610-618.

Modrich, P., and Lahue, R. (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 65, 101-133.

Muckenfuss, H., Hamdorf, M., Held, U., Perkovic, M., Lower, J., Cichutek, K., Flory, E., Schumann, G. G., and Munk, C. (2006). APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition. *J Biol Chem* 281, 22161-22172.

Muleris, M., Chalastanis, A., Meyer, N., Lae, M., Dutrillaux, B., Sastre-Garau, X., Hamelin, R., Flejou, J. F., and Duval, A. (2008). Chromosomal instability in near-diploid colorectal cancer: a link between numbers and structure. *PLoS One* 3, e1632.

Mullins, C. S., and Linnebacher, M.(2012). Human endogenous retroviruses and cancer: causality and therapeutic possibilities. *World J Gastroenterol* 18, 6027-6035.

Ndao A.B. Les cancers colorectaux à l'hôpital principal de Dakar: Etude rétrospective menée sur 7 ans (1997-2003): (2005). Aspects épidémiologiques, cliniques, paracliniques, thérapeutiques et évolutifs.Th : Méd : Dakar : 2005 n° 9

Nelson PN, Carnegie. P., Martin J, Davari Ejtehad H, Hooley P, Roden D, Rowland-Jones S, Warren P, Astley J, Murray PG. (2003). Demystified. Human endogenous retroviruses. *Mol Pathol* 56, 11-18.

Nethe M; Berkhout B; Van der Kuyl AC.(2005). Retroviral superinfection resistance. *Retrovirology*,2: 52; 2005.

Newman E NC, Holmes RK, Craig HM, Klein KC, Lingappa JR, Malim MH, Sheehy AM. (2005). Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol*.15(2):166-70.

Nosho, K., Baba, Y., Tanaka, N., Shima, K., Hayashi, M., Meyerhardt, J. A., Giovannucci, E., Dranoff, G., Fuchs, C. S., and Ogino, S. (2010). Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol* 222, 350-366.

Ogino S, Goel. A.(2008). Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 10,13-27.

Ostertag, E. M., and Kazazian, H. H., Jr. (2001). Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet* 35, 501-538.

Pagès F, Berger. A., Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353, 2654-2666.

Pavlicek, A., Paces, J., Elleder, D., and Hejnar, J. (2002). Processed pseudogenes of human endogenous retroviruses generated by LINEs: their integration, stability, and distribution. *Genome Res* 12, 391-399.

Peltomaki P. (1997). DNA mismatch repair gene mutations in human cancer. *Environ Health Perspect* 105, (suppl 4) 775-780.

Peltomaki, P., and Vasen, H. F. (1997). Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 113, 1146-1158.

Pino MS and Chung DC. (2010). The chromosomal instability Pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138: 2069-2072.

Polakis, P. (1999). The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 9, 15-21.

Polakis, P., Hart, M., and Rubinfeld, B. (1999). Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol* 470, 23-32.

Polakis, P. (2012). Drugging Wnt signalling in cancer. *Embo J* 31, 2737-2746.

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 359 (6392):235-7.

Pretlow TP, B. B., Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jurcisek JA, Stellato TA. (1991). Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res* 51 1564-1567

Priet, S., Sire, J., and Querat, G. (2006). Uracils as a cellular weapon against viruses and mechanisms of viral escape. *Curr HIV Res* 4, 31-42.

Quintero-Mora ML, D. F., JamesWaring, Robert G Korneluk, Cisneros B. (2002). Expanded CTG repeats inhibit neuronal differentiation of the PC12 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 289-294.

Ranum, L. P., and J. W. Day. (2002). Dominantly inherited, noncoding microsatellite expansion disorders. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:266–271.

Rees RC; Mian. S.(1999). Selective MHC expression in tumours modulates adaptive and innate antitumour responses. *Cancer Immunol Immunother* 48, 374-381.

Resnick, M. B., Routhier, J., Konkin, T., Sabo, E., and Pricolo, V. E. (2004). Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res* 10, 3069-3075.

Robertson KD. (2005).DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6, 597-610. 137

Rountree, M. R., Bachman, K. E., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (2001). DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 20, 3156-3165.

Roxburgh, C.S.D, and McMillan, D. C. (2012).The role of the in situ local inflammatory response in predicting recurrence and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 38, 451-466.

Rudolph RE, D. J., Lampe JW, Levy L, Qu P, Li SS, Lampe PD, Bronner MP, Potter JD. (2005). Risk factors for colorectal cancer in relation to number and size of aberrant crypt foci in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 605-608.

Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C., and Iacopetta, B. (2009). Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27, 186-192.

Santa-Marta M, da Silva FA, Fonseca AM, Goncalves J. (2005). HIV-1 Vif can directly inhibit apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G-mediated cytidine deamination by using a single amino acid interaction and without protein degradation. *J Biol Chem.* 280(10):8765-75.

Schreiber RD, O. L., Smyth MJ (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 331, 1565- 1570.

Schwartz S Jr, Y. H., Navarro M, Maestro M, Reventós J, Perucho M. (1999). Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 59, 2995-3002.

Schwitalle, Y., Kloor, M., Eiermann, S., Linnebacher, M., Kienle, P., Knaebel, H. P., Tariverdian, M., Benner, A., and von Knebel Doeberitz, M. (2008). Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* 134, 988-997. 138.

Shibata, D., Schaeffer, J., Li, Z. H., Capella, G., and Perucho, M. (1993). Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 85, 1058-1063.

Shih TY; Williams DR; Weeks MO; Maryak JM; Vass WC; Scolnick EM: (1978). Comparison of the genomic organization of Kirsten and Harvey sarcoma viruses. *J. Virol*, 27, 45-55.

Sire, J., Querat, G., Esnault, C., and Priet, S. (2008). Uracil within DNA: an actor of antiviral immunity. *Retrovirology* 5, 45.

Siu IM, P. T., Amini SB, Pretlow TP. (1997). Identification of dysplasia in human colonic aberrant crypt foci. *Am J Pathol* 150 1805-1813

Soreide, K., Nedrebo, B. S., Knapp, J. C., Glomsaker, T. B., Soreide, J. A., and Korner, H. (2009). Evolving molecular classification by genomic and proteomic biomarkers in colorectal cancer: potential implications for the surgical oncologist. *Surg Oncol* 18, 31-50.

Stallings, R. L. (1994). Distribution of trinucleotide microsatellites in different categories of mammalian genomic sequence: implications for human genetic diseases. *Genomics* 21, 116-121.

Stenglein, M. D., and Harris, R. S. (2006). APOBEC3B and APOBEC3F inhibit L1 retrotransposition by a DNA deamination-independent mechanism. *J Biol Chem* 281, 16837-16841.

Stewénus Y, G. L., Jonson T, Larsson N, Höglund M, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F, Gisselsson D. (2005). Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc Natl Acad Sci* 102, 5541-5546.

Subramanian, S., Madgula, V. M., George, R., Mishra, R. K., Pandit, M. W., Kumar, C. S., and Singh, L. (2003). Triplet repeats in human genome: distribution and their association with genes and other genomic regions. *Bioinformatics* 19, 549-552.

Suraweera N, I. B., Duval A, Compoint A, Tubacher E, Hamelin R. (2001). Conservation of mononucleotide repeats within 3' and 5' untranslated regions and their instability in MSI-H colorectal cancer. *Oncogene* 20, 7472-7477.

Svrcek M, Cervera P., Hamelin R, Lascols O, Duval D, Fléjoua JF (2011). Cancer colorectal : les nouveaux rôles du pathologiste à l'ère de la biologie moléculaire et des thérapies « ciblées ». *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES* 428 29-41.

Szyf, M. (2006). Targeting DNA methylation in cancer. *Bull Cancer* 93, 961-972.

Takeuchi H, Bilchik. A., Saha S, et al (2003). c-MET Expression Level in Primary Colon Cancer: A Predictor of Tumor Invasion and Lymph Node Metastases. *Clin Cancer Res* 9, 1480-1488.

Taylor B JM; Nik-Zainal S; Wu YL; Stebbings LA; Raine K; Campbell PJ; Rada C; Stratton MR; Neuberger M: (2013). DNA deaminases induce break-associated mutation showers with implication of APOBEC3B and 3A in breast cancer Kataegis. *Genes and chromosomes, eLife* , 2013

Ting DT, L. D., Paul S, Brannigan BW, Akhavanfard S, Coffman EJ, Contino G, Deshpande V, lafrate AJ, Letovsky S, Rivera MN, Bardeesy N, Maheswaran S, Haber DA. (2011). Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science* 331, 593-596.

Toth, G., Gaspari, Z., and Jurka, J.(2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res* 10, 967-981.

Toutenhoofd, S. L., Garcia, F., Zacharias, D. A., Wilson, R. A., and Strehler, E. E. (1998). Minimum CAG repeat in the human calmodulin-1 gene 5' untranslated region is required for full expression. *Biochim Biophys Acta* 1398, 315-320.

Trifonov, E. N., and Berezovsky, I. N. (2003). Evolutionary aspects of protein structure and folding. *Curr Opin Struct Biol* 13, 110-114.

Tsao, J., and Shibata, D. (1994). Further evidence that one of the earliest alterations in colorectal carcinogenesis involves APC. *Am J Pathol* 145, 531-534.

Vogelstein B, Fearon ER., Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988 , 319 525-532

Vogelstein B; Fearon ER. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

Volz A , R. B. (2006). Detecting the Unusual: Natural Killer Cells. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 81 473- 541

Weber M. (2008). Profiles of DNA methylation in normal and cancer cells. *Med Sci*, 24, 731-734.

Wedekind, J. E., Dance, G. S., Sowden, M. P., and Smith, H. C. (2003). Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *Trends Genet* 19, 207-216.

Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Hohler, T., Galle, P. R., and Buchler, M. W. (2005). Colorectal cancer. *Lancet* 365, 153-165. 140

Wentzensen, N., Coy, J. F., Knaebel, H. P., Linnebacher, M., Wilz, B., Gebert, J., and von Knebel Doeberitz, M. (2007). Expression of an endogenous retroviral sequence from the HERV-H group in gastrointestinal cancers. *Int J Cancer* 121, 1417-1423.

Wren, J. D., Forgacs, E., Fondon, J. W., 3rd, Pertsemlidis, A., Cheng, S. Y., Gallardo, T., Williams, R. S., Shohet, R. V., Minna, J. D., and Garner, H. R. (2000). Repeat polymorphisms within gene regions: phenotypic and evolutionary implications. *Am J Hum Genet* 67, 345-356.

Xu H, Svarovskaia ES, Barr R, Zhang Y, Khan MA, Strebel K and Pathak VK. (2004). A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *PNAS*, 101(15); 5652-5657.

Yanagisawa, Y., Akiyama, Y., Iida, S., Ito, E., Nomizu, T., Sugihara, K., Yuasa, Y., and Maruyama, K. (2000). Methylation of the hMLH1 promoter in familial gastric cancer with microsatellite instability. *Int J Cancer* 85, 50-53.

Zheng HT, P. Z., Zhou CZ, Li DP, Wang ZW, Qiu GQ, He L. (2005). Detailed deletion mapping of loss of heterozygosity on 22q13 in sporadic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 11, 1668-1672.

Zhou, C. Z., Peng, Z. H., Zhang, F., Qiu, G. Q., and He, L. (2002). Loss of heterozygosity on long arm of chromosome 22 in sporadic colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 8, 668-673.

Zhou M, G. L., Yeager AM, Findley HW (1998). Sensitivity to Fas-mediated apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with a mutant p53 phenotype and absence of Bcl-2 expression. *Leukemia* 12, 1756-1763.

Articles de périodiques imprimés

EN COURS.

Communication dans un congrès

DIALLO F. Délétion en 22q13 dans les cancers colorectaux : analyse rétrospective d'une cohorte Tourangelle. *Réunion d'Automne de l'ANPMCB, Tours, 08-10 Septembre 2011.*

Sites web consultés

Pubmed. [durant toute la période de la thèse]

Bibioinsert

Annexes

Annexe 1 :

Tableau 1A : Critères d'Amsterdam révisés en 1999

| Critères d'Amsterdam I | Critères d'Amsterdam II |
|--|---|
| Trois membres de la famille atteints de cancer du colon dont un est parenté à deux autres au premier degré | Trois membres de la famille avec cancer de spectre HNPCC* et dont un est parenté à deux autres au premier degré |
| Au moins deux générations successives atteintes | Au moins deux générations successives atteintes |
| Un des cancers diagnostiqué avant l'âge de 50 ans. | Un des cancers HNPCC avant l'âge de 50 ans. |
| Absence PAF dans la famille | Absence de FAP dans la famille |

Annexe 2 :

Tableau 2A : Classification pTNM (2009) du cancer colorectal et Stade

| Stade TNM | Signification | Stade clinique |
|------------------|---|-----------------------|
| Tis | Tumeur intra-épithéliale ou intra-muqueuse | 0 |
| T1 | Envahissement de la sous-muqueuse | I |
| T2 | Envahissement de la musculéuse | I |
| T3 | Envahissement de la sous-séreuse | IIa |
| T4a | Envahissement de la séreuse ; pénétration du péritoine viscéral | IIb |
| T4b | Envahissement d'un organe de voisinage | IIb |
| N0 | Pas de métastase ganglionnaire | III |
| N1a | 1 ganglion envahi | III |
| N1b | 2 à 3 ganglions envahis | III |
| N1c | Dépôts tumoraux « satellites » dans la sous-séreuse, ou dans le tissu péri-colique ou péri-rectal non péritonisé, dans le cadre d'une absence de ganglions lymphatiques métastatiques | III |
| N2a | 4 à 6 ganglions envahis | III |
| N2b | ≥ 7 ganglions envahis | III |
| M0 | Absence de métastases | IV |
| M1a | Métastase viscérale d'un seul organe | IV |
| M1b | Métastase viscérale de plus d'un organe ou métastase péritonéale | IV |

Annexe 3 :

Tableau 3A-1 : couples d'amorces des gènes Apobec 3 et du gène de référence

| Nom du primer | Séquence | Taille du produit |
|---------------|-----------------------------------|-------------------|
| Apobec 3B- S | 5'-ggttcccctgtctttgtcc-3' | 121pb |
| Apobec 3B- AS | 5'-gcgctccacctcatagca-3' | |
| Apobec 3G- S | 5'-gaggggcatgactacga g-3' | 156 pb |
| Apobec 3G- AS | 5'-gcagcgggtacctaagtga-3' | |
| Albumine-F | 5'- tgaaacatacgttcccaaagagttt-3' | 81 pb |
| Albumine-R | 5'- ctctccttctcagaaagtgtgcatat-3' | |

Tableau 3A-2 : couples d'amorces pour la recherche de microsatellites

| Nom | Séquence | Taille | Fluorescence en 5' |
|---------|-------------------------------|--------------|--------------------|
| NR 21f | 5'-gagtcgctggcacagtctca-3' | 107 - 110 pb | VIC (vert) |
| NR21r | 5'-ctggctactgcgtttacaa-3' | | |
| NR24f | 5'-gctgaattttacctcctgac-3' | 126 – 131 pb | FAM (bleu) |
| NR24r | 5'-attgtgccattgcattccaa-3' | | |
| NR27f | 5'-aacatgcttgcaaaccact-3' | 85 – 90 pb | FAM (bleu) |
| NR27r | 5'-cgataatactagcaatgacc-3' | | |
| Bat 25f | 5'-tcgcctcaagaatgtaagt-3' | 120 – 124 pb | VIC (vert) |
| Bat 25r | 5'-tctgcatttaactatggctc-3' | | |
| Bat26f | 5'-tgactactttgactcagcc-3' | 116 -120 pb | TED (noir) |
| Bat26r | 5'-aaccattcaacatttttaacc-3' | | |
| Cat25f | 5'-cctagaaacctttatccctgctt-3' | 150 pb | TED (noir) |
| Cat25r | 5'-gagcttgagctgagctgaga-3' | | |

Tableau 3A-3 : couples d'amorces des gènes K-ras, B-raf et Pi3K pour HRM

| Nom du primer | Séquence | Taille du produit | Tm |
|---------------|----------------------------------|-------------------|------|
| K-ras ex2-S | 5'-tataaggcctgctgaaaatgactgaa-3' | 92 pb | 68°C |
| K-ras ex2-AS | 5'-gaattagctgtatcgtcaaggcact-3' | | |
| B-raf ex15-S | 5'-ggtgatttggctctagctacag-3' | 147 pb | 53°C |
| B-raf ex15-AS | 5'-agtaactcagcagcatctcagg-3' | | |
| Pi3K ex9-S | 5'-gctcaaagcaatttctacagaga-3' | 92 pb | 50°C |
| Pi3K ex9-AS | 5'-tccatttagcacttacctgtgca-3'/ac | | |
| Pi3K ex20-S | 5'-gaggcttggagtatttcat-3' | 70 pb | 50°C |
| Pi3K ex20-S | 5'-aatccattttgtgtccag-3' | | |

Tableau 3A-4 : couples d'amorces des gènes : K-ras, B-raf et Pi3K et HLA-G pour le séquençage

| Nom du primer | Séquence | Taille du produit | Tm |
|-----------------|---------------------------------|-------------------|------|
| K-ras seq-S | 5'-gtgtgacatgttctaataatagtc -3' | 214 pb | 48°C |
| K-ras seq-AS | 5'-gaatggtcctgcaccagtaa -3' | | |
| B-raf seq-S | 5'-tcataatgcttctctgatagga -3' | 224 pb | 48°C |
| B-raf seq-AS | 5'-ggcAAAAAatttaatcagtgga -3' | | |
| Pi3K seq-ex9-S | 5'-atccagaggggAAAAatag -3' | 261 pb | 55°C |
| Pi3K seq-ex9-AS | 5'-atgctgagatcagcAAat -3' | | |
| Pi3K seq-ex20-S | 5'-tcatttctcAAactgacAA-3' | 352 pb | 55°C |
| Pi3K seq-ex20-S | 5'-tggaatccagagtgagctttca -3' | | |
| HLA-G-S | 5'-gtgatgggctgttAAagtgcacc-3' | | |
| HLA-G-AS | 5'-ggaaggaatgcagttcagcat-3' | | |

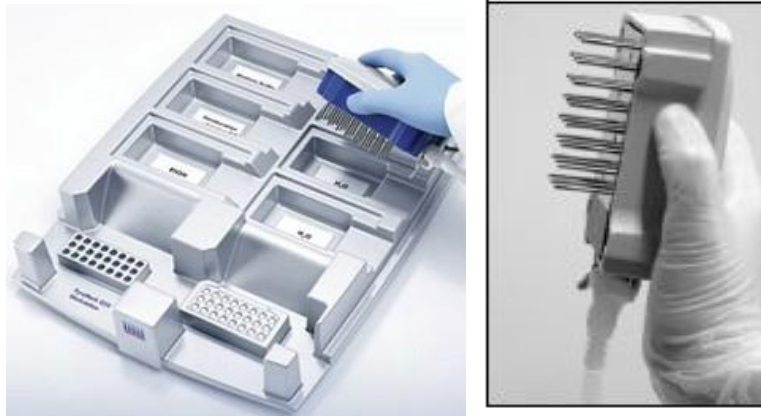
Annexe 4 :

Technique du Pyroséquençage :

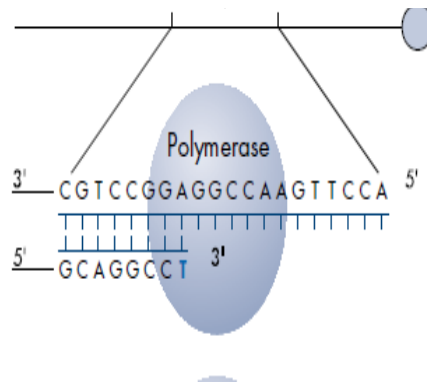


Etape 1 : Amplification du fragment d'ADN.

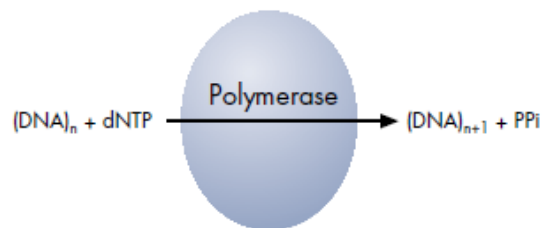
Le brin servant de matrice pour le pyroséquençage est biotinylé (amorce reverse biotinylé). Le produit de PCR biotinylé est fixé sur des billes de streptavidine. Il s'ensuit une dénaturation puis une relargage en présence du primer de séquençage. Enfin, le chargement de la plaque est effectué dans l'appareil.



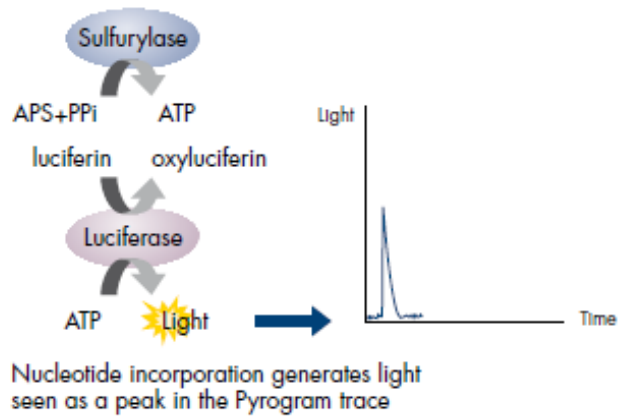
Etape 2 : Incubation avec la DNA polymérase, l'ATP sulfurylase, la luciférase, l'apyrase, l'adenosine 5' phosphosulfate (APS), et la luciférine.



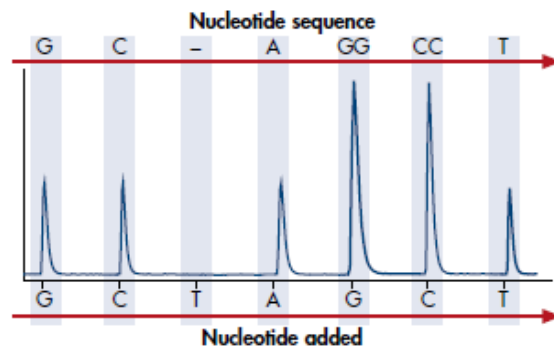
Etape 3 : Ajout du 1^{er} nucléotide, l'incorporation de la base est effectuée s'il y'a une complémentarité avec le brin matrice. Ensuite, un PPi est relargé et est proportionnel à la quantité de nucléotide incorporé.



Etape 4 : Conversion du PPi en ATP. ATP + luciférase permet la conversion de la luciférin en oxyluciferin, réaction qui va générer de la lumière, proportionnelle à la quantité d'ATP. La lumière est détectée par un capteur et traduite sous forme de pic sur le pyrogramme. La dégradation des dNTP et de l'ATP résiduels se fait avant l'injection d'un nouveau nucléotide.



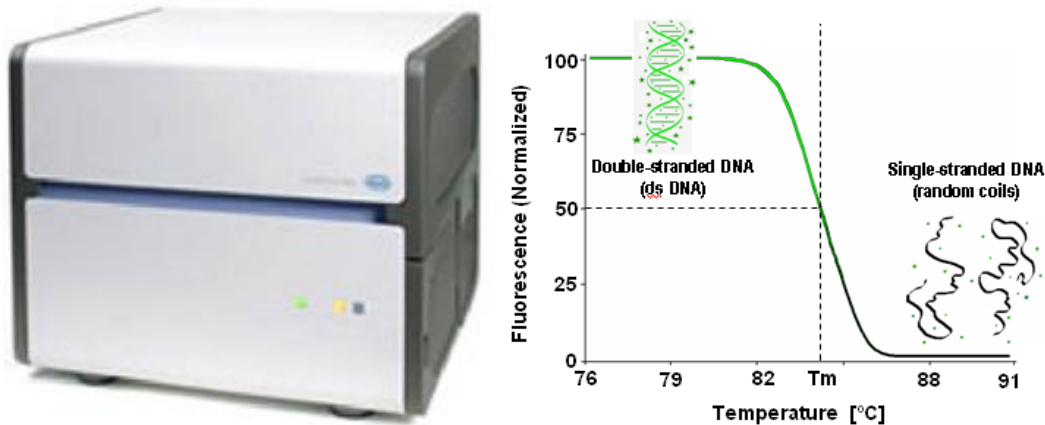
L'addition séquentielle des dNTP se poursuit et détermine la séquence nucléotidique en fonction des signaux sur le pyrogramme.



Annexe 5 :

Technique HRM :

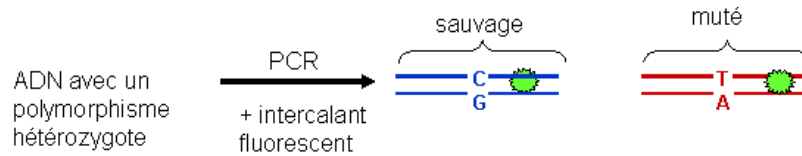
L'HRM est une technique de criblage rapide d'une population par détermination du statut de mutation ponctuelle « muté » ou « non muté » ou de méthylation. L'HRM permet la caractérisation d'échantillons d'ADN par leur comportement de dissociation de double à simple brin suite à une élévation de la température.



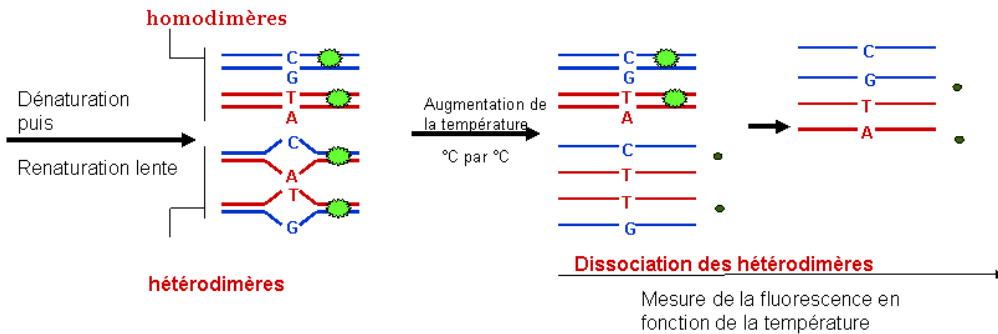
Les étapes

Un fluorochrome intercalant à l'ADN amplifié est intégré. Puis, l'augmentation de température de façon progressive entraîne une dénaturation des fragments d'ADN, éliminant le fluorochrome, ce qui provoque une diminution de la fluorescence. Ainsi, à une séquence d'ADN donnée correspond, une fluorescence spécifique représentée par une courbe de fusion.

L'ADN hétérozygote forme des hétéroduplex (muté – non muté) qui se dissocient à des températures plus basses que l'ADN homozygote (muté – muté) ou (non muté – non muté).



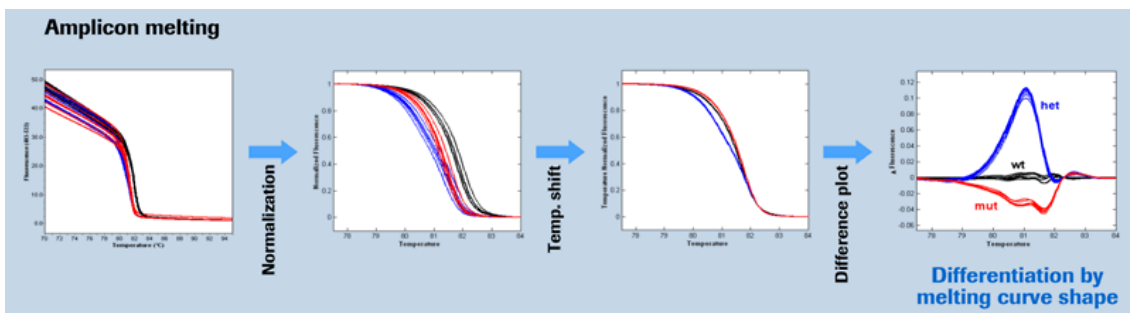
Amplification : Lors de l'augmentation progressive de la température degré par degré, le signal fluorescent provenant des hétérodimères diminue plus rapidement que celui provenant des homodimères (Formation d'hétéroduplex, courbes de fusion).



Analyse des courbes de fusion

Une fois la PCR réalisée, l'analyse des courbes de fusion se déroule en trois étapes :

- La première étape est la normalisation, c'est-à-dire que l'on va mettre les signaux pré-melting à 100% et les signaux post-melting à 0%, en essayant d'obtenir toutes les courbes regroupées. On a alors une modification de la forme des courbes qui prennent un aspect différent.



- La deuxième étape est la normalisation du signal, appelée « *Tm shift* », qui consiste à compenser la dispersion entre les échantillons d'un même groupe pour en améliorer l'homogénéité. Le logiciel applique par défaut une valeur de 5%.

- La dernière étape est appelée *difference plot* et consiste à analyser les différences dans la forme des courbes de fusion en soustrayant une courbe de référence, ce qui génère une différence de points, entraînant la mise des courbes de fusion similaires en grappes.



Fatou DIALLO AGNE

Relations entre l'infiltrat lymphocytaire et les caractéristiques moléculaires de 135 patients présentant un cancer colorectal : Prévalence de la délétion du locus Apobec 3

Résumé

Le cancer colorectal est une affection multifactorielle qui conjugue des anomalies épigénétiques et des altérations moléculaires à une déstabilisation du génome. En dehors de deux processus bien établis, l'instabilité des microsatellites et l'instabilité des chromosomes, la déstabilisation du génome peut être consécutive à la réexpression d'éléments génétiques mobiles, HERV et LINEs-1. Les HERVs ont un potentiel de modulation de l'immunité qui pourrait contrôler les réactions de l'hôte dans le processus de la carcinogénèse. Compte tenu du rôle que pourrait jouer les HERV, nous avons voulu déterminer la relation entre l'infiltrat lymphocytaire intratumoral et les différentes caractéristiques moléculaires des tumeurs. L'infiltrat lymphocytaire intratumoral a été évalué pour trois marqueurs (CD3, CD8 et CD45RO). Les marqueurs moléculaires analysés ont été : les mutations des gènes B-raf, k-ras et Pi3K, le statut des microsatellites, la méthylation de MLH1 et des LINEs-1, un polymorphisme de C-met et de HLA-G. Ces marqueurs ont été comparés à la prévalence de la délétion du locus Apobec 3 pour une cohorte de 135 patients porteurs de cancer colorectal.

L'infiltrat lymphocytaire est inversement lié à la délétion du gène Apobec 3, ($p=0,01230$) pour CD3, ($p=0,0392$) pour CD8. Il n'y a pas de significativité pour CD45RO. Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre l'infiltrat lymphocytaire et la déméthylation des HERV et des LINEs-1 ou le polymorphisme de HLA-G. Nous observons une association entre l'infiltrat lymphocytaire et le stade II de la tumeur ($p=0,0035$) pour CD3, ($p=0,0142$) pour CD8 et ($p=0,0011$) pour CD45RO. Les marqueurs CD3, CD8 sont associés à la localisation droite de la tumeur ($p=0,0296$) pour CD3 et ($p=0,0110$) pour CD8. Les tumeurs infiltrées, étaient associées au statut MSI-H, à une méthylation du gène MLH1 et inversement corrélées à la mutation de K-ras. L'association entre la mutation B-raf et l'infiltrat lymphocytaire CD45RO n'est pas démontrée.

Notre étude met en évidence pour la première fois un lien entre la délétion du locus Apobec 3 et l'importance de l'infiltrat lymphocytaire observé dans les tumeurs colorectales, ce qui incite à développer une investigation sur un échantillonnage plus important.

Mots-clés : cancer colorectal, infiltrat lymphocytaire, marqueurs moléculaires, Apobec 3, HERVs

Summary

Colorectal cancer is a multifactorial disease associated to epigenetic abnormalities and molecular alterations inducing a destabilization of the cellular genome. Besides two well-established processes, microsatellite instability and chromosome instability, the destabilization of the genome may follow mobilisation of endogenous mobile genetic elements, such as HERV or LINEs-1.

HERV have a potential to modulate immune response, which suggests that they could contribute to the process of carcinogenesis. We thus wanted to determine the relationship between intratumoral lymphocytic infiltration and the different molecular characteristics of tumours, taking into account factors that could influence the expression of HERV, such as the frequently observed deletion of a locus on 22q13 containing the Apobec 3 gene family.

The intratumoral lymphocytic infiltration was assessed for three markers (CD3, CD8 and CD45RO). The molecular markers analysed were: the mutations of B-raf, K-ras and Pi3K genes, the instability status of microsatellites, the methylation of MLH1 and LINEs-1, a polymorphism in C-met and in HLA-G. These markers were linked to the deletion of the locus containing Apobec 3 genes, in a cohort of 135 colorectal cancer patients.

Our results show that the lymphocytic infiltrate was inversely associated to the deletion of Apobec 3 ($p=0.01230$) for CD3, ($p=0.0392$) for CD8, CD45RO infiltrate being not statistically significant. We observed no correlation between the lymphocytic infiltrate and the demethylation of HERV or LINEs-1 and a polymorphism linked to HLA-G expression. An association between the lymphocytic infiltrate, expressing the three markers, and stage II tumours, ($p=0.0035$) for CD3, ($p=0.0142$) for CD8 and ($p=0.0011$) for CD45RO. This was also the case for the right location of the tumour, ($p=0.0296$) for CD3 and ($p=0.0110$) for CD8. The tumour-infiltrating lymphocytes were associated with a MSI-H status, a methylation of MLH1 promoter, and inversely correlated with K-ras mutation. No association was noted with the sex, mucinous differentiation, the staging, vascular invasion or Pi3K gene mutation.

In conclusion, our study suggests, for the first time, a correlation between the deletion of the locus containing the Apobec 3 genes and the lymphocytic infiltrate observed in colorectal tumours. This investigation needs to be confirmed through the study of a larger population.

Key words: colorectal cancer, immune infiltrate, molecular markers, Apobec 3, HERVs.