



**HAL**  
open science

# Place du stress du réticulum endoplasmique et de la réponse aux protéines non repliées dans la carcinogénèse colique

Nicolas Piton

► **To cite this version:**

Nicolas Piton. Place du stress du réticulum endoplasmique et de la réponse aux protéines non repliées dans la carcinogénèse colique. Médecine humaine et pathologie. 2014. dumas-01082344

**HAL Id: dumas-01082344**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01082344>**

Submitted on 13 Nov 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

ANNÉE 2014

**THÈSE POUR LE  
DOCTORAT EN MÉDECINE**

(Diplôme d'État)

Par

Nicolas PITON

Né le 22 février 1985 à Angers

Présentée et soutenue publiquement le 14 octobre 2014

**PLACE DU STRESS DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE ET DE  
LA RÉPONSE AUX PROTÉINES NON REPLIÉES  
DANS LA CARCINOGENÈSE COLIQUE**

Directeur de Thèse :

Monsieur le Professeur Jean-Christophe SABOURIN

Président du Jury :

Monsieur le Professeur Jean-Christophe SABOURIN

Membres du Jury :

Monsieur le Professeur Frédéric DI FIORE

Monsieur le Professeur Henri SEVESTRE

Madame le Docteur Françoise LEMOINE

Madame le Docteur Florence LE PESSOT

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2013 – 2014**  
**U.F.R. DE MEDECINE-PHARMACIE DE ROUEN**

-----

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**  
**Professeur Benoit VEBER**  
**Professeur Pascal JOLY**

DOYENS HONORAIRES :  
**Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. PIGUET – C. THUILLEZ**

PROFESSEURS HONORAIRES :  
**MM. M-PAUGUSTIN - J.ANDRIEU-GUITRANCOURT - M.BENOZIO-J.BORDE - Ph. BRASSEUR - R.COLIN - E. COMOY - J. DALION - . DESHAYES - C. FESSARD – J.P FILLASTRE - P.FRIGOT -J. GARNIER - J. HEMET - B. HILLEMAND - G. HUMBERT - J.M. JOUANY - R. LAUMONIER – Ph. LAURET - M. LE FUR – J.P. LEMERCIER - J.P LEMOINE - M<sup>le</sup> MAGARD - MM. B. MAITROT - M. MAISONNET - F. MATRAY - P.MITROFANOFF - Mme A. M. ORECCHIONI - P. PASQUIS - H.PIGUET - M.SAMSON – Mme SAMSON-DOLLFUS – J.C. SCHRUB - R.SOYER - B.TARDIF -.TESTART - J.M. THOMINE – C. THUILLEZ - P.TRON - C.WINCKLER - L.M.WOLF**

<b>I - MÉDECINE</b>
---------------------

**PROFESSEURS**

M. Frédéric **ANSELME** : HCN Cardiologie  
Mme Isabelle **AUQUIT AUCKBUR** : HCN Chirurgie Plastique  
M. Bruno **BACHY (Surnombre)** : HCN Chirurgie pédiatrique  
M. Fabrice **BAUER** : HCN Cardiologie  
Mme Soumeya **BEKRI** : HCN Biochimie et Biologie Moléculaire  
M. Jacques **BENICHOU** : HCN Biostatistiques et informatique médicale  
M. Jean-Paul **BESSOU** : HCN Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire  
Mme Françoise **BEURET-BLANQUART (Surnombre)** : CRMPR Médecine physique et de réadaptation  
M. Guy **BONMARCHAND** : HCN Réanimation médicale  
M. Olivier **BOYER** : UFR Immunologie  
M. Jean-François **CAILLARD (Surnombre)** : HCN Médecine et santé au Travail  
M. François **CARON** : HCN Maladies infectieuses et tropicales  
M. Philippe **CHASSAGNE** : HB Médecine interne (Gériatrie)  
M. Vincent **COMPERE** : HCN Anesthésiologie et réanimation chirurgicale  
M. Antoine **CUVELIER** : HB Pneumologie  
M. Pierre **CZERNICHOW** : HCH Epidémiologie, économie de la santé  
M. Jean - Nicolas **DACHER**: HCN Radiologie et Imagerie Médicale

M. Stéfan **DARMONI** : HCN Informatique Médicale/Techniques de communication  
M. Pierre **DECHELOTTE**: HCN Nutrition  
Mme Danièle **DEHESDIN (Surnombre)** : HCN Oto-Rhino-Laryngologie  
M. Jean **DOUCET** : HB Thérapeutique/Médecine – Interne - Gériatrie.  
M. Bernard **DUBRAY** : CB Radiothérapie  
M. Philippe **DUCROTTE** : HCN Hépatologie – Gastro - Entérologie  
M. Frank **DUJARDIN** : HCN Chirurgie Orthopédique - Traumatologique  
M. Fabrice **DUPARC** : HCN Anatomie - Chirurgie Orthopédique et Traumatologique  
M. Bertrand **DUREUIL**: HCN Anesthésiologie et réanimation chirurgicale  
Mme Hélène **ELTCHANINOFF** : HCN Cardiologie  
M. Thierry **FREBOURG**: UFR Génétique  
M. Pierre **FREGER** : HCN Anatomie/Neurochirurgie  
M. Jean François **GEHANNO**: HCN Médecine et Santé au Travail  
M. Emmanuel **GERARDIN** : HCN Imagerie Médicale  
Mme Priscille **GERARDIN** : HCN Pédiopsychiatrie  
M. Michel **GODIN** : HB Néphrologie  
M. Guillaume **GOURCEROL**: HCN Physiologie  
M. Philippe **GRISE** : HCN Urologie  
M. Didier **HANNEQUIN** : HCN Neurologie  
M. Fabrice **JARDIN** : CB Hématologie  
M. Luc-Marie **JOLY** : HCN Médecine d'urgence  
M. Pascal **JOLY** : HCN Dermato - vénéréologie  
M. Jean-Marc **KUHN** : HB Endocrinologie et maladies métaboliques  
Mme Annie **LAQUERRIERE** : HCN Anatomie cytologie pathologiques  
M. Vincent **LAUDENBACH**: HCN Anesthésie et réanimation chirurgicale  
M. Joël **LECHEVALLIER** : HCN Chirurgie infantile  
M. Hervé **LEFEBVRE** : HB Endocrinologie et maladies métaboliques  
M. Thierry **LEQUERRE** : HB Rhumatologie  
M. Eric **LEREBOURS** : HCN Nutrition  
Mme Anne-Marie **LEROI** : HCN Physiologie  
M. Hervé **LEVESQUE** : HB Médecine interne  
Mme Agnès **LIARD-ZMUDA**: HCN Chirurgie Infantile  
M. Pierre Yves **LITZLER** : HCN Chirurgie Cardiaque  
M. Bertrand **MACE** : HCN Histologie, embryologie, cytogénétique  
M. David **MALTETE** : HCN Neurologie  
M. Christophe **MARGUET** : HCN Pédiatrie  
Mme Isabelle **MARIE**: HB Médecine Interne  
M. Jean-Paul **MARIE** : HCN ORL  
M. Loïc **MARPEAU** : HCN Gynécologie - obstétrique  
M. Stéphane **MARRET**: HCN Pédiatrie

Mme Véronique **MERLE** : HCN Epidémiologie  
M. Pierre **MICHEL** : HCN Hépatologie - Gastro - Entérologie  
M. Francis **MICHOT** : HCN Chirurgie digestive  
M. Bruno **MIHOUT (Surnombre)** : HCN Neurologie  
M. Jean-François **MUIR** : HB Pneumologie  
M. Marc **MURAINÉ** : HCN Ophtalmologie  
M. Philippe **MUSETTE**: HCN Dermatologie - Vénérologie  
M. Christophe **PEILLON** : HCN Chirurgie générale  
M. Jean-Marc **PERON** : HCN Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale  
M. Christian **PFISTER** : HCN Urologie  
M. Jean-Christophe **PLANTIER** : HCN Bactériologie - Virologie  
M. Didier **PLISSONNIER** : HCN Chirurgie vasculaire  
M. Bernard **PROUST** : HCN Médecine légale  
M. François **PROUST** : HCN Neurochirurgie  
Mme Nathalie **RIVES**: HCN Biologie et méd. du dévelop. et de la reprod.  
M. Jean-Christophe **RICHARD (Mise en dispo)** : HCN Réanimation Médicale, Médecine d'urgence  
M. Horace **ROMAN** : HCN Gynécologie Obstétrique  
M. Jean-Christophe **SABOURIN** : HCN Anatomie – Pathologie  
M. Guillaume **SAVOYE** : HCN Hépatologie – Gastro  
Mme Céline **SAVOYE – COLLET** : HCN Imagerie Médicale  
Mme Pascale **SCHNEIDER** : HCN Pédiatrie  
M. Michel **SCOTTE**: HCN Chirurgie digestive  
Mme Fabienne **TAMION** : HCN Thérapeutique  
Mme Florence **THIBAUT** : HCN Psychiatrie d'adultes  
M. Luc **THIBERVILLE**: HCN Pneumologie  
M. Christian **THUILLEZ** : HB Pharmacologie  
M. Hervé **TILLY** : CB Hématologie et transfusion  
M. François **TRON (Surnombre)** : UFR Immunologie  
M. Jean-Jacques **TUECH** : HCN Chirurgie digestive  
M. Jean-Pierre **VANNIER** : HCN Pédiatrie génétique  
M. Benoît **VEBER** : HCN Anesthésiologie Réanimation chirurgicale  
M. Pierre **VERA** : C.B Biophysique et traitement de l'image  
M. Eric **VERIN** : CRMPR Médecine physique et de réadaptation  
M. Eric **VERSPYCK** : HCN Gynécologie obstétrique  
M. Olivier **VITTECOQ** : HB Rhumatologie  
M. Jacques **WEBER** : HCN Physiologie

#### **MAITRES DE CONFERENCES**

Mme Noëlle **BARBIER-FREBOURG** : HCN Bactériologie – Virologie

M. Jeremy **BELLIEN** : HCN Pharmacologie  
Mme Carole **BRASSE LAGNEL** : HCN Biochimie  
M. Gérard **BUCHONNET** : HCN Hématologie  
Mme Mireille **CASTANET**: HCN Pédiatrie  
Mme Nathalie **CHASTAN** : HCN Physiologie  
Mme Sophie **CLAEYSSENS** : HCN Biochimie et biologie moléculaire  
M. Moïse **COEFFIER** : HCN Nutrition  
M. Stéphane **DERREY** : HCN Neurochirurgie  
M. Eric **DURAND** : HCN Cardiologie  
M. Manuel **ETIENNE** : HCN Maladies infectieuses et tropicales  
M. Serge **JACQUOT** : UFR Immunologie  
M. Joël **LADNER** : HCN Epidémiologie, économie de la santé  
M. Jean-Baptiste **LATOUCHE**: UFR Biologie Cellulaire  
M. Thomas **MOUREZ** : HCN Bactériologie  
M. Jean-François **MENARD** : HCN Biophysique  
Mme Muriel **QUILLARD** : HCN Biochimie et Biologie moléculaire  
M. Vincent **RICHARD** : UFR Pharmacologie  
M. Francis **ROUSSEL** : HCN Histologie, embryologie, cytogénétique  
Mme Pascale **SAUGIER-VEBER** : HCN Génétique  
Mme Anne-Claire **TOBENAS-DUJARDIN** : HCN Anatomie  
M. Pierre Hugues **VIVIER** : HCN Imagerie Médicale

#### **PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE**

Mme Dominique **LANIEZ** : UFR Anglais  
Mme Cristina **BADULESCU** : UFR Communication

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS

- M. Thierry **BESSON** : Chimie Thérapeutique  
M. Jean-Jacques **BONNET** : Pharmacologie  
M. Roland **CAPRON** (PU-PH) : Biophysique  
M. Jean **COSTENTIN** (Professeur émérite) : Pharmacologie  
Mme Isabelle **DUBUS** : Biochimie  
M. Loïc **FAVENNEC** (PU-PH) : Parasitologie  
M. Jean Pierre **GOULLE** : Toxicologie  
M. Michel **GUERBET** : Toxicologie  
M. Olivier **LAFONT** : Chimie organique  
Mme Isabelle **LEROUX** : Physiologie  
M. Paul **MULDER** : Sciences du médicament  
Mme Martine **PESTEL-CARON** (PU-PH) : Microbiologie  
Mme Elisabeth **SEGUIN** : Pharmacognosie  
M. Rémi **VARIN** (PU-PH) : Pharmacie Hospitalière  
M Jean-Marie **VAUGEOIS** : Pharmacologie  
M. Philippe **VERITE** : Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES

- Mme Cécile **BARBOT** : Chimie Générale et Minérale  
Mme Dominique **BOUCHER** : Pharmacologie  
M. Frédéric **BOUNOURE** : Pharmacie Galénique  
M. Abdeslam **CHAGRAOUI** : Physiologie  
M. Jean **CHASTANG** : Biomathématiques  
Mme Marie Catherine **CONCE-CHEMTOB** : Législation pharmaceutique et économie de la santé  
Mme Elizabeth **CHOSSON** : Botanique  
Mme Cécile **CORBIERE** : Biochimie  
M. Eric **DITTMAR** : Biophysique  
Mme Nathalie **DOURMAP** : Pharmacologie  
Mme Isabelle **DUBUC** : Pharmacologie  
M. Abdelhakim **ELOMRI** : Pharmacognosie  
M. François **ESTOUR** : Chimie Organique  
M. Gilles **GARGALA** (MCU-PH) : Parasitologie  
Mme Najla **GHARBI** : Chimie analytique  
Mme Marie-Laure **GROULT** : Botanique  
M. Hervé **HUE** : Biophysique et Mathématiques

Mme Laetitia **LE GOFF** : Parasitologie Immunologie

Mme Hong **LU** : Biologie

Mme Sabine **MENAGER** : Chimie organique

Mme Christelle **MONTEIL** : Toxicologie

M. Mohamed **SKIBA** : Pharmacie Galénique

Mme Malika **SKIBA** : Pharmacie Galénique

Mme Christine **THARASSE** : Chimie thérapeutique

M. Frédéric **ZIEGLER** : Biochimie

### **PROFESSEUR CONTRACTUEL**

Mme Elizabeth **DE PAOLIS** : Anglais

### **ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

M. Imane **EL MEOUCHE** : Bactériologie

Mme Juliette **GAUTIER** : Galénique

M. Romy **RAZAKANDRAINIBE** : Parasitologie



### **III – MÉDECINE GÉNÉRALE**

#### **PROFESSEURS**

M. Jean-Loup **HERMIL** : UFR Médecine générale

#### **PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS :**

M. Pierre **FAINSILBER** : UFR Médecine générale

M. Alain **MERCIER** : UFR Médecine générale

M. Philippe **NGUYEN THANH** : UFR Médecine générale

#### **MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS :**

M Emmanuel **LEFEBVRE** : UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** : UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** : UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN-TARTARIN** : UFR Médecine Générale

**CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS** : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN : Hôpital Charles Nicolle

HB : Hôpital de Bois-Guillaume

CB : Centre Henri Becquerel

CHS : Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR : Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

#### **LISTE DES RESPONSABLES DE DISCIPLINE**

Mme Cécile **BARBOT** : Chimie Générale et Minérale

M. Thierry **BESSON** : Chimie thérapeutique

M. Roland **CAPRON** : Biophysique

M Jean **CHASTANG** : Mathématiques

Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB** : Législation, Economie de la Santé

Mme Elisabeth **CHOSSON** : Botanique

M. Jean-Jacques **BONNET** : Pharmacodynamie

Mme Isabelle **DUBUS** : Biochimie

M. Loïc **FAVENNEC** : Parasitologie

M. Michel **GUERBET** : Toxicologie

M. Olivier **LAFONT** : Chimie organique

Mme Isabelle **LEROUX-NICOLLET** : Physiologie

Mme Martine **PESTEL-CARON** : Microbiologie

Mme Elisabeth **SEGUIN** : Pharmacognosie

M. Mohamed **SKIBA** : Pharmacie Galénique

M. Philippe **VERITE** : Chimie analytique

## **ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANT**

### **MAITRES DE CONFERENCES**

M. Sahil **ADRIOUCH** : Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** : Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)

Mme Carine **CLEREN** : Neurosciences (Néovasc)

Mme Pascaline **GAILDRAT** : Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)

M. Antoine **OUVRARD-PASCAUD** : Physiologie (Unité Inserm 1076)

Mme Isabelle **TOURNIER** : Biochimie (UMR 1079)

### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

M. Serguei **FETISSOV** : Physiologie (Groupe ADEN)

Mme Su **RUAN** : Génie Informatique

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

## Remerciements

Monsieur le Professeur Sabourin,

Vous me faites l'honneur d'assurer la présidence du jury de thèse. Je tiens à vous remercier pour le soutien non feint et constant que vous m'avez apporté au cours de ces longues années d'internat, lorsque j'étais en poste dans votre service bien entendu, mais aussi lors de mon séjour dans des lieux plus lointains.

Recevez ici l'expression de ma sincère gratitude.

Monsieur le Professeur Di Fiore,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Recevez tout mon respect.

Monsieur le Professeur Sevestre,

Je vous remercie également d'avoir accepté de juger ce travail, en dépit de la distance séparant Amiens et Rouen.

Recevez également tout mon respect.

Madame le Docteur Lemoine et Madame le Docteur Florence Le Pessot,

Merci pour votre compagnonnage dans mon apprentissage du métier de pathologiste, et merci d'avoir accepté de juger cette thèse.

Recevez l'expression de ma sincère reconnaissance.

Que les personnes suivantes trouvent dans ces quelques lignes l'expression de ma gratitude:

Madame Élodie Colasse, technicienne de recherche dans le laboratoire de Pathologie du CHU de Rouen pour son aide dans l'optimisation et la réalisation des immunomarquages.

Madame Marie Cornic, technicienne de recherche dans le laboratoire de Pathologie du Centre Henri Becquerel pour la confection des micromatrices tissulaires.

Monsieur le Docteur James Wason, biostatisticien à l'institut de santé publique de l'Université de Cambridge, pour la création du modèle statistique utilisé dans la première partie de l'analyse de ce travail.

Madame le Docteur Rassl, médecin pathologiste au Papworth Hospital de Cambridge, et Monsieur le Docteur Marciniak, médecin pneumologue et chercheur au *Cambridge Institute for Medical Research*, pour m'avoir permis d'utiliser dans ce présent travail les contrôles cellulaires confectionnés lors de mon projet de master effectué sous leur direction.

Monsieur Mickael Bubenheim, statisticien au CHU de Rouen, pour ses recommandations concernant les analyses de corrélation.

Madame le Docteur Bor-Angerlier, médecin pathologiste au Centre François Baclesse de Caen, et Monsieur le Docteur Nicolas Élie, chercheur au Groupe Régional d'Études sur le Cancer pour leurs conseils méthodologiques et leur aide dans notre vaine mais intéressante tentative d'interpréter les signaux immunohistochimiques de façon automatisée.

*Last but not least*, je remercie mes parents pour leur aide durant cette décennie écoulée ; mon épouse Cécile, et mon fils Simon qui - jusqu'à présent - me remplit de joie.

Quand on aura allégé le plus possible les servitudes inutiles, évité les malheurs non nécessaires, il restera toujours, pour tenir en haleine les vertus héroïques de l'homme, la longue série des maux véritables, la mort, la vieillesse, les maladies non guérissables, l'amour non partagé, l'amitié rejetée ou trahie, la médiocrité d'une vie moins vaste que nos projets et plus terne que nos songes : tous les malheurs causés par la divine nature des choses.

Marguerite de CRAYENCOUR,  
*Mémoires d'Hadrien*

En souvenir du Docteur Francis Roussel.



## Sommaire

Remerciements .....	11
Hommage .....	15
1. Introduction .....	19
1.1 Histoire naturelle de l'adénocarcinome colique .....	19
1.2 Stress du réticulum endoplasmique et réponse aux protéines non repliées.....	23
1.3 La réponse aux protéines non repliées et le cancer .....	28
1.4 Stress du réticulum endoplasmique, transition épithélio-mésenchymateuse et lésions pré-cancéreuses.....	29
1.5 But et objectifs .....	33
2. Matériels et méthodes .....	34
2.1 Éthique .....	34
2.2 Micromatrices tissulaires .....	34
2.3 Anticorps et analyses immunohistochimiques .....	35
2.3.1 Optimisation et contrôles des réactions immunohistochimiques .....	35
2.3.2 Immunomarquages .....	36
2.4 Critères d'analyse des immunomarquages .....	37
2.4.1 Immunomarquages BiP et CHOP .....	37
2.4.2 Immunomarquages Ki67 .....	38
2.4.3 Immunomarquages GADD34, E-cadhérine et HIF-1 alpha .....	38
2.5 Analyse statistique .....	38
3. Résultats .....	41
3.1 Validation des anticorps utilisés.....	41
3.1.1 Optimisation des anticorps.....	41
3.2 Caractéristiques de la population de référence et des patients inclus dans l'étude.....	43
3.2.1 Caractéristiques de la population de référence.....	43
3.2.2 Caractéristiques des patients inclus dans l'étude .....	44

3.3 Nature des prélèvements inclus dans les micromatrices tissulaires .....	46
3.4 Analyse des micromatrices tissulaires pour les immunomarquages BiP, CHOP, GADD34, Ki67, E-cadhérine et HIF-1 alpha .....	47
3.4.1 Analyse des micromatrices immunomarquées pour BiP .....	47
3.4.2 Analyse des micromatrices immunomarquées pour CHOP .....	53
3.4.3 Analyse des micromatrices immunomarquées pour GADD34 .....	58
3.4.4 Analyse des micromatrices immunomarquées pour Ki67 .....	63
3.4.5 Analyse des micromatrices immunomarquées pour E-cadhérine .....	68
3.4.6 Analyse des micromatrices immunomarquées pour HIF-1 alpha .....	73
3.5 Études de corrélation par paires d'anticorps entre les différents scores obtenus pour chaque fragment étudié .....	78
3.5.1 Études de corrélation dans la catégorie histologique « épithélium colique normal » .....	79
3.5.2 Études de corrélation dans la catégorie histologique « lésion adénomateuse en dysplasie de bas grade » .....	81
3.5.3 Études de corrélation dans la catégorie histologique « lésion adénomateuse en dysplasie de haut grade » .....	83
3.5.4 Études de corrélation dans la catégorie histologique « adénocarcinome colique invasif primitif » .....	84
3.5.5 Études de corrélation dans la catégorie histologique « métastase ganglionnaire » .....	87
3.5.6 Études de corrélation toutes catégories histologiques confondues .....	88
3.5.7 Synthèse des résultats de corrélation .....	92
4. Discussion .....	93
4.1 Caractéristiques des protéines Ki67, E-cadhérine et HIF-1 alpha .....	93
4.1.1 Ki67 .....	93
4.1.2 E-cadhérine .....	94
4.1.3 HIF-1 alpha .....	94
4.2 Analyse des résultats obtenus .....	95

4.3 Justification de la méthodologie utilisée .....	97
4.3.1 Remarques sur la stratégie de tirage au sort en 2 temps.....	97
4.3.2 Population échantillonnée .....	98
4.3.3 Origine anatomique et nature des lésions étudiées .....	99
4.3.4 Comparaison des caractéristiques de l'échantillon et celles de la population de référence.....	101
4.3.5 Remarques sur les différentes formules utilisées pour établir un score en fonction des anticorps utilisés .....	101
4.4 Limites de l'étude.....	101
4.4.1 Risque de biais de mauvaise classification .....	102
4.4.2 Remarques concernant l'hétérogénéité de l'expression des protéines étudiées .....	102
4.4.3 Différences potentielles dans le traitement des tissus.....	103
4.5 Perspectives .....	103
5. Conclusion.....	105
Bibliographie .....	106
Résumé et mots clés .....	122

## **1. INTRODUCTION**

En 2008, le cancer colorectal était le troisième type de néoplasie dans le monde en quant à l'incidence (après le cancer du poumon et le cancer du sein), responsable de 9,7% des cancers nouvellement diagnostiqués (soit 1,23 millions de cas), et était le troisième cancer en matière de mortalité (après le cancer du poumon et du foie), responsable de 608 000 décès (1). Il s'agissait du troisième type de cancer le plus fréquent chez les hommes (663 000 nouveaux cas) et du deuxième chez les femmes (570 000 cas) (1). Dans l'Union Européenne (27 pays), l'incidence en 2012 était estimée à 342 100 nouveaux cas diagnostiqués(2). Il s'agissait cette année là du deuxième type de cancer en matière de mortalité chez les hommes (après le cancer du poumon), du deuxième type de cancer en ce qui concerne l'incidence chez la femme (après le cancer du sein), du troisième type de cancer pour ce qui est de l'incidence chez l'homme (après les cancers de la prostate et du poumon) et du troisième type de cancer pour la mortalité chez la femme (après le cancer du sein et le cancer du poumon) (2).

En France métropolitaine, 42 152 nouveaux cas ont été diagnostiqués en 2012, lui conférant le troisième rang des cancers les plus fréquents derrière les cancers de la prostate et du sein (3). Le sex-ratio était de 1,23 homme pour 1 femme (3). Ce cancer était à l'origine de 17 722 décès. L'âge médian au diagnostic était de 71 ans chez l'homme et 75 ans chez la femme (3). La région Haute-Normandie fait partie des territoires à fort taux d'incidence de la maladie (avec des taux d'incidence standardisé à la population mondiale sur la période 2008-2010 estimés chez l'homme à 39,9 pour 100 000 hommes et chez la femme à 25,4 pour 100 000 femmes (3)).

L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques apparaissant dès les premiers stades de la carcinogénèse pourrait améliorer le traitement de cette maladie.

### ***1.1 Histoire naturelle de l'adénocarcinome colique***

L'adénocarcinome colorectal est une tumeur épithéliale maligne se développant à partir du gros intestin (4) .

La plupart des adénocarcinomes colorectaux se développe à partir d'adénomes (Figure 1) (5). Par définition, les adénomes sont des lésions tumorales bénignes (4). Dans le côlon, les adénomes apparaissent soit de façon sporadique, soit dans le cadre d'un syndrome polyposique (6–8).

Les adénocarcinomes peuvent également se développer au sein de territoires muqueux dysplasiques chez les patients atteints de maladie inflammatoire du tube digestif (9).

Contrairement à l'épithélium de l'intestin grêle, l'épithélium colique est dépourvu de villosités et s'organise en cryptes glandulaires appelées cryptes de Lieberkühn, formées de cellules cylindriques (10). Ces cellules comprennent d'une part des cellules caliciformes, les plus nombreuses, d'autre part des entérocytes, très minoritaires, qui sont revêtus d'une bordure en brosse à leur pôle apical (10). Comme tous les épithéliums, l'épithélium colique repose sur une membrane basale le séparant du tissu conjonctif sous jacent.

Les foyers de cryptes aberrantes semblent être les lésions histologiques les plus précoces dans la carcinogénèse colique (11–13). Sur le plan histologique, les cryptes aberrantes sont environ trois fois plus larges que les cryptes normales, et leur lumière a une forme plus ovale(14). On distingue 2 principaux types de cryptes aberrantes (15) : celles qui sont associées avec la présence d'une mutation du gène *APC* et celles associées avec de mutations des gènes *KRAS* et *NRAS* (16).

Il est vraisemblable que ces foyers de cryptes aberrantes puissent évoluer vers des lésions adénomateuses. Ces dernières peuvent apparaître à l'endoscopie comme sessiles, pédiculés ou déprimés (16).Microscopiquement, ces lésions adénomateuses sont hypercellulaires, constituées de cellules augmentées de taille comportant un noyau souvent hyperchromatique. L'architecture est toujours glandulaire, mais il peut exister une stratification et une perte de la polarité normale. Ces lésions semblent se développer secondairement à l'inactivation de la voie *APC/bêta-caténine* (17,18).

Les lésions adénomateuses coliques sont évaluées microscopiquement selon leur degré de dysplasie, c'est à dire la présence d'anomalies de type néoplasique, architecturales ou cytologiques de l'épithélium, sans infiltration de la membrane basale (9). Il existe différents systèmes de classification de ces lésions cancéreuses pré-invasives. La plus utilisée est la classification de Vienne qui distingue 5 catégories (19) :

- **catégorie 1** : absence de néoplasie
- **catégorie 2** : incertitude quant à la présence de néoplasie

- **catégorie 3** : dysplasie de bas grade. Cette catégorie regroupe les adénomes en dysplasie minime à modérée (termes de l'ancienne nomenclature). L'épithélium est constitué de cellules conservant une polarité, possédant un noyau hyperchromatique avec une membrane nucléaire régulière. La chromatine est fine. Il peut exister une pluri-stratification des noyaux mais celle-ci ne dépasse pas la moitié inférieure de la hauteur épithéliale.

- **catégorie 4** (néoplasie de haut grade non-invasive) qui regroupe :

. **4.1 La dysplasie de haut grade** (anciennement dysplasie sévère). L'épithélium est constitué de cellules allongées, hyperchromatiques, possédant un noyau modérément pléomorphe. La chromatine est irrégulière. Il existe une stratification des noyaux, et certains d'entre eux dépassent la moitié inférieure de la hauteur épithéliale, atteignant parfois la surface de la glande.

. **4.2 Le carcinome non invasif** (ou carcinome *in situ*). Cette sous-catégorie rassemble des lésions adénomateuses constituées de cellules pléomorphes avec des noyaux de taille augmentée, vésiculeux, pourvus de volumineux nucléoles. Il est retrouvé des mitoses atypiques. Sur le plan architectural, il existe des formations glandulaires cribriiformes. Les glandes sont souvent disposées obliquement vis à vis de la membrane basale.

. **4.3 La suspicion de carcinome intra-muqueux**. Cette sous-catégorie correspond aux lésions décrites en 4.2 mais pour lesquelles il est difficile de savoir s'il existe une rupture de la membrane basale.

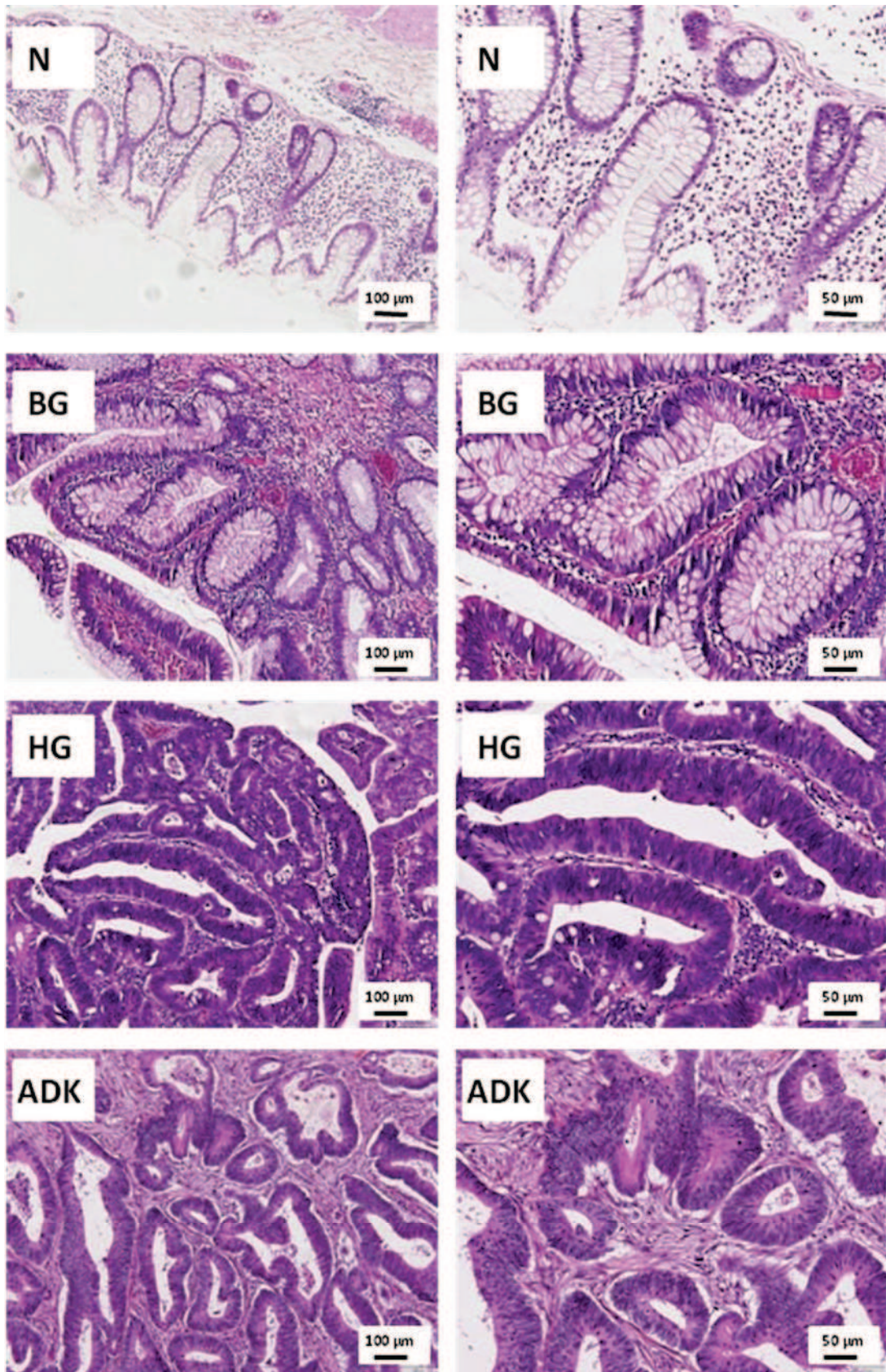
- **catégorie 5**, qui regroupe :

. **5.1 Le carcinome intra-muqueux** ; il concerne les adénomes présentant un dépassement indubitable de la membrane basale avec une invasion du chorion sous-jacent

. **5.2 Le carcinome sous-muqueux** ; il inclut les polypes avec invasion de la sous-muqueuse par les cellules néoplasiques.

Une classification en catégories d'un processus continu, comme la séquence adénome - adénocarcinome, est réductrice de la réalité du phénomène. Ceci peut expliquer la faible reproductibilité intra et inter-observateurs dans l'évaluation des lésions cancéreuses pré-invasives (20,21). La figure 1 ci-dessous illustre les différentes étapes histologiques de la carcinogénèse colique.





**Figure 1** : Images microscopiques illustrant l'histoire naturelle de l'adénocarcinome colique. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant.

L'histoire naturelle des altérations génétiques au cours de la carcinogénèse colique a été beaucoup étudiée. Il existe 2 voies distinctes(22). La première est caractérisée par une instabilité chromosomique des cellules tumorales, c'est à dire la présence d'altérations génétiques de grande taille, à l'échelle chromosomique (perte ou gains de larges portions, larges translocations etc.), avec souvent pertes d'hétérozygotie de gènes suppresseurs de tumeurs et anomalies de nombre des chromosomes (aneuploïdie). Ce type de voie est initié par une mutation du gène *APC*, suivie de l'activation de *KRAS* et de la perte de fonction de *p53*(23). Cliniquement, ce type de cancer avec instabilité chromosomique représente 60 à 70% des carcinomes colorectaux sporadiques et mettent souvent en jeu la séquence adénome-adénocarcinome.

La seconde voie de carcinogénèse est caractérisée par la présence d'une instabilité microsatellitaire, c'est à dire une instabilité dans les segments d'ADN répétés appelés microsatellites (22). Ces anomalies sont la conséquence d'une altération de la fonction de réparation des mésappariements de l'ADN (système MMR ou *mismatch repair*, qui est assuré chez l'homme par les gènes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*). La présence d'une instabilité microsatellitaire dans les cellules colorectales cancéreuses est souvent associée, pour les cancers sporadiques, à une instabilité épigénétique caractérisée par la présence d'un phénotype de méthylation des îlots CpG, c'est à dire par une grande fréquence d'îlots CpG méthylés au niveau des promoteurs des régions des gènes suppresseurs de tumeur ainsi qu'une grande fréquence de mutations du gène *BRAF*(24). Le promoteur du gène *MLH1* est ainsi méthylé dans environ 12% des cas de cancers colorectaux sporadiques (25). On retrouve également une instabilité microsatellitaire dans les cancers colorectaux héréditaires en cas de syndrome de Lynch, syndrome autosomique dominant caractérisé par des mutations constitutionnelles d'un des gènes du système MMR (26–28).

## **1.2 Stress du réticulum endoplasmique et réponse aux protéines non repliées**

Les protéines destinées à être sécrétées ou insérées au sein des membranes cellulaires sont synthétisées par les ribosomes situés du côté cytoplasmique de la membrane du réticulum endoplasmique (RE), avant de subir des modifications au sein de la lumière de ce dernier. Ces protéines nouvellement produites sont repliées



et assemblées par des protéines chaperonnes du RE en subissant des modifications post-traductionnelles avant d'être exportées (29–31). La synthèse protéique tout comme le repliement et les modifications post-traductionnelles nécessitent de l'énergie (32–35). C'est la raison pour laquelle la fonction du RE est très sensible aux perturbations du microenvironnement cellulaire comme l'hypoxie ou le manque de nutriments car ils aboutissent à une diminution de l'énergie disponible pour la cellule (36–40). Dans de telles conditions, les protéines mal repliées ou non repliées s'accumulent au sein du RE aboutissant à un état de « stress du réticulum endoplasmique ».

Les cellules réagissent à un tel stress du RE en déclenchant une réponse homéostatique, conservée parmi les espèces, qui a été appelée « réponse aux protéines non repliées » (RPNR, *unfolded protein response* ou UPR) (Figure 2). La RPNR a pour objectif de rétablir l'équilibre entre les protéines non repliées et les protéines chaperonnes du RE (29,41). A cette fin, la traduction protéique globale est atténuée, réduisant ainsi la charge de travail pour les protéines chaperonnes et les enzymes (42,43). Parallèlement, les capacités de maturation protéique du RE sont accrues par la synthèse de nouvelles protéines chaperonnes (41), et les protéines mal repliées présentes dans le RE peuvent être dégradées *via* l'activation de la dégradation associée au RE (*ER-associated degradation* ou ERAD) (44). Si un équilibre entre la quantité de protéines chaperonnes et la quantité de protéines à replier n'est pas retrouvé, on observe une activation des voies biologiques aboutissant à la mort cellulaire (45–49).

Dans l'espèce humaine, la RPNR comprend trois principales voies de transduction du signal (Figure 2). IRE1 (*Inositol requiring 1*), PERK (*Protein Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase*) et ATF6a (*Activating Transcription Factor 6a*) sont des protéines transmembranaires du RE, chacune d'elles participant à la détection du stress du RE (50,51). *Binding immunoglobulin protein* (BiP, parfois également appelée *Glucose Regulated Protein 78-kDa* ou GRP78) est une protéine chaperonne majeure du RE, appartenant à la famille HSP7. Elle se lie avec une grande affinité aux portions hydrophobes des acides aminés exposés des protéines incomplètement repliées (52–57). Dans des conditions optimales, la quantité de protéines non repliées dans la lumière du RE est faible et BiP est légèrement en excès. Une

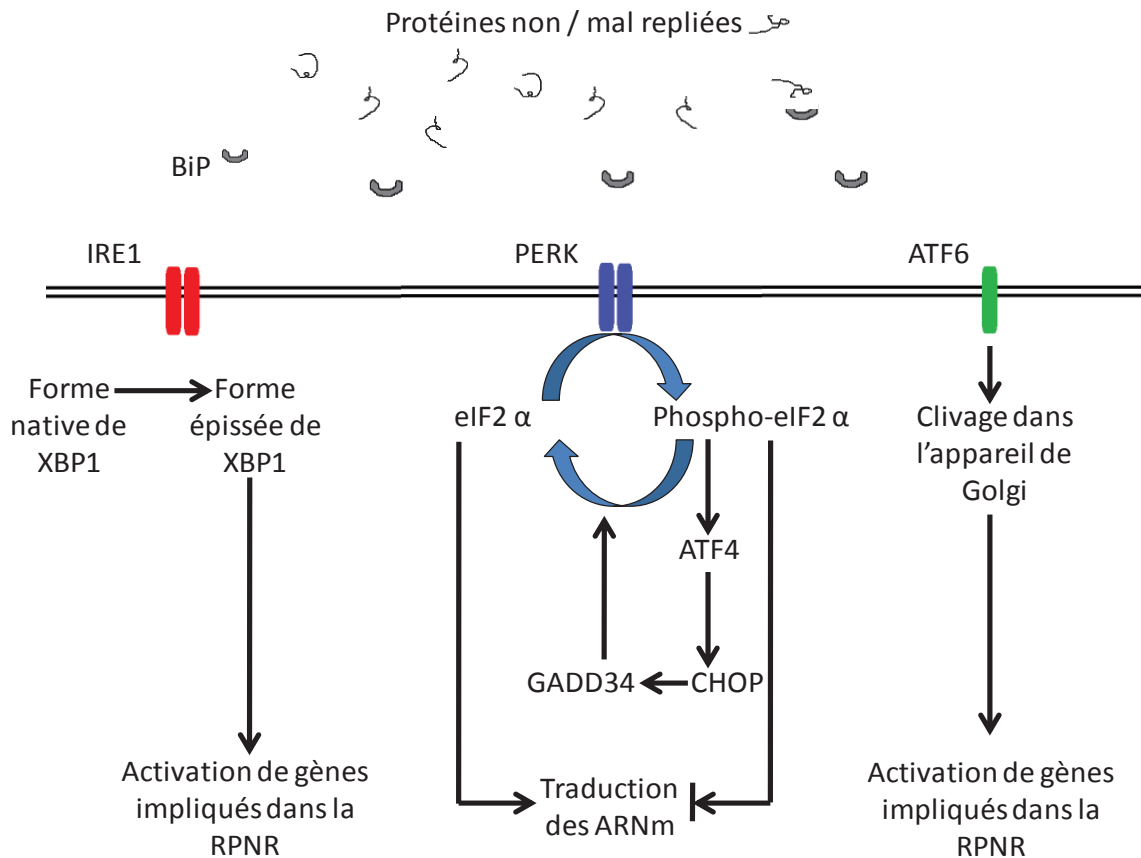
conséquence majeure et immédiate d'un stress du RE est une diminution brutale de la concentration de BiP libre, du fait de sa séquestration par les protéines non repliées en accumulation. IRE1, PERK et ATF6 semblent répondre à la concentration de BiP libre grâce à leur domaine luminal (50,58,59), mais de récentes données suggèrent que IRE1 pourrait également s'activer directement au contact de protéines non repliées présentes dans la lumière du RE (60).

IRE1 contient un domaine cytosolique protéine kinase (61). Lors d'un stress du RE, IRE1 s'oligo-dimérise et subit une *trans*-autophosphorylation au niveau de ce domaine tyrosine kinase, induisant une activité endo-ribonucléasique spécifique (62,63). Cette activité permet le clivage spécifique de l'acide ribonucléique messager (ARNm) codant pour *X-box binding protein 1* (XBP1) au niveau de deux sites (64). Ensuite, le fragment central est libéré et les fragments d'ARNm 3' et 5' sont réunis. Contrairement à l'ARNm XBP1 qui n'est pas clivé et qui inhibe la RPNR (65), l'ARNm XBP1 clivé code pour un facteur de transcription activateur de gènes cibles de la RPNR (64). Outre cette activité d'épissage de l'ARNm XBP1, l'activité endo-ribonucléasique de IRE1 permet la dégradation de nombreux autres ARNm, diminuant ainsi la synthèse protéique globale. Cette activité est appelée « dégradation régulée dépendante de IRE1 » (*regulated IRE1 dependent degradation*) (66).

De manière similaire à IRE1 durant un stress du RE, PERK s'oligo-dimérise. Cette oligo-dimérisation permet une *trans*-autophosphorylation du domaine cytosolique tyrosine-kinase (43,50) qui accroît fortement l'affinité de PERK pour la sous-unité  $\alpha$  de la protéine *translation initiation factor 2* (eIF2 $\alpha$ ) recrutée au niveau de la boucle protéique fortement phosphorylée de PERK (67). eIF2 $\alpha$  est alors phosphorylée par le centre catalytique de PERK au niveau de la serine 51 (43,68). Dans des conditions normales, le complexe eIF2 amène l'acide ribonucléique de transfert (ARNt) initiateur auprès des ribosomes sur le point de débiter la traduction, jouant ainsi un rôle crucial dans la synthèse de nouvelles protéines (69). Le complexe eIF2 se lie et hydrolyse la guanosine tri-phosphate (GTP) durant le cycle catalytique, et celle-ci doit être réapprovisionné par le *guanine nucleotide exchange factor* eIF2B (70). Une fois phosphorylé, eIF2 $\alpha$  possède une haute affinité pour eIF2B, entravant de fait sa capacité d'échanger la GTP pour une guanosine diphosphate (GDP) auprès d'eIF2 $\alpha$  non phosphorylé (71). Par conséquent, la traduction de la plupart des ARNm est inhibée, ce qui diminue la quantité de protéines au sein du RE (43,72). Néanmoins,

et de manière apparemment paradoxale, la traduction de l'ARNm d'*activating transcription factor-4* (ATF4) est favorisée dans ces conditions (73,74). Cet ARNm possède deux cadres ouverts de lecture en amont (*upstream open reading frames* ou uORF) dans sa région 5'. L'uORF situé le plus en 5' facilite la traduction de la région codante d'ATF4, alors que le second uORF bloque normalement cette traduction en raison du chevauchement hors du cadre de lecture avec cette même région codante (75). En raison de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , les ribosomes peuvent passer le second uORF et peuvent ainsi arriver au codon d'initiation de la traduction d'ATF4, permettant ainsi la traduction de ce facteur protéique (75,76). ATF4 favorise l'expression de gènes impliqués dans les phénomènes anti-oxidatifs et dans le métabolisme des acides aminés (77). En outre, il induit la traduction du facteur de transcription *C/EBP homologous protein* (CHOP, encore appelé GADD153) (73,78). Un gène cible important de CHOP code pour la protéine *growth arrest and deoxyribonucleic acid damage 34* (GADD34) (48). GADD34 forme un complexe avec *protein phosphatase 1* (PP1) qui déphosphoryle sélectivement phospho-eIF2 $\alpha$ , permettant ainsi un rétablissement de la synthèse protéique globale (79). Ceci aboutit à une boucle de rétrocontrôle négative, décalée dans le temps, jouant un rôle d'adaptation cellulaire en cas d'un stress de RE transitoire (80). Cependant, lorsque le stress du RE perdure, le rétablissement de la traduction globale par l'intermédiaire de GADD34 exacerbe l'accumulation de protéines mal repliées. Cette caractéristique est toxique pour la cellule et aboutit à l'activation de signaux de mort cellulaire (48,81–83). CHOP induit également l'expression d'*ER oxidase 1  $\alpha$*  (ERO1  $\alpha$ ), qui entraîne la création de ponts disulfures (48,77). Si cette caractéristique peut améliorer le repliement protéique, elle accroît également la production de dérivés réactifs de l'oxygène au sein de la lumière du RE, toxiques pour la cellule (48). Pour toutes ces raisons, la perte de GADD34 ou de CHOP peut améliorer la survie des tissus lors d'un stress du RE sévère (48,81,83).

Un mécanisme différent est à l'œuvre pour ATF6a. Lors d'un stress du RE, cette protéine est transportée au sein de l'appareil de Golgi, où elle est clivée par *site-1 protease* (S1P) et *site-2 protease* (S2P), aboutissant à la formation d'un facteur de transcription qui favorise l'expression de nombreux gènes de la RPNR, y compris *CHOP* (78,84–87).



**Figure 2 :** Voies de signalisation de la RPNR au cours du stress du RE chez l'homme. Les protéines non ou incomplètement repliées se lient aux protéines chaperonnes, comme BiP, au sein du RE. Lorsque ces protéines non repliées s'accumulent, la cellule est en état dit de stress du RE, ce qui déclenche la Réponse aux Protéines Non Repliées (RPNR) via IRE1, PERK et ATF6a. IRE1 s'oligo-dimérise et subit une *trans*-autophosphorylation qui lui confère une activité endo-ribonucléasique. Cette propriété lui permet d'épisser de façon non conventionnelle l'ARNm de XBP1, rendant ainsi la protéine XBP1 active. XBP1 active de nombreux gènes cibles de la RPNR. De façon similaire, PERK s'oligo-dimérise et subit une *trans*-autophosphorylation avant de phosphoryler eIF2 $\alpha$  qui, dans cet état, inhibe la traduction de la plupart des ARNm, réduisant ainsi la charge pesant sur le RE. Paradoxalement, dans ces conditions, la traduction de l'ARNm de ATF4 est accrue. ATF4 est un facteur de transcription qui induit l'expression de CHOP, qui à son tour accroît l'expression de GADD34. GADD34 déphosphoryle de façon sélective eIF2 $\alpha$ , rétablissant ainsi la synthèse protéique globale. ATF6a est transporté dans l'appareil de Golgi où il est clivé, formant un facteur de transcription activant de nombreux gènes de la RPNR.

### **1.3 La Réponse aux Protéines Non Repliées et le cancer**

Il est maintenant reconnu que le stress du RE est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies humaines, comme le diabète, les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires ou le cancer (67).

Dans de nombreux cancers solides, l'activation de certaines voies de la RPNR a été observée (86,88–92), notamment dans les adénocarcinomes et plus particulièrement l'adénocarcinome colique (93,94). Pour ce dernier, il a été mis en évidence une surexpression de BiP, avec une augmentation progressive de l'expression de cette protéine au cours de la séquence adénome - adénocarcinome (94)

Il s'avère que les tumeurs dans lesquelles la RPNR est activée sont plus agressives et plus résistantes à la chimiothérapie, alors que les tumeurs pour lesquelles la RPNR dysfonctionne sont de croissance beaucoup plus lente. Ces observations suggèrent que l'activation de la RPNR pourrait permettre aux cellules malignes de survivre et de proliférer (40,95,96). Par exemple, une expression élevée de BiP dans le cancer du sein est associée à une survie sans rechute plus courte dans les suites d'une chimiothérapie, et dans le cancer prostatique, la surexpression de BiP est associée à un haut risque de récurrence et une survie moins bonne (97,98). Des observations similaires ont été faites chez des patients atteints de cancer gastrique (99). Qui plus est, l'expression de BiP paraît nécessaire à la croissance de la tumeur et la formation de métastases. Ainsi, dans un modèle murin *knockout*, la déficience pour BiP bloquait le développement du cancer prostatique initié par la perte du gène suppresseur de tumeur *PTEN* (100) alors que dans un modèle de cancer gastrique, murin également, la perte de BiP inhibait la croissance tumorale (99). Il a été de plus démontré dans certains modèles que la perte de XBP1 entraînait une diminution de la taille tumorale dans des conditions hypoxiques, suggérant que la voie de signalisation initiée par IRE1 joue très probablement un rôle central dans l'adaptation de la tumeur à l'hypoxie (101). De manière similaire, il existe des données suggérant que la voie de signalisation PERK - eIF2 $\alpha$  - ATF4 est nécessaire pour la croissance tumorale et la survie des cellules malignes dans des conditions hypoxiques. Dans un autre modèle murin, l'injection de cellules malignes déficientes pour PERK aboutissait à la formation de tumeurs plus petites que celles possédant un PERK fonctionnel (102). Des observations similaires ont été faites pour ATF4 (103).

Cependant, toutes les composantes de la RPNR ne confèrent pas aux cellules malignes un avantage de survie. Comme décrit ci-dessus dans la partie 1.2,

l'expression de GADD34 a pour conséquence une reprise de la synthèse protéique globale, favorisant de fait la mort cellulaire en cas de persistance du stress du RE (48,81–83). Par conséquent, la perte de GADD34 dans les tumeurs pourrait empêcher l'apoptose des cellules tumorales et promouvoir leur survie dans des conditions hypoxiques (48,104). Il a été récemment montré que l'expression de GADD34 était associée au degré de différenciation des mésothéliomes, avec une faible expression de GADD34 observée dans les tumeurs peu différenciées, sarcomatoïdes (105). Étant donné que la perte de différenciation est associée à une survie moindre, il est tentant d'émettre l'hypothèse selon laquelle *GADD34* se comporte comme un gène suppresseur de tumeur, et qu'ainsi sa perte pourrait permettre aux tumeurs de croître plus facilement dans des environnements hypoxiques.

Le stress du RE n'est pas observé uniquement dans de volumineuses tumeurs hypoxiques. Certaines données suggèrent que ce phénomène pourrait exister très tôt au cours de la carcinogénèse. Dans un modèle murin transgénique exprimant une construction XBP1 - luciférase, reflétant ainsi le niveau de stress du RE dans les cellules tumorales, l'activité de la luciférase était détectée dans de petites tumeurs primitives, et l'on pouvait prédire le taux de croissance de ces lésions en fonction de l'intensité lumineuse libérée par cette enzyme (106). Cependant, la relation de cause à effet entre les deux événements qui sont le stress du RE et la carcinogénèse n'est pas clairement établie. On ne sait si l'activation de la RPNR est une conséquence d'une croissance tumorale rapide, une cause, ou si cette association est plus compliquée. Une compréhension plus fine des interactions entre le stress du RE et la carcinogénèse précoce est cruciale du fait de l'existence de thérapies ciblant la RPNR pouvant inhiber la croissance tumorale, comme c'est actuellement le cas dans le myélome avec l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome (bortezomib) (107–109).

#### ***1.4 Stress du réticulum endoplasmique, transition épithélio-mésenchymateuse et lésions pré-cancéreuses***

Les cellules épithéliales normales sont polarisées, avec une partie apicale orientée vers la lumière ou la surface, et une partie basale (110). Ces cellules sont fortement cohésives les unes avec les autres grâce à des molécules d'adhésion comme l'E-cadhérine. Elles expriment des cytotkératines et leur mobilité est très

restreinte (111,112). Ces caractéristiques permettent le maintien de l'architecture et de la fonction des épithéliums. A l'inverse, les cellules conjonctives ne sont pas polarisées et sont capables de se mouvoir avec facilité en raison de l'absence de liaisons fortes avec les structures avoisinantes. Elles expriment des marqueurs mésenchymateux comme la vimentine (112,113). Dans certaines conditions, les cellules épithéliales subissent des modifications aboutissant à la perte de leur phénotype épithélial et à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux. Ce processus est appelé « transition épithélio-mésenchymateuse » (TEM) (Figure 3).

La TEM est très impliquée au cours de l'embryogénèse (114). En effet, il a été initialement démontré que l'expression de l'E-cadhérine est fortement diminuée au cours de la gastrulation du poulet (115), et la TEM apparaît être essentielle dans le développement embryonnaire des mammifères, par exemple durant la formation de l'endoderme pariétal (116) et durant l'organogénèse cardiaque (117–119). Ce processus semble également être activé lors de la réparation et régénération tissulaires, car Slug, un facteur de transcription impliqué dans la TEM de l'embryogénèse, apparaît plus fortement exprimé dans les kératinocytes situés au contact d'une blessure cutanée (120).

La TEM semble être un processus clé de la biologie de nombreux carcinomes (cancers développés à partir des épithéliums) car sa présence est associée à un grade histologique plus élevé (121,122), à l'acquisition de propriétés d'invasion et de mobilité (123,124), particulièrement dans le cancer colorectal (125), à un risque plus élevé de récurrence (126), de métastases (127,128), et globalement à un pronostic plus défavorable (129–131), notamment dans l'adénocarcinome colorectal (132). Dans certains modèles, comme celui de la carcinogénèse pulmonaire, il apparaît que la TEM pourrait être un phénomène précoce et serait associée aux différentes étapes précédant le stade de tumeur invasive. Un phénotype mésenchymateux partiel a été mis en évidence dans des lésions bronchiques pré-cancéreuses, et il s'avère qu'une diminution de l'expression de l'E-cadhérine est associée à des lésions pré-cancéreuses plus évoluées, de grade plus sévère (133–135). Il a de plus été observé que des cellules épithéliales bronchiques humaines mises en culture en présence de carcinogènes présents dans la fumée de tabac font l'objet d'une TEM et présentent alors un phénotype se rapprochant de celui de cellules embryonnaires (136). Ce phénotype se caractérise par la formation de sphéroïdes comportant des tubules

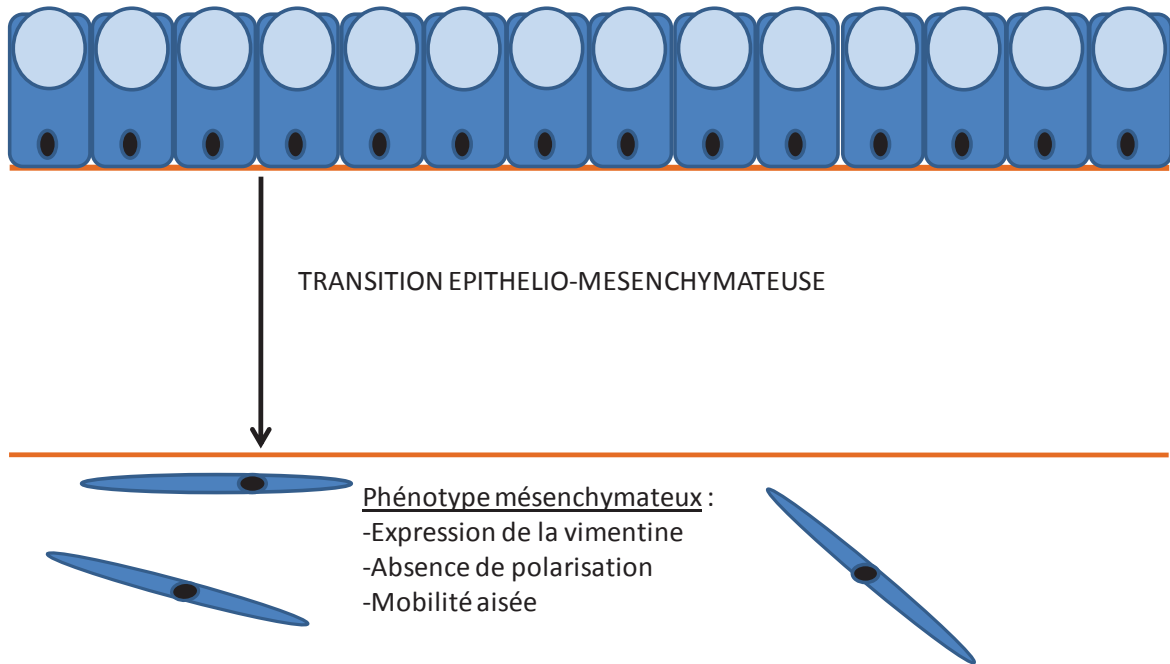
ramifiant, une expression accrue des marqueurs embryonnaires CD44, CD133, ALDH1, et une diminution de l'expression de CD23 (136).

De même, il a été démontré qu'un traitement chimique induisant un stress du RE induit une TEM ans des cellules épithéliales alvéolaires et dans des cellules thyroïdiennes PC-C3 mises en culture (137,138).



Phénotype épithélial :

- Expression des cytokératines, de l'E-cadhérine
- Polarisation
- Mobilité très limitée



**Figure 3** : Description schématique de la transition épithélio-mésenchymateuse. Les cellules épithéliales (partie supérieure du dessin, colorées en bleu) sont fortement liées entre elles par des molécules d'adhésion telles que l'E-cadhérine, et expriment les filaments intermédiaires cytokératines. Ces cellules épithéliales sont polarisées, avec un pôle apical (représenté ici par une vacuole apicale de mucus) et un pôle basal, accolé à la membrane basale (illustrée ici par la ligne orange). À l'inverse, les cellules conjonctive (partie inférieure du dessin) n'expriment pas les marqueurs épithéliaux sus-cités, mais expriment des marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, un filament intermédiaire. Elles ne sont pas polarisées et ne sont liées que faiblement avec leur environnement, ce qui explique leur capacité de migration. La transition épithélio-mésenchymateuse (flèche) est le processus par lequel les cellules épithéliales perdent leur phénotype et acquièrent progressivement les caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

### **1.5 But et objectifs**

Le but de notre étude était de tester l'hypothèse selon laquelle le stress du RE est présent au sein des lésions coliques pré-cancéreuses, et que l'expression des protéines de la RPNR BiP, GADD34 et CHOP est associée, positivement ou négativement, à la progression de ces lésions vers l'adénocarcinome colique invasif. Il a été décidé d'étudier plus particulièrement la protéine chaperonne BiP car son expression est associée à la survie cellulaire lors d'un stress du RE ; à l'inverse, les protéines CHOP et GADD34 sont des facteurs de transcription induits par la RPNR et associés à la mort cellulaire résultant d'un stress du RE prolongé.

Nos objectifs étaient les suivants :

- Observer le niveau d'expression des protéines BiP, CHOP et GADD34 par une technique d'immunomarquage à l'aide de micromatrices tissulaires (139) construites à partir de tissus humains fixés au formol et inclus en paraffine, comportant les différents stades de développement de l'adénocarcinome colique (de l'épithélium colique normal jusqu'à la métastase ganglionnaire d'adénocarcinome colique primitif).
- Évaluer la corrélation entre l'expression de ces trois protéines de la RPNR et le sexe du patient ainsi que son âge au moment du diagnostic.
- Évaluer, en prenant en compte chaque fragment tissulaire inclus, la corrélation entre l'expression de ces trois protéines BiP, CHOP et GADD34 et différents phénomènes liés au cancer à savoir la prolifération cellulaire (à l'aide de l'immunomarquage Ki67), la transition épithélio-mésenchymateuse (à l'aide de l'immunomarquage E-cadhérine) et l'hypoxie cellulaire (à l'aide de l'immunomarquage HIF-1 alpha).

## **2. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1 Éthique**

L'utilisation de tissus humains au cours de ce projet a été approuvée par le groupe Comité de Protection des Personnes du Centre Hospitalier Universitaire de Rouen. Tous les échantillons et données associées provenant de patients ont été rendus anonymes.

### **2.2 Micromatrices tissulaires**

Quatre micromatrices tissulaires (139) ont été construites à partir de tissus fixés au formol et inclus en paraffine. Les échantillons provenaient tous de pièces de résection chirurgicale ou endoscopique d'adénocarcinome colique et d'adénome colique, présents dans les archives du laboratoire de Pathologie du CHU de Rouen. La sélection des patients s'est effectuée de la façon suivante. La population étudiée a été traitée entre le 01/01/2003 et le 01/01/2013 au Centre Hospitalier Universitaire de Rouen. En premier lieu, tous les comptes rendus anatomopathologiques de résection chirurgicale colique sur cette période ayant un code ADICAP (Association pour le Développement de l'Informatique en Cytologie et Anatomie Pathologique (140)) "\*OHDCA7\*", correspondant au diagnostic "Adénocarcinome colique", ont été listés en utilisant le logiciel Statistiques APIX (Technidata, France). Neuf-cent-seize comptes rendus ont été ainsi identifiés. Ces comptes rendus ont ensuite été numérotés par ordre chronologique, de 1 à 916. Un tirage au sort simple de 68 cas a ensuite été effectué en utilisant le logiciel en ligne gratuit [www.randomizer.org](http://www.randomizer.org) (141). Une deuxième étape d'inclusion de patients a été effectuée, intéressant cette fois-ci les lésions coliques adénomateuses en dysplasie de haut grade. Une méthodologie similaire a été utilisée. Les comptes rendus anatomopathologiques rédigés sur la période comprise entre le 01/01/2003 et le 01/01/2013 et possédant le codes ADICAP "Adénome colique (...) avec dysplasie grave" ("\*OHDCA3\*") ont été listés. Cent-cinquante-et-un patients ont ainsi été identifiés. Après numérotation par ordre chronologique, un tirage au sort simple de 18 cas a été effectué en utilisant le logiciel en ligne [www.randomizer.org](http://www.randomizer.org) (141).

Au total donc, 81 patients ont été inclus dans notre étude. Les lames histologiques colorées par l'HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) ont été désarchivées et les territoires d'épithélium colique normal, d'adénome en dysplasie de bas grade (selon la classification de Vienne (19)), d'adénome en dysplasie de haut grade (idem (19))

et d'adénocarcinome invasif ont été circonscrits au feutre après examen au microscope optique Olympus BH-2 (Olympus, Japon). Dans la mesure du possible, les territoires d'épithélium normal ont été sélectionnés à distance de la lésion tumorale ou adénomateuse. Parallèlement, les données associées concernant les lésions ont été compilées, à savoir l'âge des patients à la date de diagnostic, le stade pTNM de la tumeur (réévalué selon la classification TNM 2009 (142), la présence ou non d'embolies vasculaires tumorales et d'engainements tumoraux péri-nerveux. Lors de l'estimation du stade pTNM selon la classification la plus récente, si l'information concernant l'existence ou non d'une métastase viscérale n'était pas disponible, il a été considéré qu'il n'y en avait pas, c'est à dire que la tumeur a été considérée comme M0.

Les blocs tissulaires paraffinés correspondant ont été sortis des archives et transmis avec les lames correspondantes colorées par l'HES pour la construction des micromatrices. Des échantillons de 0,6 mm de diamètre ont été prélevés dans les territoires d'intérêt et transférés dans des blocs de paraffine à l'aide d'un instrument *Beecher Manual Tissue Arrayer 1*. À visée purement exploratoire et à titre d'objectif mineur de l'étude, 3 métastases ganglionnaires lymphatiques d'adénocarcinome colique (parmi les cas tirés au sort) ont également été incluses dans les micromatrices.

Afin de permettre une cartographie précise des micromatrices et une identification exacte de chaque échantillon tissulaire, des fragments de tissu normal rénal, surrénalien, hépatique ont été insérés à intervalles réguliers.

Des coupes consécutives de 4 µm d'épaisseur ont été effectuées sur le même microtome, en un seul temps, à partir des micromatrices, et colorées toutes les 10 coupes à l'Hématoxyline-Eosine-Safran pour s'assurer de la nature histologique et de la qualité morphologique des différents échantillons.

## **2.3 Anticorps et analyses immunohistochimiques**

### **2.3.1 Optimisation et contrôles des réactions immunohistochimiques**

Pour les anticorps anti-BiP, CHOP ou GADD34, l'optimisation a été effectuée en utilisant des amas cellulaires fixés au formol et inclus en paraffine confectionnés à l'occasion d'une précédente étude dirigée (143). Des cellules adénocarcinomateuses de la lignée A549 (achetée auprès de l'American Type Culture Collection) avaient été mises en culture et traitées par de la tunicamycine à une concentration de 2,5 µg/mL

pendant différentes durées (jusqu'à 16 heures). Des cellules identiques servant de contrôles négatifs avaient été incubées dans des conditions similaires, excepté l'ajout de tunicamycine. La tunicamycine est un agent chimique induisant un stress du RE en empêchant le repliement des protéines au sein du RE du fait de l'inhibition de la N-glycosylation (45). Après traitement, les cellules en culture avaient été lysées et l'expression protéique de BiP et GADD34 avait été évaluée par une technique de *western blot* (144). Un traitement par la tunicamycine pendant 16 heures avait abouti à une augmentation maximale de l'expression des protéines BiP et GADD34, en comparaison avec les cellules non traitées, ce qui avait permis la validation de l'utilisation de ces cellules comme contrôles positifs et négatifs de la présence d'un stress du RE et de l'activation de la RPNR. D'autres cellules A549, mises en culture dans les mêmes conditions (traitement par la tunicamycine pendant 16 heures pour les témoins positifs et absence de traitement pour les témoins négatifs), avaient été fixées dans du Cytotfix (Surgipath®, Milton Keynes, Royaume-Uni) et incluses en paraffine.

Ces amas cellulaires fixés et paraffinés ont servi de témoins positifs et négatifs lors de l'optimisation des anticorps anti-BiP, CHOP ou GADD34. Des concentrations croissantes d'anticorps ont été testées (de 1 : 800 à 1 : 50) et la différence d'intensité du signal obtenu entre cellules ayant subi un stress du RE et celles ayant été cultivées dans des conditions optimales a été évaluée. Les conditions optimales de réaction immunohistochimique qui ont été choisies correspondaient à celles pour lesquelles la différence d'intensité de marquage entre les contrôles positifs et négatifs était la plus flagrante.

En ce qui concerne les anticorps dirigés contre Ki67 et E-cadhérine, nous avons choisi les conditions utilisées en pratique courante dans notre laboratoire. Pour l'immunomarquage HIF-1 alpha en revanche, nous avons optimisé le choix des conditions de réaction immunohistochimique à l'aide d'une pièce de résection de tumeur cérébrale (glioblastome multiforme) fixée au formol et incluse en paraffine, selon les recommandations du fabricant.

### 2.3.2 Immunomarquages

Le déparaffinage, le démasquage antigénique, la réaction immunohistochimique ainsi que sa détection ont été effectués en utilisant l'automate Benchmark ULTRA

Ventana Roche, Suisse). Les coupes ont été chauffées jusqu'à 72°C puis incubées pendant 30 minutes en présence des anticorps suivants, selon la dilution indiquée :

- Un anticorps monoclonal de lapin anti-BiP (C50B12 #3177; Cell Signaling Technology, États-Unis d'Amérique) reconnaissant BiP, utilisé à une dilution de 1 : 200.
- Un anticorps monoclonal de souris anti-CHOP/GADD153 (ab11419 , Abcam, Royaume-Uni) reconnaissant CHOP, utilisé à une dilution de 1 : 100.
- Un anticorps polyclonal de lapin anti-GADD34 (10449-1-AP, Proteintech, États-Unis d'Amérique), utilisé à une dilution de 1 : 100.
- Un anticorps monoclonal de souris anti-Ki67 (clone MIB-1, Dako, Danemark et États-Unis d'Amérique), utilisé à une dilution de 1 :100
- Un anticorps monoclonal de souris anti-E-cadhérine (4A2C7, Life Technologies, États-Unis d'Amérique), selon la pré-dilution fournie par le fabricant.
- Un anticorps monoclonal de souris anti-HIF-1 alpha (ab8366, Abcam, Royaume-Uni), utilisé à une dilution de 1 : 250.

Les lames ont enfin été rincées dans une solution tampon et la détection de l'anticorps primaire s'est effectuée grâce à la solution Ultraview DAB (Roche-Ventana, Suisse). Après rinçage, l'application d'une goutte d'hématoxyline pendant 4 minutes a servi de contre-coloration, avant rinçage et application d'une lamelle de verre.

## **2.4 Critères d'analyse des immunomarquages**

Les lames immunomarquées ont été lues au microscope optique Olympus BH-2. Seules les cellules épithéliales (normales dans l'épithélium normal, dysplasiques dans les lésions adénomateuses, malignes dans les lésions adénocarcinomateuses primitives ou métastatiques) ont été prises en compte pour le marquage, et les territoires de tissu conjonctif ont été ignorés.

### **2.4.1 Immunomarquages BiP et CHOP**

Pour les immunomarquages BiP et CHOP, le pourcentage de cellules marquées a été évalué pour chaque score d'intensité. Le marquage a été gradé comme : [0] aucun, [1] visible mais faible, [2] modéré, non maximal, [3] maximal. Pour BiP, seul le marquage cytoplasmique a été pris en compte, contrairement à CHOP où seul le marquage nucléaire a été analysé. Afin de prendre en compte à la fois le nombre de cellules marquées et la force du marquage, le score suivant a été calculé, adapté d'une méthode initialement décrite par Allred *et al* (145) :

**Score d'immunomarquage =**

$$100 \times [(pourcentage \ de \ cellules \ fortement \ marquées \times 3) + (pourcentage \ de \ cellules \ modérément \ marquées \times 2) + (pourcentage \ de \ cellules \ faiblement \ marquées \times 1)]$$

La valeur obtenue pour chaque échantillon était donc comprise entre 0 et 300.

#### *2.4.2 Immunomarquage Ki67*

Pour l'immunomarquage Ki67, le pourcentage de noyaux positifs parmi les cellules épithéliales d'intérêt a été évalué. L'index d'immunomarquage pour chaque lésion était donc compris entre 0 et 100.

#### *2.4.3 Immunomarquages GADD34, E-cadhérine et HIF-1 alpha*

Pour les immunomarquages GADD34, E-cadhérine et HIF-1 alpha, le marquage de tous les compartiments cellulaires, membranes comprises, a été pris en compte. L'intensité du signal a été évalué de façon semi-quantitative entre 0 et 3 (7 scores possibles par échantillon : 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 et 3).

### **2.5 Analyse statistique**

Pour chaque immunomarquage protéique, nous avons créé un modèle linéaire à effets mixtes (146) en prenant en compte la nature histologique du prélèvement ainsi que l'âge du patient à la date du diagnostic et son genre. L'utilisation d'un modèle linéaire à effets mixtes permet l'étude de la corrélation entre les données de différents échantillons lorsque certains d'entre eux sont reliés parce qu'ils proviennent du même patient, et ainsi sont dépendants. Le modèle incluait les données cliniques suivantes ; sexe et âge comme effets fixes, en ajoutant un effet stochastique pour chaque individu. La variable d'issue correspondait au score d'immunomarquage pour chaque échantillon. Deux sous-modèles ont été utilisés :

dans le premier, la nature histologique du fragment tissulaire a été incluse comme facteur à 5 niveaux ; dans le second, la nature histologique de chaque échantillon a été représentée par un score allant de 1 à 5, 1 correspondant à l'épithélium colique normal, 2 à la dysplasie de bas grade, 3 à la dysplasie de haut grade, 4 à l'adénocarcinome colique infiltrant primitif et 5 à la métastase ganglionnaire d'adénocarcinome d'origine colique. Le premier sous-modèle permettait l'utilisation d'un paramètre différent pour chaque type histologique alors que le second était plus simple et estimait un « effet de tendance ». Lorsque les suppositions du modèle n'étaient pas vérifiées (c'est-à-dire des valeurs résiduelles étant indépendantes, ayant une variance constante et étant normalement distribuées), les données brutes ont été transformées. Toutes ces analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de la version 2.15.2 du logiciel R (R Foundation for Statistical Computing, Autriche). L'interprétation de la significativité des résultats a nécessité une correction dite de « Bonferroni » afin de prendre en compte les comparaisons multiples et le risque d'obtenir des résultats statistiquement significatifs ( $p < 0,05$ ) uniquement par chance en raison du très grand nombre de tests réalisés (erreurs de type I). Le degré de significativité (risque alpha) a donc été calculé, pour le premier sous modèle linéaire à effets mixtes, à 0,000397 (c'est à dire  $0,05 / (21 \times 6)$ , 21 étant le nombre de comparaisons effectuées pour chaque anticorps entre les différentes catégories histologiques et 6 le nombre d'anticorps étudiés).

Finalement, la corrélation entre les paires d'immunomarquages pour chaque catégorie histologique a été explorée en calculant le coefficient de corrélation de Spearman à l'aide du programme gratuit accessible en ligne à l'adresse <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/?module=tests/spearman> (147). Si, pour chaque paire protéique étudiée, au minimum l'une des données n'était pas disponible pour un fragment, ce dernier était exclu de l'analyse. Ici encore, la significativité des résultats a été interprétés à la lumière d'une correction de Bonferroni, avec un seuil de significativité calculé comme suit :

$$0,05 / [6 \times (6 + 5 + 4 + 3 + 2 + 1)] = 0,000397$$

L'explication de ce calcul est la suivante : 0,05 est le risque alpha habituellement choisi ; il y a eu 6 catégories étudiées (toute histologie confondue, « épithélium colique normal », « lésion adénomateuse en dysplasie de bas grade », « lésion



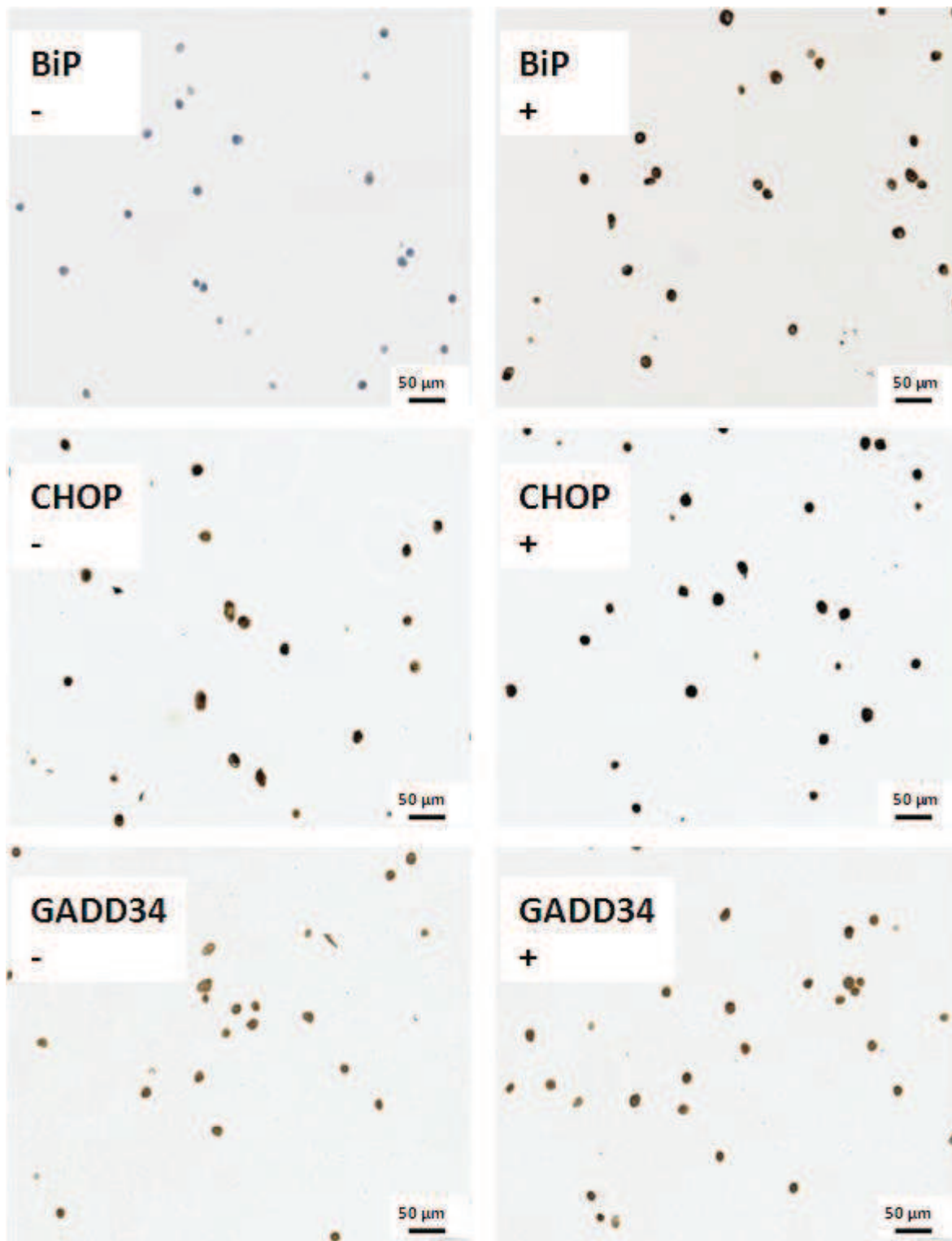
adénomateuse en dysplasie de haut grade », « adénocarcinome », « métastase ganglionnaire »), et pour chaque catégorie, 21 paires de protéines ont été étudiées (c'est à dire  $6 + 5 + 4 + 3 + 2 + 1$  paires). À noter que cette valeur est identique à celle obtenue pour l'interprétation de la significativité des résultats issus du modèle linéaire à effets mixtes.

### **3. RÉSULTATS**

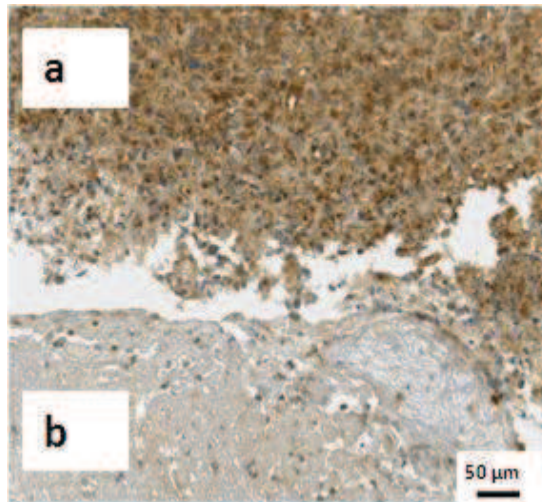
#### **3.1 Validation des anticorps utilisés**

##### *3.1.1 Optimisation des anticorps*

Avant de mesurer le taux des marqueurs étudiés de stress du RE et de la RPNR, c'est à dire BiP, CHOP et GADD34 dans les échantillons tissulaires des micromatrices, il convenait de valider les anticorps utilisés. Dans ce but, nous avons utilisé des cellules mises en culture ayant subi artificiellement un stress du RE (contrôles positifs), pour lesquels l'existence d'un tel stress avait été confirmé par la technique du *western blot* dans une précédente étude (143). La différence d'intensité du marquage entre cellules « stressées » et cellules non « stressées » a été évaluée à l'examen microscopique. Pour BiP, la différence la plus flagrante entre cellules « stressées » et celles qui ne l'étaient pas a été obtenue à une concentration d'anticorps à 1 : 200, avec des cellules non traitées comportant un marquage cytoplasmique faible comparé à un fort signal obtenu pour les cellules traitées (Figure 4). Étant donné que BiP est une protéine chaperonne abondante du RE (52), cette localisation était attendue. Pour CHOP et GADD34 en revanche, la différence d'intensité des marquages était beaucoup moins flagrante (Figure 4) ; pour ces 2 anticorps, une dilution de 1 : 100 nous est apparue la plus pertinente. Pour CHOP, il existait un marquage à la fois cytoplasmique et nucléaire, attendu du fait de son rôle de facteur de transcription. Pour GADD34, le marquage était principalement cytoplasmique, ce qui est en cohérent pour une sous-unité à activité phosphatase connue pour s'associer à la surface cytosolique de la membrane du RE. En ce qui concerne les anticorps dirigés contre Ki67, les conditions d'utilisation ont été validées par l'immunomarquage d'une biopsie fixée au formol et incluse en paraffine, correspondant à un carcinome neuro-endocrine à petites cellules broncho-pulmonaire (image non montrée). Pour E-cadhérine, nous avons utilisé des biopsies mammaires de carcinome lobulaire (contrôle négatif, non montré) et de carcinome canalaire (contrôle positif, non montré). Pour l'immunomarquage HIF-1 alpha qui n'est pas utilisé en pratique courante, nous avons optimisé le choix des conditions de réaction immunohistochimique à l'aide d'une pièce de résection de tumeur cérébrale (glioblastome multiforme) fixée au formol et incluse en paraffine, selon les recommandations du fabricant (Figure 5).



**Figure 4 :** Images représentatives des amas cellulaires A549 immunomarqués pour BiP, CHOP et GADD34 pendant l'optimisation de la réaction immunohistochimique. Les contrôles négatifs (-) n'ont pas été traités, et les contrôles positifs (+) ont été traités pendant 16 heures par de la tunicamycine à une concentration de 2,5 µg/mL. Les coupes ont été incubées avec les anticorps anti-BiP (1 : 200), anti-CHOP (1 : 100) et anti-GADD34 (1 : 100). La détection (coloration brune) s'est faite à l'aide d'une méthode en deux étapes.



**Figure 5** : Images représentatives d'une coupe tissulaire issue d'une pièce de résection cérébrale d'un glioblastome multiforme de grade IV selon la classification internationale (a), immunomarcqué pour HIF-1 alpha pendant l'optimisation de la réaction immunohistochimique. Le tissu cérébral normal adjacent (b) sert de témoin négatif interne. La coupe a été incubée avec l'anticorps anti-HIF-1 alpha (1 : 250). La détection (coloration brune) s'est faite à l'aide d'une méthode en deux étapes.

## **3.2 Caractéristiques de la population de référence et des patients inclus dans l'étude**

### **3.2.1 Caractéristiques de la population de référence**

#### **3.2.1.1 Patients présentant un adénocarcinome colique**

Neuf-cent-seize comptes rendus correspondant à la résection d'un adénocarcinome colique sur la période s'étendant du 01/01/2003 au 01/01/2013 ont été donc identifiés. L'âge moyen des patients à la date du diagnostic était de 70 ans (écart-type = 13) et l'âge médian de 72 ans (distance interquartile = 20) ; 56% (510 individus) étaient des hommes et 44% (406 individus) étaient des femmes.

#### **3.2.1.2 Patients présentant des lésions adénomateuses coliques en dysplasie de haut grade**

En ce qui concerne les comptes rendus de résection de lésion colique adénomateuse en dysplasie de haut grade, 151 cas ont été identifiés sur la même période. L'âge moyen au diagnostic était de 69 ans (écart-type = 12) et l'âge médian de 70 ans (distance interquartile = 17) ; 68% (103 individus) étaient des hommes et 32% (48 individus) étaient des femmes.

### *3.2.2 Caractéristiques des patients inclus dans l'étude*

#### *3.2.2.1 Patients présentant un adénocarcinome colique*

Pour les pièces de résection d'adénocarcinome colique, 68 cas ont été tirés au sort parmi les 916 patients identifiés. Cinq cas ont été secondairement exclus en raison de la présence d'une tumeur d'origine indéterminée (1 cas), de l'absence de bloc tissulaire dans les archives (3 cas) ou d'une erreur de codage ADICAP (en fait, pièce de résection d'une métastase hépatique). Au total, 63 patients avec adénocarcinome ont donc été sélectionnés et inclus dans l'étude. Le tableau 1 résume les caractéristiques d'âge au diagnostic. Ce dernier, tout sexe confondu, était de 69 ans (écart-type = 13) - chiffres identiques chez les hommes comme chez les femmes - et l'âge médian tout sexe confondu, de 70 ans (distance interquartile = 22) - 69 ans chez les hommes et 70 ans chez les femmes - . Cinquante-six pour-cent (35 individus) étaient des hommes et 44% (28 individus) des femmes. Quarante-et-un (65%) individus ne présentaient que des lésions adénocarcinomeuses invasives, sans lésions adénomateuses dysplasiques de bas ou haut grade associées. Dix patients (16%) présentaient à la fois des lésions adénocarcinomeuses invasives, des lésions adénomateuses de bas grade et des lésions adénomateuses de haut grade. Enfin, 9 patients (14%) présentaient des lésions adénocarcinomeuses et des lésions adénomateuses dysplasiques de bas grade, sans haut grade associé, et 3 patients (5%) présentaient des lésions adénocarcinomeuses associées à des lésions adénomateuses en dysplasie de haut grade, sans bas grade associé.

Le tableau 2 résume les marqueurs d'agressivité des lésions invasives incluses, à savoir la présence ou non d'embolie vasculaires tumorales ou d'engainements tumorales péri-nerveux.

Le tableau 3 résume quant à lui le stade des tumeurs incluses, selon la 7<sup>ième</sup> classification pTNM (142). Lorsque l'information concernant l'existence ou non d'une métastase viscérale n'était pas indiquée, il a été considéré qu'il n'y en avait pas (M0). À noter que pour 3 cas, il n'était pas possible de préciser le stade de la lésion car la résection de la tumeur était incomplète en profondeur.

	Age moyen en années (± écart-type) tous sexes confondus	Age moyen en années (± écart-type) chez les hommes	Age moyen en années (± écart-type) chez les femmes
<b>Adénocarcinome colique</b>	69 (± 13)	69 (± 13)	69 (± 13)
<b>Adénome en dysplasie de haut grade</b>	68 (± 14)	74 (± 6)	67 (± 15)

**Tableau 1** : Age moyen en années (± écart-type) des patients étudiés tirés au sort et inclus dans l'étude selon leur sexe et leur population d'origine (patients traités pour résection d'adénocarcinome colique au CHU de Rouen entre le 01/01/2003 et le 01/01/2013 ; patients traités pour résection d'adénome colique en dysplasie de haut grade au CHU de Rouen entre le 01/01/2003 et le 01/01/2013).

Marqueurs d'agressivité tumorale	Présents	Absents	Non précisé	Total
<b>Emboles vasculaires tumoraux</b>	40 (63%)	13 (21%)	10 (16%)	63
<b>Engainements tumoraux péri-nerveux</b>	28 (44%)	13 (21%)	22 (35%)	63

**Tableau 2** : Nombre de lésions (et pourcentage de l'ensemble des tumeurs) présentant / ne présentant pas de marqueurs d'agressivité tumorale (emboles vasculaires tumoraux et engainements tumoraux péri-nerveux) parmi les 63 adénocarcinomes coliques inclus dans l'étude.

Stade selon la classification TNM 2009	Nombre de cas	Pourcentage
<b>0</b>	0	0%
<b>I</b>	13	21%
<b>II</b>	15	23%
<b>III</b>	19	30%
<b>IV</b>	13	21%
<b>Information impossible à préciser</b>	3	5%
<b>Total</b>	63	100%

**Tableau 3** : Répartition des 63 adénocarcinomes coliques inclus dans l'étude en fonction du stade pTNM 2009 (7<sup>ième</sup> édition).

### *3.2.2.2 Patients présentant des lésions adénomateuses coliques en dysplasie de haut grade*

Après numérotation par ordre chronologique, un tirage au sort simple de 18 cas a été effectué parmi la population de patients ayant bénéficié de l'exérèse d'une lésion colique adénomateuse en dysplasie de haut grade entre le 01/01/2003 et le 01/01/2013 (n = 151).

L'âge moyen à la date du diagnostic était de 69 ans (écart-type = 13 ans) et l'âge médian de 71 ans (distance interquartile = 14 ans) ; 78% (14 individus) étaient des hommes et 22% (4 individus) des femmes. Sur ces 18 cas, 13 (72%) présentaient des lésions de dysplasie de bas grade associées, et 3 (17%) une lésion adénocarcinomateuse invasive.

### **3.3 Nature des prélèvements inclus dans les micromatrices tissulaires**

Dans la mesure du possible et en fonction de la quantité de matériel tissulaire disponible, pour chaque patient inclus dans l'étude, 2 fragments d'épithélium colique normal à distance des lésions adénomateuses ou adénocarcinomateuses ont été transférés dans les micromatrices. Pour les territoires adénomateux et adénocarcinomateux, au mieux 3 fragments ont été intégrés dans les micromatrices en essayant d'échantillonner au mieux la lésion en prenant en compte sa superficie (vers la lumière digestive), son centre, et son front d'invasion périphérique pour les lésions invasives.

Cet échantillonnage n'a pas toujours été possible : dans les cas où le matériel tissulaire était peu abondant, l'attitude choisie a été de ne pas mutiler les blocs paraffinés pour permettre une éventuelle relecture diagnostique ou la réalisation d'autres études (pour le bénéfice direct du patient ou à visée de recherche).

Pour les quelques patients inclus dans l'étude pour lesquels le curage ganglionnaire associé à la pièce opératoire présentait une métastase ganglionnaire (3 individus seulement), ces lésions à distance ont été associées dans la matrice, à raison de 2 échantillons par lésion, soit 6 fragments inclus.

Le tableau 4 indique le nombre de fragments tissulaires intégrés dans les micromatrices en fonction de leur nature histologique.

	<b>N</b>	<b>BG</b>	<b>HG</b>	<b>ADK</b>	<b>META</b>	<b>Total</b>
<b>Nombre de fragments inclus</b>	117	86	62	175	6	446

**Tableau 4** : Nombre de fragments tissulaires inclus dans les micromatrices tissulaires en fonction de leur nature histologique. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.

### **3.4 Analyse des micromatrices tissulaires pour les immunomarquages BiP, CHOP, GADD34, Ki67, E-cadhérine et HIF-1 alpha**

Le tableau 5 met en évidence le nombre de fragments étudiés selon leur nature histologique, et ce pour chaque anticorps utilisé.

	<b>N</b>	<b>BG</b>	<b>HG</b>	<b>ADK</b>	<b>META</b>	<b>Total</b>
<b>BiP</b>	87	80	55	155	5	382
<b>CHOP</b>	76	82	53	135	6	352
<b>GADD34</b>	79	81	55	152	5	372
<b>Ki67</b>	83	76	49	142	4	354
<b>E-cadhérine</b>	84	77	50	143	4	358
<b>HIF-1 alpha</b>	81	76	51	146	4	358

**Tableau 5** : Nombre de fragments évalués pour chaque anticorps selon leur nature histologique. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.

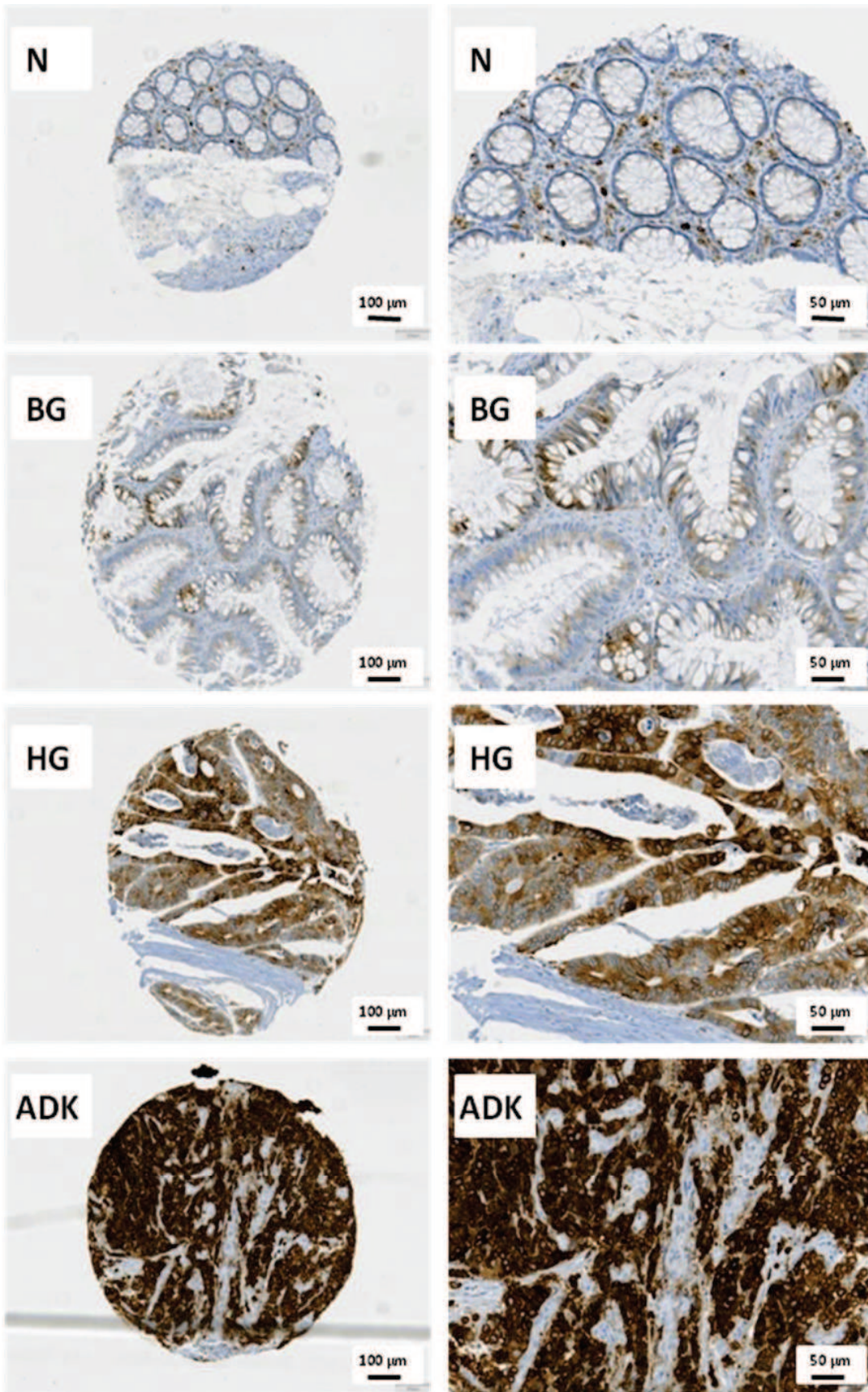
#### **3.4.1 Analyse des micromatrices immunomarquées pour BiP**

Des images représentatives des échantillons inclus dans les micromatrices marqués pour BiP sont compilées dans la figure 6. Comme attendu, le marquage était de localisation cytoplasmique. Le score moyen (avec écart-type) et médian (avec distance interquartile) a été calculé pour chaque type histologique (Tableau 6). Les valeurs ne présentant pas une distribution normale (après vérification graphique), un diagramme à « boîtes et à moustaches » a été construit en plus d'un histogramme (Figure 7). Le marquage de BiP était relativement faible dans l'épithélium colique normal et s'accroissait progressivement au fur et à mesure que les lésions progressaient vers l'adénocarcinome infiltrant, avec dans cette catégorie un score moyen correspondant à environ 5 fois celui de l'épithélium colique normal. La



tendance était continue hormis pour la catégorie « métastase » dans laquelle le score moyen est plus bas que celui de la catégorie « adénome en dysplasie de haut grade ». Ceci peut s'expliquer par une variation due à la chance étant donné le très petit nombre de fragments de métastases étudiées (n = 5).

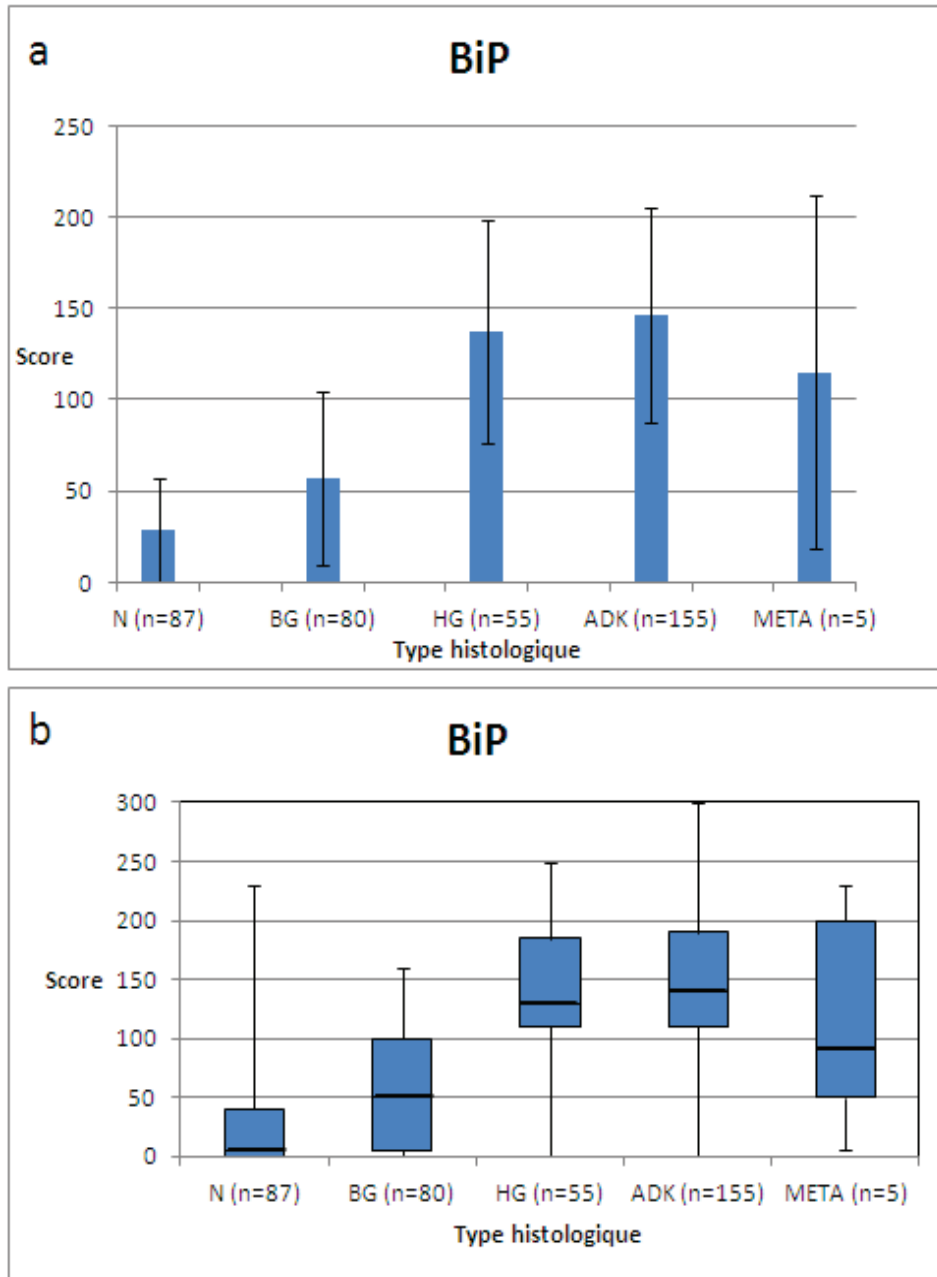
Un modèle linéaire à effets mixtes (146) a ensuite été utilisé pour tester la significativité des résultats obtenus. Les données brutes ont été élevées au carré pour respecter les hypothèses du modèle à savoir des résidus normalement distribués, indépendants, avec une variance constante. Ce modèle n'a pas montré d'association entre l'index d'immunomarquage de BiP et les variables cliniques « âge à la date du diagnostic » et « sexe ». Les index d'immunomarquage étaient significativement différents entre de nombreuses catégories histologiques, et ces résultats sont compilés dans le tableau 7. Le paramètre d' « effet de tendance » était très significatif ( $p < 0,001$ ), indiquant que globalement, le score d'immunomarquage pour BiP augmentait significativement à mesure que l'épithélium colique progressait vers des lésions tumorales malignes primitives ou métastatiques.



**Figure 6**: Images représentatives de fragments après immunomarquage pour BiP. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant.

<b>BiP</b>	<b>N</b>	<b>BG</b>	<b>HG</b>	<b>ADK</b>	<b>META</b>
<b>Score moyen</b> (± écart-type)	28 (± 45)	57 (± 47)	137 (± 61)	146 (± 59)	115 (± 97)
<b>Score médian</b> (± distance inter-quartile)	5 (± 40)	50 (± 95)	130 (± 75)	140 (± 80)	90 (± 150)

**Tableau 6** : Score moyen (± écart-type) et score médian (± distance inter-quartile) des fragments tissulaires inclus dans les micromatrices et immunomarqués pour BiP, selon leur nature histologique. Pour chaque échantillon de tissu, le score était compris entre 0 et 300. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.



**Figure 7** : Quantification du marquage de BiP. L'intensité du marquage et le pourcentage de cellules marquées ont été utilisés pour obtenir, pour chaque fragment, un index d'immunomarquage selon la formule suivante :  $index = Score\ d'immunomarquage = 100 \times [(pourcentage\ de\ cellules\ fortement\ marquées \times 3) + (pourcentage\ de\ cellules\ modérément\ marquées \times 2) + (pourcentage\ de\ cellules\ faiblement\ marquées \times 1)]$ . (a) Les données sont présentées comme moyenne  $\pm$  écart type. (b) Les données sont présentées comme médiane (barre centrale), premier et troisième quartiles (extrémités du rectangle) et valeurs extrêmes (barres de la moustache). N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'adénocarcinome colique primitif.

<b>BiP</b>	<b>N</b>	<b>BG</b>	<b>HG</b>	<b>ADK</b>	<b>META</b>
<b>N</b>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<b>BG</b>			<0,001	<0,001	0,138
<b>HG</b>				0,897	0,154
<b>ADK</b>					0,127
<b>META</b>					

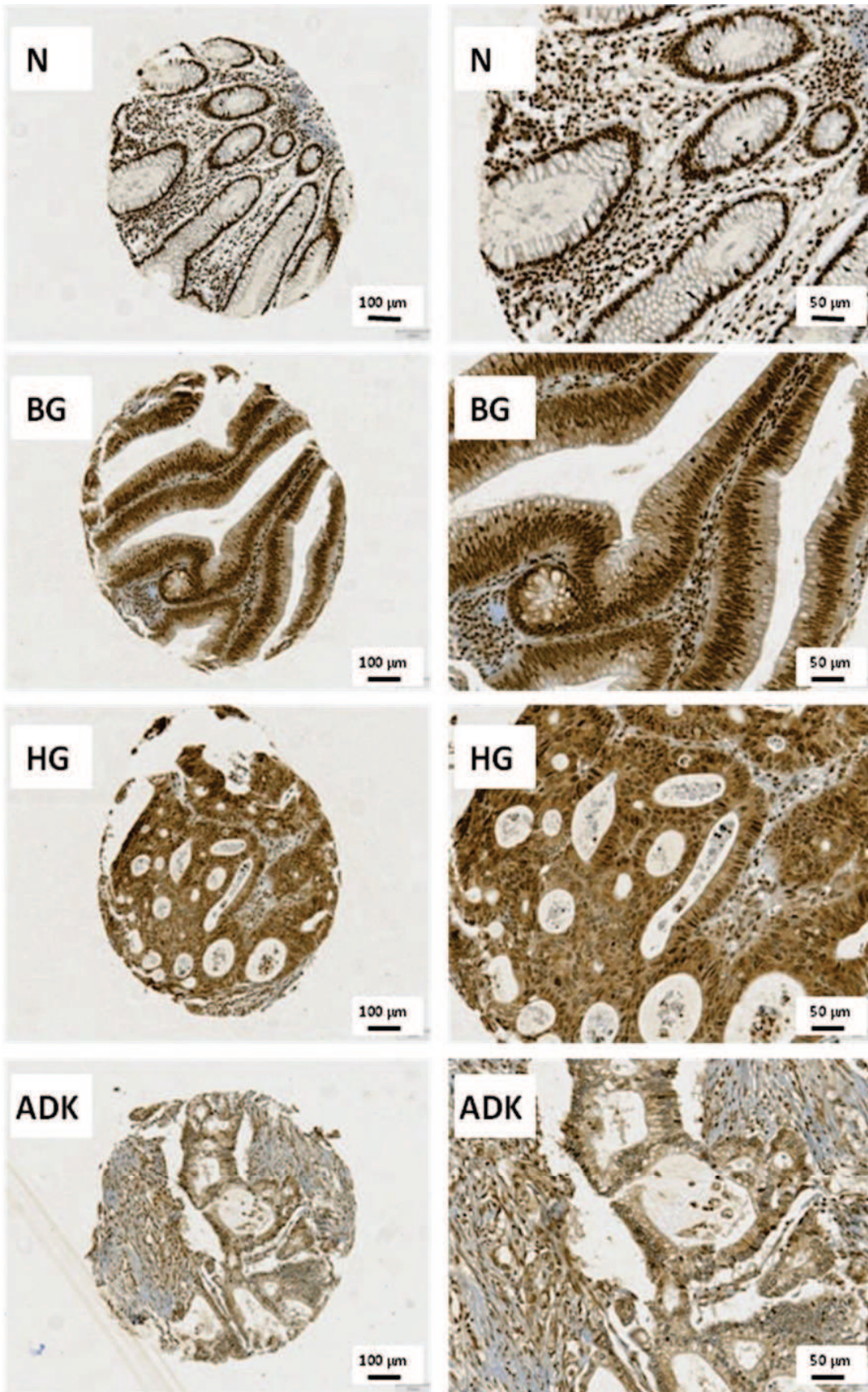
**Tableau 7** : Degré de significativité des différences de score d'immunomarquage pour BiP constatées entre les différentes catégories histologiques. Les valeurs p ont été obtenues en utilisant un modèle linéaire à effets mixtes incluant la nature histologique de l'échantillon, l'âge du patient à la date du diagnostic et son sexe. Chaque entrée représente la valeur p sous l'hypothèse nulle que le score d'immunomarquage pour le type histologique dans une ligne du tableau est égal à au score pour le type histologique dans une colonne. Pour prendre en compte les comparaisons multiples, le seuil de significativité, en utilisant une correction de Bonferroni, a été calculé à  $8 \times 10^{-4}$  (c'est-à-dire  $0,05 / [10 \times 6]$ ). Les cellules rouges indiquent un résultat en deçà de ce seuil, considéré comme significatif. Les données brutes ont été élevées au carré pour être en accord avec les suppositions du modèle (à savoir résidus normalement distribués et indépendants, variance constante). L'analyse des données a été effectuée en utilisant le logiciel R. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.

### 3.4.2 Analyse des micromatrices immunomarquées pour CHOP

Des images représentatives des échantillons inclus dans les micromatrices marqués pour CHOP sont compilées dans la figure 8. Comme attendu, le marquage était de localisation nucléaire. Le score moyen (avec écart-type) et médian (avec distance interquartile) a été calculé pour chaque type histologique (Tableau 8). Les valeurs ne présentant pas une distribution normale (après vérification graphique), un diagramme à boîtes et à moustaches a été construit en plus d'un histogramme (Figure 9). Le marquage de CHOP était relativement fort dans l'épithélium colique normal et diminuait progressivement au fur et à mesure que les lésions progressaient vers l'adénocarcinome infiltrant, avec dans cette catégorie un score moyen environ 2 fois moindre que celui de l'épithélium colique normal. La tendance n'était cependant pas continue : le score moyen de la catégorie « adénome en dysplasie de bas grade » était très faiblement inférieur à celui de la catégorie « adénome en dysplasie de haut grade ». De même, le score moyen dans la catégorie « métastase » était légèrement supérieur à celui de la catégorie « adénocarcinome ».

Les hypothèses du modèle linéaire à effet mixte en utilisant les données brutes étaient vérifiées, et aucune modification n'était alors requise. Ce modèle n'a pas montré d'association entre l'index d'immunomarquage de CHOP et les variables cliniques « âge à la date du diagnostic » et « sexe ». Les index d'immunomarquage étaient significativement différents entre de nombreuses catégories histologiques, et ces résultats sont compilés dans le tableau 9. Le paramètre d'« effet de tendance » était très significatif ( $p < 0,001$ ), indiquant que globalement, le score d'immunomarquage pour CHOP diminuait significativement à mesure que l'épithélium colique progressait vers des lésions tumorales malignes primitives ou métastatiques.



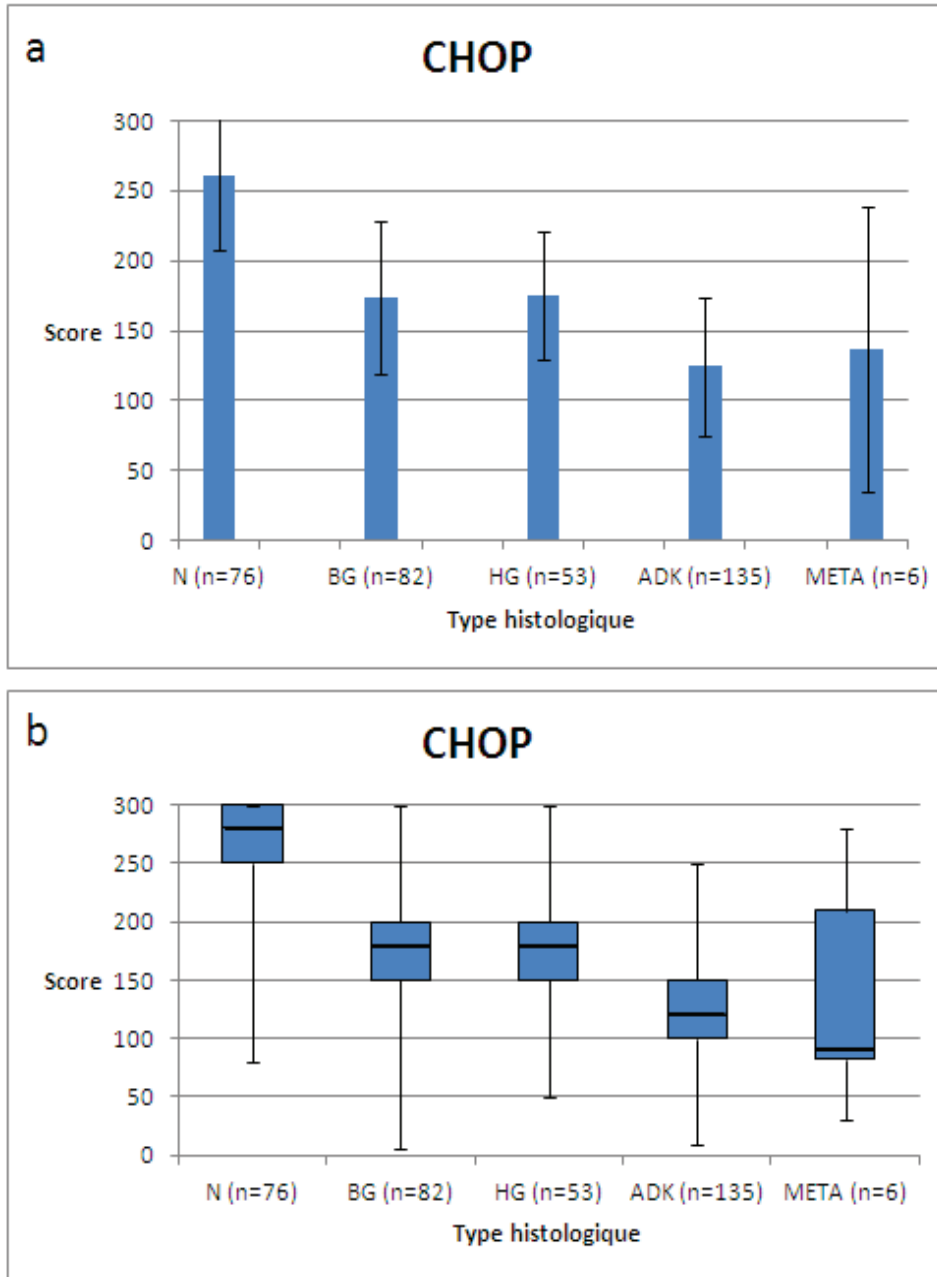


**Figure 8:** Images représentatives de fragments après immunomarquage pour CHOP. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant.

<b>CHOP</b>	<b>N</b>	<b>BG</b>	<b>HG</b>	<b>ADK</b>	<b>META</b>
<b>Score moyen</b> (± écart-type)	260 (± 52)	173 (± 54)	175 (± 46)	124 (± 49)	137 (± 102)
<b>Score médian</b> (± distance inter-quartile)	280 (± 50)	180 (± 50)	180 (± 50)	120 (± 50)	90 (± 128)

**Tableau 8** : Score moyen (± écart-type) et score médian (± distance inter-quartile) des fragments tissulaires inclus dans les micromatrices et immunomarqués pour CHOP, selon leur nature histologique. Pour chaque échantillon de tissu, le score était compris entre 0 et 300. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.





**Figure 9 :** Quantification du marquage de CHOP. L'intensité du marquage et le pourcentage de cellules marquées ont été utilisés pour obtenir, pour chaque fragment, un index d'immunomarquage selon la formule suivante :  $index = Score\ d'immunomarquage = 100 \times [(pourcentage\ de\ cellules\ fortement\ marquées \times 3) + (pourcentage\ de\ cellules\ modérément\ marquées \times 2) + (pourcentage\ de\ cellules\ faiblement\ marquées \times 1)]$ . (a) Les données sont présentées comme moyenne  $\pm$  écart type. (b) Les données sont présentées comme médiane (barre centrale), premier et troisième quartiles (extrémités du rectangle) et valeurs extrêmes (barres de la moustache). N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'adénocarcinome colique primitif.

<b>CHOP</b>	<b>N</b>	<b>BG</b>	<b>HG</b>	<b>ADK</b>	<b>META</b>
<b>N</b>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<b>BG</b>			0,525	<0,001	0,020
<b>HG</b>				<0,001	0,039
<b>ADK</b>					0,910
<b>META</b>					

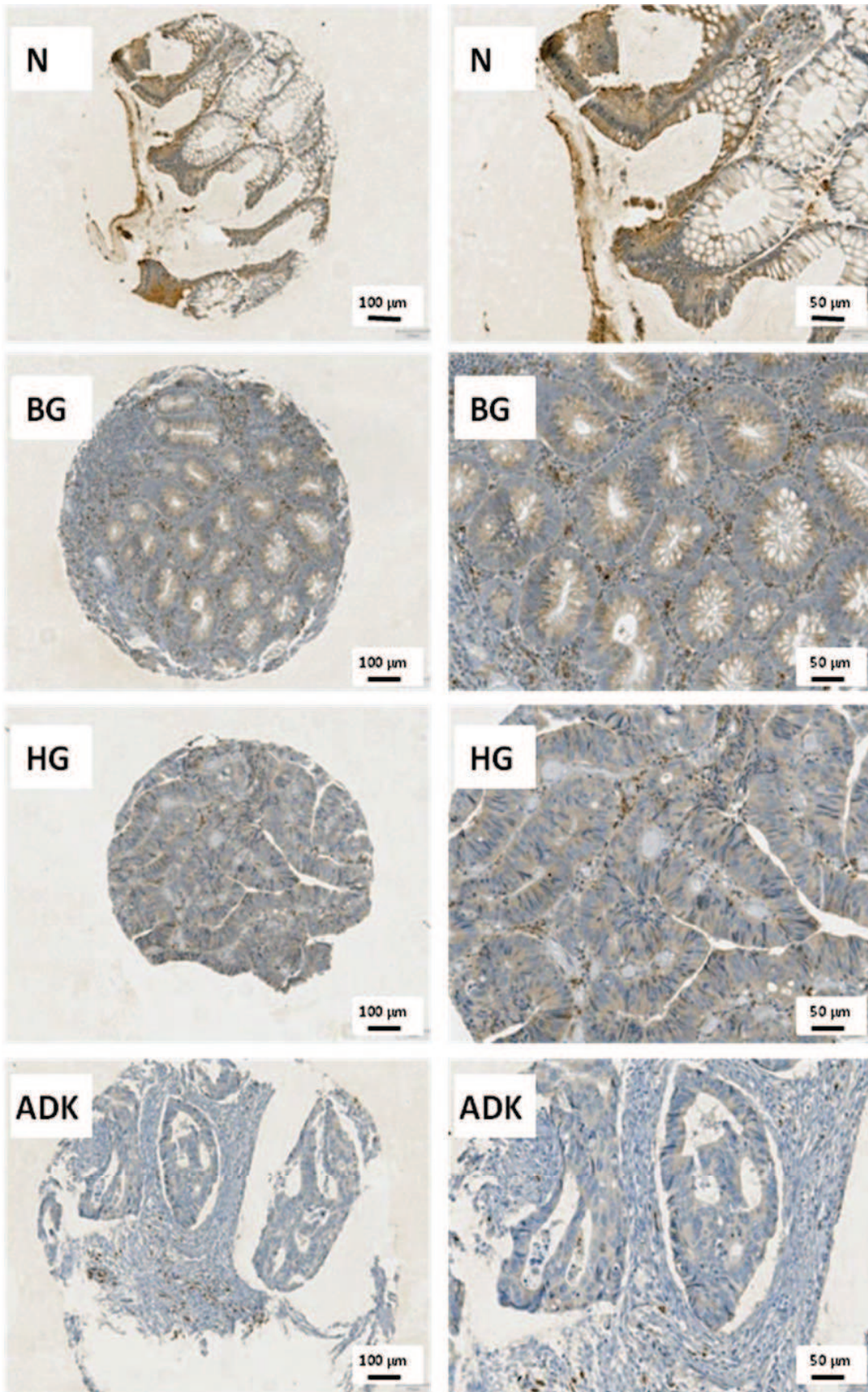
**Tableau 9** : Degré de significativité des différences de score d'immunomarquage pour CHOP constatées entre les différentes catégories histologiques. Les valeurs p ont été obtenues en utilisant un modèle linéaire à effets mixtes incluant la nature histologique de l'échantillon, l'âge du patient à la date du diagnostic et son sexe. Chaque entrée représente la valeur p sous l'hypothèse nulle que le score d'immunomarquage pour le type histologique dans une ligne du tableau est égal à au score pour le type histologique dans une colonne. Pour prendre en compte les comparaisons multiples, le seuil de significativité, en utilisant une correction de Bonferroni, a été calculé à  $8 \times 10^{-4}$  (c'est-à-dire  $0,05 / [10 \times 6]$ ). Les cellules rouges indiquent un résultat en deçà de ce seuil, considéré comme significatif. L'analyse des données a été effectuée en utilisant le logiciel R. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.

### 3.4.3 Analyse des micromatrices immunomarquées pour GADD34

Des images représentatives des échantillons inclus dans les micromatrices marquées pour GADD34 sont compilées dans la figure 10. Le marquage était de localisation cytoplasmique et apparaissait très homogène au sein des cellules épithéliales. Le score moyen (avec écart-type) et médian (avec distance interquartile) a été calculé pour chaque type histologique (Tableau 10). Les valeurs ne présentant pas une distribution normale (après vérification graphique), un diagramme à boîtes et à moustaches a été construit en plus d'un histogramme (Figure 11). Le marquage de GADD34 était relativement fort dans l'épithélium colique normal et tendait à décroître à mesure que les lésions progressaient vers l'adénocarcinome infiltrant, avec dans cette catégorie un score moyen environ 1,3 fois moindre que celui de l'épithélium colique normal. La tendance n'était cependant pas continue : le score moyen de la catégorie « adénome en dysplasie de bas grade » était légèrement inférieur à celui de la catégorie « adénome en dysplasie de haut grade », et surtout, le score moyen dans la catégorie « adénome en dysplasie de haut grade » était légèrement supérieur à celui de la catégorie « épithélium colique normal ».

Les hypothèses du modèle linéaire à effet mixte en utilisant les données brutes étaient vérifiées, et aucune modification n'était alors requise. Ce modèle n'a pas montré d'association entre l'index d'immunomarquage de GADD34 et les variables cliniques « âge à la date du diagnostic » et « sexe ». Les index d'immunomarquage étaient significativement différents entre quelques catégories histologiques, et ces résultats sont compilés dans le tableau 11. Il est important de noter que la différence entre les catégories « adénome en dysplasie de bas grade » et « adénome en dysplasie de haut grade » n'était pas significative dans le modèle linéaire à effet mixte ( $p = 0,067$ ), tout comme la différence entre les catégories « épithélium colique normal » et « adénome en dysplasie de haut grade » ( $p = 0,256$ ).

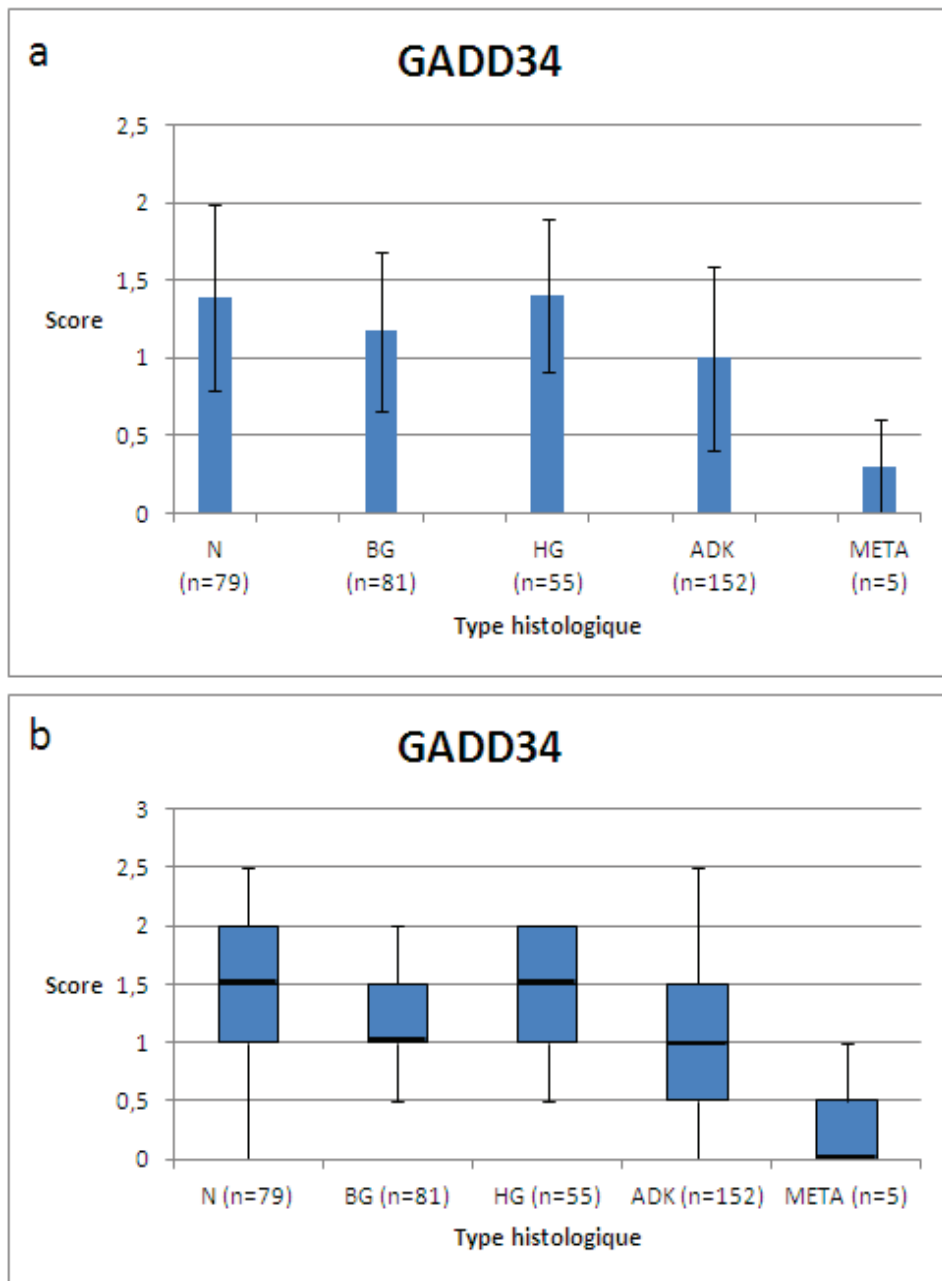
Le paramètre d' « effet de tendance » était très significatif ( $p < 0,001$ ), indiquant que globalement, le score d'immunomarquage pour GADD34 diminuait significativement à mesure que l'épithélium colique progressait vers des lésions tumorales malignes primitives ou métastatiques.



**Figure 10** : Images représentatives de fragments après immunomarquage pour GADD34. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant.

<b>GADD34</b>	<b>N</b>	<b>BG</b>	<b>HG</b>	<b>ADK</b>	<b>META</b>
<b>Score moyen</b> (± écart-type)	1,39 (± 0,6)	1,17 (± 0,5)	1,41 (± 0,5)	1 (± 0,6)	0,3 (± 0,45)
<b>Score médian</b> (± distance inter-quartile)	1,5 (± 1)	1 (± 0,5)	1,5 (± 1)	1 (± 1)	0 (± 0,5)

**Tableau 10** : Score moyen (± écart-type) et score médian (± distance inter-quartile) des fragments tissulaires inclus dans les micromatrices et immunomarqués pour GADD34, selon leur nature histologique. Pour chaque échantillon de tissu, le score était compris entre 0 et 3. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.



**Figure 11** : Quantification du marquage de GADD34. L'intensité du marquage a été utilisée pour obtenir, pour chaque fragment, un index d'immunomarquage compris entre 0 et 3 (scores possibles : 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3). (a) Les données sont présentées comme moyenne  $\pm$  écart type. (b) Les données sont présentées comme médiane (barre centrale), premier et troisième quartiles (extrémités du rectangle) et valeurs extrêmes (barres de la moustache). N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'adénocarcinome colique primitif.

<b>GADD34</b>	<b>N</b>	<b>BG</b>	<b>HG</b>	<b>ADK</b>	<b>META</b>
<b>N</b>		0,002	0,265	<0,001	<0,001
<b>BG</b>			0,067	0,056	0,007
<b>HG</b>				<0,001	0,001
<b>ADK</b>					0,029
<b>META</b>					

**Tableau 11** : Degré de significativité des différences de score d'immunomarquage pour GADD34 constatées entre les différentes catégories histologiques. Les valeurs p ont été obtenues en utilisant un modèle linéaire à effets mixtes incluant la nature histologique de l'échantillon, l'âge du patient à la date du diagnostic et son sexe. Chaque entrée représente la valeur p sous l'hypothèse nulle que le score d'immunomarquage pour le type histologique dans une ligne du tableau est égal à au score pour le type histologique dans une colonne. Pour prendre en compte les comparaisons multiples, le seuil de significativité, en utilisant une correction de Bonferroni, a été calculé à  $8 \times 10^{-4}$  (c'est-à-dire  $0,05 / [10 \times 6]$ ). Les cellules rouges indiquent un résultat en deçà de ce seuil, considéré comme significatif. L'analyse des données a été effectuée en utilisant le logiciel R. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.



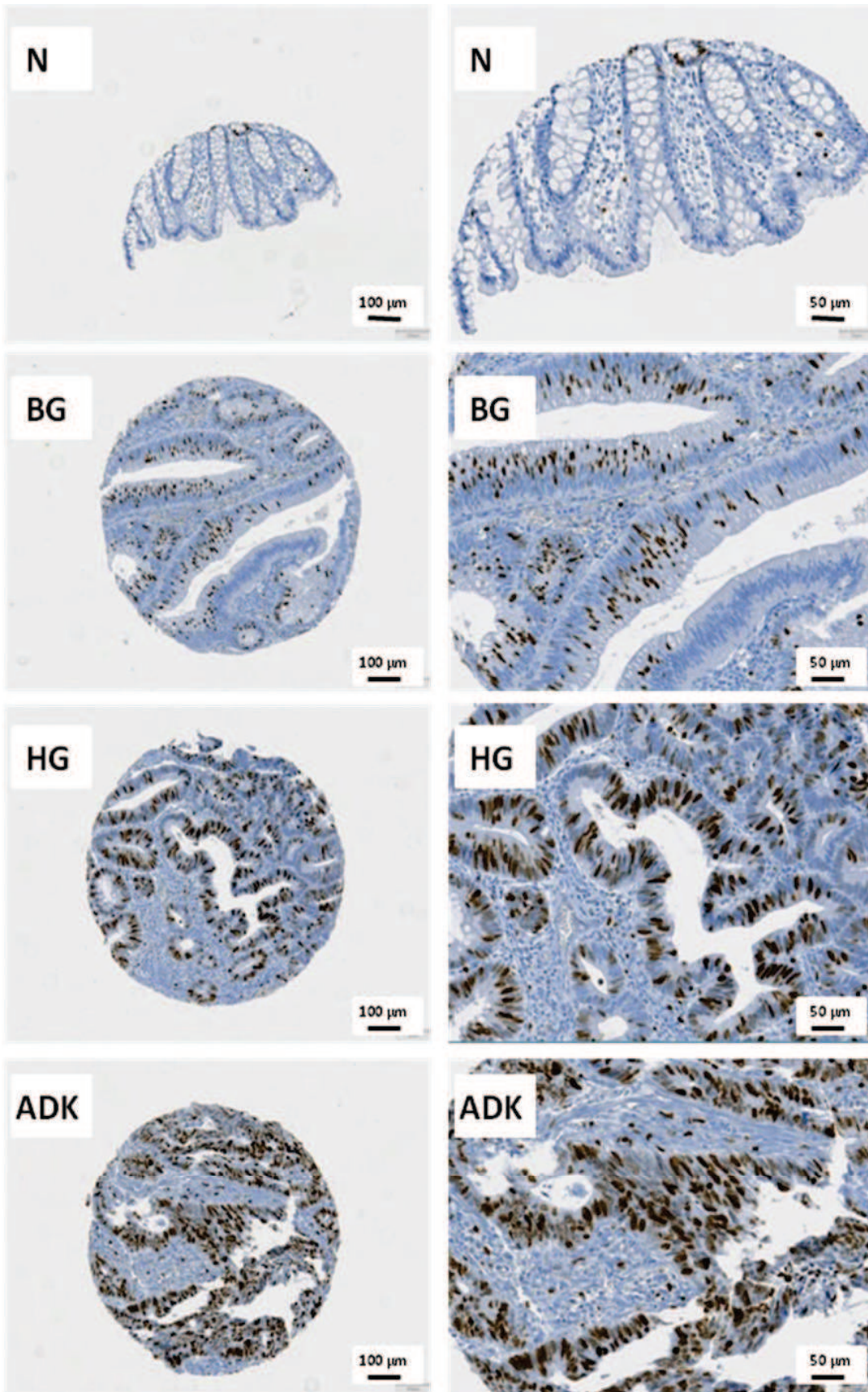
#### 3.4.4 Analyse des micromatrices immunomarquées pour Ki67

Des images représentatives des échantillons inclus dans les micromatrices marqués pour Ki67 sont compilées dans la figure 12. Le marquage était de localisation nucléaire. Le score moyen (avec écart-type) et médian (avec distance interquartile) a été calculé pour chaque type histologique (Tableau 12). Les valeurs ne présentant pas une distribution normale (après vérification graphique), un diagramme à boîtes et à moustaches a été construit en plus d'un histogramme (Figure 13). Le pourcentage de cellules épithéliales marquée pour Ki67 était relativement faible dans l'épithélium colique normal et augmentait au fur et à mesure que les lésions progressaient vers l'adénocarcinome infiltrant, avec dans cette catégorie un score moyen environ 3,5 fois plus élevé que celui de l'épithélium colique normal. Néanmoins, dans la catégorie « métastase ganglionnaire », le pourcentage de cellules épithéliales tumorales était plus faible que dans la catégorie « adénome en dysplasie de haut grade » et « adénocarcinome ».

Les hypothèses du modèle linéaire à effet mixte en utilisant les données brutes étaient vérifiées, et aucune modification n'était alors requise. La variable clinique « âge à la date du diagnostic » était significativement associée avec le pourcentage de cellules marquées, mais de façon marginale ( $p = 0,035$ ). En revanche, il n'existait pas d'association avec le sexe des patients. Les index d'immunomarquage étaient significativement différents entre de d'assez nombreuses catégories histologiques, et ces résultats sont compilés dans le tableau 13. Il est à de noter que la différence entre les catégories « adénocarcinome » et « adénome en dysplasie de haut grade » n'était pas significative dans le modèle linéaire à effet mixte ( $p = 0,0963$ ), tout comme la différence entre la catégorie « métastase » et la plupart des autres catégories histologiques.

Le paramètre d' « effet de tendance » était très significatif ( $p < 0,001$ ), indiquant que globalement, le pourcentage de cellules marquées par le Ki67 s'accroissait significativement à mesure que l'épithélium colique progressait vers des lésions tumorales malignes primitives ou métastatiques.

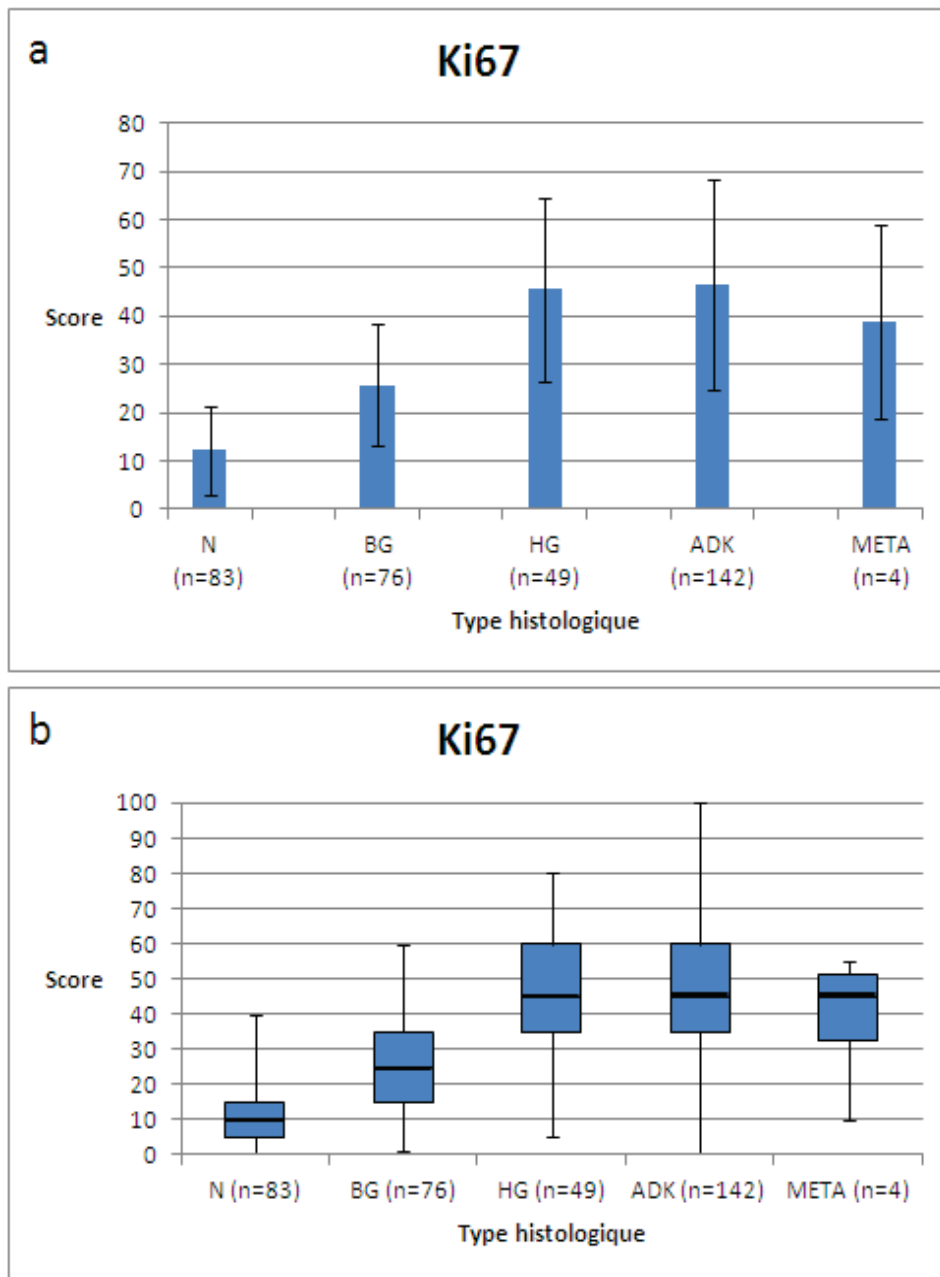




**Figure 12** : Images représentatives de fragments après immunomarquage pour Ki67. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant.

<b>Ki67</b>	<b>N</b>	<b>BG</b>	<b>HG</b>	<b>ADK</b>	<b>META</b>
<b>Score moyen</b> (± écart-type)	12 (± 9)	26 (± 13)	46 (± 19)	47 (± 22)	39 (± 20)
<b>Score médian</b> (± distance inter-quartile)	10 (± 10)	25 (± 20)	45 (± 25)	45 (± 25)	45 (± 18,75)

**Tableau 12** : Score moyen (± écart-type) et score médian (± distance inter-quartile) des fragments tissulaires inclus dans les micromatrices et immunomarqués pour Ki67, selon leur nature histologique. Pour chaque échantillon de tissu, le score était compris entre 0 et 100. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.



**Figure 13** : Quantification du marquage de Ki67. Le pourcentage de cellules épithéliales marquées a été utilisé pour obtenir, pour chaque fragment, un index d'immunomarquage compris entre 0 et 100. (a) Les données sont présentées comme moyenne  $\pm$  écart type. (b) Les données sont présentées comme médiane (barre centrale), premier et troisième quartiles (extrémités du rectangle) et valeurs extrêmes (barres de la moustache). N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'adénocarcinome colique primitif.

<b>Ki67</b>	<b>N</b>	<b>BG</b>	<b>HG</b>	<b>ADK</b>	<b>META</b>
<b>N</b>		<0,001	<0,001	<0,001	0,022
<b>BG</b>			<0,001	<0,001	0,533
<b>HG</b>				0,963	0,136
<b>ADK</b>					0,119
<b>META</b>					

**Tableau 13 :** Degré de significativité des différences de score d'immunomarquage pour Ki67 constatées entre les différentes catégories histologiques. Les valeurs p ont été obtenues en utilisant un modèle linéaire à effets mixtes incluant la nature histologique de l'échantillon, l'âge du patient à la date du diagnostic et son sexe. Chaque entrée représente la valeur p sous l'hypothèse nulle que le score d'immunomarquage pour le type histologique dans une ligne du tableau est égal à au score pour le type histologique dans une colonne. Pour prendre en compte les comparaisons multiples, le seuil de significativité, en utilisant une correction de Bonferroni, a été calculé à  $8 \times 10^{-4}$  (c'est-à-dire  $0,05 / [10 \times 6]$ ). Les cellules rouges indiquent un résultat en deçà de ce seuil, considéré comme significatif. L'analyse des données a été effectuée en utilisant le logiciel R. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.

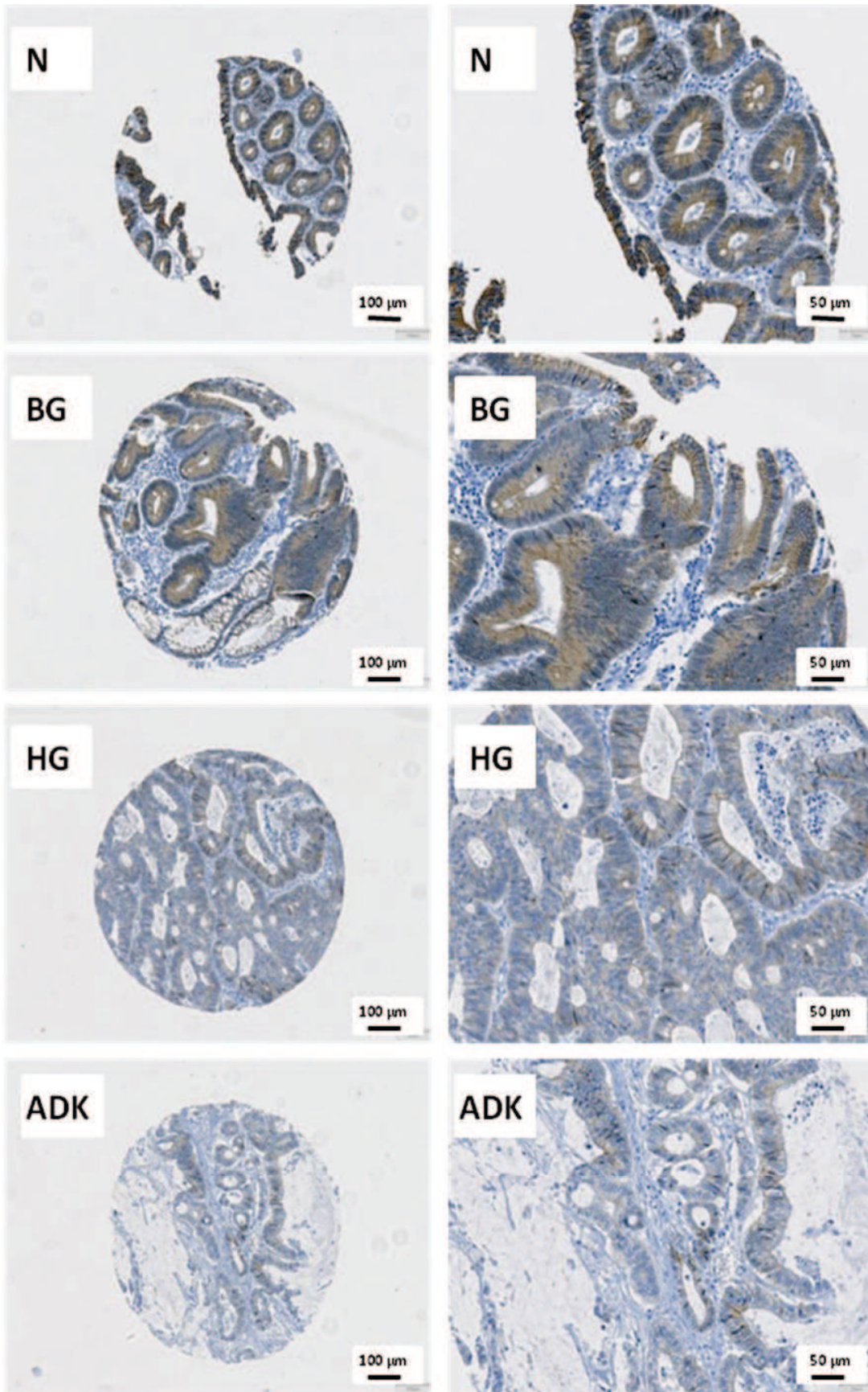
### 3.4.5 Analyse des micromatrices immunomarquées pour E-cadhérine

Des images représentatives des échantillons inclus dans les micromatrices marqués pour E-cadhérine sont compilées dans la figure 14. Le marquage pris en considération était membranaire cytoplasmique. Le score moyen (avec écart-type) et médian (avec distance interquartile) a été calculé pour chaque type histologique (Tableau 14). Les valeurs ne présentant pas une distribution normale (après vérification graphique), un diagramme à boîtes et à moustaches a été construit en plus d'un histogramme (Figure 15).

Les hypothèses du modèle linéaire à effet mixte en utilisant les données brutes étaient vérifiées, et aucune modification n'était alors requise. Ce modèle n'a pas montré d'association entre l'index d'immunomarquage de l'E-cadhérine et les variables cliniques « âge à la date du diagnostic » et « sexe ». Les index d'immunomarquage étaient significativement différents entre quelques catégories histologiques à savoir entre « épithélium colique normal » et « adénome en dysplasie de bas grade », de même qu'entre « épithélium colique normal » et « adénocarcinome » (Tableau 15). Il est à noter que la différence entre les catégories « adénocarcinome » et « adénome en dysplasie de haut grade » n'était pas significative dans le modèle linéaire à effet mixte ( $p = 0,0963$ ), tout comme la différence entre la catégorie « métastase » et la plupart des autres catégories histologiques.

Le paramètre d' « effet de tendance » était très significatif ( $p < 0,001$ ), indiquant que globalement, le score d'immunomarquage par l'E-cadhérine diminuait significativement à mesure que l'épithélium colique progressait vers des lésions tumorales malignes primitives ou métastatiques.

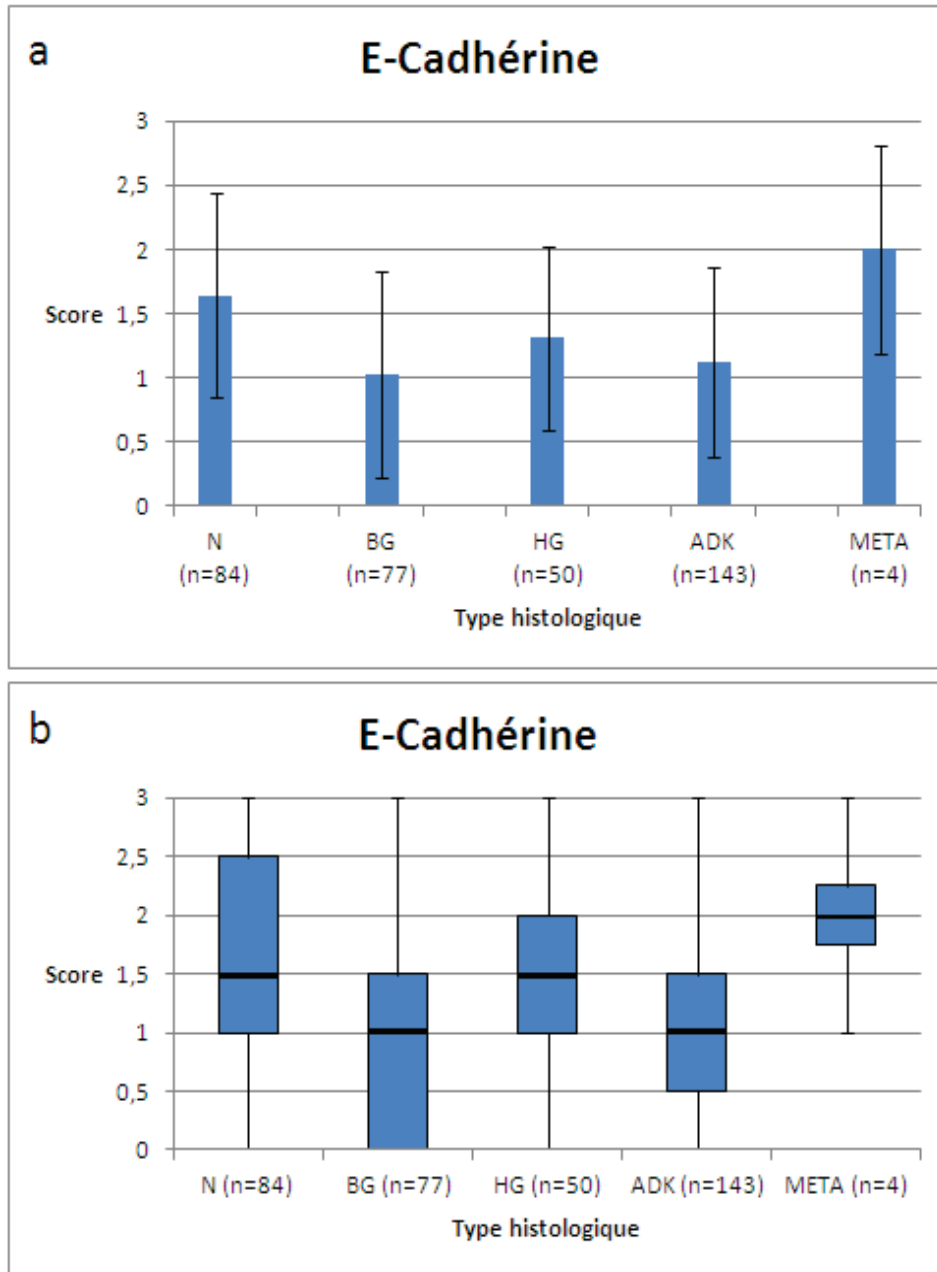




**Figure 14** : Images représentatives de fragments après immunomarquage pour E-cadhérine. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant.

<b>E-cadhérine</b>	<b>N</b>	<b>BG</b>	<b>HG</b>	<b>ADK</b>	<b>META</b>
<b>Score moyen</b> (± écart-type)	1,64 (± 0,79)	1,03 (± 0,80)	1,31 (± 0,71)	1,13 (± 0,74)	2 (± 0,82)
<b>Score médian</b> (± distance inter-quartile)	1,5 (± 1,5)	1 (± 1,5)	1,5 (± 1)	1 (± 1)	2 (± 0,5)

**Tableau 14** : Score moyen (± écart-type) et score médian (± distance inter-quartile) des fragments tissulaires inclus dans les micromatrices et immunomarqués pour E-cadhérine, selon leur nature histologique. Pour chaque échantillon de tissu, le score était compris entre 0 et 3. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.



**Figure 15:** Quantification du marquage d'E-cadhérine. L'intensité du marquage a été utilisé pour obtenir, pour chaque fragment, un index d'immunomarquage compris entre 0 et 3 (scores possibles : 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3). (a) Les données sont présentées comme moyenne  $\pm$  écart type. (b) Les données sont présentées comme médiane (barre centrale), premier et troisième quartiles (extrémités du rectangle) et valeurs extrêmes (barres de la moustache). N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'adénocarcinome colique primitif.



<u>E-cadhérine</u>	N	BG	HG	ADK	META
N		<0,001	0,027	<0,001	0,400
BG			0,008	0,532	0,015
HG				0,038	0,120
ADK					0,022
META					

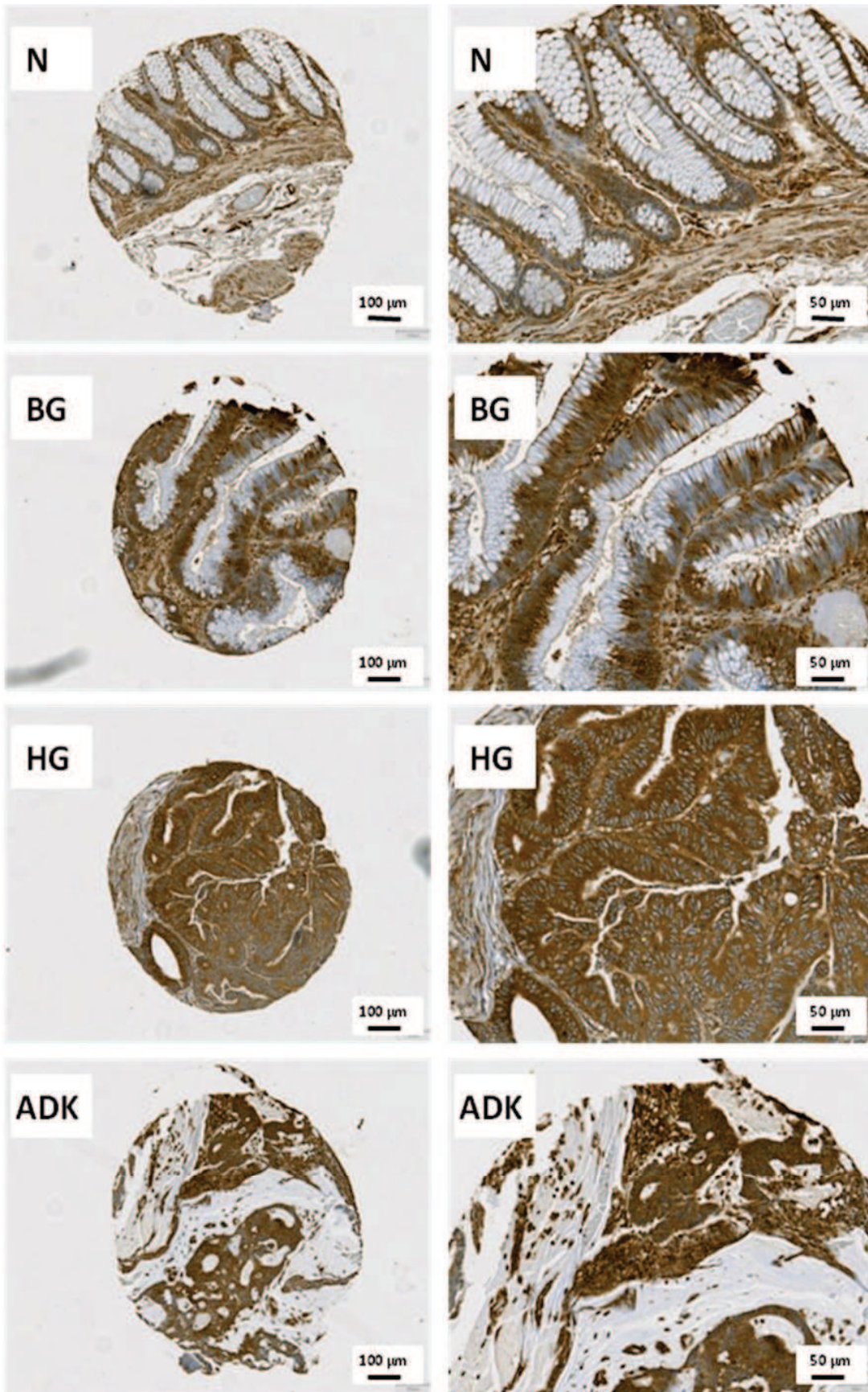
**Tableau 15** : Degré de significativité des différences de score d'immunomarquage pour E-cadhérine constatées entre les différentes catégories histologiques. Les valeurs p ont été obtenues en utilisant un modèle linéaire à effets mixtes incluant la nature histologique de l'échantillon, l'âge du patient à la date du diagnostic et son sexe. Chaque entrée représente la valeur p sous l'hypothèse nulle que le score d'immunomarquage pour le type histologique dans une ligne du tableau est égal à au score pour le type histologique dans une colonne. Pour prendre en compte les comparaisons multiples, le seuil de significativité, en utilisant une correction de Bonferroni, a été calculé à  $8 \times 10^{-4}$  (c'est-à-dire  $0,05 / [10 \times 6]$ ). Les cellules rouges indiquent un résultat en deçà de ce seuil, considéré comme significatif. L'analyse des données a été effectuée en utilisant le logiciel R. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.

#### 3.4.6 Analyse des micromatrices immunomarquées pour HIF-1 alpha

Des images représentatives des échantillons inclus dans les micromatrices marqués pour HIF-1 alpha sont compilées dans la figure 16. Le marquage était diffus, relativement homogène, cytoplasmique et nucléaire, et ces deux compartiments cellulaires ont été pris en compte dans l'estimation des scores. Le score moyen (avec écart-type) et médian (avec distance interquartile) a été calculé pour chaque type histologique (Tableau 16). Les valeurs ne présentant pas une distribution normale (après vérification graphique), un diagramme à boîtes et à moustaches a été construit en plus d'un histogramme (Figure 17).

Les hypothèses du modèle linéaire à effet mixte en utilisant les données brutes étaient vérifiées, et aucune modification n'était alors requise. Ce modèle n'a pas montré d'association entre l'index d'immunomarquage de l'HIF-1 alpha et les variables cliniques « âge à la date du diagnostic » et « sexe ». Les index d'immunomarquage étaient significativement différents entre quelques catégories histologiques à savoir entre « épithélium colique normal » et « adénome en dysplasie de haut grade », de même qu'entre « épithélium colique normal » et « adénocarcinome » (Tableau 17).

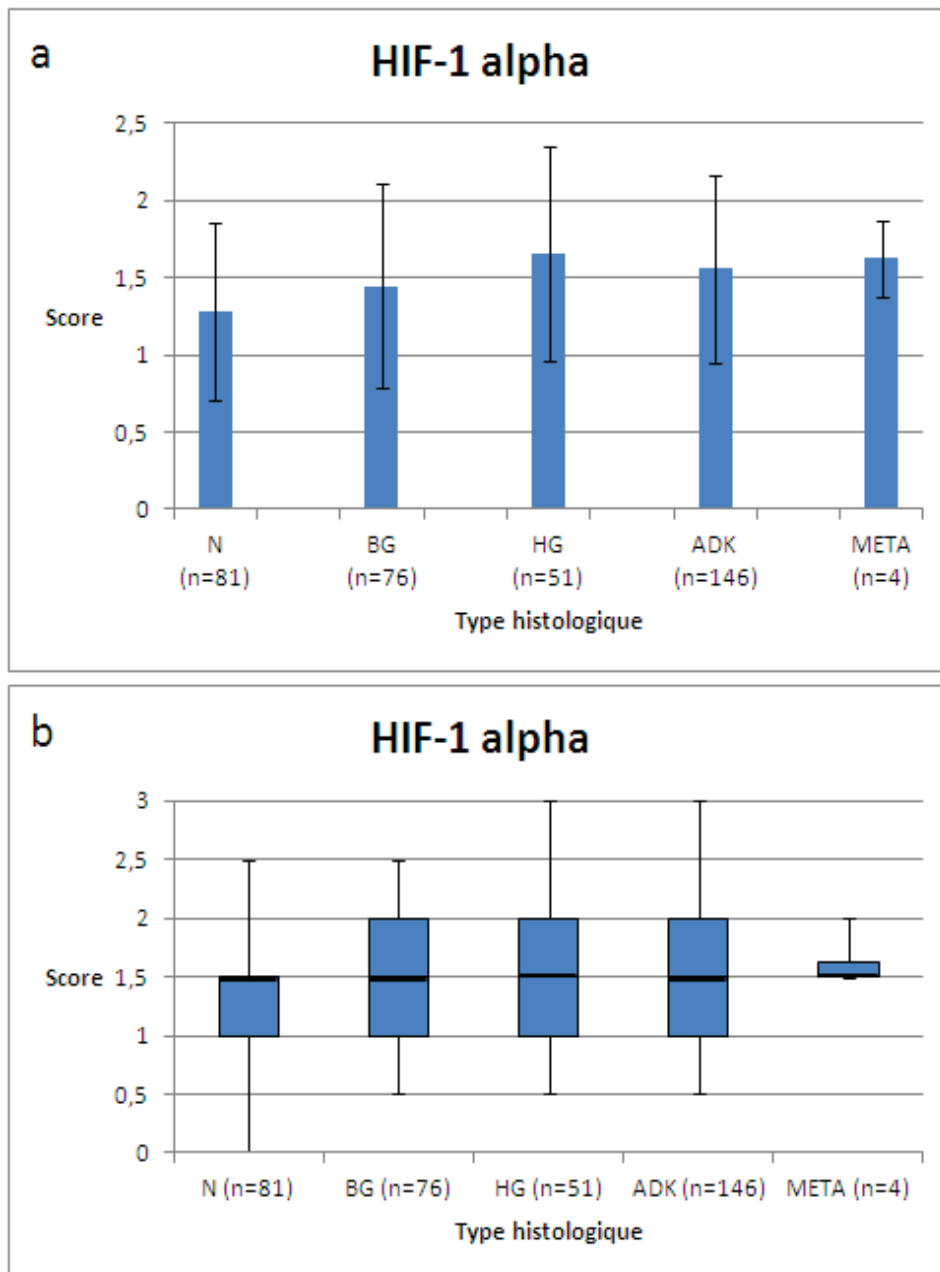
Le paramètre d' « effet de tendance » était très significatif ( $p < 0,001$ ), indiquant que globalement, le score d'immunomarquage par l'HIF-1 alpha augmentait significativement à mesure que l'épithélium colique progressait vers des lésions tumorales malignes primitives ou métastatiques.



**Figure 16**: Images représentatives de fragments après immunomarquage pour HIF-1 alpha. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant.

<b>HIF-1 alpha</b>	<b>N</b>	<b>BG</b>	<b>HG</b>	<b>ADK</b>	<b>META</b>
<b>Score moyen</b> (± écart-type)	1,28 (± 0,58)	1,45 (± 0,67)	1,66 (± 0,70)	1,56 (± 0,61)	1,63 (± 0,25)
<b>Score médian</b> (± distance inter-quartile)	1,5 (± 0,5)	1,5 (± 1)	1,5 (± 1)	1,5 (± 1)	1,5 (± 0,125)

**Tableau 16** : Score moyen (± écart-type) et score médian (± distance inter-quartile) des fragments tissulaires inclus dans les micromatrices et immunomarqués pour HIF-1 alpha, selon leur nature histologique. Pour chaque échantillon de tissu, le score était compris entre 0 et 3. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.



**Figure 17:** Quantification du marquage de HIF-1 alpha. L'intensité du marquage a été utilisé pour obtenir, pour chaque fragment, un index d'immunomarquage compris entre 0 et 3 (scores possibles : 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3). (a) Les données sont présentées comme moyenne  $\pm$  écart type. (b) Les données sont présentées comme médiane (barre centrale), premier et troisième quartiles (extrémités du rectangle) et valeurs extrêmes (barres de la moustache). N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'adénocarcinome colique primitif.

<b>HIF-1 alpha</b>	<b>N</b>	<b>BG</b>	<b>HG</b>	<b>ADK</b>	<b>META</b>
<b>N</b>		0,032	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,061
<b>BG</b>			0,014	0,335	0,223
<b>HG</b>				0,104	0,672
<b>ADK</b>					0,333
<b>META</b>					

**Tableau 17** : Degré de significativité des différences de score d'immunomarquage pour HIF-1 alpha constatées entre les différentes catégories histologiques. Les valeurs p ont été obtenues en utilisant un modèle linéaire à effets mixtes incluant la nature histologique de l'échantillon, l'âge du patient à la date du diagnostic et son sexe. Chaque entrée représente la valeur p sous l'hypothèse nulle que le score d'immunomarquage pour le type histologique dans une ligne du tableau est égal à au score pour le type histologique dans une colonne. Pour prendre en compte les comparaisons multiples, le seuil de significativité, en utilisant une correction de Bonferroni, a été calculé à  $8 \times 10^{-4}$  (c'est-à-dire  $0,05 / [10 \times 6]$ ). Les cellules rouges indiquent un résultat en deçà de ce seuil, considéré comme significatif. L'analyse des données a été effectuée en utilisant le logiciel R. N = épithélium colique normal ; BG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de bas grade ; HG = lésion adénomateuse colique en dysplasie de haut grade ; ADK = adénocarcinome colique infiltrant ; META = métastase ganglionnaire d'un adénocarcinome colique.

### ***3.5 Études de corrélation par paires d'anticorps entre les différents scores obtenus pour chaque fragment étudié***

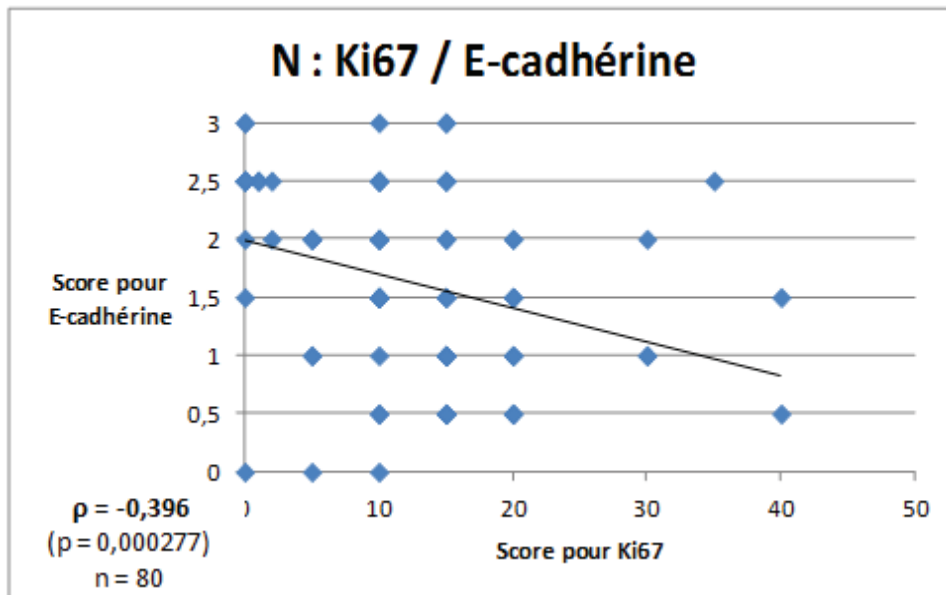
Dans le but d'explorer d'éventuelles associations entre les niveaux d'expression des protéines étudiées, nous avons utilisé le coefficient de corrélation de Spearman (test non-paramétrique). Le coefficient de corrélation de Pearson n'était pas ici indiqué car après vérification graphique, les données obtenues ne suivaient pas une distribution normale (148). Les résultats sont présentés ci-après selon les catégories histologiques prises en considération. Pour les coefficients de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) ayant une valeur p inférieure à 0,000397, nous avons précisé le nombre de paires incluses dans l'analyse et le graphique de nuage de points est représenté sous le tableau.



### 3.5.1 Études de corrélation dans la catégorie histologique « épithélium colique normal »

	BiP	CHOP	GADD34	Ki67	E-cadhérine	HIF-1 alpha
BiP						
CHOP	-0,0439 p = 0,710117					
GADD34	0,2352 p = 0,039457	0,1287 p = 0,288345				
Ki67	0,3384 p = 0,003646	0,1689 p = 0,182020	0,1298 p = 0,299065			
E-cadhérine	0,0681 p = 0,567165	0,1452 p = 0,252136	0,2678 p = 0,028477	<b>-0,396</b> <b>p = 0,000277</b> <b>n = 80</b>		
HIF-1 alpha	0,2098 p = 0,081357	-0,1642 p = 0,198587	0,2195 p = 0,081429	-0,3478 p = 0,001806	0,1489 p = 0,190416	

**Tableau 18** : Coefficients de corrélation de Spearman obtenus pour chaque paire d'anticorps en prenant en compte les scores d'immunomarquage pour chaque échantillon d'épithélium colique normal inclus dans les micromatrices. N'ont été pris en compte dans le calcul du coefficient de corrélation uniquement les fragments ayant les 2 immunomarquages de la paire analysables. Pour chaque coefficient, le degré de significativité (p) est indiqué. La cellule colorée indique un coefficient de corrélation ayant un degré de significativité inférieur au risque alpha estimé après correction de Bonferroni, calculé à 0,000397 ; la couleur rouge indique que ce coefficient est négatif. Pour ce dernier, le nombre de fragments (n) inclus dans le calcul du coefficient est indiqué.

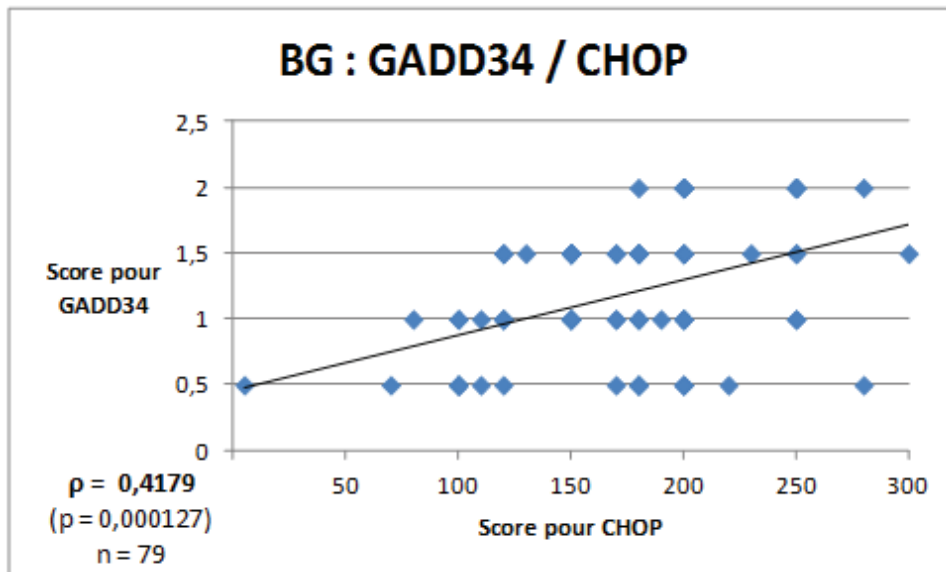


**Figure 18** : Corrélation entre les marquages Ki67 et E-cadhérine pour chaque fragment d'épithélium colique normal inclus dans les micromatrices. Les échantillons avec au moins une donnée manquante sur les deux ont été exclus de l'analyse. La droite correspond à la courbe de tendance linéaire. A partir des scores pour les 80 prélèvements inclus, le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) a été calculé à  $-0,396$  ( $p = 0,000277$ ), mettant en évidence une corrélation négative « faible » (149).

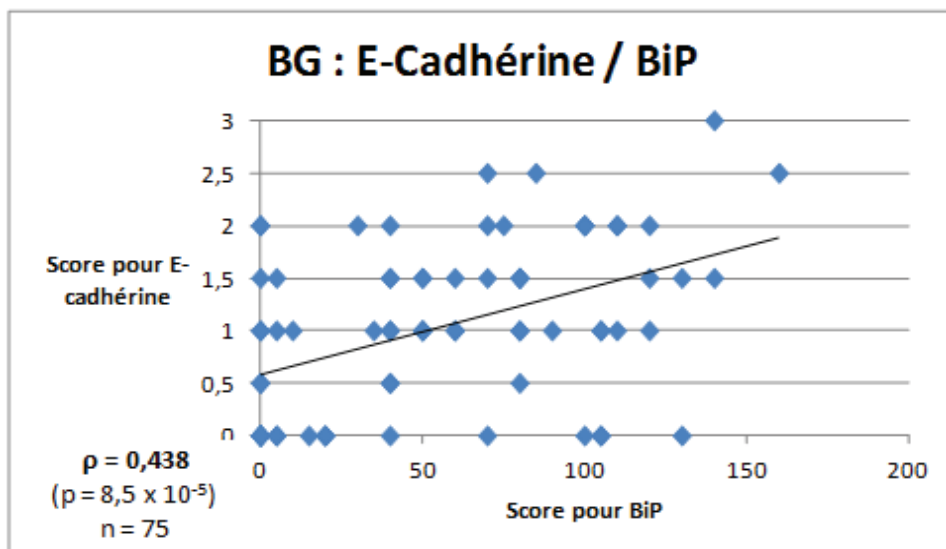
3.5.2 Études de corrélation dans la catégorie histologique « lésion adénomateuse en dysplasie de bas grade »

	BiP	CHOP	GADD34	Ki67	E-cadhérine	HIF-1 alpha
BiP						
CHOP	0,1465 p = 0,197785					
GADD34	0,0821 p = 0,478054	<b>0,4179</b> <b>p = 0,000127</b> <b>n = 79</b>				
Ki67	0,3934 p = 0,000480	0,2605 p = 0,025003	0,2769 p = 0,018526			
E-cadhérine	<b>0,438</b> <b>p = 8,5 x 10<sup>-5</sup></b> <b>n = 75</b>	0,108 p = 0,356574	-0,1226 p = 0,301429	0,3106 p = 0,006319		
HIF-1 alpha	0,0904 p = 0,443904	-0,3423 p = 0,002833	-0,0758 p = 0,527004	0,1019 p = 0,384207	0,0711 p = 0,541374	

**Tableau 19** : Coefficients de corrélation de Spearman obtenus pour chaque paire d'anticorps en prenant en compte les scores d'immunomarquage pour chaque échantillon d'adénome colique en dysplasie de bas grade inclus dans les micromatrices. N'ont été pris en compte dans le calcul du coefficient de corrélation uniquement les fragments ayant les 2 immunomarquages de la paire analysables. Pour chaque coefficient, le degré de significativité (p) est indiqué. Les cellules colorées indiquent un coefficient de corrélation ayant un degré de significativité inférieur au risque alpha estimé après correction de Bonferroni, calculé à 0,000397 ; la coloration bleue indique que ces coefficients de corrélation sont positifs. Pour ceux ci, le nombre de fragments (n) inclus dans le calcul du coefficient est indiqué.



**Figure 19** : Corrélation entre les marquages GADD34 et CHOP pour chaque fragment d'adénome colique en dysplasie de bas grade inclus dans les micromatrices. Les échantillons avec au moins une donnée manquante sur les deux ont été exclus de l'analyse. La droite correspond à la courbe de tendance linéaire. A partir des scores pour les 79 prélèvements inclus, le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) a été calculé à 0,4179 ( $p = 0,000127$ ), mettant en évidence une corrélation positive « faible » (149).



**Figure 20** : Corrélation entre les marquages E-cadhérine et BiP pour chaque fragment d'adénome colique en dysplasie de bas grade inclus dans les micromatrices. Les échantillons avec au moins une donnée manquante sur les deux ont été exclus de l'analyse. La droite correspond à la courbe de tendance linéaire. A partir des scores pour les 75 prélèvements inclus, le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) a été calculé à 0,438 ( $p = 8,5 \times 10^{-5}$ ), mettant en évidence une corrélation positive « faible » (149).

3.5.3 Études de corrélation dans la catégorie histologique « lésion adénomateuse en dysplasie de haut grade »

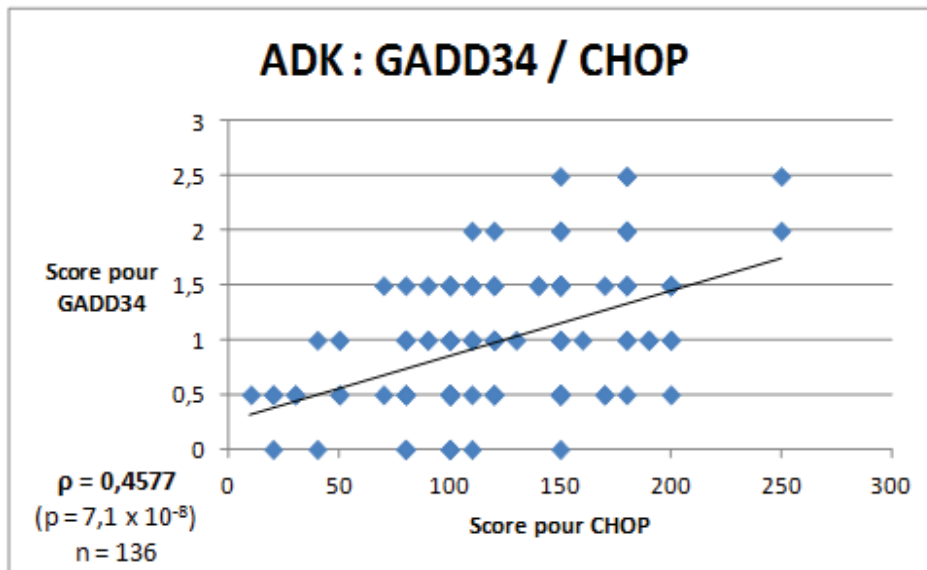
	<b>BiP</b>	<b>CHOP</b>	<b>GADD34</b>	<b>Ki67</b>	<b>E-cadhérine</b>	<b>HIF-1 alpha</b>
<b>BiP</b>						
<b>CHOP</b>	-0,1526 p = 0,275286					
<b>GADD34</b>	0,05 p = 0,719349	0,2244 p = 0,109717				
<b>Ki67</b>	0,362 p = 0,017052	0,1445 p = 0,355095	0,0456 p = 0,774091			
<b>E-cadhérine</b>	0,067 p = 0,665796	0,1274 p = 0,409860	-0,3248 p = 0,033551	0,1991 p = 0,174972		
<b>HIF-1 alpha</b>	0,1252 p = 0,412608	-0,195 p = 0,199277	-0,0588 p = 0,704389	-0,0527 p = 0,719083	0,0933 p = 0,519089	

**Tableau 20 :** Coefficients de corrélation de Spearman obtenus pour chaque paire d'anticorps en prenant en compte les scores d'immunomarquage pour chaque échantillon d'adénome colique en dysplasie de haut grade inclus dans les micromatrices. N'ont été pris en compte dans le calcul du coefficient de corrélation uniquement les fragments ayant les 2 immunomarquages de la paire analysables. Pour chaque coefficient, le degré de significativité (p) est indiqué. Aucun coefficient obtenu n'était inférieur au seuil de significativité calculé après correction de Bonferroni (0,000397).

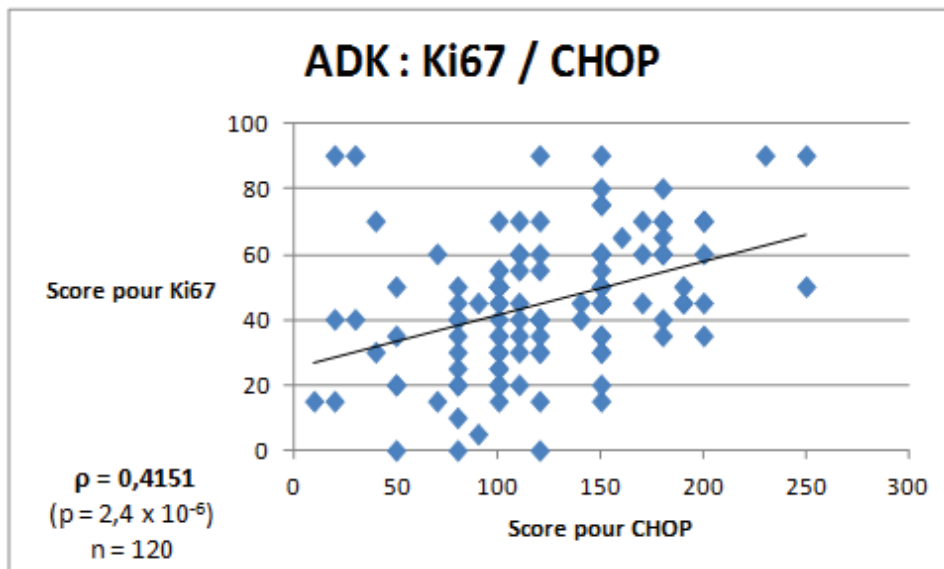
### 3.5.4 Études de corrélation dans la catégorie histologique « adénocarcinome colique invasif primitif »

	BiP	CHOP	GADD34	Ki67	E-cadhérine	HIF-1 alpha
BiP						
CHOP	0,0691 p = 0,431295					
GADD34	0,0665 p = 0,424943	<b>0,4577</b> <b>p = 7,1 x 10<sup>-8</sup></b> <b>n = 136</b>				
Ki67	-0,0311 p = 0,720391	<b>0,4151</b> <b>p = 2,4 x 10<sup>-6</sup></b> <b>n = 120</b>	0,2972 p = 0,000659			
E-cadhérine	-0,1395 p = 0,105265	0,1975 p = 0,029251	0,1432 p = 0,104179	0,1699 p = 0,046319		
HIF-1 alpha	0,1619 p = 0,059647	0,1091 p = 0,231644	<b>0,3623</b> <b>p = 2,5 x 10<sup>-5</sup></b> <b>n = 130</b>	0,0498 p = 0,560574	0,0744 p = 0,380643	

**Tableau 21 :** Coefficients de corrélation de Spearman obtenus pour chaque paire d'anticorps en prenant en compte les scores d'immunomarquage pour chaque échantillon d'adénocarcinome colique invasif primitif inclus dans les micromatrices. N'ont été pris en compte dans le calcul du coefficient de corrélation uniquement les fragments ayant les 2 immunomarquages de la paire analysables. Pour chaque coefficient, le degré de significativité (p) est indiqué. Les cellules colorées indiquent un coefficient de corrélation ayant un degré de significativité inférieur au risque alpha estimé après correction de Bonferroni, calculé à 0,000397 ; la coloration bleue indique que ces coefficients de corrélation sont positifs. Pour ceux ci, le nombre de fragments (n) inclus dans le calcul du coefficient est indiqué.

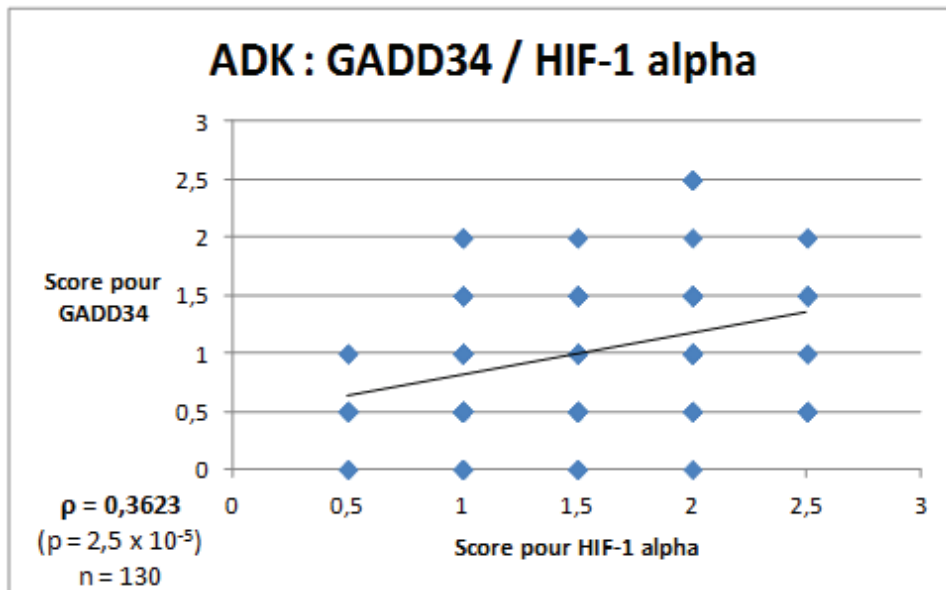


**Figure 21** : Corrélation entre les marquages GADD34 et CHOP pour chaque fragment d'adénocarcinome colique primitif inclus dans les micromatrices. Les échantillons avec au moins une donnée manquante sur les deux ont été exclus de l'analyse. La droite correspond à la courbe de tendance linéaire. A partir des scores pour les 136 prélèvements inclus, le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) a été calculé à 0,4577 ( $p = 7,1 \times 10^{-8}$ ), mettant en évidence une corrélation positive « faible » (149).



**Figure 22** : Corrélation entre les marquages Ki67 et CHOP pour chaque fragment d'adénocarcinome colique primitif inclus dans les micromatrices. Les échantillons avec au moins une donnée manquante sur les deux ont été exclus de l'analyse. La droite correspond à la courbe de tendance linéaire. A partir des scores pour les 120 prélèvements inclus, le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) a été calculé à 0,4151 ( $p = 2,4 \times 10^{-6}$ ), mettant en évidence une corrélation positive « faible » (149).





**Figure 23 :** Corrélation entre les marquages GADD34 et HIF-1 alpha pour chaque fragment d'adénocarcinome colique primitif inclus dans les micromatrices. Les échantillons avec au moins une donnée manquante sur les deux ont été exclus de l'analyse. La droite correspond à la courbe de tendance linéaire. A partir des scores pour les 130 prélèvements inclus, le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) a été calculé à 0,3623 ( $p = 2,5 \times 10^{-5}$ ), mettant en évidence une corrélation positive « faible » (149).

### 3.5.5 Études de corrélation dans la catégorie histologique « métastase ganglionnaire »

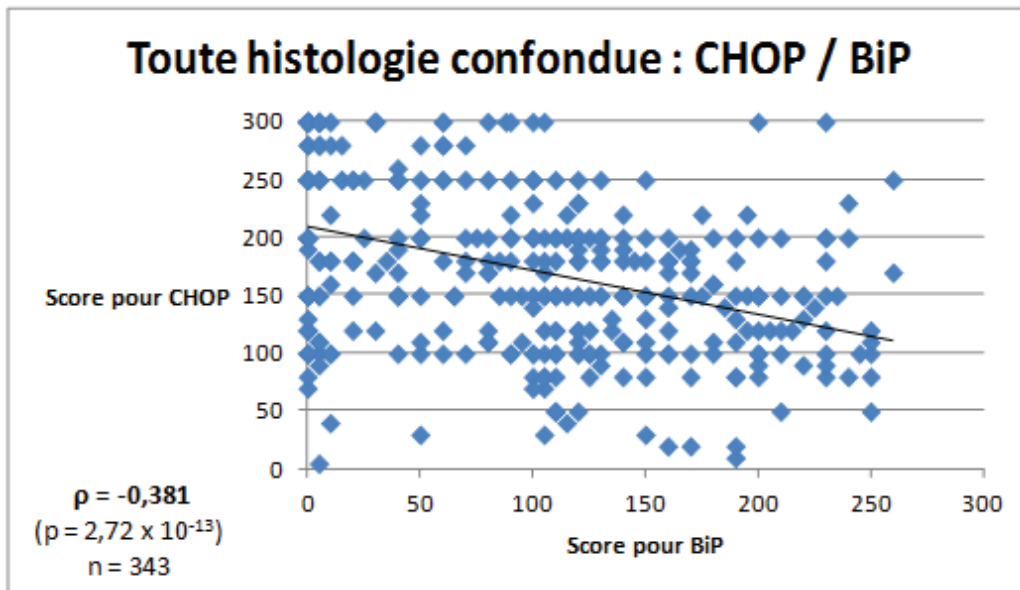
	<b>BiP</b>	<b>CHOP</b>	<b>GADD34</b>	<b>Ki67</b>	<b>E-cadhérine</b>	<b>HIF-1 alpha</b>
<b>BiP</b>						
<b>CHOP</b>	-0,0513 p = 0,934713					
<b>GADD34</b>	0,8944 p = 0,040519	-0,2294 p = 0,710482				
<b>Ki67</b>	0,8 p = 0,333333	-0,3162 p = 0,683772	0,7379 p non calculable			
<b>E-cadhérine</b>	-0,3162 p = 0,683772	-0,5 p = 0,5	Non calculable	-0,3162 p non calculable		
<b>HIF-1 alpha</b>	0,2582 p = 0,741801	Non calculable	0,2722 p non calculable	0,7746 p non calculable	Non calculable	

**Tableau 22 :** Coefficients de corrélation de Spearman obtenus pour chaque paire d'anticorps en prenant en compte les scores d'immunomarquage pour chaque échantillon de métastase ganglionnaire d'adénocarcinome d'origine colique inclus dans les micromatrices. N'ont été pris en compte dans le calcul du coefficient de corrélation uniquement les fragments ayant les 2 immunomarquages de la paire analysables. Pour chaque coefficient, le degré de significativité (p) est indiqué. Aucun coefficient obtenu n'était inférieur au seuil de significativité calculé après correction de Bonferroni (0,000397). Il n'a pas été possible de calculer certains coefficients en raison du trop petit nombre de paires analysables ; de même pour certains degrés de significativité p.

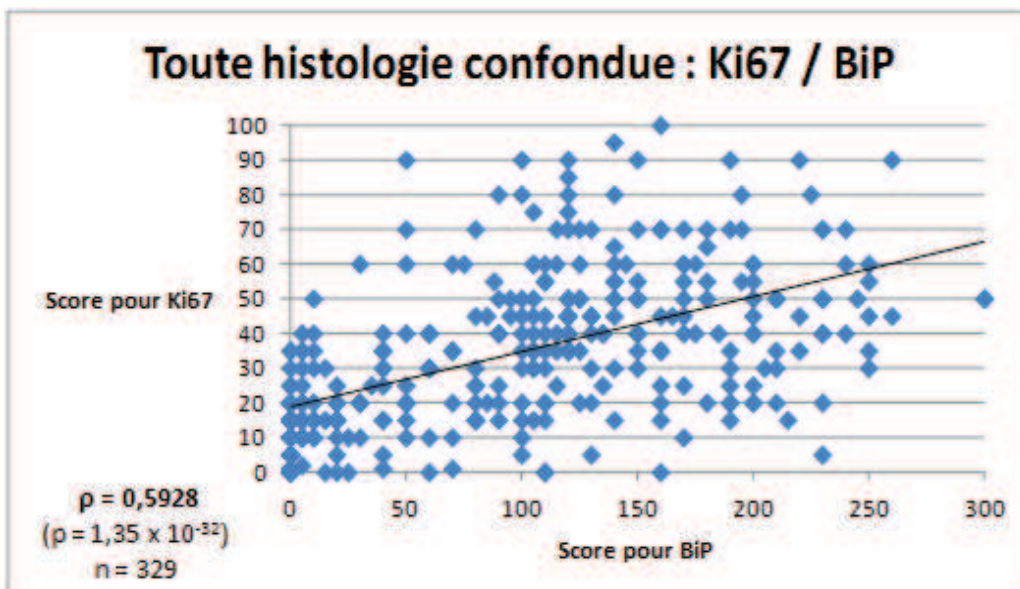
### 3.5.6 Études de corrélation toutes catégories histologiques confondues

	BiP	CHOP	GADD34	Ki67	E-cadhérine	HIF-1 alpha
BiP						
CHOP	<b>-0.381</b> <b><math>2.72 \times 10^{-13}</math></b> <b>n = 343</b>					
GADD34	-0.0305 0.564853	<b>0.4299</b> <b><math>2.30 \times 10^{-16}</math></b> <b>n = 332</b>				
Ki67	<b>0.5928</b> <b><math>1.35 \times 10^{-32}</math></b> <b>n = 329</b>	<b>-0.2208</b> <b>0.000101</b> <b>n = 305</b>	0.0328 0.563233			
E-cadhérine	-0.0643 0.242725	<b>0.2263</b> <b><math>5.9 \times 10^{-5}</math></b> <b>n = 309</b>	0.109 0.052460	-0.043 0.425546		
HIF-1 alpha	<b>0.2178</b> <b><math>6.8 \times 10^{-5}</math></b> <b>n = 329</b>	-0.1793 0.001579	0.1378 0.014696	0.111 0.039408	0.0561 0.295684	

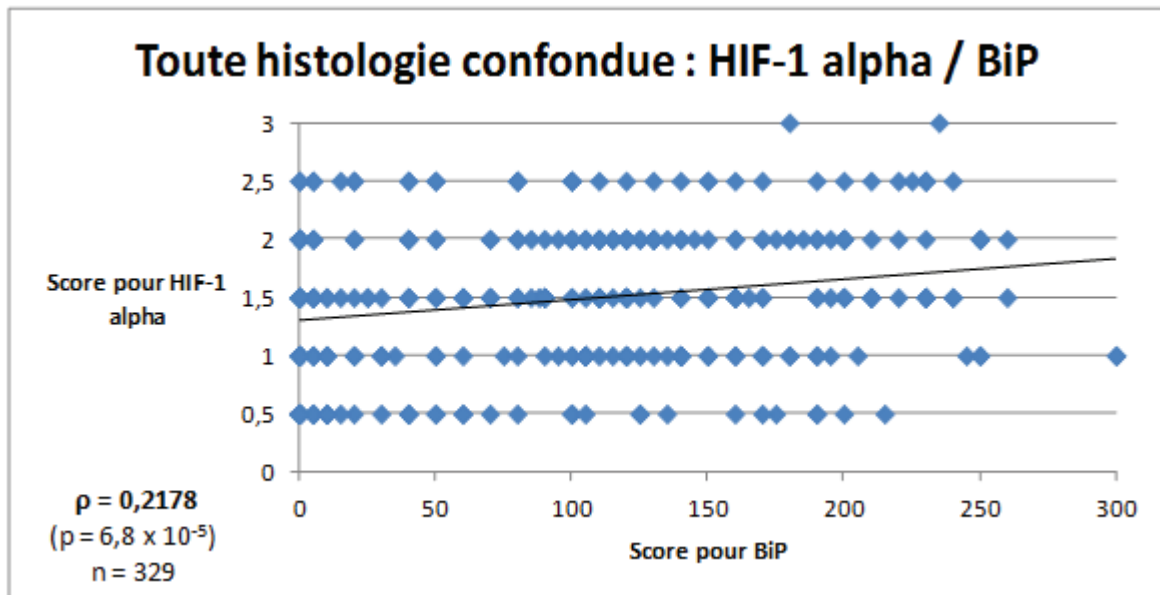
**Tableau 23** : Coefficients de corrélation de Spearman obtenus pour chaque paire d'anticorps en prenant en compte les scores d'immunomarquage pour chaque échantillon inclus dans les micromatrices, en ignorant leur nature histologique. N'ont été pris en compte dans le calcul du coefficient de corrélation uniquement les fragments ayant les 2 immunomarquages de la paire analysables. Pour chaque coefficient, le degré de significativité (p) est indiqué. Les cellules colorées indiquent un coefficient de corrélation ayant un degré de significativité inférieur au risque alpha estimé après correction de Bonferroni, calculé à 0,000397. Pour ceux ci, le nombre de fragments (n) inclus dans le calcul du coefficient est indiqué. Les cases colorées en rouge indiquent un coefficient de corrélation négatif, celles en bleu un coefficient de corrélation positif.



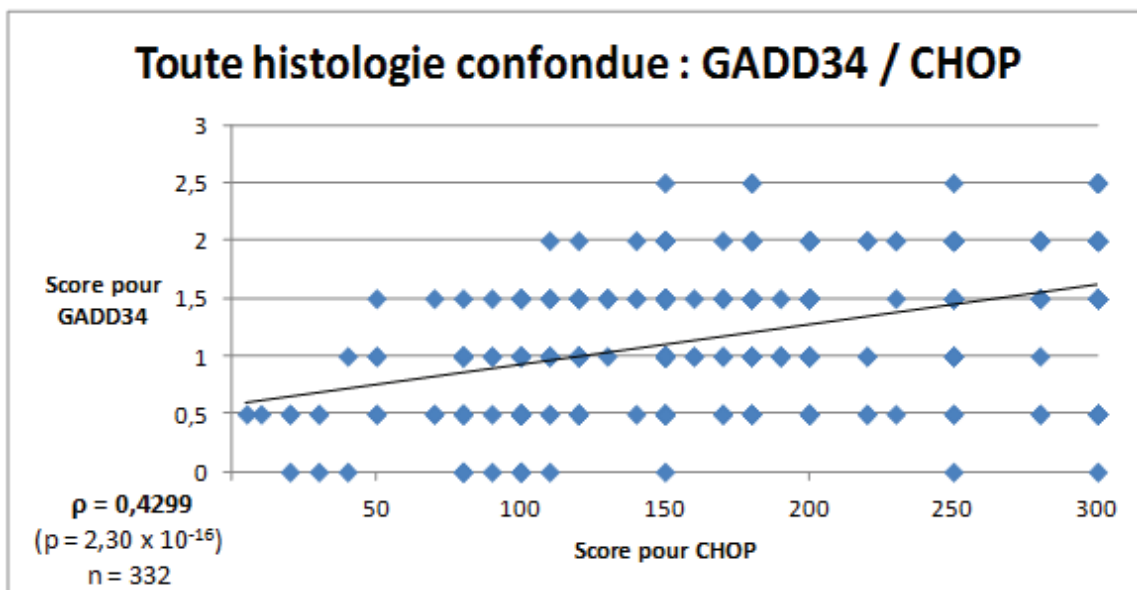
**Figure 24** : Corrélation entre les marquages CHOP et BiP pour chaque fragment inclus dans les micromatrices, sans prendre en compte sa nature histologique. Les échantillons avec au moins une donnée manquante sur les deux ont été exclus de l'analyse. La droite correspond à la courbe de tendance linéaire. A partir des scores pour les 343 prélèvements inclus, le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) a été calculé à  $-0,381$  ( $p = 2,72 \times 10^{-13}$ ), mettant en évidence une corrélation négative « faible » (149).



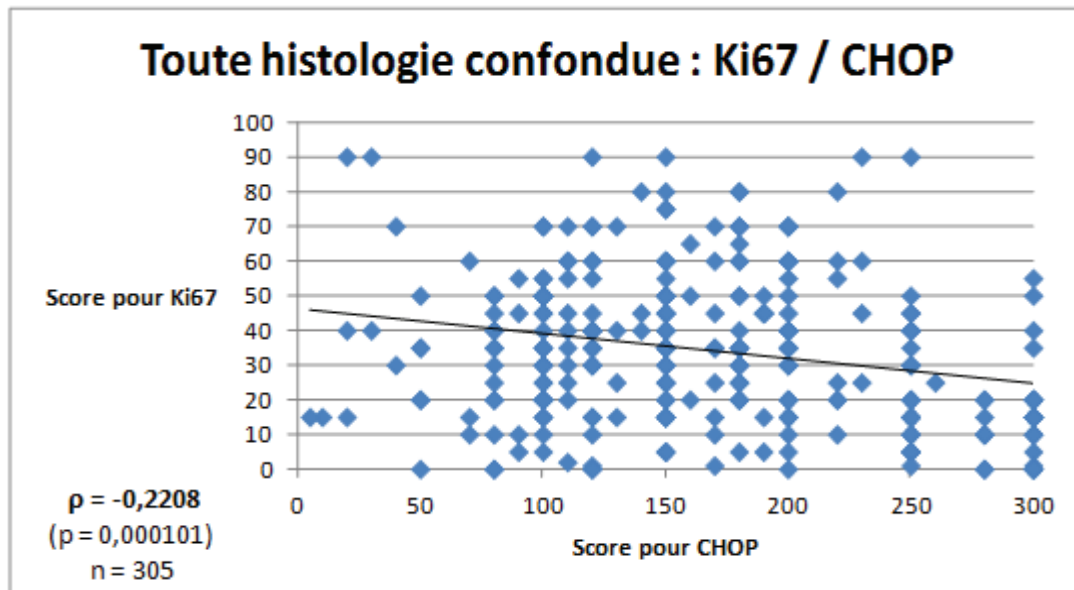
**Figure 25** : Corrélation entre les marquages Ki67 et BiP pour chaque fragment inclus dans les micromatrices, sans prendre en compte sa nature histologique. Les échantillons avec au moins une donnée manquante sur les deux ont été exclus de l'analyse. La droite correspond à la courbe de tendance linéaire. A partir des scores pour les 329 prélèvements inclus, le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) a été calculé à  $0,5928$  ( $p = 1,35 \times 10^{-32}$ ), mettant en évidence une corrélation positive « modérée » (149).



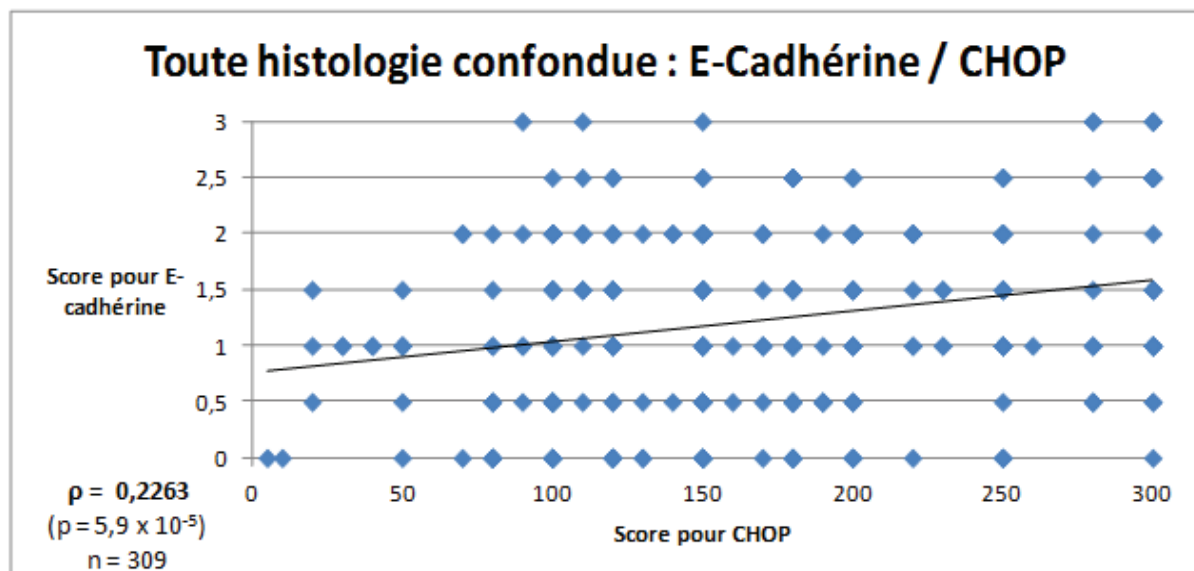
**Figure 26** : Corrélation entre les marquages HIF-1 alpha et BiP pour chaque fragment inclus dans les micromatrices, sans prendre en compte sa nature histologique. Les échantillons avec au moins une donnée manquante sur les deux ont été exclus de l'analyse. La droite correspond à la courbe de tendance linéaire. A partir des scores pour les 329 prélèvements inclus, le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) a été calculé à 0,2178 ( $p = 6,8 \times 10^{-5}$ ), mettant en évidence une corrélation positive « négligeable » (149).



**Figure 27** : Corrélation entre les marquages GADD34 et CHOP pour chaque fragment inclus dans les micromatrices, sans prendre en compte sa nature histologique. Les échantillons avec au moins une donnée manquante sur les deux ont été exclus de l'analyse. La droite correspond à la courbe de tendance linéaire. A partir des scores pour les 332 prélèvements inclus, le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) a été calculé à 0,4299 ( $p = 2,30 \times 10^{-16}$ ), mettant en évidence une corrélation positive « faible » (149).



**Figure 28** : Corrélation entre les marquages Ki67 et CHOP pour chaque fragment inclus dans les micromatrices, sans prendre en compte sa nature histologique. Les échantillons avec au moins une donnée manquante sur les deux ont été exclus de l'analyse. La droite correspond à la courbe de tendance linéaire. A partir des scores pour les 305 prélèvements inclus, le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) a été calculé à  $-0,2208$  ( $p = 0,000101$ ), mettant en évidence une corrélation négative « négligeable » (149).



**Figure 29** : Corrélation entre les marquages E-cadhérine et CHOP pour chaque fragment inclus dans les micromatrices, sans prendre en compte sa nature histologique. Les échantillons avec au moins une donnée manquante sur les deux ont été exclus de l'analyse. La droite correspond à la courbe de tendance linéaire. A partir des scores pour les 309 prélèvements inclus, le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) a été calculé à  $0,2263$  ( $p = 5,9 \times 10^{-5}$ ), mettant en évidence une corrélation positive « négligeable » (149).

### 3.5.7 Synthèse des résultats de corrélation

Le tableau 24 résume les différentes études de corrélation effectuées en additionnant pour chaque paire de protéines étudiée le nombre de résultats statistiquement significatifs retrouvés. Pour deux paires seulement étaient obtenues des corrélations significatives dans plus d'une analyse : GADD34 / CHOP (3 fois significatif) et Ki67 / CHOP (2 fois significatif). À noter que le coefficient de corrélation entre Ki67 et CHOP est positif dans la catégorie histologique « adénocarcinome colique invasif primitif » alors qu'il est négatif lorsque l'ensemble des catégories histologiques sont prises en compte.

	BiP	CHOP	GADD34	Ki67	E-cadhérine	HIF-1 alpha
BiP						
CHOP	1					
GADD34	0	3				
Ki67	1	2	0			
E-cadhérine	1	1	0	1		
HIF-1 alpha	1	0	1	0	0	

**Tableau 24** : Synthèse des résultats obtenus lors de l'étude de corrélation. Le chiffre dans les cases indique le nombre total de corrélations statistiquement significatives retrouvées lors des différentes analyses effectuées, à savoir dans les catégories « épithélium colique normal », « lésion adénomateuse en dysplasie de bas grade », « lésion adénomateuse en dysplasie de haut grade », « adénocarcinome colique invasif primitif », « métastase ganglionnaire » et toutes catégories histologiques confondues.



## **4. DISCUSSION**

Dans cette étude, nous avons évalué le niveau d'expression de protéines induites par un stress du RE - à savoir BiP, CHOP et GADD34 - dans l'épithélium colique, de l'épithélium normal jusqu'à l'adénocarcinome invasif et la métastase ganglionnaire d'adénocarcinome d'origine colique, en passant par de multiples étapes intermédiaires pré-malignes. Nous avons pu identifier une tendance statistiquement significative dans l'expression de BiP, CHOP et GADD34 lorsque l'épithélium progresse vers une lésion tumorale infiltrante et métastatique. L'expression de BiP tend à s'accroître, alors que l'expression de CHOP et de GADD34 est progressivement perdue. Nous avons par ailleurs étudié 3 phénomènes connexes en essayant d'étudier leur association avec les protéines BiP, CHOP et GADD34 : la prolifération cellulaire, à l'aide de la protéine Ki67 ; la transition épithélio-mésenchymateuse, à l'aide de la protéine E-cadhérine ; et enfin l'hypoxie cellulaire, à l'aide de la protéine HIF-1 alpha.

Nous allons par la suite brièvement détailler le rôle des protéines Ki67, E-cadhérine et HIF-1 alpha, analyser les résultats obtenus, puis nous nous attacherons à justifier quelques aspects de la méthodologie utilisée avant commenter les limites de cette étude et de tenter d'en dessiner d'éventuelles perspectives.

### ***4.1 Caractéristiques des protéines Ki67, E-cadhérine et HIF-1 alpha***

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à 6 protéines afin d'explorer la RPNR et sa boucle de rétrocontrôle favorisant la mort cellulaire (BiP, CHOP et GADD34), la prolifération cellulaire (Ki67), la transition épithélio-mésenchymateuse (E-cadhérine) et l'hypoxie tissulaire (HIF-1 alpha). Nous allons développer brièvement le rôle respectif des 3 dernières (voir section 1.2 pour les 3 premières).

#### ***4.1.1 Ki67***

Cette protéine se nomme ainsi en raison du lieu géographique de sa découverte, la ville de Kiel en Allemagne, et du numéro de puits de la plaque dans laquelle elle a été identifiée. Il s'agit d'une protéine nucléaire non histone (150). Universellement exprimée dans les cellules en prolifération (phase G1 tardive, S, G2 et M) et absente dans les cellules quiescentes (phase G0) (151,152), son rôle exact n'est pas connu. Une surexpression de Ki67 dans les cellules tumorales est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers, en particulier mammaire (153,154).

#### 4.1.2 E-cadhérine

Cette protéine joue un rôle majeur dans l'adhésion des cellules épithéliales et leur polarisation. Elle appartient à la famille des cadhérines qui sont des glycoprotéines transmembranaires. L'E-cadhérine est donc une protéine transmembranaire d'adhésion, ayant un poids moléculaire de 120 kD. Son domaine extracellulaire est impliqué dans l'adhésion entre cellules mettant en jeu des interactions homophiles régulées par le calcium (155). Son domaine intracellulaire est quant à lui connecté au cytosquelette d'actine via les caténines. Beta-caténine et gamma-caténine s'associent à l'alpha-caténine, qui lie le complexe cadhérine-caténine au cytosquelette d'actine (155,156). L'E-cadhérine est considérée comme un suppresseur actif de l'invasion et de la croissance des nombreux carcinomes (155–157). Parallèlement à la perte d'expression de l'E-cadhérine, il existe dans les cellules cancéreuses une surexpression de N-cadhérine, phénomène appelé *cadherin switch*. La N-cadhérine coopère avec le récepteur FGF, ce qui accroît l'expression de MMP-9 (*matrix metallo-peptidase 9*) et ainsi favorise l'invasion cellulaire (157). La perte d'expression d'E-cadhérine constitue un événement clé de la TEM (158). Il a déjà été observé une diminution d'expression dans le tissu tumoral colique en comparaison avec le tissu colique normal, observation que nous renouvelons dans notre présente étude (159).

#### 4.1.3 HIF-1 alpha

HIF-1 est l'acronyme d'*Hypoxia-inducible factor 1*. Il s'agit d'un facteur de transcription hétérodimérique jouant un rôle majeur dans la réponse cellulaire à l'hypoxie (160). HIF-1 est un complexe formé de 2 sous-unités, HIF-1 alpha et HIF-1 bêta. Ces dernières sont des protéines hélice-boucle-hélice de la famille PAS (Per, ARNT, Sim) (161). HIF-1 sert à la régulation de la transcription de nombreux gènes facilitant la réponse à un environnement hypoxique : gènes liés à de nombreuses fonctions comme l'apoptose, l'angiogénèse, l'érythropoïèse, le cycle cellulaire ou le métabolisme. Dans des conditions normales, l'hydroxylation des prolines de HIF-1 induit un changement de conformation qui favorise la liaison avec le complexe E3 ligase de VHL (*Von Hippel Lindau protein*), entraînant l'ubiquitinylation et la dégradation de cette protéine dans le protéasome. Des conditions hypoxiques entraînent une inhibition de la dégradation de HIF-1 alpha et une stabilisation de la protéine. À noter que cette stabilisation peut être également induite par une voie ne

dépendant pas de l'hypoxie, via de multiples cytokines activant la voie PI3K-AKT-mTOR (162,163). HIF-1 alpha est exprimé dans l'épithélium colique normal, et son expression accrue dans les lésions ischémiques (164). Il est intéressant de remarquer que HIF-1 peut induire la TEM en activant l'expression de Twist, Snail et VEGF-A (165–167).

#### **4.2 Analyse des résultats obtenus**

Ces résultats (augmentation progressive de l'expression de BiP, diminution progressive de l'expression de CHOP et GADD34) sont comparables à ceux observés dans notre précédente étude relative à la carcinogénèse bronchique (143). A notre connaissance et hormis ce qui concerne l'expression de BiP, il s'agit de la première observation de ce type dans le côlon (94).

Pour BiP, ces constatations est en accord avec de précédentes études montrant que cette protéine est nécessaire à la croissance tumorale (102,103). Cela pourrait refléter un changement progressif du microenvironnement, avec l'apparition d'une relative hypoxie et d'un manque de nutriments en raison de la croissance cellulaire accentuée, déclenchant ainsi un stress du RE (36–40). Néanmoins, nos analyses de corrélations ne semblent appuyer cette hypothèse, tout du moins dans les lésions tumorales pré-invasives, car les corrélations obtenues entre expression de BiP et HIF-1 alpha ne sont significatives que si on ne prend pas en compte la nature histologique des fragments (catégorie « toute histologie confondue »), et cette corrélation alors obtenue est considérée comme « négligeable » (voir paragraphe 3.5.4). Ce résultat est de plus sujet à caution, car la probabilité d'obtenir davantage de corrélations statistiquement significatives lorsqu'on ne distingue plus par catégories histologiques est accrue, car le nombre de cas influence grandement le degré de significativité (148). Il convient d'y prendre garde lors de l'interprétation des résultats car un coefficient très proche de zéro peut être statistiquement significatif si la taille de l'échantillon est grand, comme c'est le cas ici ( $p = 0,2178$  avec  $n = 329$  et  $p = 6,8 \times 10^{-5}$ ). Si nos résultats obtenus sont valides et reflètent fidèlement la réalité biologique des lésions analysées, il en découle que l'hypoxie cellulaire ne jouerait qu'un rôle marginal dans le déclenchement de la RPNR au sein des lésions adénomateuses coliques, et on pourrait alors imaginer cette RPNR comme un mécanisme indépendant, propre à la tumeur, jouant éventuellement un rôle dans sa

progression vers la malignité (une relation de cause à effet reste à être prouvée et il resterait à en définir le sens).

En ce que concerne la boucle de rétrocontrôle négatif de la RPNR, la perte progressive de l'expression de CHOP et GADD34 à mesure que l'épithélium colique se modifie est en accord avec l'hypothèse selon laquelle *CHOP* et *GADD34* seraient des gènes suppresseurs de tumeur. Ces constatations corroborent celles d'une étude récente qui a évalué l'expression de CHOP et GADD34 dans le mésothéliome (105). Dans cette étude, l'expression immunohistochimique de CHOP était associée indépendamment avec la survie, alors que le marquage de GADD34 corrélait avec le niveau de différenciation tumorale, et était alors très faible dans les territoires sarcomatoïdes. Dans notre étude, nous avons observé que la diminution de l'expression de CHOP et GADD34 semble être un événement précoce de la carcinogénèse colique. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans notre étude sur la carcinogénèse bronchique (143).

L'hypothèse selon laquelle *GADD34* joue le rôle de suppresseur de tumeur existe depuis plusieurs années (168–170). D'une manière générale, son expression favorise la mort cellulaire dans des situations de stress, alors que sa perte maintient la prolifération cellulaire et la survie. Par exemple, son hyper-expression dans des cellules adénocarcinomateuses coliques de la lignée SW480 entraîne une augmentation de l'apoptose après exposition à des radiations ionisantes (169). À l'inverse, le *knock-out* de *GADD34* dans des fibroblastes aboutit à une perte de la sénescence (170). Dans un modèle *in vitro* de réparation tissulaire après blessure, les fibroblastes déficients pour *GADD34* migrent plus rapidement que les fibroblastes sauvages, suggérant que *GADD34* pourrait également jouer un rôle régulateur de la migration cellulaire (171). Les mécanismes de mort favorisés par *GADD34* ne sont pas à ce jour complètement compris, mais il est probable qu'ils impliquent l'accumulation de protéines mal repliées secondairement à la restauration de la synthèse protéique globale (48). Au cours de la carcinogénèse, plusieurs mécanismes peuvent conduire à l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur. Le plus souvent, les deux allèles du gène doivent être inactivés, le modèle historique de ce phénomène étant l'inactivation du gène *RB* dans le rétinoblastome (172). Néanmoins, des exemples d'haplo-insuffisance existent, par exemple pour le gène

*p27* chez la souris (173) et il a été décrit des phénomènes d'effet dominant négatif, par exemple pour des mutations faux-sens de *p53* (174). La perte de l'expression d'un gène peut impliquer des mutations somatiques ou également des altérations épigénétiques, par exemple dans le cas d'une méthylation de la région promotrice (175,176). Des modifications post-transcriptionnelles, par l'intermédiaire de micro-ARN ou de phénomènes de dégradation protéique, peuvent aussi atténuer l'expression génique (177). S'il s'avère que *GADD34* est effectivement un gène suppresseur de tumeur perdu au cours de la carcinogénèse colique, il est probable que le mécanisme de son inactivation soit post-transcriptionnelle. *GADD34* est en effet situé en 19q13.2, un locus chromosomique qui n'est pas connu pour être délété dans les lésions colique précancéreuses ou cancéreuses (22,178–180). Dans le laboratoire du Docteur Marciniak (médecin pneumologue et chercheur, *Cambridge Institute for Medical Research*, Cambridge, Royaume-Uni), il a été observé que bien que des lignées cellulaires dérivant de mésothéliome sarcomatoïde n'exprimaient pas spontanément *GADD34*, l'expression de cette protéine peut être réactivée au cours d'un stress du RE, suggérant que le gène reste intact et que le niveau de régulation se situe en aval de l'expression génique (181). La perte de l'expression de *GADD34* pourrait être médiée par la perte de CHOP. En effet, nous avons observé à trois reprises lors des analyses de corrélation que l'extinction de CHOP au cours de la carcinogénèse colique était associée à une perte progressive de *GADD34*. Cette constatation est en accord avec de précédentes études mettant en évidence que l'expression de *GADD34* est induite par CHOP (71). Nous n'avons en revanche trouvé qu'une seule corrélation significative entre les expressions de CHOP et BiP (lors de l'analyse de corrélation toutes catégories histologiques confondues), et aucune entre celles de *GADD34* et BiP. Ceci pourrait s'expliquer par une puissance faible de nos analyses ou plus simplement par une absence de corrélation. Cette dernière hypothèse est soutenue par le fait que l'expression de CHOP et *GADD34* peut être activée par des signaux différant de ceux régulant l'expression de BiP (71).

### **4.3 Justification de la méthodologie utilisée**

#### **4.3.1 Remarques sur la stratégie de tirage au sort en 2 temps**

La deuxième étape d'inclusion de patients a été effectuée dans le but d'enrichir notre échantillon en lésions adénomateuses en dysplasie de haut grade, plus rares, et

ainsi augmenter la puissance de notre étude et être capable de détecter une différence significative si elle existe.

#### *4.3.2 Population échantillonnée*

Dans cette étude, nous avons fait le choix d'étudier la population prise en charge entre le 01/01/2003 et le 01/01/2013 au CHU de Rouen pour exérèse d'adénome et d'adénocarcinome colique. Le choix de cette période de 10 ans tout comme le tirage au sort des patients avaient pour objectif de contrôler au mieux les facteurs de confusion connus ou inconnus pouvant influencer sur le niveau d'expression des protéines étudiées ou sur les techniques d'immunomarquage (variabilité dans l'origine sociale des patients, la technique opératoire ou endoscopique avec différents temps d'ischémie chaude et froide, la durée de fixation formolée des prélèvements tissulaires etc.). La décision de ne pas définir de nombreux critères d'exclusion, comme la présence d'un syndrome héréditaire de prédisposition au cancer (syndrome de Lynch, polypose adénomateuse familiale etc.) relevait d'un même raisonnement.

Ainsi, nous espérons pouvoir étendre au maximum, jusqu'à la carcinogénèse colique humaine en général, les résultats obtenus, au prix évident d'une certaine hétérogénéité des scores d'expression au sein de catégories histologiques identiques.

De façon globale, les caractéristiques de nos deux échantillons tirés au sort en matière d'âge et de sex-ratio s'approchaient de nos deux populations étudiées. Dans notre population avec adénocarcinomes coliques, l'âge moyen au diagnostic était de 70 ans (écart-type = 13), avec 56% d'hommes et 44% de femmes ; versus un âge moyen dans notre échantillon de 69 ans (écart-type = 13), et une répartition par sexe identique. Dans la population ayant servi au deuxième tirage au sort, celle présentant des lésions adénomateuses en dysplasie de haut grade, l'âge moyen était de 69 ans (écart-type = 12), l'âge médian de 70 ans (distance interquartile = 17), et comportait 68% d'hommes et 32% de femme ; dans notre échantillon, les âges moyen et médian étaient comparable à la population de référence (69 ans et 71 ans). Ici cependant, la répartition par sexe différait quelque peu, avec 68% d'hommes et 32% de femmes dans notre population de référence, contre 78% d'hommes et 22% de femmes. Cette légère discordance peut s'expliquer par le petit nombre d'individus tirés au sort (18 cas seulement). Au total, il semble raisonnable de considérer que nos deux tirages

au sort ont été capables de sélectionner un échantillon représentatif de la population de référence. Le caractère représentatif d'un échantillon est fondamental dans la démarche scientifique en général, et est reconnu comme étant un critère important pour juger de la qualité des études utilisant des micromatrices tissulaires en particulier (182).

En revanche, quelques limites doivent être concédées pour ce qui est de la représentativité de notre échantillon étudié au regard de la population française de patients traités pour adénocarcinome colique. Notre population d'étude apparaissait plus jeune en âge médian (70 ans chez l'homme et 69 ans chez la femme ans comparé à 71 ans chez l'homme et 75 ans chez la femme dans la population française en 2012 (3). Cette différence est aisément expliquée, nous semble-t-il, par le recrutement particulier d'un centre hospitalier universitaire qui accueille et soigne des cas plus difficiles, plus jeunes et présentant plus souvent un syndrome de prédisposition héréditaire au cancer, ce d'autant que le CHU de Rouen est un lieu de référence en la matière. De plus, les chiffres de l'Institut National du Cancer (3) ne distinguent pas comme dans notre étude les adénocarcinomes coliques et adénocarcinomes rectaux, ce qui rend la comparaison difficile.

#### *4.3.3 Origine anatomique et nature des lésions étudiées*

Voici quelques remarques concernant l'exclusion des lésions rectales, la méthode utilisée pour choisir les territoires épithéliaux sains, l'échantillonnage des lésions, l'inclusion de quelques métastases ganglionnaires, et enfin l'absence de foyers de cryptes aberrantes étudiés.

Si nous avons limité les critères d'exclusion, en revanche, nous nous sommes restreints à l'étude des lésions coliques, et non pas colorectales. Dans les lésions cancéreuses du rectum, la fréquence des traitements par radiothérapie néoadjuvante est élevé (183). Or les rayonnements ionisants sont connus pour induire un stress du réticulum endoplasmique probablement *via* un stress oxydatif (168,184,185). Ce phénomène aurait introduit un biais dans notre étude et c'est la raison pour laquelle nous avons exclu d'emblée les lésions rectales.

Cependant, il est probable que ce choix n'ait pas eu de grande influence sur les résultats obtenus. Il a en effet été mis en évidence que les adénocarcinomes



coliques et rectaux (non hyper-mutés) sont biologiquement très similaires, tout du moins pour ce qui est de leurs altérations génétiques (186).

Dans la mesure du possible, l'épithélium colique morphologiquement normal de contrôle a été prélevé le plus à distance des lésions adénomateuses ou adénocarcinomateuses, souvent au niveau de la limite de résection en cas de pièce opératoire la plus éloignée de la lésion. Ce choix a été fait dans le but de s'affranchir au mieux d'une altération quelconque du tissu histologiquement normal qui pourrait avoir un lien avec la survenue d'une lésion adénomateuse ou adénocarcinomateuse, en se fondant sur l'hypothèse selon laquelle cette altération devrait se retrouver proche de la lésion tumorale et devrait disparaître plus à distance. Ce phénomène d'anomalies moléculaires présentes au sein d'un tissu morphologiquement normal a été surtout décrit dans le sein (187).

Dans la mesure du possible également, chaque lésion a fait l'objet de plusieurs prélèvements (jusqu'à 3). Cet échantillonnage avait pour objectif de mieux contrôler une éventuelle hétérogénéité tumorale dans l'expression des protéines étudiées de la RPNR, qui semble être très liés aux facteurs microenvironnementaux (50,106). Il est de plus habituellement recommandé de réaliser 3 prélèvements par lésions lors de la construction d'une micromatrice tissulaire (188).

Il est à noter que l'intégration de métastases ganglionnaires d'adénocarcinome colique (2 échantillons pour 3 métastases provenant de 3 patients différents, soit 6 échantillons inclus dans l'étude) a été ici effectuée dans un but exploratoire pour tenter de satisfaire notre curiosité. Bien entendu, le très petit nombre de cas ne permet pas de tirer de conclusion concernant le niveau d'expression des protéines étudiées dans ce type de lésions.

L'inclusion dans notre étude de foyers de cryptes aberrantes était une idée séduisante que nous avons initialement envisagée dans le but d'observer de manière beaucoup plus fine l'ensemble des étapes de la carcinogénèse colique initiale telles qu'elles se traduisent morphologiquement pour le pathologiste (11–13,189). Néanmoins cette idée a rapidement été abandonnée parce que ces lésions

passent la plupart du temps inaperçues et n'entraînent donc pas de codage spécifique permettant de retrouver les cas.

#### *4.3.4 Comparaison des caractéristiques de l'échantillon et celles de la population de référence*

Les caractéristiques cliniques de nos échantillons sont assez proches de celles des 2 populations de référence, même si les patients tirés au sort étaient légèrement plus jeunes et que la proportion d'hommes chez les patients avec adénome en dysplasie de haut grade tirés au sort était légèrement plus importante. Nous pouvons par conséquent inférer que notre échantillon était représentatif des deux populations d'origine. Nous estimons de fait être en mesure d'étendre avec confiance les résultats obtenus à l'ensemble de la population de référence, et ainsi de tirer avec confiance des enseignements plus globaux sur la biologie de la carcinogénèse colique chez l'homme.

#### *4.3.5 Remarques sur les différentes formules utilisées pour établir un score en fonction des anticorps utilisés*

Il ne nous a malheureusement pas été possible d'utiliser un score identique pour tous les anticorps étudiés. Ceci s'explique par la grande hétérogénéité du marquage des cellules étudiées pour les marquages BiP et CHOP et au contraire par l'homogénéité des marquages GADD34, E-cadhérine et HIF-1 alpha au sein des tissus. Pour ces trois derniers anticorps, cette homogénéité a entraîné une finesse moindre dans l'évaluation de l'intensité de marquage, rendant de fait la comparaison plus difficile entre les estimateurs de tendance centrale (moyenne et médiane) des différentes catégories histologiques.

Quant à l'immunomarquage Ki67, nous avons utilisé la méthode d'évaluation classique aussi bien en recherche qu'en pratique courante (190,191).

#### **4.4 Limites de l'étude**

Ce travail est l'objet de plusieurs biais potentiels. Les résultats obtenus doivent de fait être interprétés avec prudence.

#### *4.4.1 Risque de biais de mauvaise classification*

La principale limitation de cette étude réside dans le risque d'une mauvaise classification systématique lors du calcul des scores immunohistochimiques pour chaque fragment tissulaire. Ce biais est dû à l'impossibilité d'une procédure en aveugle concernant la nature histologique des tissus évalués. Par conséquent, il est possible que l'évaluateur ait été inconsciemment tenté de sur ou sous-évaluer l'intensité du marquage en fonction du degré de sévérité des lésions. Afin de lutter contre ce biais, nous avons sollicité l'expertise en histo-imagerie quantitative du Groupe Régional d'Études sur le Cancer (GRECAN) de l'Université de Caen Basse Normandie. Après numérisation des lames immunomarquées, cette équipe de recherche a développé un algorithme permettant dans un premier temps de définir automatiquement, pour chaque échantillon tissulaire, les territoires épithéliaux (en excluant le chorion, les cellules inflammatoires ou le stroma tumoral), puis dans un second temps d'évaluer automatiquement l'intensité de l'immunomarquage sur ce seul territoire d'intérêt. Nous espérons ainsi nous affranchir de tout biais dans l'assignation d'un score. Malheureusement, cette tentative s'est avérée vaine car les territoires d'intérêts étaient mal reconnus et l'assignation du score trop peu fiable.

#### *4.4.2 Remarques concernant l'hétérogénéité de l'expression des protéines étudiées*

La technique de micromatrice tissulaire possède de nombreux atouts (139). Il s'agit d'un outil puissant permettant une évaluation rapide d'un très grand nombre de fragments tissulaires tout en préservant une uniformité dans les conditions expérimentales et en économisant les réactifs. Cependant, un des problèmes majeurs de cette technique réside dans l'échantillonnage des tissus, avec des fragments inclus généralement de très petite taille (0,6 mm de diamètre dans notre étude) et qui peuvent ne pas être représentatifs de l'ensemble de la lésion dont ils sont issus. Plusieurs études ont démontré néanmoins que l'utilisation de cette technique peut, de manière fiable, refléter les caractéristiques de tumeurs comme si elles avaient été étudiées en utilisant des coupes tissulaires complètes, et donner des résultats concordant avec de précédents travaux reportés dans la littérature (139,192–194). Néanmoins, dans notre étude, l'utilisation de micromatrices pourrait induire d'autres limitations étant donné que l'intensité du stress du RE est connue pour varier grandement au sein d'une même tumeur en fonction des variations

métaboliques du microenvironnement (106). Le choix d'étudier plusieurs territoires pour une même lésion (jusqu'à 3) a été pris afin de réduire au maximum ce biais.

#### **4.4.3 Différences potentielles dans le traitement des tissus**

Les fragments tissulaires de nos micromatrices tissulaires provenaient d'un seul laboratoire, mais correspondaient à une décennie d'activité (2003 – 2013) De plus, les blocs de micromatrices tissulaires ont été construits à partir de pièces de résection colique chirurgicale mais aussi à partir de pièces de mucosectomie par voie endoscopique, rendant par conséquent possible une différence entre les patients en ce qui concerne la durée de fixation dans le formol de leurs tissus. Une variation dans le temps de fixation formolée (195,196), un délai de fixation (ischémie froide) (197), une différence dans les moyens par lesquels les tissus sont obtenus (résection chirurgicale ou biopsie) (198,199) ou une différence dans le temps d'ischémie chaude (200) sont connus pour avoir un impact sur l'expression génique et l'immunoréactivité de certains anticorps dans des tissus inclus en paraffine. Tous ces phénomènes peuvent être source de biais s'ils sont systématiquement associés à certains types de lésion. Cependant, dans notre étude, l'existence d'une sur ou sous-fixation est peu probable car tous les échantillons provenaient du même laboratoire, doté depuis longtemps de protocoles de prise en charge. De surcroît, alors que les lésions étaient de plus en plus sévères, nous avons mis en évidence que de manière générale l'expression de BiP s'intensifiait alors que celle de CHOP et GADD34 diminuait. De telles tendances opposées sont rassurantes quant à l'existence de biais techniques décrits ci-dessus.

#### **4.5 Perspectives**

Les phénomènes que nous avons observé nous permettent de mieux comprendre la carcinogénèse colique et d'expliquer certaines constatations préalables. L'anticorps monoclonal bortezomib est un inhibiteur sélectif du protéasome utilisé en pratique courante dans le traitement du myélome, aboutissant à une mort cellulaire via une induction d'un stress du réticulum endoplasmique (201). Des études *in vitro* ont montré que l'inhibition sélective du protéasome ainsi provoquée, potentialisée par l'utilisation d'autres molécules, induit un arrêt du cycle dans des lignées cellulaires d'adénocarcinome colique (202,203). Cependant, ce traitement par bortezomib en monothérapie semble inefficace *in vivo* chez les patients atteints d'adénocarcinome

colorectal métastatique (204). Un mécanisme connu de résistance au traitement par inhibiteur du protéasome et donc, de façon plus générale, de survie à un stress chronique du RE est l'inhibition de la phosphorylation de phospho-eIF2 $\alpha$  (205). Cette inhibition maintient la répression globale de la synthèse protéique et protège de l'apoptose la cellule tumorale en la maintenant dans un état de quiescence. Nos données suggèrent que ce traitement, inducteur de stress du réticulum endoplasmique, pourrait être efficace chez l'homme à la condition de restaurer préalablement ou en parallèle l'activité de GADD34. Un tel stress du réticulum endoplasmique associé à une synthèse protéique globale conservée précipiterait vers l'apoptose la cellule maligne. Ceci ouvre des pistes d'investigations qui nous semblent intéressantes.

## **5. CONCLUSION**

Nous avons mis en évidence une relation positive entre l'expression de BiP et la carcinogénèse colique, contrairement à CHOP et GADD34 dont l'expression tend à diminuer significativement lors de la progression maligne. Ces constatations sont en adéquation avec un modèle dans lequel le stress du réticulum endoplasmique accompagne la transformation maligne et où la perte ou la diminution de l'expression des protéines aboutissant à la mort cellulaire en cas de stress prolongé, comme CHOP ou GADD34, facilite la progression tumorale. Par ailleurs, l'analyse de corrélation entre l'expression de ces 3 protéines BiP, CHOP et GADD34 et l'hypoxie cellulaire évaluée par HIF-1 alpha était inexistante, négligeable ou faible. Cela suggère que la RPNR au cours de la carcinogénèse colique est peut-être un phénomène partiellement indépendant du microenvironnement tumoral.

L'ensemble de ces données laisse à penser que la restauration de la boucle de rétrocontrôle favorisant la mort cellulaire via CHOP et GADD34 pourrait entraver le processus malin, et qu'une molécule ayant une telle propriété, éventuellement associée à un agent favorisant le stress du RE, pourrait s'avérer être un traitement efficace de l'adénocarcinome colorectal.

## **BIBLIOGRAPHIE :**

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. déc 2010;127(12):2893-917.
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. avr 2013;49(6):1374-403.
3. Institut National du Cancer. Les Cancers en France - Édition 2013 [Internet]. Institut National du Cancer; 2014. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/publications/69-epidemiologie/758-les-cancers-en-france-edition-2013>
4. Organization WH. WHO Classification of Tumours of the Digestive System - 4ième édition. 2010.
5. Morson BC, Whiteway JE, Jones EA, Macrae FA, Williams : CB. Histopathology and prognosis of malignant colorectal polyps treated by endoscopic polypectomy. *Gut*. mai 1984;25(5):437-44.
6. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol*. févr 2006;101(2):385-98.
7. Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Aretz S, Bernstein I, Bertario L, et al. Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut*. mai 2008;57(5):704-13.
8. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet*. févr 2002;30(2):227-32.
9. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol*. nov 1983;14(11):931-68.
10. Kühnel, Wolfgang. Atlas de poche d'Histologie. Flammarion, éditeur. 1997.
11. Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*. 30 oct 1987;37(2):147-51.
12. Caderni G, Bianchini F, Mancina A, Spagnesi MT, Dolara P. Effect of dietary carbohydrates on the growth of dysplastic crypt foci in the colon of rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res*. 15 juill 1991;51(14):3721-5.
13. Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jurcisek JA, et al. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res*. 1 mars 1991;51(5):1564-7.
14. Otori K, Sugiyama K, Hasebe T, Fukushima S, Esumi H. Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation. *Cancer Res*. 1 nov 1995;55(21):4743-6.



15. Nucci MR, Robinson CR, Longo P, Campbell P, Hamilton SR. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum Pathol.* déc 1997;28(12):1396-1407.
16. Kudo S. Endoscopic mucosal resection of flat and depressed types of early colorectal cancer. *Endoscopy.* sept 1993;25(7):455-61.
17. Polyak K, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia. *Am J Pathol.* août 1996;149(2):381-387.
18. Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, et al. MOLECULAR DETERMINANTS OF DYSPLASIA IN COLORECTAL LESIONS. *Cancer Res.* 1 nov 1994;54(21):5523-5526.
19. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut.* août 2000;47(2):251-5.
20. Yoon H, Martin A, Benamouzig R, Longchamp E, Deyra J, Chaussade S, et al. [Inter-observer agreement on histological diagnosis of colorectal polyps: the APACC study]. *Gastroentérologie Clin Biol.* mars 2002;26(3):220-224.
21. Terry MB, Neugut AI, Bostick RM, Potter JD, Haile RW, Fenoglio-Preiser CM. Reliability in the classification of advanced colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* juill 2002;11(7):660-663.
22. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 17 déc 1998;396(6712):643-9.
23. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1 sept 1988;319(9):525-32.
24. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology.* sept 2005;129(3):837-45.
25. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1 mars 1997;57(5):808-811.
26. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 6 mars 2003;348(10):919-932.
27. Peltomäki P, de la Chapelle A. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Adv Cancer Res.* 1997;71:93-119.

28. Papadopoulos N, Lindblom A. Molecular basis of HNPCC: mutations of MMR genes. *Hum Mutat.* 1997;10(2):89-99.
29. Gething MJ, Sambrook J. PROTEIN FOLDING IN THE CELL. *Nature.* 2 janv 1992;355(6355):33-45.
30. Fewell SW, Travers KJ, Weissman JS, Brodsky JL. The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet.* 2001;35:149-191.
31. Dobson CM. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol.* févr 2004;15(1):3-16.
32. Hopfield JJ. KINETIC PROOFREADING - NEW MECHANISM FOR REDUCING ERRORS IN BIOSYNTHETIC PROCESSES REQUIRING HIGH SPECIFICITY. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(10):4135-4139.
33. Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ. PROTEIN DISSOCIATION FROM GRP78 AND SECRETION ARE BLOCKED BY DEPLETION OF CELLULAR ATP LEVELS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* oct 1990;87(19):7429-7432.
34. Zavialov AV, Ehrenberg M. Peptidyl-tRNA regulates the GTPase activity of translation factors. *Cell.* 11 juill 2003;114(1):113-122.
35. Blanchard SC, Gonzalez RL, Kim HD, Chu S, Puglisi JD. tRNA selection and kinetic proofreading in translation. *Nat Struct Mol Biol.* oct 2004;11(10):1008-1014.
36. Dever TE, Feng L, Wek RC, Cigan AM, Donahue TF, Hinnebusch AG. Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell.* 7 févr 1992;68(3):585-596.
37. Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC. Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 sept 1996;93(18):9493-9498.
38. Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, et al. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 alpha. *Mol Cell Biol.* nov 2002;22(21):7405-7416.
39. Bi M, Naczki C, Koritzinsky M, Fels D, Blais J, Hu N, et al. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and. *Embo J.* 5 oct 2005;24(19):3470-81.
40. Feldman DE, Chauhan V, Koong AC. The unfolded protein response: A novel component of the hypoxic stress response in tumors. *Mol Cancer Res.* nov 2005;3(11):597-605.
41. Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-related proteins. *Nature.* 31 mars 1988;332(6163):462-464.

42. Wong WL, Brostrom MA, Kuznetsov G, Gmitteryellen D, Brostrom CO. INHIBITION OF PROTEIN-SYNTHESIS AND EARLY PROTEIN PROCESSING BY THAPSIGARGIN IN CULTURED-CELLS. *Biochem J.* 1 janv 1993;289:71-79.
43. Harding HP, Zhang YH, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 21 janv 1999;397(6716):271-274.
44. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell.* 28 avr 2000;101(3):249-258.
45. Larsson O, Carlberg M, Zetterberg A. Selective killing induced by an inhibitor of N-linked glycosylation. *J Cell Sci.* sept 1993;106 ( Pt 1):299-307.
46. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 6 janv 2000;403(6765):98-103.
47. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: A control point for apoptosis. *Science.* 4 avr 2003;300(5616):135-139.
48. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* United States; 2004. p. 3066-77.
49. Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science.* 9 nov 2007;318(5852):944-949.
50. Bertolotti A, Zhang YH, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* juin 2000;2(6):326-332.
51. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell.* déc 2000;6(6):1355-1364.
52. Bole DG, Hendershot LM, Kearney JF. POSTTRANSLATIONAL ASSOCIATION OF IMMUNOGLOBULIN HEAVY-CHAIN BINDING-PROTEIN WITH NASCENT HEAVY-CHAINS IN NONSECRETING AND SECRETING HYBRIDOMAS. *J Cell Biol.* mai 1986;102(5):1558-1566.
53. Munro S, Pelham HRB. AN HSP70-LIKE PROTEIN IN THE ER - IDENTITY WITH THE 78 KD GLUCOSE-REGULATED PROTEIN AND IMMUNOGLOBULIN HEAVY-CHAIN BINDING-PROTEIN. *Cell.* 18 juill 1986;46(2):291-300.
54. Dorner AJ, Bole DG, Kaufman RJ. THE RELATIONSHIP OF N-LINKED GLYCOSYLATION AND HEAVY-CHAIN BINDING-PROTEIN ASSOCIATION WITH THE SECRETION OF GLYCOPROTEINS. *J Cell Biol.* déc 1987;105(6):2665-2674.

55. Machamer CE, Doms RW, Bole DG, Helenius A, Rose JK. HEAVY-CHAIN BINDING-PROTEIN RECOGNIZES INCOMPLETELY DISULFIDE-BONDED FORMS OF VESICULAR STOMATITIS VIRUS-G PROTEIN. *J Biol Chem.* 25 avr 1990;265(12):6879-6883.
56. Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE. PEPTIDE-BINDING SPECIFICITY OF THE MOLECULAR CHAPERONE BIP. *Nature.* 24 oct 1991;353(6346):726-730.
57. Blondelguindi S, Cwirla SE, Dower WJ, Lipshutz RJ, Sprang SR, Sambrook JF, et al. AFFINITY PANNING OF A LIBRARY OF PEPTIDES DISPLAYED ON BACTERIOPHAGES REVEALS THE BINDING-SPECIFICITY OF BIP. *Cell.* 19 nov 1993;75(4):717-728.
58. Okamura K, Kimata Y, Higashio H, Tsuru A, Kohno K. Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* 20 déc 2000;279(2):445-450.
59. Liu CY, Xu ZH, Kaufman RJ. Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1 alpha. *J Biol Chem.* 16 mai 2003;278(20):17680-17687.
60. Credle JJ, Finer-Moore JS, Papa FR, Stroud RM, Walter P. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 déc 2005;102(52):18773-18784.
61. Mori K, Ma WZ, Gething MJ, Sambrook J. A TRANSMEMBRANE PROTEIN WITH A CDC2+/CDC28-RELATED KINASE-ACTIVITY IS REQUIRED FOR SIGNALING FROM THE ER TO THE NUCLEUS. *Cell.* 27 août 1993;74(4):743-756.
62. Shamu CE, Walter P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Embo J.* 17 juin 1996;15(12):3028-3039.
63. Sidrauski C, Walter P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell.* 19 sept 1997;90(6):1031-1039.
64. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 28 déc 2001;107(7):881-891.
65. Yoshida H, Oku M, Suzuki M, Mori K. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J Cell Biol.* 13 févr 2006;172(4):565-575.
66. Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol.* 10 août 2009;186(3):323-331.

67. Marciniak SJ, Garcia-Bonilla L, Hu JJ, Harding HP, Ron D. Activation-dependent substrate recruitment by the eukaryotic translation initiation factor 2 kinase PERK. *J Cell Biol.* 16 janv 2006;172(2):201-209.
68. Shi YG, Vattem KM, Sood R, An J, Liang JD, Stramm L, et al. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol.* déc 1998;18(12):7499-7509.
69. Hinnebusch AG. Molecular Mechanism of Scanning and Start Codon Selection in Eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* sept 2011;75(3):434-467.
70. Merrick WC. MECHANISM AND REGULATION OF EUKARYOTIC PROTEIN-SYNTHESIS. *Microbiol Rev.* juin 1992;56(2):291-315.
71. Pavitt GD, Ramaiah KVA, Kimball SR, Hinnebusch AG. eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange. *Genes Dev.* 15 févr 1998;12(4):514-526.
72. Srivastava SP, Davies MV, Kaufman RJ. CALCIUM DEPLETION FROM THE ENDOPLASMIC-RETICULUM ACTIVATES THE DOUBLE-STRANDED RNA-DEPENDENT PROTEIN-KINASE (PKR) TO INHIBIT PROTEIN-SYNTHESIS. *J Biol Chem.* 14 juill 1995;270(28):16619-16624.
73. Harding HP, Novoa I, Zhang YH, Zeng HQ, Wek R, Schapira M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* nov 2000;6(5):1099-1108.
74. Scheuner D, Song BB, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell.* juin 2001;7(6):1165-1176.
75. Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 août 2004;101(31):11269-11274.
76. Lu PD, Harding HP, Ron D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol.* 11 oct 2004;167(1):27-33.
77. Harding HP, Zhang YH, Zeng HQ, Novoa I, Lu PD, Calton M, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* mars 2003;11(3):619-633.
78. Ma YJ, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol.* 17 mai 2002;318(5):1351-1365.
79. Novoa I, Zeng HQ, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 alpha. *J Cell Biol.* 28 mai 2001;153(5):1011-1021.

80. Ma YJ, Hendershot LM. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 12 sept 2003;278(37):34864-34873.
81. Zinszner H, Kuroda M, Wang XZ, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 1 avr 1998;12(7):982-995.
82. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2. *Mol Cell Biol.* févr 2001;21(4):1249-59.
83. Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the. *Proc Natl Acad Sci U A.* 11 sept 2001;98(19):10845-50.
84. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* nov 1999;10(11):3787-3799.
85. Wang Y, Shen JS, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ, Prywes R. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem.* 1 sept 2000;275(35):27013-27020.
86. Shen JS, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of golgi localization signals. *Dev Cell.* juill 2002;3(1):99-111.
87. Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, et al. ATF6 alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell.* sept 2007;13(3):351-364.
88. Gazit G, Lu J, Lee AS. De-regulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* mars 1999;54(2):135-46.
89. Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, Manning FCR, Tsangaris TN, Schwartz AM, et al. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res Treat.* janv 2000;59(1):15-26.
90. Ozawa K, Tsukamoto Y, Hori O, Kitao Y, Yanagi H, Stern DM, et al. Regulation of tumor angiogenesis by oxygen-regulated protein 150, an inducible endoplasmic reticulum chaperone. *Cancer Res.* 15 mai 2001;61(10):4206-13.
91. Song MS, Park YK, Lee JH, Park K. Induction of glucose-regulated protein 78 by chronic hypoxia in human gastric tumor cells through a protein kinase C-epsilon/ERK/AP-1 signaling cascade. *Cancer Res.* 15 nov 2001;61(22):8322-30.
92. Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, Tanaka K, Okada T, Mori K, et al. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible



- involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J Hepatol.* England; 2003. p. 605-14.
93. Chen X, Ding Y, Liu CG, Mikhail S, Yang CS. Overexpression of glucose-regulated protein 94 (Grp94) in esophageal adenocarcinomas of a rat surgical model and humans. *Carcinogenesis.* janv 2002;23(1):123-30.
  94. Xing XM, Lai MD, Wang YH, Xu EP, Huang Q. Overexpression of glucose-regulated protein 78 in colon cancer. *Clin Chim Acta.* févr 2006;364(1-2):308-315.
  95. Koumenis C, Wouters BG. « Translating » tumor hypoxia: Unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways. *Mol Cancer Res.* juill 2006;4(7):423-436.
  96. Jorgensen E, Stinson A, Shan L, Yang J, Gietl D, Albino AP. Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in normal and malignant human lung cells. *Bmc Cancer* [Internet]. 11 août 2008;8. Disponible sur: [://WOS:000259072000001](http://WOS:000259072000001)
  97. Lee E, Nichols P, Spicer D, Groshen S, Yu MC, Lee AS. GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res.* 15 août 2006;66(16):7849-7853.
  98. Daneshmand S, Quek ML, Lin E, Lee C, Cote RJ, Hawes D, et al. Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival. *Hum Pathol.* oct 2007;38(10):1547-1552.
  99. Zhang J, Jiang Y, Jia Z, Li Q, Gong W, Wang L, et al. Association of elevated GRP78 expression with increased lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer. *Clin Exp Metastasis.* déc 2006;23(7-8):401-410.
  100. Fu Y, Wey S, Wang M, Ye R, Liao C-P, Roy-Burman P, et al. Pten null prostate tumorigenesis and AKT activation are blocked by targeted knockout of ER chaperone GRP78/BiP in prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 déc 2008;105(49):19444-19449.
  101. Romero-Ramirez L, Cao H, Nelson D, Hammond E, Lee AH, Yoshida H, et al. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res. United States;* 2004. p. 5943-7.
  102. Blais JD, Addison CL, Edge R, Falls T, Zhao H, Wary K, et al. Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress. *Mol Cell Biol. United States;* 2006. p. 9517-32.
  103. Ye J, Kumanova M, Hart LS, Sloane K, Zhang H, De Panis DN, et al. The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J. England;* 2010. p. 2082-96.



104. Su ZZ, Emdad L, Sarkar D, Randolph A, Valerie K, Yacoub A, et al. Potential molecular mechanism for rodent tumorigenesis: mutational generation of Progression Elevated Gene-3 (PEG-3). *Oncogene*. 24 mars 2005;24(13):2247-55.
105. Dalton LE, Clarke HJ, Knight J, Lawson MH, Wason J, Lomas DA, et al. The endoplasmic reticulum stress marker CHOP predicts survival in malignant mesothelioma. *Br J Cancer*. 2013.
106. Spiotto MT, Banh A, Papandreou I, Cao H, Galvez MG, Gurtner GC, et al. Imaging the unfolded protein response in primary tumors reveals microenvironments with metabolic variations that predict tumor growth. *Cancer Res*. janv 2010;70(1):78-88.
107. Wang G, Yang ZQ, Zhang K. Endoplasmic reticulum stress response in cancer: molecular mechanism and. *Am J Transl Res*. 2010;2(1):65-74.
108. Papandreou I, Denko NC, Olson M, Van Melckebeke H, Lust S, Tam A, et al. Identification of an Ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood*. United States; 2011. p. 1311-4.
109. Mimura N, Fulciniti M, Gorgun G, Tai YT, Cirstea D, Santo L, et al. Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1alpha is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood*. United States; 2012. p. 5772-81.
110. Eroschenko VP, Fiore MSH. Di Fiore's atlas of histology with functional correlations. 10th ed. / Victor P. Eroschenko. Philadelphia, Pa. ; London: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
111. Farquhar MG, Palade GE. JUNCTIONAL COMPLEXES IN VARIOUS EPITHELIA. *J Cell Biol*. 1963;17(2):375-&.
112. Fu: CHS E, Weber K. INTERMEDIATE FILAMENTS - STRUCTURE, DYNAMICS, FUNCTION, AND DISEASE. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:345-382.
113. Ivaska J, Pallari H-M, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res*. 10 juin 2007;313(10):2050-2062.
114. Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn*. juill 2005;233(3):706-20.
115. Edelman GM, Gallin WJ, Delougee A, Cunningham BA, Thiery JP. EARLY EPOCHAL MAPS OF 2 DIFFERENT CELL-ADHESION MOLECULES. *Proc Natl Acad Sci U S Am-Biol Sci*. 1983;80(14):4384-4388.
116. Veltmaat JM, Orelia CC, Oostwaard DWV, Van Rooijen MA, Mummery CL, Defize LHK. Snail is an immediate early target gene of parathyroid hormone related peptide signaling in parietal endoderm formation. *Int J Dev Biol*. avr 2000;44(3):297-307.
117. Nakajima Y, Yamagishi T, Hokari S, Nakamura H. Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: Roles of transforming

- growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP). *Anat Rec.* 1 févr 2000;258(2):119-127.
118. Rivera-Feliciano J, Lee K-H, Kong SW, Rajagopal S, Ma Q, Springer Z, et al. Development of heart valves requires Gata4 expression in endothelial-derived cells. *Development.* 15 sept 2006;133(18):3607-3618.
  119. Fischer A, Steidl C, Wagner TU, Lang E, Jakob PM, Friedl P, et al. Combined loss of Hey1 and HeyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition. *Circ Res.* 30 mars 2007;100(6):856-863.
  120. Savagner P, Kusewitt DF, Carver EA, Magnino F, Choi C, Gridley T, et al. Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol.* mars 2005;202(3):858-66.
  121. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrío D, Locascio A, Cano A, Palacios J, et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene.* 9 mai 2002;21(20):3241-3246.
  122. Graham TR, Zhou HE, Odero-Marah VA, Osunkoya AO, Kimbro KS, Tighiouart M, et al. Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1 avr 2008;68(7):2479-2488.
  123. Gotzmann J, Fischer ANM, Zojer M, Mikula M, Proell V, Huber H, et al. A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene.* 25 mai 2006;25(22):3170-3185.
  124. Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liyanarac: HChi S, et al. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20 févr 2007;104(8):2803-2808.
  125. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 août 2001;98(18):10356-10361.
  126. Chung CH, Parker JS, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy BA, et al. Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappa B signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 15 août 2006;66(16):8210-8218.
  127. Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Perez-Gomez B, Palacios J, Pollan M, et al. A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res.* 1 avr 2007;67(7):3450-3460.
  128. Hagemann T, Bozanovic T, Hooper S, Ljubic A, Slettenaar VIF, Wilson JL, et al. Molecular profiling of cervical cancer progression. *Br J Cancer.* 29 janv 2007;96(2):321-328.

129. Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 1 déc 2007;13(23):7003-7011.
130. Ble: CHSchmidt K, Sassen S, Schmalfeldt B, Schuster T, Hoefler H, Becker KF. The E-cadherin repressor Snail is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients. *Br J Cancer.* 22 janv 2008;98(2):489-495.
131. Yang M-H, Chen C-L, Chau G-Y, Chiou S-H, Su C-W, Chou T-Y, et al. Comprehensive Analysis of the Independent Effect of Twist and Snail in Promoting Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology.* nov 2009;50(5):1464-1474.
132. Shioiri M, Shida T, Koda K, Oda K, Seike K, Nishimura M, et al. Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer.* 19 juin 2006;94(12):1816-1822.
133. Kato Y, Hirano T, Yoshida K, Yashima K, Akimoto S, Tsuji K, et al. Frequent loss of E-cadherin and/or catenins in intrabronchial lesions during carcinogenesis of the bronchial epithelium. *Lung Cancer.* juin 2005;48(3):323-330.
134. Shen J, Behrens C, Wistuba I, Feng L, Lee JJ, Hong WK, et al. Identification and validation of differences in protein levels in normal, premalignant, and malignant lung cells and tissues using high-throughput Western Array and immunohistochemistry. *Cancer Res. United States;* 2006. p. 11194-206.
135. Prudkin L, Liu DD, Ozburn NC, Sun M, Behrens C, Tang X, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in the development and progression of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol.* mai 2009;22(5):668-678.
136. Tellez CS, Juri DE, Do K, Bernauer AM, Thomas CL, Damiani LA, et al. EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic. *Cancer Res.* 15 avr 2011;71(8):3087-97.
137. Ulianich L, Garbi C, Treglia AS, Punzi D, Miele C, Raciti GA, et al. ER stress is associated with dedifferentiation and an epithelial-to-mesenchymal transition-like phenotype in PC Cl3 thyroid cells. *J Cell Sci.* févr 2008;121(Pt 4):477-86.
138. Zhong Q, Zhou B, Ann DK, Mino P, Liu Y, Banfalvi A, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal transition of. *Am J Respir Cell Mol Biol.* sept 2011;45(3):498-509.
139. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* juill 1998;4(7):844-847.
140. Association pour le Développement de l'Informatique en Cytologie et en Anatomie Pathologiques. Thésaurus de la codification ADICAP [Internet]. 2009 [cité 15 juill 2014]. Disponible sur: [http://medphar.univ-poitiers.fr/registre-cancers-poitou-charentes/documents\\_registre/adicap\\_version5\\_4\\_1\\_2009.pdf](http://medphar.univ-poitiers.fr/registre-cancers-poitou-charentes/documents_registre/adicap_version5_4_1_2009.pdf)

141. Urbaniak, G. C., & Plous, S. Research Randomizer (Version 4.0) [Internet]. 2013 [cité 15 juill 2014]. Disponible sur: <http://www.randomizer.org/>
142. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours, 7th Edition [Internet]. 7th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2010. Disponible sur: Publisher description <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0917/2009029889-d.html>
143. Nicolas Piton. Endoplasmic reticulum stress and the development of bronchial squamous cell carcinoma. [Cambridge, Royaume-Uni]: University of Cambridge; 2013.
144. Burnette WN. WESTERN BLOTTING - ELECTROPHORETIC TRANSFER OF PROTEINS FROM SODIUM DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GELS TO UNMODIFIED NITROCELLULOSE AND RADIOGRAPHIC DETECTION WITH ANTIBODY AND RADIOIODINATED PROTEIN-A. *Anal Biochem.* 1981;112(2):195-203.
145. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* févr 1998;11(2):155-168.
146. McLean RA, Sanders WL, Stroup WW. A unified approach to mixed linear models. *Am Stat.* févr 1991;45(1):54-64.
147. Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique UMR S 1136, affilié à l'INSERM et l'Université Pierre et Marie Curie. BiostaTGV - Statistiques en ligne [Internet]. [cité 15 juill 2014]. Disponible sur: <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/?module=tests/spearman>
148. Porter AM. Misuse of correlation and regression in three medical journals. *J R Soc Med.* mars 1999;92(3):123-128.
149. Hinkle DE, Wiersma W, Jurs SG. *Applied Statistics for the Behavioral Sciences.* 5 edition. Boston: Cengage Learning; 2002. 784 p.
150. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 15 janv 1983;31(1):13-20.
151. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer.* déc 2010;17(4):R245-62.
152. Lopez F, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P, et al. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry.* 1991;12(1):42-9.
153. Jones RL, Salter J, A'Hern R, Nerurkar A, Parton M, Reis-Filho JS, et al. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* juill 2009;116(1):53-68.
154. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* févr 2010;11(2):174-183.

155. Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003;19:207-35.
156. Christofori G. Changing neighbor: HBours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *Embo J.* 15 mai 2003;22(10):2318-23.
157. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Acad Sci.* avr 2004;1014:155-63.
158. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* juin 2007;7(6):415-28.
159. Roy N, Bommi PV, Bhat UG, Bhattacharjee S, Elangovan I, Li J, et al. DDB2 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colon cancer. *Cancer Res.* 15 juin 2013;73(12):3771-82.
160. Sharp FR, Bernaudin M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci.* juin 2004;5(6):437-48.
161. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6 juin 1995;92(12):5510-4.
162. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem.* 11 oct 2002;277(41):38205-11.
163. Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ.* juill 2001;12(7):363-9.
164. Okuda T, Azuma T, Ohtani M, Masaki R, Ito Y, Yamazaki Y, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor overexpression in ischemic colitis. *World J Gastroenterol.* 14 mars 2005;11(10):1535-9.
165. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol.* mars 2008;10(3):295-305.
166. Mak P, Leav I, Pursell B, Bae D, Yang X, Taglienti CA, et al. ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer Cell.* 13 avr 2010;17(4):319-32.
167. Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T, et al. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol.* oct 2003;163(4):1437-47.
168. Hollander MC, Zhan QM, Bae I, Fornace AJ. Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene. *J Biol Chem.* 23 mai 1997;272(21):13731-13737.

169. Adler HT, Chinery R, Wu DY, Kussick SJ, Payne JM, Fornace AJ, et al. Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins. *Mol Cell Biol.* oct 1999;19(10):7050-7060.
170. Minami K, Inoue H, Terashita T, Kawakami T, Watanabe R, Haneda M, et al. GADD34 induces p21 expression and cellular senescence. *Oncol Rep.* juin 2007;17(6):1481-1485.
171. Tanaka C, Ito S, Nishio N, Kodera Y, Sakurai H, Suzuki H, et al. GADD34 suppresses wound healing by upregulating expression of myosin IIA. *Transgenic Res.* août 2010;19(4):637-645.
172. Knudson AG. MUTATION AND CANCER - STATISTICAL STUDY OF RETINOBLASTOMA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(4):820-&.
173. Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ. The murine gene p27(Kip1) is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature.* 12 nov 1998;396(6707):177-180.
174. Willis A, Jung EJ, Wakefield T, Chen XB. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene.* 25 mars 2004;23(13):2330-2338.
175. Issa JP. Opinion - CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer.* déc 2004;4(12):988-993.
176. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* oct 2011;11(10):726-734.
177. Wang D, Qiu C, Zhang H, Wang J, Cui Q, Yin Y. Human MicroRNA Oncogenes and Tumor Suppressors Show Significantly Different Biological Patterns: From Functions to Targets. *Plos One* [Internet]. 30 sept 2010;5(9). Disponible sur: [://WOS:000282312600016](http://WOS:000282312600016)
178. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput A, Thiagalingam S, Lutterbaugh JD, et al. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* 15 janv 1999;59(2):320-324.
179. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 4 sept 1998;281(5382):1509-1512.
180. Dulak AM, Schumacher SE, van Lieshout J, Imamura Y, Fox C, Shim B, et al. Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis. *Cancer Res.* 1 sept 2012;72(17):4383-4393.
181. Clarke. The role of GADD34 in mesothelioma - First year PhD report. University of Cambridge; 2010.



182. Ilyas M, Grabsch H, Ellis IO, Womack C, Brown R, Berney D, et al. Guidelines and considerations for conducting experiments using tissue microarrays. *Histopathology*. mai 2013;62(6):827-39.
183. Glimelius B. Neo-adjuvant radiotherapy in rectal cancer. *World J Gastroenterol*. 14 déc 2013;19(46):8489-501.
184. Panganiban RA, Mungunsukh O, Day RM. X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells. *Int J Radiat Biol*. août 2013;89(8):656-67.
185. Zhang B, Wang Y, Pang X, Su Y, Ai G, Wang T. ER stress induced by ionising radiation in IEC-6 cells. *Int J Radiat Biol*. juin 2010;86(6):429-35.
186. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 19 juill 2012;487(7407):330-7.
187. Graham K, de las Morenas A, Tripathi A, King C, Kavanah M, Mendez J, et al. Gene expression in histologically normal epithelium from breast cancer patients and from cancer-free prophylactic mastectomy patients shares a similar profile. *Br J Cancer*. 13 avr 2010;102(8):1284-93.
188. Schmidt LH, Biesterfeld S, Kummel A, Faldum A, Sebastian M, Taube C, et al. Tissue microarrays are reliable tools for the clinicopathological characterization of lung cancer tissue. *Anticancer Res*. janv 2009;29(1):201-9.
189. Di Gregorio C, Losi L, Fante R, Modica S, Ghidoni M, Pedroni M, et al. Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology*. avr 1997;30(4):328-34.
190. Luporsi E, André F, Spyrtos F, Martin P-M, Jacquemier J, Penault-Llorca F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat*. avr 2012;132(3):895-915.
191. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast Edinb Scotl*. août 2008;17(4):323-334.
192. Mucci NR, Akdas G, Manely S, Rubin MA. Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: Evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol*. avr 2000;31(4):406-414.
193. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*. déc 2000;80(12):1943-1949.
194. Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Suess K, Wagner U, Forster T, et al. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol*. juill 2001;194(3):349-357.

195. Goldstein NS, Ferkowicz M, Odish E, Mani A, Hastah F. Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol.* juill 2003;120(1):86-92.
196. De Marzo AM, Fedor HH, Gage WR, Rubin MA. Inadequate formalin fixation decreases reliability of p27(Kip1) immunohistochemical staining: Probing optimal fixation time using high-density tissue microarrays. *Hum Pathol.* juill 2002;33(7):756-760.
197. Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, et al. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod Pathol.* nov 2009;22(11):1457-1467.
198. Fadhil W, Ilyas M. Immunostaining for mismatch repair (MMR) protein expression in colorectal cancer is better and easier to interpret when performed on diagnostic biopsies. *Histopathology.* mars 2012;60(4):653-655.
199. Mann GB, Fahey VD, Feleppa F, Buchanan MR. Reliance on hormone receptor assays of surgical specimens may compromise outcome in patients with breast cancer. *J Clin Oncol.* 1 août 2005;23(22):5148-5154.
200. Huang J, Qi R, Quackenbush J, Dauway E, Lazaridis E, Yeatman T. Effects of ischemia on gene expression. *J Surg Res.* août 2001;99(2):222-227.
201. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ Jr, Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood.* 15 juin 2006;107(12):4907-16.
202. Pitts TM, Morrow M, Kaufman SA, Tentler JJ, Eckhardt SG. Vorinostat and bortezomib exert synergistic antiproliferative and proapoptotic effects in colon cancer cell models. *Mol Cancer Ther.* févr 2009;8(2):342-9.
203. Voutsadakis IA, Patrikidou A, Tsapakidis K, Karagiannaki A, Hatzidaki E, Stathakis NE, et al. Additive inhibition of colorectal cancer cell lines by aspirin and bortezomib. *Int J Colorectal Dis.* juill 2010;25(7):795-804.
204. Mackay H, Hedley D, Major P, Townsley C, Mackenzie M, Vincent M, et al. A phase II trial with pharmacodynamic endpoints of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 1 août 2005;11(15):5526-33.
205. Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. Inhibition of eIF2alpha dephosphorylation maximizes bortezomib efficiency and eliminates quiescent multiple myeloma cells surviving proteasome inhibitor therapy. *Cancer Res.* 15 févr 2009;69(4):1545-52.



## RÉSUMÉ

Lorsque les protéines s'accumulent dans le réticulum endoplasmique (RE), en cas d'hypoxie ou de manque de nutriments, la cellule est dite en état de « stress du RE ». Ce stress déclenche la « réponse aux protéines non repliées » (RPNR) afin de restaurer l'équilibre entre les protéines mal ou non repliées et les protéines chaperonnes comme BiP. Cette RPNR est nécessaire pour la croissance de nombreux cancers solides, et un important stress du RE a été observé dans des tumeurs plus agressives. En cas de stress chronique du RE, des facteurs de transcription tels que CHOP ou GADD34 sont responsables de la mort cellulaire. Il a de plus été récemment montré que dans le mésothéliome, les tumeurs sarcomatoïdes, plus agressives, perdent l'expression de GADD34. L'adénocarcinome colique apparaît suite à des altérations progressives au sein de lésion pré-malignes. Notre but était de tester l'hypothèse selon laquelle le niveau d'expression des marqueurs de la réponse aux protéines non repliées (BiP, CHOP et GADD34) est corrélée à une progression de ces lésions pré-malignes vers l'adénocarcinome colique invasif.

Quatre-vingt-un patients présentant des adénomes ou des adénocarcinomes coliques ont été sélectionnés par tirage au sort à partir des données du laboratoire de Pathologie du CHU de Rouen sur la période s'étendant du 01/01/2003 au 01/01/2013. L'expression de BiP, CHOP et GADD34 a été estimée par marquage immunohistochimique sur des micromatrices tissulaires confectionnées à partir d'échantillons tissulaires coliques fixés au formol et inclus en paraffine correspondant à de l'épithélium colique normal (n = 117), des adénomes coliques en dysplasie de bas grade (n = 86), des adénomes coliques en dysplasie de haut grade (n = 62), des adénocarcinomes coliques invasifs (n = 175) et des métastases ganglionnaires d'adénocarcinomes coliques (n = 6). Nous avons utilisé comme témoin positif des cellules de la lignée A549 traitées avec la tunicamycine (agent chimique induisant un stress du réticulum endoplasmique).

Nous avons observé qu'alors que l'épithélium colique se transforme en adénome puis en adénocarcinome, l'expression de BiP augmente significativement ( $p < 0,001$ ), alors que l'expression de CHOP et de GADD34 s'atténue progressivement ( $p < 0,001$ ).

Nous avons identifié une relation positive entre l'expression de BiP et la carcinogénèse colique, et une relation négative pour l'expression de CHOP et GADD34. Ces constatations sont en accord avec un modèle dans lequel le stress du RE accompagne la transformation maligne et où la perte de protéines qui induisent la toxicité d'un stress chronique du RE, comme GADD34, facilite la cancérogénèse. Ceci soulève la possibilité que la restauration de la fonction de GADD34 pourrait entraver le processus malin.

Mots clés : stress du réticulum endoplasmique, réponse aux protéines non repliées, carcinogénèse colique, BiP, CHOP, GADD34