



HAL
open science

Contribution à l'étude du stress dicarbone au cours de la progression cancéreuse et métastatique dans le cas du cancer colorectal KRAS muté

Valentin Platel

► **To cite this version:**

Valentin Platel. Contribution à l'étude du stress dicarbone au cours de la progression cancéreuse et métastatique dans le cas du cancer colorectal KRAS muté. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03108709

HAL Id: dumas-03108709

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03108709>

Submitted on 13 Jan 2021

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.



THESE

Pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Contribution à l'étude du stress dicarbonyle
au cours de la progression cancéreuse et métastatique
dans le cas du cancer colorectal KRAS muté**

**Présentée par
Valentin PLATEL**

**Soutenue publiquement le 19/10/2020
devant le jury composé de**

Madame Véronique ANDRE	Maître de Conférence des Université-HDR / Université de Caen Normandie	Présidente du jury
Madame Marie VILLEDIEU	Maître de Conférence des Université -HDR / Université de Caen Normandie	Directrice de thèse
Monsieur Michel BOULOUARD	Professeur des Université / Université de Caen Normandie	Examineur
Monsieur / Louis-Bastien WEISWALD	Post-Doctorant / Université de Caen Normandie	Examineur

Thèse dirigée par Marie VILLEDIEU

LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs
Professeur Pascale SCHUMANN-BARD
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative
Madame Sarah CHEMTOB

Directrice administrative adjointe
Madame Emmanuelle BOURDON

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
ROCHAIS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique – HDR	Biochimie, Toxicologie
BOUET Valentine – HDR	Physiologie, Pharmacologie
CAILLY Thomas – HDR	Chimie bio-inorganique, Chimie organique
DENOYELLE Christophe – HDR	Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
DHALLUIN Anne	Bactériologie, Virologie, Immunologie
ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR	Parasitologie, Mycologie médicale
GROO Anne-Claire	Pharmacie galénique
KIEFFER Charline	Chimie médicinale

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) – HDR	Biologie clinique
LAPORTE-WOJCIK Catherine	Chimie bio-inorganique
LEBAILLY Pierre – HDR	Santé publique
LECHEVREL Mathilde – HDR	Toxicologie
LEGER Marianne	Physiologie, Pharmacologie
LEPAILLEUR Alban – HDR	Modélisation moléculaire
N'DIAYE Monique	Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique
PAIZANIS Eleni	Physiologie, Pharmacologie
PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima	Chimie organique et thérapeutique
POTTIER Ivannah	Chimie et toxicologie analytiques
PREVOST Virginie – HDR	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
QUINTIN Jérôme	Pharmacognosie
RIOULT Jean-Philippe	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
SINCE Marc	Chimie analytique
VILLEDIEU Marie – HDR	Biologie et thérapies innovantes des cancers

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

PRICOT Sophie..... Anglais

PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume Pharmacie clinique

SEDILLO Patrick..... Pharmacie officinale

RICHARD Estelle Pharmacie officinale

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

JOURDAN Jean-Pierre

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Remerciements

J'adresse, en premier lieu, mes sincères remerciements au **Dr. Marie Villedieu** pour avoir acceptée de superviser l'écriture de ce manuscrit ainsi que le **Pr. Véronique André** pour avoir acceptée d'être ma présidente de jury.

Je remercie également le **Pr. Michel Boulouard** et le **Dr. Louis-Bastien Weiswald** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement **Pr. Vincent Castronovo** pour m'avoir permis de réaliser mon stage au sein du Laboratoire de Recherche sur les Métastases. Votre exigence et votre rigueur sont des modèles pour tout futur chercheur.

Je remercie également sincèrement le **Dr. Akeila Bellahcène** pour son encadrement au quotidien. Nos discussions ont toujours été stimulantes, et vous avez su me motiver à poursuivre dans cette voie.

Je tiens également à remercier les doctorants du laboratoire. Tout particulièrement à **Justine Bellier** pour son encadrement en début de stage, ainsi que pour sa patience et ses conseils tout le long de ces six mois. Également un grand merci à **Assia Tiamiou** pour son accompagnement et ses conseils qui auront été d'une grande pertinence tout du long.

J'adresse des remerciements tous particuliers à l'ensemble des enseignants de l'UFR santé de Caen pour ces six années d'apprentissages et de découvertes qui m'ont permis de me construire.

Remerciements particuliers à notre doyen le **Pr. Michel Boulouard**.

Un très grand merci à **Johanna Giovannini**, ma comparse de recherche. Nos échanges auront été d'un grand soutien pendant cette période intense. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Mes pensées les plus affectueusement ainsi que toute ma gratitude vont à **mes Parents** sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir toujours poussé à aller jusqu'au bout et de m'avoir encouragé à croire en mes capacités

Un ultime merci à « toute la bande » **Castiel Garaud ; Natacha Huet ; Cédric Pez ; Marion Touzeau ; Guillaume Wagner**. Vous donnez du sens à chaque pas fait en avant. Je vous dois plus que vous ne l'imaginez sans doute, merci d'être là, merci d'être vous-même. Un merci bien particulier à **Edouard Gravier**, mon frère, toujours là depuis le début.

Table des matières

PARTIE I.....	3
I. Introduction	10
1. Contexte et structure d'accueil	10
2. Introduction thématique	10
II. Rappels anatomiques.....	11
3. Anatomie du côlon	11
a. Morphologie externe.....	11
b. Morphologie interne.....	13
4. Anatomie du rectum	14
a. Morphologie externe.....	14
b. Morphologie interne.....	16
III. Epidémiologie du cancer colorectal	16
IV. Cancer Colorectal.....	18
V. Prévention et dépistage.....	20
1. Prévention primaire	20
2. Prévention secondaire	20
a. Les tests biologiques.....	22
b. Les explorations d'imagerie.....	28
VI. L'arsenal thérapeutique des CCR :.....	33
1. La chirurgie	33
a. La chirurgie des CCR Loco-régionaux.....	33
a. La chirurgie des CCR métastatiques	35
2. La radiothérapie.....	35
a. La radiothérapie dans le CCR.....	35
b. La radiothérapie des CCR métastatiques	36
3. La chimiothérapie.....	36

a.	Liste des médicaments et classes thérapeutiques	36
b.	Implication de la chimiothérapie dans les protocoles de soin du CCR.....	38
a.	La chimiothérapie des CCR métastatiques	43
4.	Les thérapies ciblées.....	43
a.	Les molécules	43
b.	Implication dans la thérapeutique	44
PARTIE II		46
I.	Cancer colorectal et métabolisme	47
1.	La mutation <i>KRAS</i> dans le CCR.....	47
2.	Métabolisme du cancer.....	49
a)	Métabolisme énergétique	49
b)	L'effet Warburg	50
c)	Régulation de la reprogrammation métabolique par les oncogènes	53
3.	Le méthylglyoxal.....	55
a)	Origine et caractéristiques chimiques	55
b)	Le stress dicarbone.....	57
c)	Détoxification du MG	60
d)	« MG scavenger »	62
4.	Stress dicarbone et cancer	63
a)	Le MG comme facteur anti-tumoral	63
b)	Le MG comme facteur pro-tumoral	64
c)	Le MG : un facteur hormétique.....	65
5.	Objectifs du stage de Master 2	66
II.	Matériel et Méthode :	67
1.	Culture cellulaire et traitement	67
2.	Détermination de l'IC50 au MG	67
3.	Extraction d'ARN et qRT-PCR.....	67

4. Western Blot.....	68
5. Mesure de l'activité de Glo1	69
6. Dosage du L-Lactate	69
III. Résultats	70
1. Étude du profil glycolytique.....	70
2. Étude de la tolérance au MG des différentes lignées du cancer du côlon.	71
3. Étude des effets du MG sur la formation d'adduits protéiques.....	72
4. Étude de l'expression de Glo1 en réponse à un traitement au MG.....	73
a) Analyse de l'expression du transcrit de Glo1	73
b) Analyse de l'expression protéique de Glo1	74
5. Étude de l'activité enzymatique de Glo1 en réponse à un traitement au MG.....	75
IV. Discussion et perspectives.....	76
V. Références	83

Abréviation	Définition
2-DG	2-déoxy-glucose
3-DG	3-déoxy-glucose
5-FU	5-fluoro-uracile
ArgPyr	aldéhydes réductases
AKRIB	adhéydes-réductases
ALDH	adlo-kéto-réductases
acétoyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide désocyribonucléique complémentaire
AGEs	"Advanced Glycation End products"
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
APC	"Adenomatous Polyposis Coli"
ATCC	American Type Cunture Collection
ATP	Adénosine triphosphate
BBGC	S-p-bromobenzylglutathion Cyclopentyl Diester
BCA	"BiCinchoninic acid Assay"
β -actine	Gène codant l'actine
CAM	"Chicken Chorioallantoic membrane"
CCR	Cancer colorectal
CEL	N ϵ -(carboxyethyl)lysine
CO ₂	Dioxyde de carbone
DACH	1,2 diaminocyclohexane
DC	Double contraste
DFS	"Disease Free Survival"
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle medium"
Dnase I	désoxyribonucléase I
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
ECL	"Enhanced Chemiluminescent"
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EGFR	"Epithelial Growth Factor"
FBS	"Fetal Bovin Serum"
FCCP	Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FdUMP	5-fluorodéoxyuridine 5'-monophosphate
FIT	"Fecal immunochemical Testing"
FOBT	"Fecal Occult Blood Test"
FOLFIRI	Irinotécan+5-fluoro-uracile +Acide folinique
FOLFOX4	5-fluoro-uracile+Oxaliplatine+Acide folinique
FOLFOXIRI	Irinotécan+Oxaliplatine+5-fluoro-uracile +Acide folinique
FPGS	Folyl-Polyglutamate-Synthétase
GAP	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GAPDH	Glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase
GDP	Guanosine Diphosphate

gFOBT	guaiac "Fecal Occult Blood Test"
Glo1/2	Glyoxalase 1/2
GO	Glyoxal
GTP	Guanosine Triphosphate
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion disulfide
HIF-1α	gène codant pour "Hypoxia inductible factor-1 alpha"
HK2	Hexokinase 2
HDP27	"Heat shock protein 27"
HDP90	"Heat shock protein 90"
IC50	Dose inhibitrice 50
KRAS	"V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog"
LDH	Lactate Déshydrogénase
LV5FU2	5-fluoro-uracile+Acide folinique
M2-PK	M2-Pyruvate Kinase
mARN	ARN messenger
MAPK	"mitogen-activated protein kinase"
Mbo	Methyl diaminobenzene-BODIPY
MCT	"Monocarboxylate transporter"
MDR	Multi Drug Resistance
MEC	Matrice Extracellulaire
MG	Methylglyoxal
MGH-1	Hydroimidazolones
MMR	"MisMatch Repair"
MODIC	Methylglyoxal-derived imidazolium cross-link
MOLD	1,3-di(N ϵ -lysino)-4-methyl-imidazolium
mTORC1	Gène codant pour l'enzyme "mammalian target of ranpamycin 1"
NaCl	Chlorure de Sodium
NAD	Nicotinamide adenine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NRS	"Nitrogen Reactive Species"
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P53	gène codant pour la "Tumor protein 53"
PBS	"Phosphate buffered saline"
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
PDH	Pyruvate Déshydrogénase
PDK	Pyruvate Kinase Déshydrogénase
PFS	"Prgression Free Survival"
PGC-1α	"peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha"
PI3K	"Phosphatidylinositide 3-kinases"
PVDF	polyfluorure de vinylidène
RAS	gène codant pour la protéine "rat sarcoma"
rédox	statut oxydatif
RIPA	"RadioImmunoprecipitation Assay Buffer"
ROS	"Reactive Oxygen species"
RT	"Reverse transcription"
RT-PCR	"Reverse transcription-polymerase chain reaction"
sDNA	"stoolDNA"
SDS	Sodium DodecylSulfate
SDS-PAGE	"S sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"
SVF	Serum de veau fœtal
TBS-T	"Tris Buffired Saline-Tween"
THF	tétrahydropyrimidines
ThyPase	Thymidine-Phosphorylase
TNM	"Tumor Node Metastasis"
TS	Thymidilate-Synthétase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Liste des Figures et Tableaux

- Figure 1 : côlon
- Figure 2 : Coupes histologiques de la muqueuse colique normale
- Figure 3 : Anatomie du rectum et du canal anal
- Figure 4 : Incidence du cancer colorectal dans le monde selon la région et le sexe
- Tableau I TNM classification des cancers colorectaux
- Figure 5 : Schéma décisionnel de prise en charge du cancer du côlon
- Figure 6 : Schéma décisionnel de prise en charge du cancer du rectum
- Tableau II : Les principaux outils de dépistage du CCR
- Tableau II : Protocoles de chimiothérapies adjuvantes employées dans le traitement du CCR
- Figure 7 : Répartition des différentes mutations somatiques dans le cancer colorectal et des différents isotypes de KRAS
- Figure 8 : La voie de signalisation Ras
- Figure 9 : Métabolisme énergétique physiologique et effet Warburg
- Figure 10 : La glycolyse, source de précurseurs anaboliques
- Figure 11 : Production de ROS par la mitochondrie et détoxification
- Figure 12 : Déterminants du phénotype métabolique des tumeurs
- Figure 13 : Structure chimique du méthylglyoxal
- Figure 14 : Voies de production du méthylglyoxal
- Figure 15 : Implication du stress dicarbone dans des pathologies chroniques
- Figure 16 : Glycation des protéines par la réaction de Maillard
- Figure 17 : MG-AGEs, adduits du méthylglyoxal sur les acides aminés
- Figure 18 : Principales voies de détoxification du méthylglyoxal
- Figure 19 : Structure chimique de la carnosine et de la metformine, deux molécules capables de capturer le MG ou « MG scavengers »
- Figure 20 : Effet hormétique du stress dicarbone
- Tableau IV : Liste des amorces utilisées pour la PCR à temps réel
- Tableau V : Liste des anticorps utilisés pour les expériences de western-blot
- Figure 21 : Dosage du L-Lactate dans les lignées cellulaires de CCR SW480, HCT116 et Lovo
- Figure 22 : Détermination de l'IC50 au MG des lignées cellulaires de CCR SW480, HCT116 et Lovo
- Figure 23 : Etude de la formation des adduits dépendant du MG dans les lignées cellulaires de CCR SW480, HCT116 et Lovo après traitement au MG par western-blot
- Figure 24 : Etude de l'effet du traitement au MG sur la transcription de l'ARNm de Glo1 dans les lignées SW480, les HCT116 et les Lovo
- Figure 25 : Etude de l'effet du traitement au MG sur l'expression protéique de Glo1 dans les SW480, les HCT116 et les Lovo
- Figure 26 : Etude de l'activité enzymatique de Glo1 dans les SW480, les HCT116 et les Lovo après traitement au MG pendant 6h

PARTIE I

I. Introduction

1. Contexte et structure d'accueil

Ma thèse d'exercice est en partie basée sur le travail que j'ai réalisé au cours de mon stage de Master 2 que j'ai effectué au sein du laboratoire de Recherche sur les Métastases dirigé par le Pr. Vincent Castronovo (MD, PhD) et qui dépend de la Faculté de médecine de l'Université de Liège, en Belgique. Le laboratoire fait partie d'un ensemble de structures regroupées sous le nom de Grappe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée (GIGA), qui elle-même se divise en plusieurs sous-unités de recherche thématique telles que le GIGA-Cancer dont fait partie le LRM. Le laboratoire étudie les mécanismes moléculaires impliqués dans la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Plus récemment, le Laboratoire a contribué à l'étude de l'implication du stress dicarbone dans ces processus. Une autre thématique d'intérêt pour le Laboratoire consiste en la recherche de nouveaux biomarqueurs permettant le ciblage thérapeutique. C'est au cours de ce stage que j'ai réellement pu faire mes armes sur des notions de biologies avancées, ainsi que sur le travail de recherche au quotidien. Si l'exigence et la philosophie du laboratoire ne me laissera pas un souvenir impérissable, l'expérience que j'ai tiré de ses 6 mois de stage aura été déterminante pour acquérir le savoir-faire (notamment technique) que je pratique aujourd'hui dans le cadre de ma thèse de sciences à la faculté d'Angers et qui a pour thème « Innovation dans la thérapeutique du mélanome, implication de la NADPH oxydase 4 dans le microenvironnement tumoral ». Si on passe du cancer colorectal au mélanome et du stress dicarbone au stress oxydant, les thématiques restent proches et les savoirs acquis pendant ce stage de Master m'ont permis d'aborder le défi que représente cette thèse de façon plus sereine.

2. Introduction thématique

Aujourd'hui, le cancer devrait se classer comme la principale source de décès et la cause la plus importante d'absence d'augmentation de l'espérance de vie dans tous les pays du monde au 21^{ème} siècle. Selon les estimations de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en 2015, le cancer était la première ou deuxième (selon le sexe) cause de décès avant 70 ans dans 91 pays sur 172, et se classe troisième ou quatrième dans 22 autres. Parmi l'ensemble des cancers, le cancer colorectal (CCR) constitue un modèle particulièrement intéressant. En effet il est depuis longtemps établi que son incidence est étroitement liée à l'hygiène de vie. On constate ainsi une incidence largement supérieure dans les pays développés, et qui tend à augmenter dans les pays en transition économique. Ces facteurs de risque, associés à l'âge comme facteur de risque

principal ont conduit de nombreux pays à instaurer un dépistage systématique pour le CCR, en faisant un bon sujet d'étude de l'impact de la prévention sur l'incidence de la maladie.

En parallèle, le CCR fait partie des cancers pour lesquels ont été développés un certain nombre de thérapies ciblées, ouvrant de nouvelles perspectives dans le traitement de ces pathologies. Les inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) en sont un exemple majeur. Malheureusement, ces thérapies se sont heurtées à l'émergence de résistances ainsi qu'à des écueils comme la mutation KRAS en aval de l'EGFR qui rend la thérapie inefficace. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques constitue donc un enjeu majeur. Dans ce contexte, la compréhension du métabolisme particulier des cellules cancéreuses ainsi que des différents stress présents dans le microenvironnement tumoral (comme le stress dicarbone) apparaît être une piste prometteuse.

Ce document s'articulera donc autour de deux grandes parties. La première se consacrera à décrire le CCR, son épidémiologie, sa clinique et les différentes stratégies médicamenteuses ou non mises en œuvre pour le combattre. La deuxième partie se focalisera sur l'étude du métabolisme tumoral, et plus précisément de la place du stress dicarbone dans ce dernier, et intégrera les travaux de recherche réalisés au sein du laboratoire de Recherche sur les Métastases (LRM) dans le cadre de mon stage de Master 2, et portant sur l'impact du stress dicarbone (notamment médié par le méthylglyoxal) sur le développement des CCR KRAS mutés.

II. **Rappels anatomiques**

3. Anatomie du côlon

a. **Morphologie externe**

Le côlon forme un cadre qui entoure le jéjunum et l'iléon. Commencant dans la fosse iliaque droite par le cæcum et l'appendice, il se poursuit par le côlon ascendant, qui va du flanc droit à l'hypochondre droit. Juste sous le foie, il tourne vers la gauche, formant l'angle colique droit (angle hépatique), puis traverse l'abdomen jusqu'à l'hypochondre gauche, devenant le côlon transverse. À ce niveau, juste sous la rate, le côlon tourne vers le bas, formant l'angle colique gauche (angle splénique, plus haut que l'angle droit) et se poursuit par le côlon descendant à travers le flanc gauche jusqu'à la fosse iliaque gauche. Il devient le côlon sigmoïde et pénètre dans la partie supérieure de la cavité pelvienne, puis se prolonge le long de la paroi postérieure du pelvis par le rectum (**figure 1**).

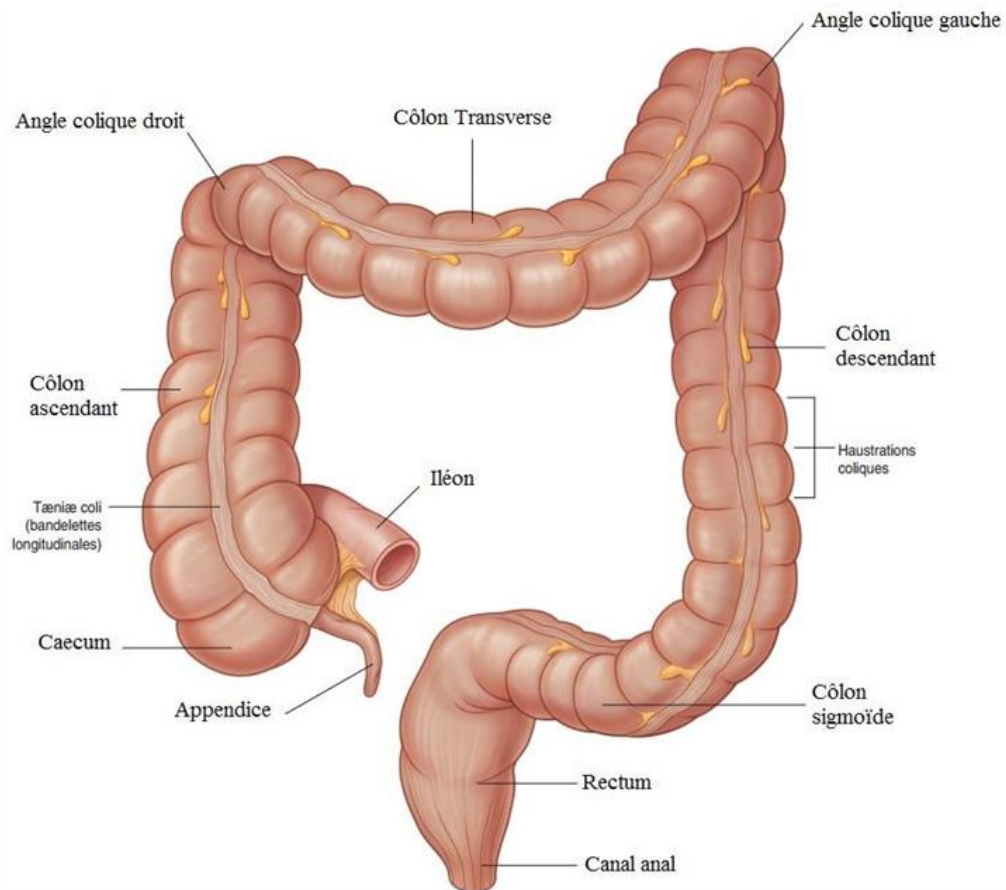


Figure 1 : côlon

Source : *Gray's Anatomie pour les étudiants*, Richard L. Drake (traduit de Drake, Vogl, Mitchell, *Gray's Anatomy for Students*, 2nd ed, 978044306952). Elsevier Masson, 2e édition, 2011. Figure 4.74

b. Morphologie interne

Contrairement à ce qui est observé dans l'intestin grêle, il n'y a pas de dispositifs d'amplification de surface dans le côlon. La couche longitudinale externe de la musculature a la particularité d'être discontinue et d'être composée de trois bandes épaisses, les Tænia coli, alors qu'entre ces bandes, la musculature longitudinale est quasi inexistante, seulement réduite à quelques fibres. Ces trois bandes, équidistantes, existent du cæcum jusqu'à la charnière rectosigmoïdienne. Elles fusionnent au niveau de cette charnière. La musculature circulaire, interne, comporte des épaississements réguliers (les haustra) qui délimitent ainsi, entre les bandelettes longitudinales, une succession de petites chambres séparées par les haustrations.

La paroi colique est constituée d'une muqueuse (épithélium, membrane basale, chorion, musculaire muqueuse), d'une sous-muqueuse, d'une musculature, et d'une sous-séreuse. La muqueuse colique (**figure 2**) ressemble à la muqueuse intestinale, mais n'a pas de villosités. Elle a uniquement des cryptes ou glandes de Lieberkühn. L'épithélium des cryptes est constitué principalement de cellules caliciformes (mucosécrétantes), de colonocytes (cellules absorbantes), et de rares cellules neuroendocrines. On trouve, à l'état normal, des lymphocytes (CD8+) au sein de l'épithélium de surface, dans une proportion inférieure à 10 lymphocytes pour 100 cellules épithéliales. Il y a quelques particularités histologiques en fonction des segments du côlon :

- On trouve des cellules de Paneth dans la base des cryptes seulement au niveau du côlon droit. Plus on progresse dans le côlon, plus il y a de cellules caliciformes et moins il y a de cellules absorbantes.

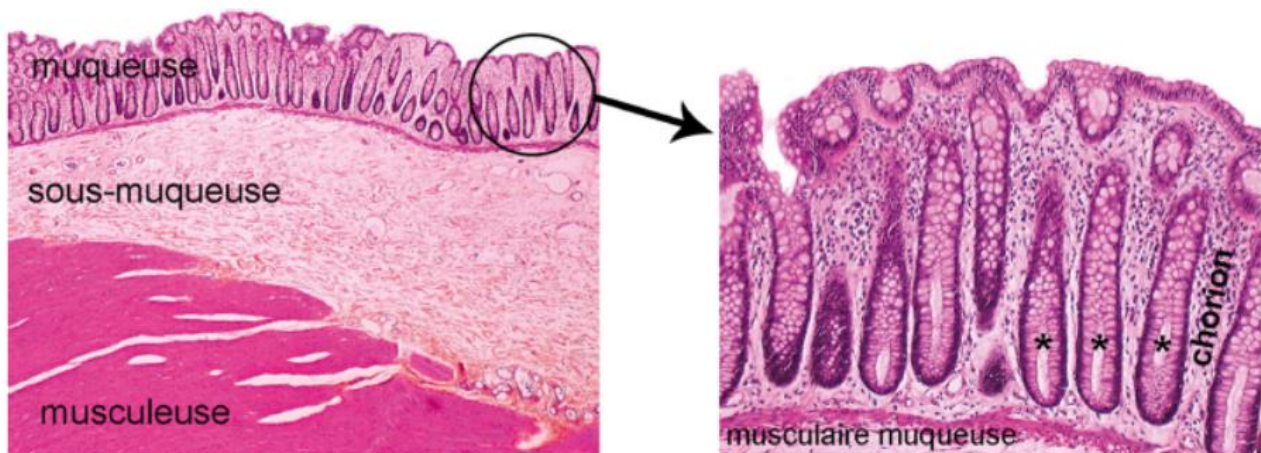


Figure 2 : Coupes histologiques de la muqueuse colique normale. Les astérisques représentent des glandes de Lieberkühn

Source : Dominique Wendum

- Le reste de la paroi ne présente pas de particularités. La couche longitudinale externe de la musculature est discontinue formant trois bandelettes épaisses (*Tænia coli*) reliées par de fins faisceaux musculaires longitudinaux.

4. Anatomie du rectum

a. Morphologie externe

Le rectum fait suite au côlon sigmoïde. Il est moulé sur la concavité sacrée, médian et globalement vertical dans un plan frontal d'où son nom (*rectum* en latin veut dire droit). Il commence en regard de S3, et est dépourvu de bandelette, d'haustration et d'appendice omental, ce qui le différencie du côlon. Long de 15 cm, le rectum a une partie supérieure recouverte de péritoine viscéral (partie péritonisée) et une partie non péritonisée (partie sous-péritonéale).

Le rectum peut être divisé en trois parties en fonction de la distance par rapport à la ligne pectinée (ou bord supérieur du sphincter) :

- le bas rectum, à moins de 2 cm du bord supérieur du sphincter, soit moins de 5 cm de la marge anale
- le moyen rectum, étendu de 2 à 7 cm du bord supérieur du sphincter, soit de 5 à 10 cm de la marge anale
- le haut rectum, étendu de 7 à 15 cm du bord supérieur du sphincter, soit de 10 à 18 cm de la marge anale.

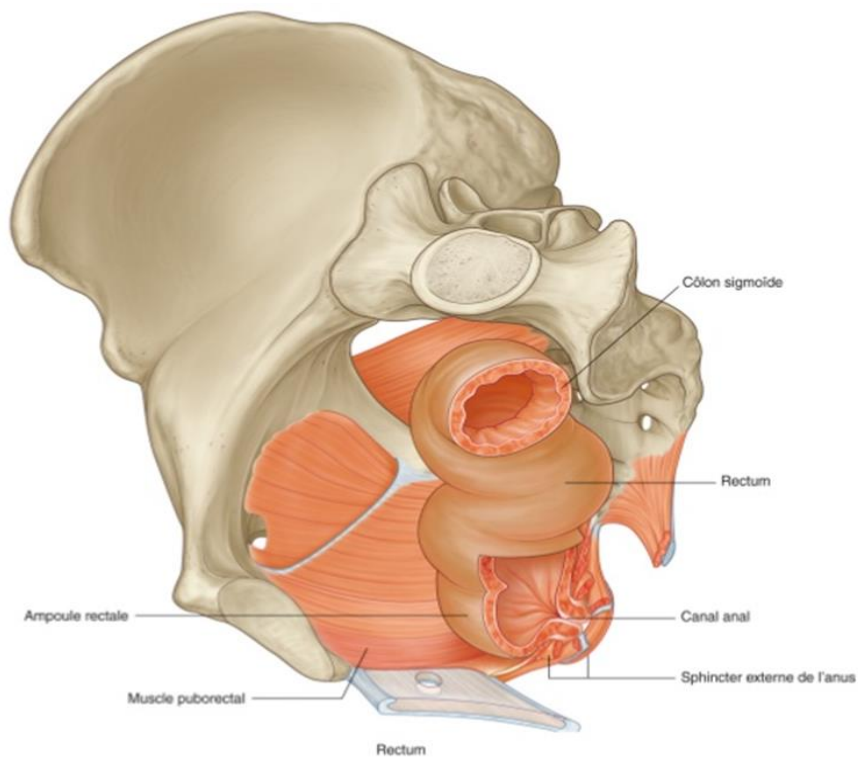
Dans le plan sagittal, le rectum et le canal anal forment deux courbures : une courbure sacrale (le rectum est plaqué contre le sacrum), et une courbure périnéale (ou cap anal), au niveau de laquelle le rectum se poursuit par le canal anal. La courbure périnéale fait un angle de 90° vers le bas et l'arrière et correspond au passage du rectum à travers le diaphragme pelvien. Le canal anal se dirige vers l'arrière lorsqu'il passe au-dessous du plancher pelvien (**figure 3 A**).

Le canal anal commence à la terminaison de l'ampoule rectale lorsqu'elle arrive au plancher pelvien. Le canal anal traverse le périnée sur une longueur de 3 à 4 cm et se termine par l'anus. Le canal anal est entouré sur toute sa longueur par deux sphincters, interne et externe (l'appareil sphinctérien), responsables de la continence anale.

La partie supérieure du canal anal est revêtue d'une muqueuse glandulaire identique à celle tapissant le rectum et se distingue par un certain nombre de plis orientés longitudinalement. Ceux-ci sont connus sous le nom de colonnes anales (colonnes de Morgani), qui sont réunies

en bas par des replis en croissants appelés les valvules anales. Les valvules anales forment ensemble un cercle sur la circonférence du canal anal, appelée à cet endroit la ligne pectinée, située au milieu du canal anal. Au-dessus des valvules se trouvent des dépressions appelées sinus anaux au fond desquels s'abouchent les canaux des glandes d'Hermann et Desfosses (glandes anales). Ces glandes sont situées dans la sous-muqueuse et dans le sphincter interne. Rarement, il existe quelques glandes anales dans l'espace entre le sphincter interne et externe, voire dans le sphincter externe (**figure 3 B**).

A



B

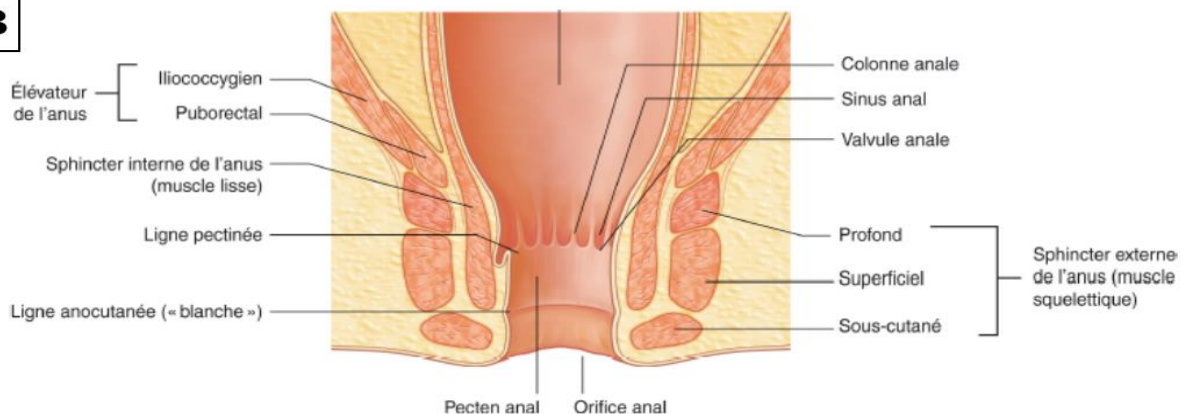


Figure 3 : Anatomie du rectum et du canal anal : A : Rectum et canal anal, os coxal gauche enlevé.

B : Section longitudinale du rectum et du canal anal

Illustration : *Gray's Anatomie pour les étudiants, Richard L. Drake (traduit de Drake, Vogl, Mitchell, Gray's Anatomy for Students, 2nd ed, 978044306952). Elsevier Masson, 2e édition, 2011*

b. Morphologie interne

La paroi rectale est constituée de fibres lisses organisées en deux couches principales, circulaire interne et longitudinale externe. La couche circulaire interne s'épaissit dans sa partie basse pour former de façon indissociable le sphincter anal interne. Le sphincter anal interne est une structure circulaire continue de 3 à 4 mm d'épaisseur entourant la partie haute et moyenne du canal anal. Il assure une activité tonique permanente qui participe majoritairement aux pressions de repos du canal anal. La couche longitudinale externe est renforcée dans sa partie basse par des fibres striées du muscle puborectal et des fibres conjonctives des fascias pelviens.

La plupart des caractéristiques histologiques du rectum sont les mêmes que celles du côlon. Il existe de minimes variations de l'histologie par rapport à la muqueuse colique : dans le rectum, les colonocytes (cellules mucosécrétantes) sont plus nombreux, le chorion est moins cellulaire, et les cryptes un peu irrégulières.

III. Epidémiologie du cancer colorectal

Le CCR est une pathologie hétérogène causée à la fois par des facteurs génétiques et environnementaux. La majorité des CCR sont sporadiques (70% à 80%), l'âge étant le facteur de risque le plus important. Seule une faible proportion de cas est due à des formes héréditaires, que ce soit une polypose adénomateuse familiale (moins de 1%), une CCR héréditaire non polyposique ou un syndrome de Lynch (2% -5%) ou une polypose associée au gène *MYH* (<1%) (Farrington et al., 2005). On estime que 20% à 25% des cas sont associés à une composante héréditaire, qui n'a pas encore été bien établie. On les regroupe sous l'appellation : « CCR familial ».

Le CCR est le 3^{ème} cancer le plus commun et constitue la 2^{ème} cause de décès par cancer dans le monde. Il représente environ 1.8 millions de diagnostics par an ainsi que 881 000 décès dans le monde (pour environ 40 000 diagnostics et 17 000 décès en France) (Bray, *et al.* 2018). L'incidence est très faible chez les sujets jeunes et dans plus de 9 cas sur 10, le diagnostic se fait à plus de 50 ans, avec la majorité des diagnostics établis entre 50 et 74 ans, 70 ans constituant l'âge médian dans les pays développés. Bien que l'incidence varie grandement dans le monde, le rapport hommes/femmes reste similaire avec un taux d'incidence et une mortalité en défaveur des hommes (**figure 4**).

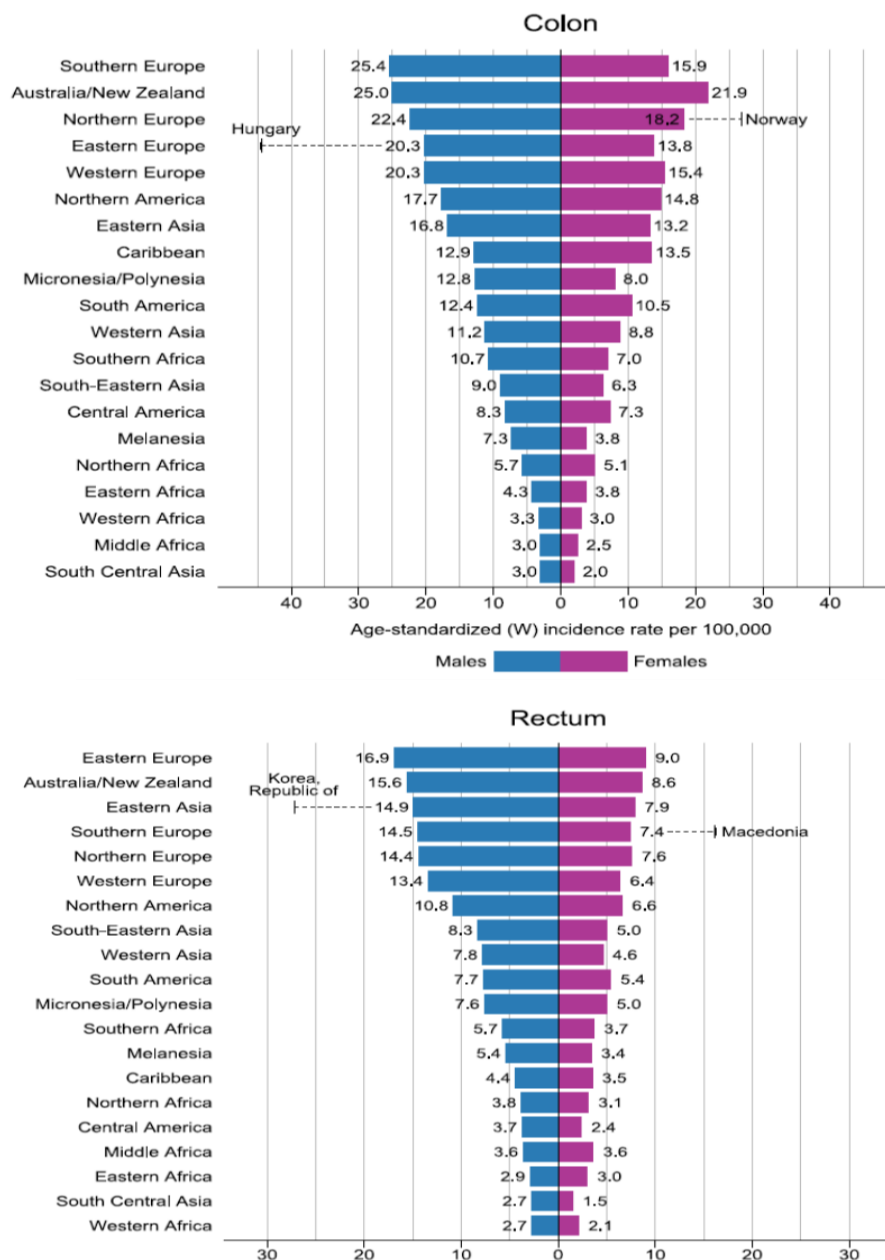


Figure 4 : Incidence du cancer colorectal dans le monde selon la région et le sexe.
 Représentation graphique du risque cumulé d'incidence du cancer colorectal dans le monde, en 2018, chez les hommes (bleu) et chez les femmes (violet).
 Source : GLOBOCAN 2018.

Bien qu'historiquement, les taux d'incidence et de mortalité aux États-Unis soient restés supérieurs à ceux observés en Europe, cette relation a récemment changé. Selon les dernières données GLOBOCAN (Bray, *et al.* 2018), le taux d'incidence standardisé aux États-Unis par âge se situe à 29,2 cas pour 100 000, avec un taux de mortalité de 8,8. Il a été estimé que l'Europe, quant à elle, subissait une augmentation de l'incidence annuelle du CCR d'au moins 0,5%.

En se basant sur les taux d'incidence et de mortalité actuels, ainsi que sur les changements démographiques prévus dans le monde pour les prochaines décennies, L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime une augmentation de 77% du nombre de cas de CCR nouvellement diagnostiqués et une augmentation de 80% des décès dus au CCR d'ici 2030 (Bray, *et al.* 2018).

Depuis les années 90, il y a eu une amélioration du taux de survie à 5 ans du CCR qui peut être expliquée par : (i) un diagnostic précoce aux stades initiaux, notamment lié à un dépistage organisé efficace, (ii) une percée dans le traitement de la maladie dans les stades II et III ainsi que par (iii) une diminution de la mortalité post-opératoire.

IV. **Cancer Colorectal**

D'une façon générale, un cancer se développe à partir d'une cellule initialement normale qui se transforme et se met à se multiplier de façon anarchique. L'ensemble des différents types cellulaires présents dans le colon et le rectum peut être à l'origine d'une forme de cancer spécifique. Dans la plupart des cas, les cancers colorectaux se développent à partir des glandes de Lieberkühn qui tapissent l'intérieur de la paroi du côlon et du rectum. Cette forme de cancer est appelée adénocarcinome et représente plus de 90% des CCR.

Dans environ 80 % des cas, l'adénocarcinome se développe à partir d'un adénome. Des cellules cancéreuses apparaissent, d'abord peu nombreuses et bien localisées. On parle de cancer « in situ » : seule la première couche de la paroi du côlon ou du rectum (la muqueuse) est atteinte. Avec le temps et si aucun traitement n'est effectué, la tumeur grossit et s'étend plus profondément à l'intérieur de la paroi du côlon ou du rectum.

Des cellules cancéreuses peuvent ensuite se détacher de la tumeur pour aller envahir d'autres parties du corps : les ganglions lymphatiques proches de la tumeur, le foie ou les poumons notamment. De nouvelles tumeurs apparaissent alors : ce sont les métastases.

Dans moins de 5 % des cas, d'autres tumeurs malignes se développent au niveau du côlon ou du rectum. Il s'agit notamment :

- Des tumeurs carcinoïdes : les tumeurs carcinoïdes représentent 1,5 % des cancers colorectaux. Elles se développent à partir de cellules nerveuses digestives, qui sécrètent des hormones ou des neurotransmetteurs.

- De lymphomes : les lymphomes sont des tumeurs qui se développent dans les organes lymphoïdes et notamment dans les ganglions lymphatiques.
- De sarcomes : les sarcomes regroupent différents types de tumeurs qui se développent à partir des os ou des tissus mous qui relient, soutiennent et entourent tous les organes du corps (muscles, tendons, graisse, etc.).
- De mélanomes : un mélanome est une tumeur qui se développe à partir de cellules appelées mélanocytes. Les mélanocytes sont présents essentiellement dans la peau, mais également dans les muqueuses de la bouche, du rectum (canal anal) ou des organes génitaux.

Au moment du diagnostic, c'est l'évaluation de la propagation et de la dissémination des cellules cancéreuses qui va permettre de définir le stade du cancer. On associe pour ce faire la progression des cellules cancéreuses (que l'on note T pour « *Tumor* »), l'invasion des nœuds lymphatiques (que l'on note N pour « *Nods* ») et la présence ou non de métastases (que l'on note M pour « *Metastasis* »). On obtient ainsi la classification dite TNM majoritairement utilisée pour le diagnostic et le pronostic du CCR, mais aussi d'autres cancers. Les différents stades TNM et leurs définitions sont résumés dans le **Tableau I**

Tableau I TNM classification des cancers colorectaux

T = Tumeur primaire
T0 = Aucune preuve de tumeur primaire
T1 = Invasion de la sous-muqueuse par la tumeur
T2 = Invasion de la muqueuse musculaire par la tumeur
T3 = La tumeur envahit la sous-séreuse ou les tissus péricoliques ou tissus péricoliques non péritonéaux
T4a = La tumeur pénètre à la surface des viscères péritonéaux
T4b = La tumeur envahit directement ou est adhérente à d'autres organes ou structures anatomiques
N = Nœuds lymphatiques régionaux
N0 = L'invasion des nœuds lymphatiques ne peut être établie
N1a = Invasion d'un nœud lymphatique
N1b = Invasion de deux ou trois nœuds lymphatiques
N1c = Dépôt tumoral dans la sous-séreuse, le mésentère, ou les tissus péricoliques non péritonéaux sans invasion des nœuds lymphatiques régionaux
N2a = Invasion de quatre à six nœuds lymphatiques
N2b = Invasion de sept nœuds lymphatiques ou plus
M = Métastases
M0 = La présence de métastases ne peut être établie
M1a = Présence de métastases sur un organe (ou site) distant
M1b = Présence de métastases sur plus d'un organe (ou site) ou sur le péritoine
Stages
Stage I (T1-T2, N0, M0)
Stage II A (T3, N0, M0)
Stage II B (T4a, N0, M0)
Stage II C (T4b, N0, M0)
Stage III A (T1-T2, N1, M0 ou T1, N1, M0)
Stage III B (T1-T2, N2b, M0; T2-T3, N2a, M0 ou T3-T4a, N1, M0)
Stage III C (T3-T4a, N2b, M0 ou T4b, N1-N2, M0, ou T4a, N2a, M0)
Stage IV A (Tn, Nn, M1a)
Stage IV B (Tn, Nn, M1b)

V. Prévention et dépistage

1. Prévention primaire

Comme mentionné précédemment, plus de 70% des cas de CCR sont sporadiques et fortement liés au mode de vie.

Bien qu'étant l'un des cancers les plus fréquents, le CCR fait partie de ceux qui pourraient bénéficier le plus de la prévention, notamment primaire. On estime qu'entre 66 et 75% des cas de CCR pourraient être évités avec un mode de vie sain (Giovannucci, 2002).

Les facteurs de risque connus pour le CCR sont : un régime alimentaire faible en fruits et en légumes, une consommation excessive de viande rouge et de graisses saturées, la consommation d'alcool, un mode de vie sédentaire, le tabac et le surpoids. Néanmoins, le principal facteur de risque demeure l'âge (50-75 ans).

La prévention primaire reste la meilleure stratégie pour éviter le CCR. Cependant, les programmes qui visent à changer les habitudes alimentaires et d'hygiène ont des résultats à long terme et devraient donc être complétés par d'autres stratégies telles que la prévention secondaire.

2. Prévention secondaire

Parmi les différentes options de prévention concernant le CCR, la prévention secondaire est considérée comme l'une des plus appropriées, elle permet de détecter des lésions annonciatrices du cancer (réduisant l'incidence et la mortalité) et / ou une maladie à un stade précoce, lorsque le traitement est le plus efficace (réduisant ainsi la mortalité).

Il est admis que le principal facteur pronostique du CCR est le stade au diagnostic. La survie moyenne à 5 ans du CCR se situe entre 50% et 60% et est plus élevée dans les premiers stades (75% à 90%) que dans les stades avancés (<15%) de la maladie (Ciccolallo et al., 2005). La majorité des CCR est détectée par la présence de signes ou de symptômes, qui apparaissent généralement dans les phases avancées ; dans ces cas, un diagnostic rapide ne garantit pas un meilleur pronostic, puisque la présentation de tout symptôme (douleurs abdominales, fatigue, altération de l'état général, sang dans les selles) peut indiquer la présence de CCR avancé. L'implémentation de stratégies de dépistage systématique est d'une importance capitale. La population cible de cette stratégie sont les personnes âgées de 50 à 75 ans, asymptomatiques et

n'ayant aucun antécédent personnel ou familial de CCR. Les personnes présentant des facteurs de risques spécifiques (antécédents familiaux ou personnels, prédispositions génétiques, etc...) bénéficient d'une stratégie de veille plus précoce et plus longue. Elles ne sont donc pas concernées par les stratégies de dépistage systématique.

Le nombre de techniques de dépistage existant a grandement augmenté depuis les années 2000 avec l'émergence des technologies de marquage moléculaire. Bien que toutes les techniques de dépistage n'y parviennent pas, elles ont pour vocation de remplir les critères suivants :

- Présenter une bonne sensibilité et spécificité
- Permettre une baisse significative de la mortalité due au CCR
- Être acceptée par la population cible
- Présenter un coût acceptable

A ce titre les trois techniques de dépistage les plus acceptées et largement utilisées sont le test du sang dans les selles (Hemoccult ou FOBT (Fecal Occult Blood Test)), La coloscopie et la sigmoïdoscopie.

En Europe, le dépistage s'organise principalement autour d'un test FOBT tous les deux ans qui en fonction du résultat orientera, ou non, vers une coloscopie (Zavoral et al., 2009). Dans d'autres pays comme le Japon, ce test est recommandé tous les ans. Les recommandations américaines, quant à elles, proposent un FOBT tous les ans, une sigmoïdoscopie ou une colonographie tous les 5 ans ou une coloscopie tous les 10 ans.

L'ensemble des techniques de dépistage utilisées peuvent être divisées en deux catégories : Les explorations permettant d'obtenir des images (directes ou non) du côlon, et les analyses d'échantillons biologiques. L'ensemble de ces techniques est résumé dans le **tableau II**.

Tableau II Les principaux outils de dépistage du CCR

Test	Sensibilité	Spécificité	Contraintes
Coloscopie			
Adénome ≤ 5mm	70%-79%		Requiert un lavement en préparation ainsi qu'une anesthésie Présente des risques de complication sévères N'est pas bien acceptée par la population
Adénome 6-9 mm	80%-92%	90%	
Adénome ≥ 10mm	92%-99%		
CCR	92%-99%		
Sigmoïdoscopie			
Adénome ≤ 5mm	70-79%		Pas d'anesthésie nécessaire Les lésions proximales ne sont pas détectées
Adénome 6-9 mm	80%-92%	92%	
Adénome ≥ 10mm	92%-99%		
CCR	90%-92%		
gFOBT standard			
Adénome ≤ 5mm	1%-5%		Présente des interactions médicamenteuses et alimentaires Nécessite 3 prélèvements
Adénome 6-9 mm	5%-13,7%	95%-99%	
Adénome ≥ 10mm	98,9%-27,5%		
CCR	25%-50%		
gFOBT sensitive			
Adénome ≤ 5mm	5%-10%		Présente des interactions médicamenteuses et alimentaires Nécessite 3 prélèvements
Adénome 6-9 mm	10%-26,2%	90%-95%	
Adénome ≥ 10mm	17,7%-49,4%		
CCR	50%-87%		
FIT			
Adénome ≤ 5mm	2%-7,5%		Les échantillons doivent être congelés
Adénome 6-9 mm	7,5%-24,0%	92,5%-98%	
Adénome ≥ 10mm	16%-48%		
CCR	50%-87%		

a. Les tests biologiques

Stratégie de dépistage classique

Le test de l'hémoglobine fécale ou Fecal occult blood test (FOBT) consiste en la détection d'infimes pertes sanguines dans les selles. En effet, du sang est très souvent retrouvé dans les selles, dans des proportions d'abord invisibles à l'œil, en cas de lésions coliques de taille supérieure à 10mm. Ceci permet la détection des lésions néoplasiques à un stade précoce. Pour réaliser le test, le patient doit prélever un échantillon de selle dans un flacon qui lui est fourni.

Le test FOBT est la méthode de primo détection la plus utilisée dans le cadre de dépistage dans le monde et rentre dans la composition de nombreux programmes de dépistage organisés en Europe. Il s'agit de la première ligne de détection en France pour la population se trouvant dans la tranche d'âge du dépistage et ne présentant pas de risque particulier. Ce test a rencontré une très large acceptation par le public due à son absence d'invasivité, sa facilité de réalisation. Il présente de plus un faible coût.

Il existe deux types de test FOBT : ceux basés sur l'utilisation de la résine de guaiac (test gFOBT) qui reposent sur des réactions biochimiques et qui sont essentiellement qualitatifs, et ceux basés sur des interactions immunologiques (Fecal Immunochemical Testing ; (FIT)) à la fois qualitatifs et quantitatifs.

Le test (gFOBT) est celui qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études cliniques randomisées et qui a montré son efficacité à diminuer aussi bien l'incidence que la mortalité du CCR. Ces études mettent en évidence une réduction de la mortalité entre 15% et 33%, en grande partie due à une détection très précoce des lésions. La diminution de l'incidence s'explique, quant à elle, par le plus grand nombre de détection de lésions préneoplasiques (adénomes) suivie de leur résection afin d'éviter une progression vers le développement d'un CCR. La réduction de la mortalité la plus importante est observée lorsque le test est proposé annuellement (33% après un suivi de 13 ans). Un test réalisé tous les deux ans permet d'obtenir une réduction entre 15% et 21% après un suivi de 8 ans et de 18%-21% après un suivi de 10 ans. C'est la politique qui est actuellement en vigueur en France.

Le test gFOBT repose sur la détection de l'action de la peroxydase sur l'hème de l'hémoglobine. Le test n'étant pas spécifique de l'hémoglobine humaine, une réaction est possible avec une molécule d'hémoglobine provenant de l'alimentation (notamment de la viande rouge), mais également avec de la peroxydase provenant de certains légumes (Raifort, cantaloup, navets crus, brocoli, chou-fleur, radis rouges, et panais) qui devront être exclus du régime au moins deux jours avant l'examen. Le test n'est également pas spécifique pour des saignements colorectaux, et peut donc donner des faux positifs lors de saignements gastro-intestinaux provenant du tractus digestif supérieur.

Le test gFOBT est essentiellement qualitatif, et repose sur le changement de coloration des selles en association avec un réactif en laboratoire. Le résultat du test est donc laissé dans une certaine mesure à l'appréciation du technicien. La sensibilité du test peut grandement varier (entre 6,2% et 83%) en fonction du test utilisé (standard ou sensible). La spécificité est plus constante, dépassant les 80% dans tous les cas et pouvant atteindre les 98,4% (Burch et al., 2007; Young et al., 2002 ; Allison et al., 2007).

Le FIT, quant à lui, est basé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques de l'hémoglobine humaine. Le test détecte la présence d'hémoglobine via une réaction immunochimique. Les méthodes les plus utilisées sont l'agglutination au latex (turbidimétrie), l'essai enzymatique (ELISA) et l'immunochromatographie.

En raison de sa spécificité, estimée entre 77% et 99% (Burch et al., 2007), le test FIT ne requiert pas de régime alimentaire particulier, le test est également spécifique pour les saignements de l'ensemble du tractus digestif. Le test est qualitatif, mais aussi semi-quantitatif permettant de déterminer le dépassement ou non d'une valeur seuil. L'ensemble de ces paramètres en font le

test le plus largement utilisé et partie intégrante des programmes de dépistage des pays européens (Italie, France, Hollande, Espagne, Slovénie), du Japon, de la Nouvelle-Zélande et de l'Australie. Le Royaume-Unis est actuellement en transition du gFOBT vers le FIT.

Un inconvénient du FIT par rapport au gFOBT est que les échantillons doivent être stockés dans un réfrigérateur car de trop hautes températures peuvent altérer le résultat du test, augmentant le nombre de faux-négatifs.

La littérature concernant le test FIT lui attribue une sensibilité très variable s'échelonnant de 5,4% à 98% (Young et al., 2002 ; Allison et al., 2007 ; Dam et al., 2010 ; Grazzini et al., 2010; Vilkin et al., 2005). Des différences significatives ont été rapportées en fonction de l'emplacement de la lésion avec une meilleure sensibilité pour des lésions distales.

Des études montrent une nette supériorité du FIT par rapport au gFOBT dans la détection du CCR, ainsi qu'un meilleur taux de participation. Quel que soit le test FOBT utilisé, une coloscopie doit impérativement suivre un résultat positif. L'un des désavantages majeurs des tests FOBT est le fort pourcentage de faux-positifs et faux-négatifs. Il existe aujourd'hui sur le marché plus de 70 tests différents de type FOBT.

ADN et ARN fécal

Les avancées sans précédent dans la connaissance du génome, du méthylome, du transcriptome, et du protéome ont conduit à l'exploration de nouvelles méthodes de diagnostic du CCR.

Le CCR est une maladie très hétérogène. Bien que l'on puisse noter quelques exceptions (APC, p53, KRAS), la plupart des mutations géniques impliquées sont observées dans un faible pourcentage de cas (Wood et al., 2007 ; Sjöblom et al., 2006). De plus, l'hyperméthylation des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeur est un événement précoce de la cancérogenèse (Shen et al., 2007) décelable dans la majorité des CCR, bien que ce phénomène ne soit pas universel (Ostwald et al., 2009). Ainsi, l'identification de groupes de marqueurs génétiques et/ou épigénétiques capables de fournir une couverture maximale pour le diagnostic du CCR apparaît comme une stratégie particulièrement intéressante. Récemment, l'utilisation d'ADN, d'ARN et de marqueurs protéiques à partir de différents échantillons biologiques a été explorée (Notterman et al., 2001 ; Friedman et al., 2004) comme stratégie de diagnostic du CCR.

Les tests moléculaires non invasifs sont à ce jour les mieux évalués. Les cellules de CCR présentent un grand indice mitotique et une faible adhérence à la membrane basale, ce qui facilite leur exfoliation continue dans la lumière intestinale (Ahlquist et al., 2000),

contrairement à la perte de sang intermittente détectée par FOBT. Cette exfoliation constante peut être utilisée pour des analyses moléculaires.

Seulement 0,01% de l'ADN fécal (sDNA (stoolDNA)) totale est d'origine humaine ; le reste provient de l'alimentation et de la flore bactérienne (Klaassen et al., 2003). De plus, le sDNA de la tumeur représente un faible pourcentage de tout le sDNA humain (Diehl et al., 2008 ; Zou et al., 2009) et est encore plus faible dans le cas de lésions préneoplasiques. Cela implique que les techniques de détection des marqueurs doivent présenter une très forte sensibilité.

La première mutation recherchée dans le sDNA des patients atteints de CCR est la mutation *KRAS*. Imperial *et al* (2004) ont constitué une cohorte représentative de la population et comparant les résultats obtenus par un test gFOBT et par un test sDNA analysant 21 mutations. La sensibilité pour le diagnostic du CCR était de 13% et 53% respectivement ($P = 0.003$). Les tests utilisant du sDNA de première génération ne comportaient pas de tampon de conservation, et les études démontraient une sensibilité assez faible, bien que supérieure à celle obtenue *via* gFOBT. Aujourd'hui, des tampons de conservation ont été ajoutés aux échantillons, ce qui empêche la dégradation des marqueurs pendant le transport ou le stockage. Également, de nouvelles méthodes de détection plus sensibles sont apparues permettant une détection allant jusqu'à 0.1% des copies de gènes mutés. Ceci améliore considérablement la recherche de petites lésions, comme les lésions néoplasiques. Un essai comparant un test au sDNA avec le gFOBT pour la détection de telles lésions a obtenu une sensibilité de 46% et 16% respectivement (Imperiale et al., 2004).

L'un des inconvénients du test FOBT est sa faible sensibilité pour les lésions proximales (Vilkin et al., 2005). En outre, la coloscopie a été récemment remise en cause quant à sa capacité à détecter des lésions proximales (Brenner et al., 2010). Les tests basés sur le sDNA ne sont pas affectés par la localisation de la lésion. Plusieurs équipes ont évalué un panel de marqueurs qui permet d'identifier 85% des patients atteints de CCR avec 54% présentant des lésions néoplasiques, sans différence de sensibilité en fonction de l'emplacement (Brenner et al., 2010), (Ahlquist et al., 2012).

La principale limite dans l'utilisation des tests sDNA est leur coût. Song *et al* ont calculé que les tests FOBT et la coloscopie étaient plus rentables que l'analyse des marqueurs fécaux. L'utilisation, dans le futur, de plateformes de séquençage de nouvelle génération permettant l'utilisation que deux marqueurs faibles (l'hyperméthylation du gène codant pour la vimentine

et l'intégrité de la double hélice de ADN) permettra de réduire le coût et d'améliorer la viabilité d'une telle pratique dans un contexte clinique.

Cette stratégie de détection a été étendue aux marqueurs d'autres natures, notamment l'ARN et les protéines. Ainsi l'analyse de l'ARNm de COX-2 dans les fèces présente une sensibilité de 87% et une spécificité de 100 pour identifier le CCR. Le CCR présente également un profil d'expression de miARN qui lui est propre et qui peut être détecté dans les selles. On pourrait notamment détecter une surexpression de miR21 et du miR106 avec une spécificité de 74,1% et de 79% respectivement (Link et al., 2010). De la même façon certaines protéines présentes dans le plasma peuvent aussi être détectées dans les fèces. On peut notamment citer l'isoenzyme pyruvate kinase de type M2 (M2-PK) qui est surexprimée dans les cellules en prolifération. Une méta-analyse a évalué la concentration en M2-PK dans les selles de 704 patients atteints de CCR et de 11412 personnes saines provenant de 17 études indépendantes. La sensibilité pour le CCR et les adénomes de taille inférieure à 1cm a été évaluée à 80% et 44% respectivement avec une spécificité de 95%.

Stratégies de dépistage innovantes :

Contrairement aux selles, tout l'ADN de l'hôte se trouve dans le sang / plasma, mais le nombre de copies d'ADN altérées qui pourrait être retrouvé dans des lésions précoces ou préneoplasiques peut être absent ou inférieur à la limite de détection (Diehl et al., 2005). Certaines enzymes plasmatiques pourraient affecter la stabilité de ces copies (Tamkovich & Anna, 2006). Par conséquent, un traitement d'optimisation de l'échantillon pour éliminer les inhibiteurs de la PCR, nécessaire à l'amplification de l'ADN tumoral recherché, sera nécessaire pour améliorer sa sensibilité (Diehl et al., 2005).

Des cellules cancéreuses peuvent se trouver dans le sang suite à l'invasion tumorale des vaisseaux sanguins. Une fois dans le système sanguin, elles circulent dans l'organisme et relâchent des marqueurs qui seront détectables dans le plasma. Cependant, une telle invasion des vaisseaux ne survient généralement que dans des stades avancés de CCR et est absente dans le cas de lésions préneoplasiques. Ainsi, la détection de cellules tumorales circulantes pourrait s'avérer être un bon marqueur pronostic, mais ne serait pas pertinent dans un contexte de dépistage. Par ailleurs, la présence d'acides nucléiques libres d'origine tumorale dans le plasma a déjà été documentée, et bien qu'ils ne soient présents qu'en faible quantité, leur utilisation comme biomarqueurs pourrait être envisagée.

Un certain nombre de marqueurs relatifs au CCR ont déjà été identifiés dans le plasma. Les mutations du gène *APC*, fréquemment présentes dans le CCR, ont par exemple été détectées avec une sensibilité de 73% (cette sensibilité tombe à 9% dans le cas de lésions préneoplasiques) (Diehl et al., 2005).

Comme une alternative à la recherche de mutations dans l'ADN plasmatique, la détection de variations épigénétiques a également été étudiée. Ainsi, l'hyperméthylation de *Septine 9* (un gène appartenant à la classe des guanosine triphosphate) est associée au CCR. Une analyse de la méthylation de *Septine 9* dans le plasma permet de détecter entre 58% et 98% des patients atteints de CCR avec une spécificité entre 86%-100% (DeVos et al., 2009 ; Grützmann et al., 2008 ; Lofton-day et al., 2008). Il existe actuellement un test disponible sur le marché (EpiproColon Early Detection Assay Kit®). L'ajout de nouveaux marqueurs pour la détection plasmatique permettrait d'optimiser les performances de ce test dans le futur, bien que son coût nettement plus élevé que celui du FOBT limite son utilisation.

De la même façon que pour les marqueurs identifiés dans les fèces, l'investigation du plasma a été étendue à la recherche d'ARN et de protéines. En effet, le transcriptome des cellules présentes dans le sang et dans le plasma périphérique est une source de biomarqueurs potentiels. Han *et al* ont constitué un panel de biomarqueurs (*BANK1*, *BCNP1*, *CDA*, *MGC20553* et *MS4A1*) d'après le profil l'expression d'ARNm d'un leucocyte analysé par microarray. Ce panel permettrait de discriminer un patient atteint de CCR d'un patient sain avec une sensibilité et spécificité de 88% et 64% respectivement.

De même, l'émergence de nouvelles technologies d'analyse de données a rendu possible l'étude à grande échelle de profils protéiques. L'utilisation de la protéomique dans le diagnostic/dépistage du CCR est aujourd'hui encore au stade expérimental, mais on peut notamment citer l'étude de Babel et al qui identifie 43 protéines (sur une base de 8000 protéines évaluées par microarray) capable de discriminer un sérum tumoral d'un sérum sain. L'analyse ELISA de deux de ces marqueurs (*MAPKAPK3* et *ACVR2B*) dans une population de CCR et une population saine a permis d'obtenir une sensibilité de 83% et une spécificité de 74% (Casal & Barderas, 2010).

Urines

Les marqueurs tumoraux peuvent pénétrer dans les urines via la circulation sanguine. Ils sont pour cela métabolisés en petits fragments qui passent la filtration glomérulaire (Feng et al., 2009). La récolte d'échantillon d'urine est une tâche facile et non invasive. La purification

d'ADN à partir de tels échantillons est plus facile que dans les fèces car les urines contiennent moins de protéines d'origine exogène.

Des nucléosides permettant de discriminer efficacement les patients atteints de CCR des cas contrôle ont été identifiés. Une étude a ainsi évalué les séquences mutées du gène KRAS présentes dans les tissus et dans les urines d'un petit nombre de patients atteint de CCR et de contrôles sains, rapportant 83% de concordance entre les mutations présentes dans l'ADN provenant des tissus et celles présentes dans l'ADN provenant des urines (Su et al., 2005).

b. Les explorations d'imagerie

La coloscopie :

La coloscopie consiste à explorer la paroi interne du gros intestin (côlon) à l'aide d'un endoscope (fibre optique) introduit par l'anus.

L'endoscope se compose d'un câble souple d'un centimètre de diamètre et d'un mètre cinquante de long, muni d'une fibre optique. Il possède une source lumineuse à l'une de ses extrémités. Les plus performants utilisent une mini caméra et sont connectés à un écran vidéo. Ils peuvent être équipés de pinces afin de réaliser des prélèvements pour une analyse en laboratoire. Un système de commande permet à l'extrémité de l'endoscope de pivoter pour aider la progression en suivant les courbures de l'intestin.

Pour réaliser l'examen, le côlon doit être impérativement nettoyé afin que les parois puissent être visualisées. La préparation va commencer par un régime alimentaire adapté à mettre en place 3 jours avant l'examen. Il va consister en une alimentation sans fruits ni légumes (régime sans fibres). Afin de vider le côlon, un laxatif sous forme liquide est à prendre la veille de l'examen. Il est conseillé de le boire très frais afin d'en atténuer le goût salé. Le jour même, en raison de l'anesthésie générale, il faut être à jeun. À partir de minuit la veille de l'examen, il ne faut ni manger ni boire et ne pas fumer. De plus, avant l'examen, il faut prendre une douche en se savonnant soigneusement l'ensemble du corps avec une solution antiseptique. Il faut noter que le laxatif peut modifier l'action ou/et l'absorption de certains traitements médicamenteux, notamment la pilule contraceptive. Il faut donc signaler à son médecin tout traitement en cours avant de réaliser un examen par coloscopie. Une bonne préparation avant coloscopie est fondamentale pour le bon déroulement de l'examen. En effet, si le côlon n'est pas suffisamment propre, l'examen peut être interrompu et reporté.

La coloscopie est un examen qui dure généralement 30 minutes environ. Il est ordinairement indolore, néanmoins parfois inconfortable. Pour ces raisons, il est réalisé dans 95 % des cas sous anesthésie générale. Il peut être aussi pratiqué uniquement sous calmants selon les demandes du patient ou contre-indications médicales.

Une fois sous anesthésie générale, le coloscope est introduit par l'anus puis progressivement amené jusqu'au côlon. Afin de déplisser les tissus, le côlon est gonflé par de l'air permettant ainsi une bonne visualisation de toutes les parois. Au fur et à mesure de la progression du coloscope, des images sont directement transmises et analysées par le gastroentérologue. Si des anomalies sont détectées, un échantillon de tissu est prélevé pour analyse ultérieure (biopsie). Il est également possible que l'intégralité du tissu anormal soit enlevée (ablation).

La coloscopie est aujourd'hui considérée comme le test d'excellence pour le diagnostic de pathologies colorectales. Bien que son utilisation soit clairement associée avec une réduction du nombre de morts dû au CCR, il n'y a, à l'heure actuelle, aucun résultat issu d'un essai clinique randomisé démontrant son efficacité. Ce sont d'autres types d'études (prospective, cas-témoin) qui ont montré une réduction significative de la mortalité et de l'incidence associées au CCR, atteignant, dans certains cas, 65% et 67% respectivement (Kahi et al., 2009) (Rabeneck et al., 2010).

On dénombre à l'heure actuelle deux grands essais cliniques multicentriques en cours en Europe visant à démontrer l'efficacité de la coloscopie. L'essai NordICC est conduit dans les pays scandinaves, les Pays-Bas et la Pologne et compare la pratique de la coloscopie (22000 personnes âgées de 55 à 64 ans invités à subir une seule coloscopie) à l'absence de dépistage (44000 personnes de la même tranche d'âge). L'essai COLONOPREV est une étude Espagnole dans laquelle 8 régions collaborent. L'efficacité d'une coloscopie ponctuelle (26703 sujets âgés de 50 à 69 ans) y est comparée à celle d'un test FOBT réalisé tous les deux ans (26599 sujets) (Quintero et al., 2012). Les résultats de ces deux études sont attendus pour 2026 et 2021 respectivement.

Cependant, l'invasivité du test confère à la coloscopie un certain nombre de désavantages. La procédure peut présenter des complications, la perforation de la paroi colique et le saignement post-polypectomie étant les plus sérieuses. D'après les *“European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis”* les complications majeures surviennent dans 3% à 16% des cas selon que le test est utilisé comme dépistage ou comme confirmation après un test FOBT positif.

Les autres limitations pour l'utilisation de la coloscopie comme test de dépistage sont son coût, ainsi que sa faible acceptation par le public. En effet la coloscopie est une intervention compliquée qui requiert une plus importante préparation en amont que les autres tests. La nécessité de prendre rendez-vous avec un anesthésiste avant l'intervention, le régime particulier, ainsi que la gêne et parfois la honte associée à l'examen proprement dit en font un examen que la population-cible du dépistage tend à considérer « en dernier recours » présentant une préférence claire pour des tests moins invasifs.

La coloscopie reste néanmoins le test présentant les meilleures performances en termes de détection des pathologies colorectales avec une sensibilité dépassant les 98% et une spécificité de 99% pour les lésions de taille supérieure à 6mm (Graser et al., 2009 ; Rockey et al., 2005 ; Sung et al., 2003). Les différentes recommandations disponibles proposent une coloscopie tous les 10 ans pour une population à risque normal. Les populations présentant des facteurs de risque supplémentaires doivent suivre d'autres schémas de contrôle, avec notamment des intervalles de temps réduits entre les différents tests.

La sigmoïdoscopie :

La sigmoïdoscopie est aussi appelée proctosigmoïdoscopie ou rectosigmoïdoscopie. C'est une intervention qui permet au médecin d'observer le revêtement du côlon sigmoïde, soit la dernière partie du côlon, et le rectum. On pratique la sigmoïdoscopie à l'aide d'un sigmoïdoscope, qui est un type d'endoscope.

La préparation à une sigmoïdoscopie est très semblable à celle nécessaire pour une coloscopie, si ce n'est qu'elle ne nécessite pas une prise en charge en lien avec l'anesthésie. Cette moindre préparation constitue un avantage par rapport à la coloscopie. Toutefois, la principale limitation de la sigmoïdoscopie est de ne détecter que les anomalies distales du côlon (l'examen ne dépassant pas, comme son nom l'indique, le côlon sigmoïde).

L'intervention est plus rapide que la coloscopie classique, la section intestinale explorée étant plus courte. L'examen va durer entre 15 et 20 minutes selon les cas et la nécessité éventuelle d'une biopsie. Par lui-même, l'examen n'est pas douloureux c'est pourquoi une anesthésie générale n'est pas nécessaire. Néanmoins, les patients se voient souvent proposer des sédatifs (typiquement du midazolam et du fentanyl) afin de diminuer l'anxiété.

La décision de réaliser une coloscopie dans le cas d'une néoplasie découverte par sigmoïdoscopie est controversée. Les facteurs de risque associés à l'apparition de lésions proximales du côlon sont : un âge supérieur à 65 ans, une histologie villositaire dans le côlon distal,

la présence d'un adénome distal $\geq 1\text{cm}$ ou de multiple adénomes dans le côlon distal, des antécédents familiaux de CCR (Levin et al. 1999; Imperiale et al., 2000). Un certain nombre d'études démontre que la prévalence d'adénomes avancés dans la partie proximale du côlon chez les patients sans lésions distales n'est que de 2% à 5%. De plus, des données suggèrent également que le risque de développer une néoplasie avancée dans la partie proximale du côlon est le même chez les patients qui présentent des polypes hyperplasiques distaux que chez ceux qui n'en présentent pas (Farraye & Wallace, 2002).

Contrairement à la coloscopie, il existe des résultats provenant d'essais cliniques randomisés attestant l'efficacité de la sigmoïdoscopie. Dans les résultats d'une étude américaine (Schoen et al., 2012) les auteurs admettent une réduction de 33% de l'incidence du CCR ainsi qu'une réduction de 43% de la mortalité. La sensibilité de la sigmoïdoscopie pour détecter des néoplasies avancées est plus faible que celle de la coloscopie, avec des résultats compris entre 78% et 83% (Levin et al. 1999 ; Imperiale et al., 2000). Les recommandations font état d'une sigmoïdoscopie tous les 5 ans pour les personnes à risque normal. Une sigmoïdoscopie peut être réalisée seule, ou en association avec un test FOBT annuel ou tous les deux ans (Segnan et al., 2015 ; B. Levin et al., 2008).

Le lavement baryté double contraste.

L'examen radiologique appelé lavement baryté double contraste (DC) vise l'exploration du côlon à l'aide de deux produits de contraste : le baryum et l'air. Les deux produits sont introduits dans l'intestin par voie rectale à l'aide d'une canule. Pour réaliser cet examen, on utilise la radioscopie (visualisation des organes en mouvement grâce aux rayons X) et des radiographies standards.

Pour passer un lavement baryté DC, on demande au patient de suivre une diète très stricte qui commence la veille de l'examen. Cette diète a pour but de vidanger le côlon pour permettre une bonne visualisation de la paroi intestinale. Le matin de l'examen, le patient doit être à jeun. Le patient peut en revanche prendre ses médicaments avec un peu d'eau. Une mauvaise préparation peut nécessiter la reprise de l'examen.

Une radiographie standard ne peut pas démontrer des lésions situées sur la paroi interne ou muqueuse de l'intestin. La muqueuse est le lieu où naissent les polypes et les cancers. Pour qu'elle puisse être examinée, la muqueuse doit être tapissée par un produit de contraste opaque aux rayons X. Pour y arriver, le radiologue introduit un peu de baryum et de l'air à l'aide d'un dispositif d'injection. Par la suite, le radiologue demande au patient de tourner sur lui-même

pour s'assurer que le baryum se colle bien à la paroi de tout le côlon. Enfin, il reste à prendre des images dans différentes positions pour examiner toutes les parties du gros intestin.

Pendant l'examen, le patient peut se sentir ballonné, ce qui peut provoquer un certain niveau d'inconfort. Certains patients ressentent aussi des crampes intestinales. L'examen est décrit comme désagréable, mais non douloureux. Après un lavement baryté DC, le liquide et l'air sont évacués par les voies naturelles. Le patient peut retourner à ses occupations, mais il est recommandé de boire beaucoup car le baryum peut causer de la constipation. Dans les jours qui suivent l'examen, il est normal que le patient retrouve dans ses selles des résidus de baryum (substance blanchâtre).

Il existe à l'heure actuelle peu de données sur le lavement baryté DC, et les quelques résultats disponibles ne proviennent pas d'essais cliniques randomisés. La « *National Polyp Study* » estime que le lavement baryté DC permet de détecter 53% des polypes entre 6mm et 10mm, 48% des polypes plus large que 10mm et 32% de ceux inférieur à 6mm (Winawer et al., 2000). Dans une étude non-randomisée conduite dans des conditions de pratiques cliniques, la sensibilité de ce test a été évaluée à 73% pour détecter des adénomes > 7mm et à 85% pour détecter des CCR. Le lavement baryté DC n'est que très rarement utilisé comme premier test pour le dépistage en raison de son coût élevé, et de sa pauvre acceptation par la population. Il est préférentiellement utilisé comme test complémentaire d'une technique d'exploration endoscopique.

CT colonographie :

La CT colonographie ou colonoscopie virtuelle par scanner multibarrette permet de réaliser une étude virtuelle en 3 dimensions de l'intérieur du côlon de manière moins invasive qu'une colonoscopie classique.

Le patient est couché sur un lit mobile qui glisse doucement dans un anneau. Pendant l'examen, le soignant procède à l'insufflation progressive du côlon à l'aide d'une petite sonde rectale, ceci permet d'obtenir une distension correcte des différentes parties du côlon. Deux passages sont ensuite réalisés : l'un sur le dos et l'autre sur le ventre. L'examen ne nécessite pas d'injection de produit de contraste intraveineux. Pour la parfaite netteté des images le patient doit rester immobile pendant quelques secondes et retenir sa respiration pendant 5 à 10 secondes. L'examen dure environ 15 minutes au total.

Une préparation laxative du côlon est nécessaire pour la réalisation de cet examen. Deux jours avant l'intervention, le patient doit s'astreindre à un régime sans fibre, qui se poursuivra la

veille de l'examen par la prise d'un laxatif. Le patient devra également boire un liquide opacifiant permettant de colorer les éventuelles selles résiduelles. Aucune sédation n'est nécessaire pour cet examen.

Bien que la CT colonographie présente une meilleure acceptation de la part des patients symptomatiques que la coloscopie (von Wagner et al., 2012), cette méthode est encore très récente et reste peu utilisée dans le contexte du dépistage. Dans le cas où des lésions seraient détectées pendant une colonographie, un examen exploratoire complémentaire devra être conduit afin de réséquer ou du biopsier ces dernières. Deux méta-analyses sont parvenues aux mêmes conclusions concernant l'utilisation de la colonographie : Elle démontre une sensibilité élevée associée à une bonne spécificité pour l'identification de polypes de taille supérieure à 10mm (82%), mais pas pour les polypes de taille inférieure, la spécificité étant de 56% pour les lésions inférieures à 5mm. Un des principaux désavantages concernant l'utilisation de la colonographie comme méthode de dépistage est sa forte propension à détecter des lésions extracoliques (jusqu'à 66%). Un tiers de ces lésions nécessiteront des tests de suivi complémentaires ce qui engendre un surcoût imprévisible.

VI. L'arsenal thérapeutique des CCR :

Le traitement du CCR s'articule autour de trois grands axes majeurs : La chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. L'ordre et la combinaison de ce différents traitements varie en fonction du stade de la maladie, et notamment de la présence ou de l'absence de métastases.

Environ la moitié des patients diagnostiqués pour un CCR développeront des métastases. Le site le plus commun d'apparition de métastases dans ce contexte est le foie. Environ 20% des patients sont diagnostiqués avec des métastases hépatiques associées. La résection des métastases hépatiques peut permettre l'apparition de rémission allant jusqu'à une DFS à 5ans de 20%. Pour cette raison, il est particulièrement important de sélectionner les patients présentant des métastases résécables (Pulitanò et al., 2011). Cela a rendu l'approche thérapeutique envers les CCR métastatiques plus complexe, avec des possibilités de traitement nombreuses et justifiant de plus en plus une approche multidisciplinaire.

1. La chirurgie

a. La chirurgie des CCR Loco-régionaux

L'intervention chirurgicale proposée consiste en l'excision de la tumeur avec une marge de sécurité de 5 cm minimum autour de la tumeur afin de ne pas laisser de cellules cancéreuses en

place. La zone retirée est plus ou moins importante selon la localisation de la tumeur et son degré d'avancement :

- **L'hémi-colectomie** droite ou gauche est nécessaire lorsque la tumeur est respectivement dans le côlon droit ou gauche, ce geste consiste à retirer la moitié droite ou gauche du côlon ainsi que la moitié adjacente du côlon transverse.
- On parle de **sigmoïdectomie** lorsque la tumeur est située dans le côlon sigmoïde.
- Pour quelques cas très avancés, il est nécessaire de retirer la totalité du côlon : on parle de **colectomie** totale.
- Pour les tumeurs localisées au niveau du rectum, ce dernier doit être retiré : c'est une **proctectomie**.

Dans tous les cas, les ganglions lymphatiques drainant la région anatomique doivent également être retirés car ils peuvent contenir quelques cellules cancéreuses ayant déjà réussi à se disséminer (West et al., 2010). Par ailleurs, le retrait de la partie du mésocôlon ou du mésorectum qui entoure la tumeur permet d'améliorer le succès de l'opération en diminuant le risque de récurrence. On entend par mésocôlon ou mésorectum l'ensemble du pédicule vasculaire ainsi que les fascias associés. Une excision locale grâce à une microchirurgie endoscopique peut également être réalisée sur des tumeurs qui ne dépassent pas le tiers supérieur de la sous-muqueuse (Tytherleigh et al., 2008).

Dans la majorité des cas, une cœlioscopie/laparoscopie est possible. Le principe est d'accéder à la cavité abdominale sans ouvrir la paroi abdominale. Pour cela le chirurgien utilise un endoscope, ainsi que du CO₂ pour dilater les parois du côlon (sur le même principe qu'une coloscopie) et des trocarts qui font office d'extensions sur lesquelles le chirurgien peut installer les instruments dont il a besoin pour réaliser les différentes étapes de l'opération (pinces, ciseaux, instruments de coagulation et de suture, etc.). Plusieurs méta-analyses (Friedman et al., 2004 ; Shen et al., 2007 ; Ostwald et al., 2009) ont montré que des résections de CCR pratiquées *via* laparoscopie permettent d'obtenir les mêmes résultats sur le long terme que celles obtenues *via* une chirurgie « ouverte », et sont associées avec un plus faible nombre de patients requérant une transfusion sanguine (3,4% contre 12,2%), une reprise des fonctions digestives plus rapide (premiers mouvements de l'intestin après 3,3 jours contre 4,6 jours) et une durée d'hospitalisation plus courte (9,1 jours contre 11,7 jours). Cependant, l'opération en elle-même est plus longue (208 min contre 167 min) et les coûts intrinsèques sont plus élevés.

a. La chirurgie des CCR métastatiques

Dans le cas d'une résection de métastases hépatiques, sont décrits comme facteurs de bon pronostic : un faible nombre de métastases, des lésions de taille inférieure à 5cm, pas d'atteinte majeure du réseau vasculaire, l'absence d'affection hépatique,

la présence de bonnes réserves hépatiques, et des marges négatives lors de la résection du foie (Fong et al., 1999 ; Altendorf-Hofmann & Scheele, 2003). Les métastases extra-hépatiques, bien qu'étant un facteur de mauvais pronostic, peuvent être réséquées et ainsi apporter une réelle amélioration du DFS. La résection de métastases pulmonaires a un impact sur la survie dans certains cas (Girard et al., 1996).

2. La radiothérapie

a. La radiothérapie dans le CCR

La radiothérapie n'est généralement pas utilisée dans le cancer du côlon, sauf si la tumeur ne peut être retirée en totalité du fait d'un envahissement important. La radiothérapie consiste à délivrer des doses de rayons dont l'énergie est capable de tuer les cellules cancéreuses. La radiothérapie est principalement néoadjuvante, c'est-à-dire qu'elle vise à réduire le volume de la tumeur en préopératoire afin de rendre son excision plus facile ou simplement possible. Le traitement est réalisé en séances courtes de quelques minutes, cinq jours par semaine pendant cinq semaines en moyenne, et se termine par une intervention chirurgicale six semaines après. La radiothérapie est de plus en plus souvent associée à une chimiothérapie néo-adjuvante.

Concernant les cancers rectaux, la complexité de la région anatomique du pelvis les rend difficiles à traiter. Le risque de récurrence locorégionale est plus élevé dans le cas de cancers rectaux que de cancers du côlon et est généralement associé à un plus mauvais pronostic. Ce risque est dû à l'absence de séreuse dans le rectum, et à sa proximité avec d'autres organes et structures pelviennes, ce qui rend difficile l'obtention de marges chirurgicales suffisantes (Kapiteijn et al., 1998). Le traitement de référence pour les cancers du rectum de stade II et III (cliniquement T3 ou T4 ou avec propagation ganglionnaire) inclut des séances de radiothérapie préopératoires pour une dose totale de 50.4Gy répartie en 28 séances.

L'ajout d'une chimiothérapie concomitante à de la radiothérapie dans le traitement du cancer rectal locorégional que ce soit préopératoire ou postopératoire permet d'accroître l'efficacité de cette dernière. Ceci améliore la réponse au traitement et permet une possible éradication des micro-métastases. Les traitements les plus utilisés sont la 5-fluorouracile (5-FU) en perfusion,

ou plus récemment la capecitabine (prodrogue orale du 5-FU), les deux ayant montré des résultats équivalents (Hofheinz et al., 2012).

Actuellement, des outils technologiques très performants permettent de mieux cibler la dose d'irradiation sur la tumeur : la radiothérapie à modulation d'intensité permet à beaucoup de malades d'être traités avec moins de risque d'effets secondaires.

Concernant les effets secondaires de la radiothérapie, ils sont variables selon les personnes. On note souvent une rougeur de la peau qui peut être atténuée par des soins locaux. Une envie impérieuse d'uriner associée à des sensations de brûlures, appelée cystite radique, peut apparaître. Boire beaucoup, et en particulier une eau riche en bicarbonates, permet de la soulager.

b. La radiothérapie des CCR métastatiques

Dans la pratique clinique, d'autres techniques, comme l'ablation des métastases par radiofréquence (Wong et al., 2010), la chimiothérapie artérielle hépatique (Fiorentini et al., 2012) administrée directement au foie, la radio-embolisation avec des microsphères de yttrium-90 (Seidensticker et al., 2012) et la radiothérapie stéréotaxique, ont été implémentées dans le traitement de patients sélectionnés présentant un faible nombre de métastases hépatiques, ou comme complément à la chirurgie pour atteindre la résécabilité. L'impact de tels traitements n'est pas encore complètement élucidé dans la mesure où il n'existe pas à ce jour d'essai clinique permettant de les évaluer.

3. La chimiothérapie

a. Liste des médicaments et classes thérapeutiques

Les agents alkylants

L'oxaliplatine

L'oxaliplatine est un agent antinéoplasique, appartenant à une nouvelle classe de dérivés du platine dans laquelle l'atome de platine est complexé avec un 1,2 diaminocyclohexane (DACH) et un groupe oxalate. L'oxaliplatine présente un large spectre d'activité cytotoxique *in vitro* et anti-tumorale *in vivo* dans divers systèmes de modèles tumoraux, y compris des modèles de cancer colorectal de l'homme.

L'oxaliplatine s'est aussi montré efficace *in vitro* et *in vivo* dans différentes lignées résistantes au cisplatine. Une action cytotoxique synergique avec le 5-fluorouracile (5-FU) a également été mise en évidence *in vitro* et *in vivo*.

Les études sur le mécanisme d'action, bien que celui-ci ne soit pas totalement élucidé, montrent que les dérivés hydratés résultant de la biotransformation de l'oxaliplatine interagissent avec l'ADN pour former des ponts intra- et inter-brins entraînant une interruption de la synthèse de l'ADN, cause de l'activité cytotoxique et anti-tumorale. Les différents conditionnements sont des formes injectables à 50 mg, 100 mg ou 200 mg ainsi que des solutions pour perfusion à 5 mg/mL

Les antimétabolites

Le 5-FU

Le 5-FU est un antinéoplasique cytostatique de la classe des antimétabolites (antiprimidine). Son action cible principalement les cellules cancéreuses car l'uracile joue un double rôle fondamental dans les tissus à croissance rapide : d'une part, en étant le précurseur (*via* la thymidilate-synthétase (TS)) de la thymine, base nécessaire à la synthèse d'ADN (acide désoxyribonucléique) qui préside à la division cellulaire ; d'autre part, en entrant dans la composition des ARNs qui président à la synthèse des protéines et des enzymes cellulaires. Ainsi, le 5-FU exerce plusieurs effets antimétaboliques : tout d'abord, il est métabolisé en 5-fluorodéoxyuridine 5'-monophosphate (FdUMP) qui, en présence de 6-méthyltétrahydrofolate, se lie à la TS, bloquant la méthylation de l'uracile en thymine, provoquant ainsi une inhibition de la synthèse d'ADN qui freine la prolifération cellulaire ; d'autre part, il est phosphorylé et triphosphaté (FUTP) et incorporé à la place de l'uracile dans les ARNs (acides ribonucléiques), entraînant des erreurs de lecture du code génétique lors de la synthèse de protéines et d'enzymes, et de la production de coenzymes inefficaces et de ribosomes immatures. Les différents conditionnements sont des perfusions IV de 50mg/ml, de 1000mg/20ml ou de 5000mg/100ml. Le 5-FU est réservé à l'usage hospitalier.

La capécitabine

La capécitabine est un carbamate de la fluoropyrimidine non cytotoxique. Il se comporte comme un précurseur, administré par voie orale, de la fraction cytotoxique, le 5-fluoro-uracile (5-FU). L'enzyme impliquée dans la conversion finale en 5-FU, la thymidine-phosphorylase (ThyPase) est localisée principalement dans les tissus tumoraux. La capécitabine est couramment utilisée dans la prise en charge des cancers colorectaux, du sein et de l'estomac. Les différents conditionnements des comprimés sont de 150mg ou 500mg.

Les inhibiteurs de topoisomérase

L'irinotécan

L'irinotécan est un dérivé hémi-synthétique de la camptothécine. Il s'agit d'un agent anti-néoplasique qui agit comme inhibiteur spécifique de l'ADN topo-isomérase I. L'irinotécan est métabolisé par la carboxylestérase dans la plupart des tissus en un métabolite actif, le SN-38, qui s'est révélé plus actif que l'irinotécan sur la topo-isomérase I purifiée, et plus cytotoxique sur plusieurs lignées de cellules tumorales murines ou humaines. L'inhibition de l'ADN topo-isomérase I par l'irinotécan ou le SN-38 induit des lésions simple-brin de l'ADN qui bloquent la fourche de réplication de l'ADN et sont responsables de l'activité cytotoxique. Celle-ci est fonction du temps de contact avec les cellules et est spécifique de la phase S.

L'irinotécan est disponible en flacon pour solutions injectables de 40mg/2ml, 100mg/5ml et 300/15ml.

Les antianémiques

Acide folinique (Leucovorine)

L'acide folinique, dérivé de l'acide L-glutamique, est un mélange racémique de dérivés dextrogyre et lévogyre. Le lévofolinate de calcium est la forme lévogyre (L), forme active du racémique DL-acide folinique. Il est, utilisé comme antagoniste biochimique des antifoliques en particulier du méthotrexate. Il est également utilisé à très fortes doses pour potentialiser l'activité cytostatique du 5-FU. Cette synergie d'action a été démontrée notamment dans les cancers colorectaux métastasés.

L'acide folinique existe dans une grande variété de conditionnements différents, en association avec le 5-FU il est prescrit sous forme IV à 200mg/m²/jour ou 100mg/m²/jour. Avec le méthotrexate il est prescrit à 10 à 25mg/m² ou 5 à 12.5mg/m² par voie IM, IV lente ou orale.

b. Implication de la chimiothérapie dans les protocoles de soin du CCR

La chirurgie reste le seul traitement curatif du CCR, cependant, une chimiothérapie peut être prescrite en fonction du stade d'avancement de la maladie. Les schémas décisionnels et les différents protocoles de chimiothérapie sont résumés dans les figures ci-dessous : pour le cancer du côlon dans la **figure 5** et pour le cancer du rectum dans la **figure 6**.

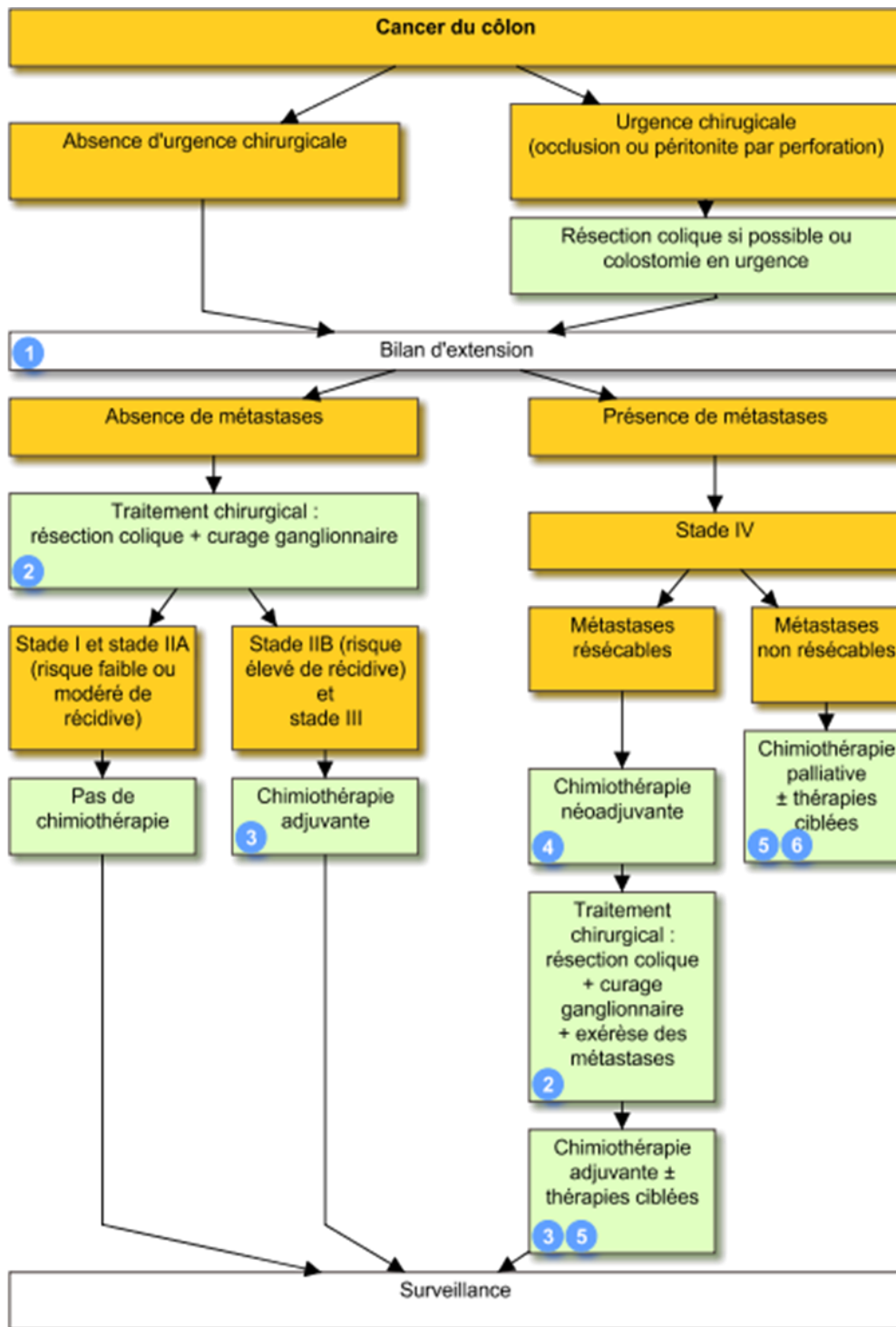


Figure 5 : Schéma décisionnel de prise en charge du cancer du côlon

Source : VIDAL

https://www.vidal.fr/recommandations/3506/cancer_colorectal/prise_en_charge/#com1-c03

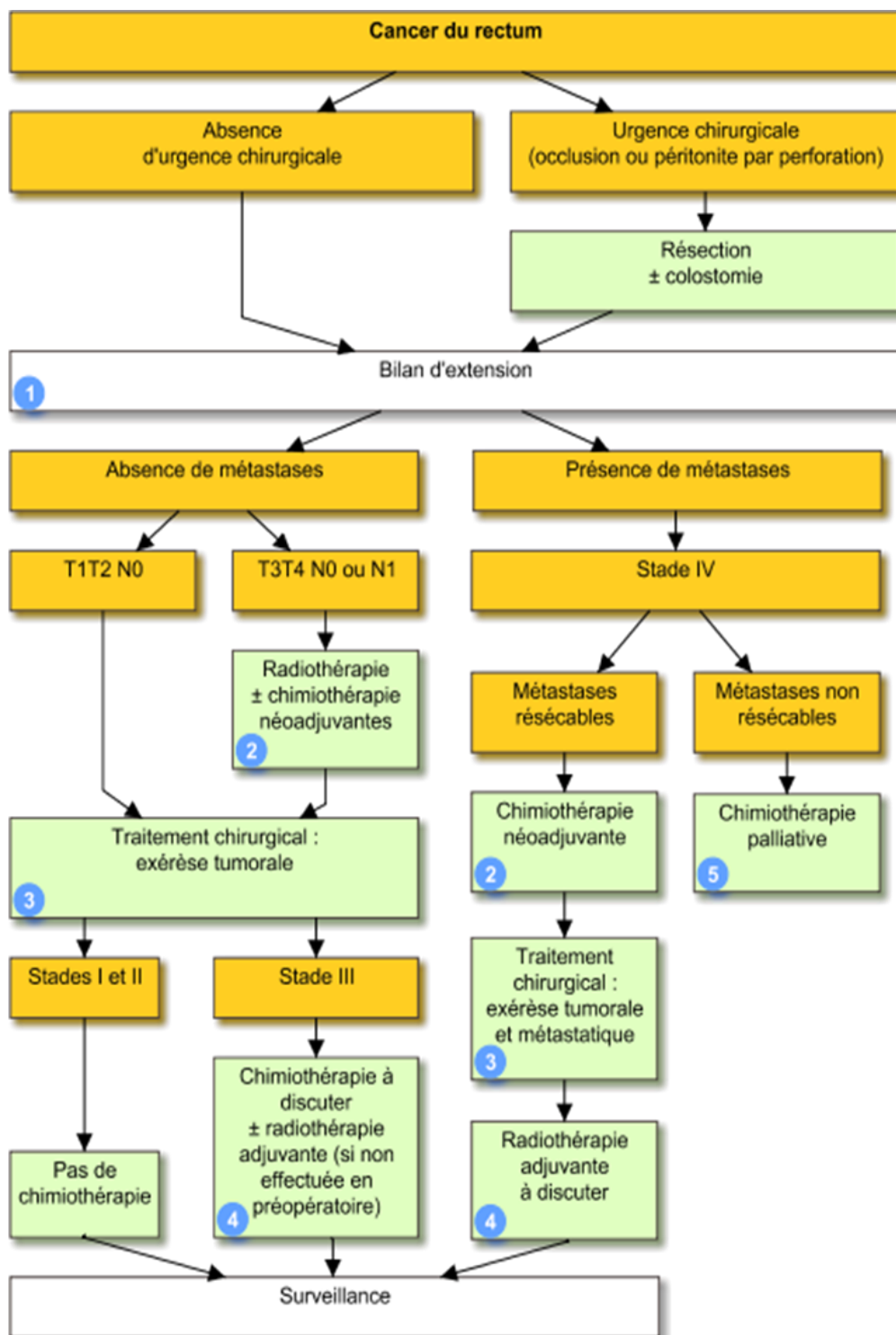


Figure 6 : Schéma décisionnel de prise en charge du cancer du rectum

Source : VIDAL

https://www.vidal.fr/recommandations/3506/cancer_colorectal/prise_en_charge/#d4782e185

- **Fig.5&6 (3) Chimiothérapie adjuvante (après chirurgie)** : Elle fait appel, en cas de risque élevé de récurrence (stade IIb), aux protocoles FOLFOX 4 (5-fluoro-uracile (5FU), Oxaliplatine, Acide folinique) ou LV5FU2 (5-fluoro-uracile (5FU), Acide folinique). Au stade III, le traitement de référence est le FOLFOX 4 pendant 6 mois. En cas de contre-indication à l'oxaliplatine, les alternatives sont : LV5FU2, 5FU oral.
- **Fig.5&6 (4) Chimiothérapie néoadjuvante (avant chirurgie)** : Indiquée en présence de métastases, elle a pour but de réduire le volume tumoral et de tester la sensibilité de la tumeur et des métastases à la chimiothérapie. Le protocole de référence est le FOLFOX 4, seul ou associé à des thérapies ciblées (bévacizumab, cétuximab).
- **Fig.5&6 (5) Thérapies ciblées** : Il s'agit de médicaments dirigés contre des cibles moléculaires spécifiques (récepteurs, gènes ou protéines jouant un rôle dans la cancérogenèse). Le bévacizumab et le cétuximab sont indiqués, en présence de métastases, en association aux protocoles FOLFOX 4 (avant et après chirurgie) ou FOLFIRI (Irinotécan ; 5-fluoro-uracile (5FU), Acide folinique) (après chirurgie).
- **Fig.5&6 (6) Chimiothérapie palliative** : Le choix entre différents schémas (5FU seul ou associé à l'irinotécan, plus ou moins bévacizumab ou cétuximab), est à discuter selon les toxicités et les contre-indications. En cas de métastases hépatiques, une chimiothérapie intra-artérielle hépatique par 5FU ou oxaliplatine peut être discutée.

Les différents protocoles de chimiothérapie sont détaillés dans le **tableau III**

Tableau III Protocole de chimiothérapies adjuvantes employées dans le traitement du CCR

Nom	Indications	durée	Protocole d'administration
FOLFOX4	CCR stade 3 et métastatique 1ère et seconde ligne	2 jours intervalle entre 2 cures : 2 semaines (J1=J15)	J1 : -Oxaliplatine ELOXATINE® : 85mg/m ² en perfusion IV de 120 min (avec acide folinique) -Acide folinique : 400 mg/m ² ou acide L-folinique : 200 mg/m ² en perfusion IV de 120 min (avec oxaliplatine) -5-Fluoro-uracile "bolus" : 400 mg/m ² en perfusion IV de 10 min -5-Fluoro-uracile "infusionnel" : 1200 mg/m ² en infusion IV continue de 22h (infuseur ou pompe)
LV5FU2	CCR métastatique traitement adjuvant des CCR de stade III (alternative à FOLFOX4) Traitement éventuel des CCR de stade II après évaluation de la balance bénéfiques/risques	2 jours intervalle entre 2 cures : 2 semaines (J1=J15)	J2 : -5-Fluoro-uracile "infusionnel" : 1200 mg/m ² en infusion IV continue de 24h (infuseur ou pompe)
FOLFIRI	CCR métastatique 1ère ou seconde ligne	2 jours intervalle entre 2 cures : 2 semaines (J1=J15)	J1 : -Irinotécan CAMPTO® : 180 mg/m ² en perfusion IV de 90 min (avec acide folinique) -Acide folinique : 400 mg/m ² ou acide L-folinique : 200 mg/m ² en perfusion IV de 120 min (avec oxaliplatine) -5-Fluoro-uracile "bolus" : 400 mg/m ² en perfusion IV de 10 min -5-Fluoro-uracile "infusionnel" : 1200 mg/m ² en infusion IV continue de 22h (infuseur ou pompe)
			J2 : -5-Fluoro-uracile "infusionnel" : 1200 mg/m ² en infusion IV continue de 24h (infuseur ou pompe)

Le traitement de choix pour un CCR de stade III reste le protocole FOLFOX qui permet aux patients de bénéficier d'une amélioration de 3% de leur « *disease free survival* » (DFS) à 3 ans. De même, le schéma associant la capécitabine à de l'oxaliplatine (CapeOx) s'est révélé plus efficace que le schéma traditionnel associant du 5-FU à de l'acide folinique, permettant d'augmenter le DFS à trois ans des patients de 4.4% (Haller et al., 2011). Les associations comportant de l'oxaliplatine sont privilégiées, on ne réservera les schémas dépourvus d'oxaliplatine qu'en cas de contre-indication de son utilisation.

L'utilisation de chimiothérapie adjuvante au stade II est plus controversée. Pour un sous-groupe de patients ayant un fort risque de récurrence, l'utilisation de chimiothérapie, selon les associations décrites ci-dessus peut être envisagée (Benson et al., 2004). Il est recommandé de discuter avec le patient des avantages et inconvénients qu'une telle thérapie pourrait lui apporter. Il a cependant été rapporté dans certains cas que l'utilisation de chimiothérapie adjuvante à ce stade ne pouvait apporter qu'un bénéfice négligeable voir même des effets négatifs. Sur cette base, l'utilisation systématique d'une chimiothérapie adjuvante dans le CCR de stade II n'est pas recommandée.

c. La chimiothérapie des CCR métastatiques

Une chimiothérapie doit être envisagée pour tout patient présentant un CCR métastatique. Ces traitements peuvent jouer un rôle synergique en association avec la chirurgie, un rôle néoadjuvant afin de rendre les métastases résécables, ou bien un rôle palliatif en dernier recours. Une étude comparant l'utilisation du schéma de chimiothérapie FOLFOX pendant 6 mois suivi d'une chirurgie avec une chirurgie seule chez des patients ayant jusqu'à 4 métastases hépatiques résécables, a démontré une amélioration de 3 ans de la survie sans progression (PFS). Le schéma FOLFOX est considéré comme la meilleure thérapie adjuvante à la chirurgie des métastases hépatiques (Nordlinger et al., 2008).

Concernant l'utilisation néoadjuvante de la chimiothérapie sur des atteintes hépatiques potentiellement résécables, FOLFOX et FOLFIRI ont montré un taux de réponse similaire d'approximativement 30% (Colucci et al., 2005), alors que la combinaison associant l'oxaliplatine, l'irinotecan et le 5-FU (FOLFOXIRI) a montré un plus haut niveau de réponse (66%), permettant d'atteindre plus fréquemment un état résécable qu'avec FOLFIRI (Falcone et al., 2007).

La chimiothérapie à usage palliatif permet d'augmenter la survie, de réduire la symptomatologie et peut augmenter la qualité de vie. Un tel traitement peut être prescrit pendant 6 mois ou jusqu'à la progression de la maladie en fonction de la toxicité. Les ajustements en temps, et le choix exact de la composition de la thérapie vont dépendre des thérapies précédentes, des voies d'administrations, du profil de toxicité, ainsi que des objectifs poursuivis par ce traitement. FOLFOX et FOLFIRI atteignent des résultats similaires avec une survie globale de 15 mois, équivalente aux schémas associant l'oxaliplatine et à ceux substituant le 5-FU par la Capécitabine (Díaz-Rubio et al., 2007).

4. Les thérapies ciblées

a. Les molécules

Le cétuximab

Le cetuximab est un anticorps monoclonal chimérique IgG1 dirigé contre le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) produit en excès dans les tumeurs. Le cétuximab bloque la liaison des ligands endogènes de l'EGFR aboutissant à une inhibition de la fonction du récepteur. De plus, il induit l'internalisation de l'EGFR, ce qui peut entraîner une régulation négative de l'EGFR. Le cétuximab recrute également les cellules immunes effectrices

cytotoxiques contre les cellules tumorales exprimant l'EGFR (cytotoxicité médiée par les cellules dépendantes des anticorps-ADCC).

La protéine produite par le proto-oncogène *RAS* (rat sarcoma) joue un rôle central dans la transduction des signaux en aval de l'EGFR. Au sein des tumeurs, l'activation de la protéine Ras par l'EGFR contribue à l'augmentation de la prolifération et de la survie.

Les gènes *RAS* (notamment *KRAS*) constituent l'une des familles d'oncogènes le plus fréquemment activées dans le cadre des cancers humains. Les mutations des gènes *RAS* au niveau de certains hot-spots des exons 2, 3 et 4 engendrent une activation constitutive des protéines RAS indépendamment des signaux de l'EGFR.

Le cétuximab existe en conditionnement pour préparations injectables à 5mg/mL de 100mL ou 200mL.

Le bévacizumab

Le bévacizumab est un anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Il inhibe la liaison du VEGF à ses récepteurs flt-1 (VEGFR-1) et KDR (VEGFR-2) à la surface des cellules endothéliales, réduisant ainsi la vascularisation et la croissance tumorale. La neutralisation de l'activité biologique du VEGF fait régresser les vaisseaux tumoraux, normalise les vaisseaux tumoraux restants, et inhibe la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux. Le bévacizumab se présente en préparations pour solutions injectables de 100mg/4mL ou de 400mg/16mL.

b. Implication dans la thérapeutique

Depuis les 10 dernières années, de nouveaux traitements ciblés, en particulier des anticorps monoclonaux, ont fait leur apparition dans les schémas de prise en charge du CCR (en particulier du CCR métastatique) ainsi que dans celle d'autres cancers.

Certaines études ont montré le bénéfice apporté par l'ajout du Bevacizumab à une thérapie oxaliplatine/irinotecan. On obtient une augmentation à la fois du PFS et de la survie globale. Sa combinaison avec des protocoles comportant uniquement de l'oxaliplatine a permis d'augmenter la PFS mais pas la survie globale (Saltz et al., 2008 ; Cassidy et al., 2008).

La présence de mutation de l'*EGFR* dans un nombre important de CCR (et de cancers du poumon) a conduit à l'émergence de l'utilisation du Cetuximab. La combinaison du Cetuximab avec le protocole FOLFIRI permet d'augmenter le PFS et la survie globale (Van Cutsem et al., 2011). En revanche l'utilisation du Cetuximab n'a pas montré de bénéfice sur la survie

statistiquement décelable en association avec FOLFOX (Maughan et al., 2011). Il a été montré que le Cetuximab pouvait lever la résistance à l'irinotecan. Les mutations des gènes *KRAS* et *BRAF* dans les voies de signalisation en aval de l'EGFR dans les tumeurs, sont incompatibles avec une réponse positive au Cétuximab. Déterminer le statut mutationnel de *KRAS* est donc de première importance afin de déterminer quels patients seront éligibles à une thérapie au Cetuximab.

PARTIE II

I. Cancer colorectal et métabolisme

1. La mutation *KRAS* dans le CCR

L'apparition de nouvelles thérapies ciblées comme le bevacizumab un anticorps monoclonal inhibiteur de l'angiogenèse, ou le cetuximab, un anticorps inhibiteur de l'Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR), a contribué à l'amélioration de la prise en charge des formes avancées de CCR. Néanmoins, ces médicaments ne sont pas administrables chez tous les patients. Le cetuximab n'est par exemple pas indiqué dans les formes de CCR présentant une mutation de l'oncogène *KRAS* : l'activation de la protéine codée par ce gène intervient en aval de celle de l'EGFR, et rend inefficace l'inhibition du récepteur. De plus, les patients traités par ces molécules sont très souvent sujets à l'apparition de résistances qui conduisent à la recrudescence de la tumeur (Deschoolmeester, *et al.* 2010). Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de prendre en charge les formes les plus avancées de CCR constitue donc un enjeu de santé publique majeur.

Le gène *ras* est l'un des oncogènes les mieux caractérisés et les plus étudiés à ce jour. Parmi les trois isoformes humains, *KRAS* est le plus fréquemment altéré. Les mutations du gène *KRAS* sont particulièrement fréquentes dans les cancers du pancréas et du côlon dans lesquels elles représentent environ 90% et 40% des cas respectivement. Entre 30 et 50% des patients atteints d'un CCR métastatique présentent une mutation *KRAS*. Les mutations les plus fréquentes sont sur le codon 12 (G12D, 13% et G12V, 9%) ou 13 (G13D, 8%) (Osumi. *et al.* 2015) (**Figure 7**).

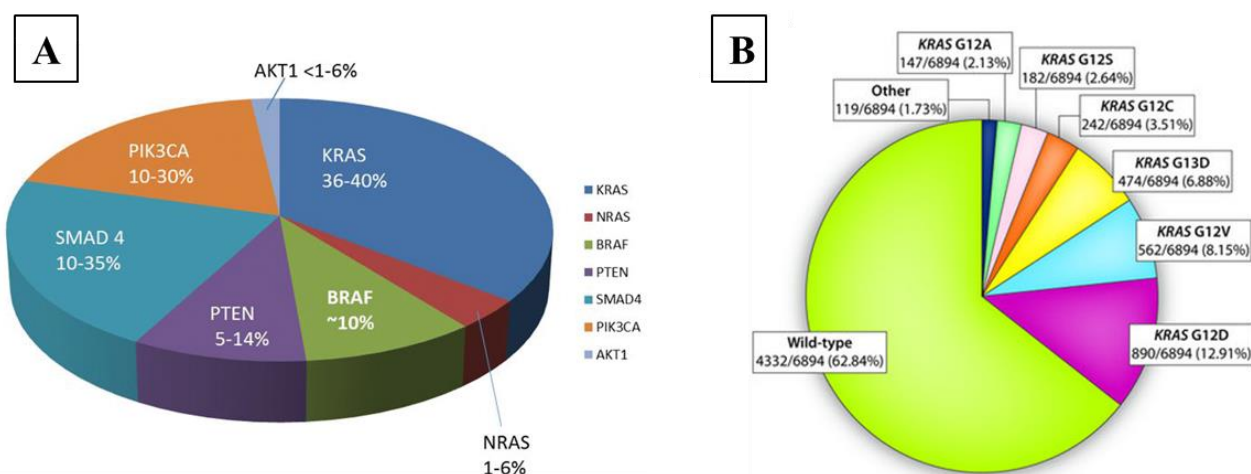


Figure 7 : Répartition des différentes mutations somatiques dans le cancer colorectal et des différents isotopes de *KRAS*.

A) Schéma de la répartition des différentes mutations somatiques retrouvées le plus fréquemment dans le cancer colorectal. B) Représentation schématique des différentes mutations de *KRAS* retrouvées dans une population de carcinomes et d'adénocarcinomes de colon. *D'après Parsons 2013*

Les gènes de la famille *ras* codent pour des protéines de 21 kDa (118 acides aminés), associées

à la face interne la membrane plasmique. Sous leur forme inactive, les protéines ras sont exprimées de façon ubiquitaire. Elles s'activent dès lors qu'un récepteur tyrosine kinase proche (notamment les récepteurs aux facteurs de croissance comme l'EGFR) se lie à son ligand. Elles changent alors d'état, passent d'une conformation GDP-liée (Guanosine Diphosphate liée) inactive à une conformation GTP-liée (Guanosine Triphosphate liée) active. Une fois activées, les protéines Ras vont entraîner une activation de voies de signalisation en aval, comme les voies PI3K (phosphoinositide 3-kinase) et MAPK (Mitogen-activated protein kinases), impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire. Lorsque *Kras* est muté, la protéine se trouve perpétuellement dans un état GTP-lié, conduisant à une activation constitutive des voies de survie, indépendamment des signaux transmis par les récepteurs aux facteurs de croissance (Arrington, *et al.* 2012) (**Figure 8**). La transduction de ces signaux mène *in fine* à une prolifération anarchique et à la prédominance des signaux de survie, deux caractéristiques majeures des cellules cancéreuses.

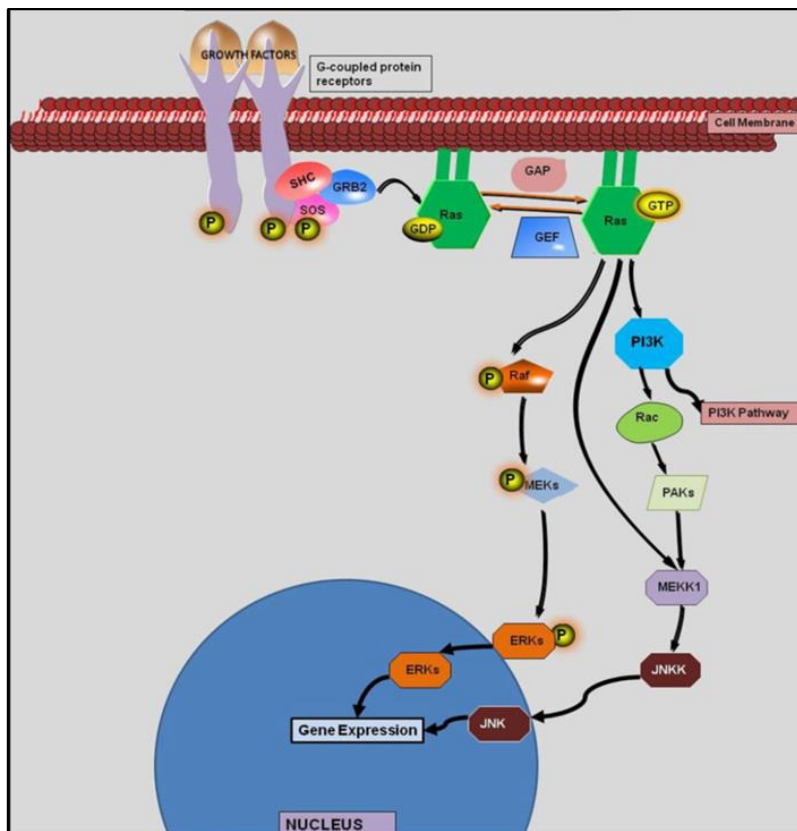


Figure 8 : La voie de signalisation Ras.

Représentation schématique de la cascade d'activation de Ras. En réponse à la stimulation d'un facteur de croissance, la protéine Ras passe de la forme inactive GDP liée à une forme active GTP liée qui pourra exercer son activité GTPase afin d'activer différentes voies de signalisation cellulaire, comme la voie MEK/ERK et la voie PI3K/Akt/mTOR. D'après Arrington *et al* 2012

2. Métabolisme du cancer

a) Métabolisme énergétique

Les cellules cancéreuses présentent un certain nombre d'altérations caractéristiques, qui participent à leur développement et à leur survie. Elles sont regroupées sous l'appellation « hallmarks of cancer », rassemblées en 2001 puis actualisées en 2011, par Hanahan et Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011). Ces caractéristiques incluent notamment la dérégulation du métabolisme énergétique.

Le métabolisme énergétique des cellules normales a pour but de maintenir l'homéostasie ce qui nécessite de produire de l'énergie principalement sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Dans ce but, le glucose est dégradé par le biais de différentes voies métaboliques : la glycolyse dans le cytoplasme, le transfert dans la mitochondrie sous forme d'acétyl-Coenzyme A (Acétyl-CoA), le cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques, cycle TCA) dans la matrice mitochondriale puis le long de la chaîne de transport des électrons qui, couplée à l'ATP synthase permet la production d'ATP a raison de 36 à 38 molécules d'ATP par molécule de glucose oxydée (**Figure 9A**). Ceci constitue la voie primordiale de l'utilisation du glucose et permet d'atteindre un taux optimal de production d'énergie pour assurer la maintenance

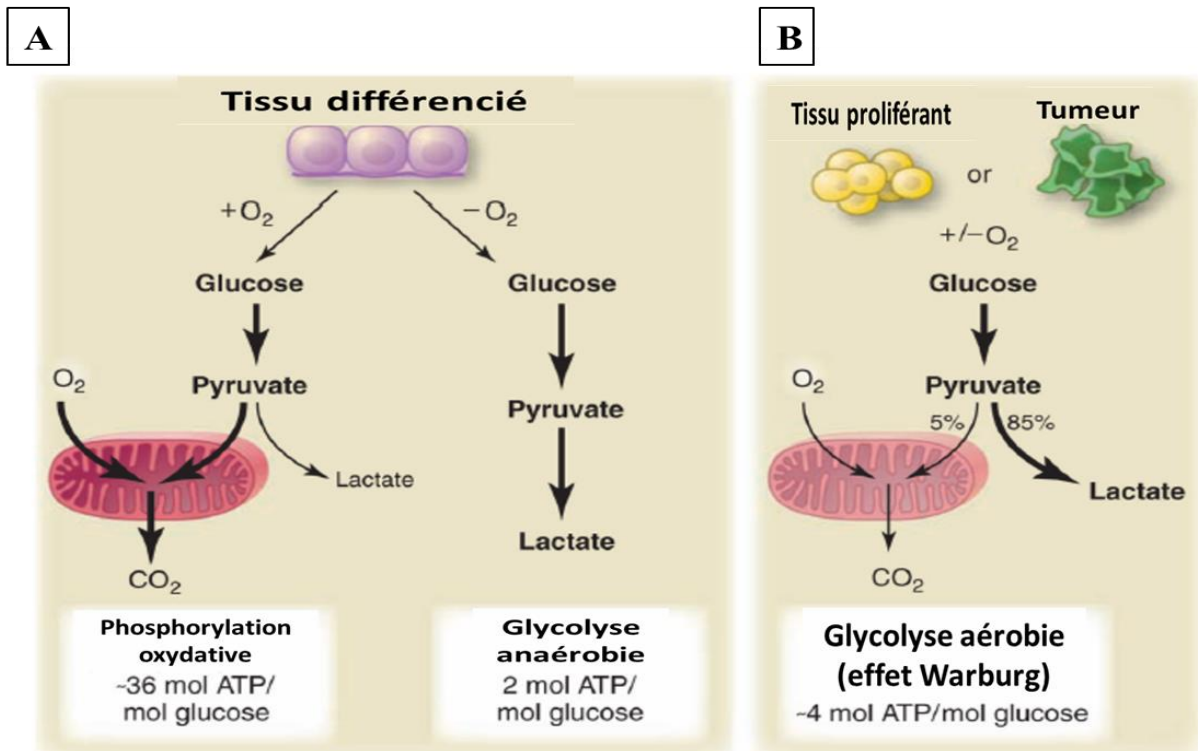


Figure 9 : Métabolisme énergétique physiologique et effet Warburg.

Représentation schématique du métabolisme énergétique physiologique (A) et de l'effet Warburg (B). Les cellules proliférantes et tumorales se reposent sur la glycolyse plutôt que sur la phosphorylation oxydative pour produire, entre autres, de l'énergie, et ce, même en présence de dioxygène. D'après Matthew et al 2009

cellulaire et entretenir des processus tels que le renouvellement protéique et la réparation de l'ADN. Les cellules cancéreuses ont des besoins énergétiques et anaboliques très élevés du fait de leur activité de prolifération exacerbée. Pour se multiplier, elles requièrent de l'énergie, des acides aminés pour produire de nouvelles protéines, des nucléotides pour répliquer leur ADN (Acide Désoxyribonucléique) ainsi que des lipides pour constituer membrane plasmique et organites cellulaires.

b) L'effet Warburg

Afin de répondre à leurs besoins énergétiques et anaboliques, et également pour maintenir un statut oxydatif (rédox) correct, la majorité des cellules cancéreuses présentent une augmentation de la prise de glucose, du flux glycolytique et de la production de lactate, et ce même en présence de dioxygène. Ce comportement particulier avait déjà été observé par O. Warburg dans Les années 20 et avait initialement été attribué à un dysfonctionnement mitochondrial. Cette dégradation incomplète du glucose avec conversion du pyruvate en lactate a depuis été appelée glycolyse aérobie ou effet Warburg (pour revue, voir Koppenol, *et al.* 2011) (**Figure 9B**). Aujourd'hui, on sait que cette glycolyse aérobie n'est pas la conséquence d'une déficience au niveau des mitochondries. Les mitochondries des cellules proliférantes sont fonctionnelles mais au lieu de réaliser prioritairement la phosphorylation oxydative pour la production d'énergie, elles sont reprogrammées pour servir d'organelles biosynthétiques (Ward & Thompson. 2012). Le pyruvate étant réduit en lactate par la lactase déshydrogénase (LDH), la voie de la respiration cellulaire n'est pas favorisée.

Cependant, bien que la glycolyse seule conduise à un rendement énergétique moins élevé que les phosphorylations oxydatives (2 molécules d'ATP contre 36-38), elle confère sans nul doute d'autres avantages à la cellule cancéreuse.

En premier lieu, le processus glycolytique est 10 à 100 fois plus rapide ce qui permet une fourniture rapidement mobilisable d'énergie et adaptable en fonction de la disponibilité du glucose et de la demande en ATP de la cellule (Shestov, *et al.* 2014.).

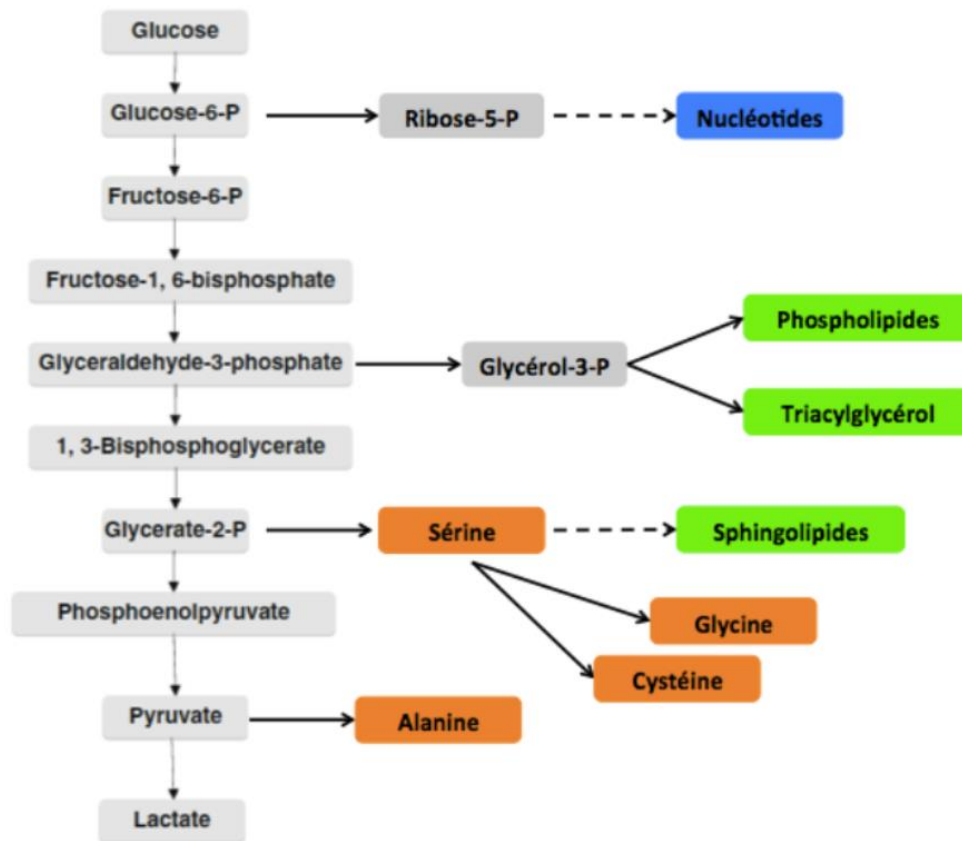


Figure 10 : La glycolyse, source de précurseurs anaboliques.

Représentation schématique des différents intermédiaires de la glycolyse. Plusieurs d'entre eux peuvent être détournés pour fournir des nucléotides (en bleu), des lipides (en vert) et des acides aminés (en orange). *Adapté de Lunt et Van der Heiden 2011.*

De plus, la prolifération cellulaire requiert non seulement de l'ATP mais aussi des nucléotides, des acides aminés et des lipides. Les intermédiaires métaboliques de la glycolyse peuvent servir de précurseurs pour générer ces molécules (**Figure 10**).

Le glucose-6-phosphate peut être dévié vers la voie des pentoses phosphates, converti en ribose-5-phosphate pour *in fine* produire des nucléotides avec production de NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate). Les intermédiaires de la glycolyse peuvent également être détournés vers la synthèse de lipides : le dihydroxyacétone phosphate peut être réduit en glycérol-3-phosphate, précurseur du triacylglycérol et phospholipides, participant ainsi au renouvellement des membranes. Le 3-phosphoglycérate peut être converti en sphingolipides, qui entrent également dans la composition des membranes. Le 3-phosphoglycérate et le pyruvate peuvent être transformés en acides aminés comme la sérine, la glycine, la cystéine ou l'alanine. Une très grande partie des intermédiaires de la glycolyse peut donc servir de base pour générer les principales macromolécules biologique nécessaire à la prolifération cellulaire.

L'effet Warburg procure d'autres avantages pour le développement tumoral. Il permet à la cellule cancéreuse de survivre dans un environnement bien souvent hypoxique, ou transitoirement hypoxique. De plus, la forte production de lactate conduit à une baisse du pH, d'abord intracellulaire, puis extracellulaire via les transporteurs de monocarboxylate (MCT). Cette acidification a, d'une part, des effets mutagènes et clastogènes en inhibant la réparation de l'ADN et participe à l'instabilité génétique caractéristique des cellules tumorales (Morita, *et al.* 1992.). D'autre part, l'acidification du milieu extracellulaire favorise l'invasion cellulaire et le processus métastatique. Le pH bas va entraîner la mort des cellules voisines par apoptose via l'activation de *p53* et des caspases. Les cellules cancéreuses ayant très souvent une mutation de *p53*, ce mécanisme affecte préférentiellement les cellules saines (Park, *et al.* 1999). Enfin, un milieu acide favorise l'activité des métalloprotéases qui pourront conduire à une dégradation de la matrice extracellulaire et des lames basales et, *in fine* favoriser l'invasion tumorale (Martinez-Zaguilan, *et al.* 1996 ;El-Kenawi *et al.*, 2019).

Un autre avantage à l'utilisation préférentielle de la glycolyse par les cellules tumorales est le maintien d'un niveau bas des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont dommageables

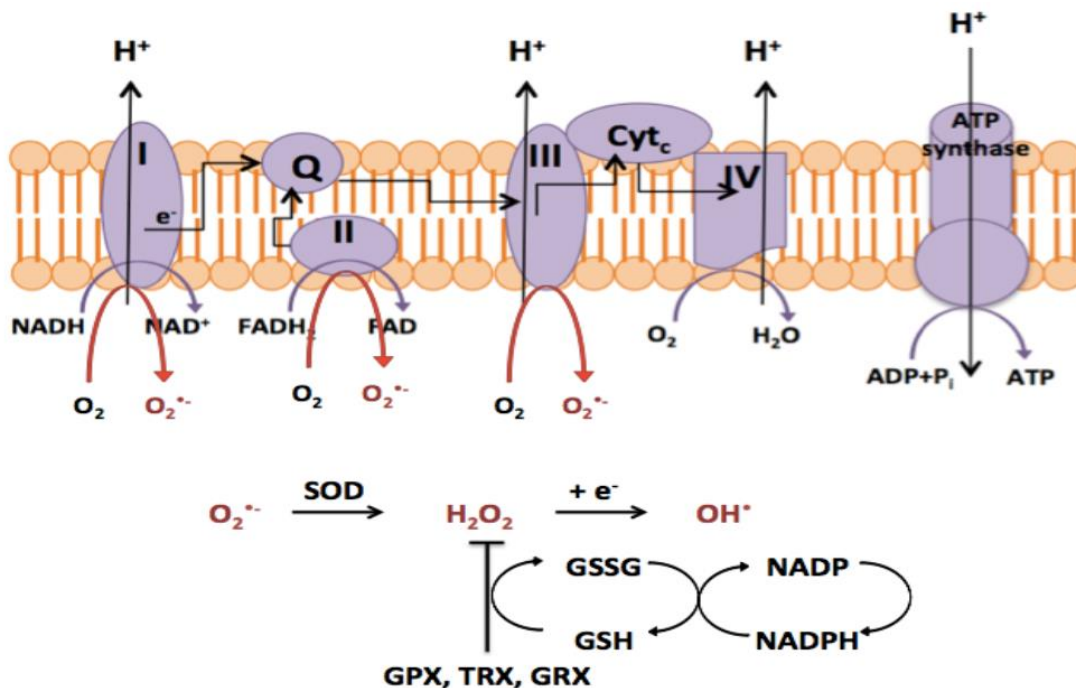


Figure 11 : Production de ROS par la mitochondrie et détoxification.

Les ROS sont notamment produits au niveau de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie par perte d'électrons (e⁻) qui se lient à l'oxygène (O₂) pour former l'anion superoxyde (O₂⁻). L'anion superoxyde est converti en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par la superoxyde dismutase (SOD). H₂O₂ peut être converti en radical hydroxyle par ajout d'électron. Les radicaux libres sont neutralisés par des enzymes comme la glutathion peroxydase (GPX), la thiorédoxine (TRX) et glutarédoxine (GRX). Ces enzymes utilisent le glutathion réduit (GSH) comme co-facteur, qui est régénéré grâce au NADPH.

pour les cellules. En effet, la mitochondrie est la source majeure de production de ROS tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^\bullet). Les ROS sont formés à partir de la liaison de l'oxygène à des électrons qui s'échappent de la chaîne de transport mitochondriale. L'accumulation excessive de ROS entraîne un stress oxydant qui est toxique pour la cellule. La glycolyse prenant le pas sur la respiration mitochondriale, on observe une diminution de la formation des ROS par la mitochondrie. De plus, la déviation du glucose vers la voie des pentoses phosphates permet la production de NADPH, un facteur essentiel pour le réapprovisionnement en glutathion réduit (GSH), un facteur antioxydant majeur (**Figure 11**).

On notera cependant qu'il existe une hétérogénéité au sein des tumeurs, et que bien que la majorité des cellules cancéreuses présentent un métabolisme du glucose essentiellement glycolytique, certaines cellules maintiennent un métabolisme énergétique dépendant de la respiration cellulaire. Il existe ainsi une coopération entre les zones tumorales glycolytiques qui produisent du lactate et les zones oxydatives qui importent le lactate pour le convertir en acétyl-CoA et ainsi alimenter le cycle de Krebs (Sonveaux, *et al.* 2008.). Il faut, de plus, remettre cette dérégulation métabolique dans un contexte physiologique dynamique avec de nombreuses variations qui peuvent survenir au court du temps en fonction des différents stades de développement de la tumeur (Danhier, *et al.* 2017). Des travaux ont montré que des cellules issues de cancer du sein présentaient une augmentation de leur métabolisme oxydatif au cours du processus métastatique via l'activation du facteur de transcription PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha) qui favorisent les voies de la respiration cellulaire (Lebleu, *et al.* 2014). Cette observation est cohérente avec le modèle selon lequel l'effet Warburg aurait comme but principal de favoriser la synthèse de macromolécules nécessaire à la prolifération plus qu'à générer de l'énergie sous forme d'ATP. Pour initier un phénotype invasif et mobile, les cellules auraient donc besoin de revenir vers un métabolisme permettant de produire plus d'énergie.

c) Régulation de la reprogrammation métabolique par les oncogènes

La transformation maligne est accompagnée de certaines mutations, amplifications ou pertes de gènes qui ont un impact non seulement sur les capacités prolifératives mais aussi sur le métabolisme. Les perturbations métaboliques rencontrées au niveau des cellules cancéreuses, au premier rang desquels l'effet Warburg, sont notamment la conséquence d'altérations génétiques, que ce soit l'activation d'oncogènes, ou la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeur.

On peut notamment citer l'oncogène *Myc* qui régule la synthèse des nucléotides (Miller, *et al.* 2012), ainsi que la biogenèse mitochondriale et induit la glycolyse aérobie. *Myc* favorise la consommation de glucose en augmentant l'expression de ses transporteurs (Osthus, *et al.* 2000) ainsi que la production de lactate (Shim, *et al.* 1997). *Akt* induit l'augmentation de l'expression de transporteurs du glucose (Jacobs, *et al.* 2008) et de l'hexokinase (Elstrom, *et al.* 2004 ; Robey & Hay 2009), favorisant l'effet Warburg et l'addiction des cellules cancéreuses au glucose. En aval d'*Akt*, *mTORC1* (mammalian target of rapamycin 1) est impliqué dans la régulation du métabolisme mitochondrial. Il favorise la production des acides aminés par les réactions de transamination au niveau de la mitochondrie comme la production d'aspartate à partir d'oxaloacétate et de glutamate (Ward & Thompson 2012)

HIF1a (Hypoxia inducible factor 1a) est un facteur de transcription qui présente un impact majeur sur la régulation du métabolisme énergétique. En normoxie *HIF1a* est normalement adressé vers le protéasome pour y être dégradé. Cette dégradation est empêchée en cas d'hypoxie. Et *HIF1a* peut alors jouer son rôle au niveau du noyau et stimuler la transcription de gènes liés au métabolisme anaérobie et donc liés à la glycolyse. Dans les tumeurs, *HIF1a* est maintenu actif et favorise la glycolyse aérobie en induisant l'expression de transporteurs du glucose et de la pyruvate kinase déshydrogénase (PDK) (Kim, *et al.* 2006). PDK inhibe l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH) ce qui favorise la conversion du pyruvate en lactate plutôt que son envoi dans le cycle de Krebs sous forme d'acétylCoA (Kim, *et al.* 2006). Enfin, en plus de leurs effets déjà mentionnés sur la prolifération et la survie les mutations de *Ras*, majoritairement représentées par KRAS, favorisent l'expression du transporteur de glucose GLUT1 (Sasaki, *et al.* 2012). Il est intéressant de noter que la carence en glucose augmente le taux d'apparition de mutations *Ras* au niveau de cellules de carcinome du côlon (Yun, *et al.* 2009), ce qui indique l'avidité de ces cellules pour le glucose. *Ras* favorise également l'absorption et la synthèse des acides gras (Kamphorst, *et al.* 2013).

En conclusion, la dérégulation du métabolisme énergétique des cellules tumorales constitue une adaptation essentielle permettant aux cellules cancéreuses de produire une fourniture énergétique et un apport d'intermédiaires métaboliques suffisamment important pour soutenir leur importante réplication tout en maintenant un statut rédox acceptable. Ces altérations sont une réponse à un environnement carencé ainsi qu'à des altérations génétiques (**Figure 12**).

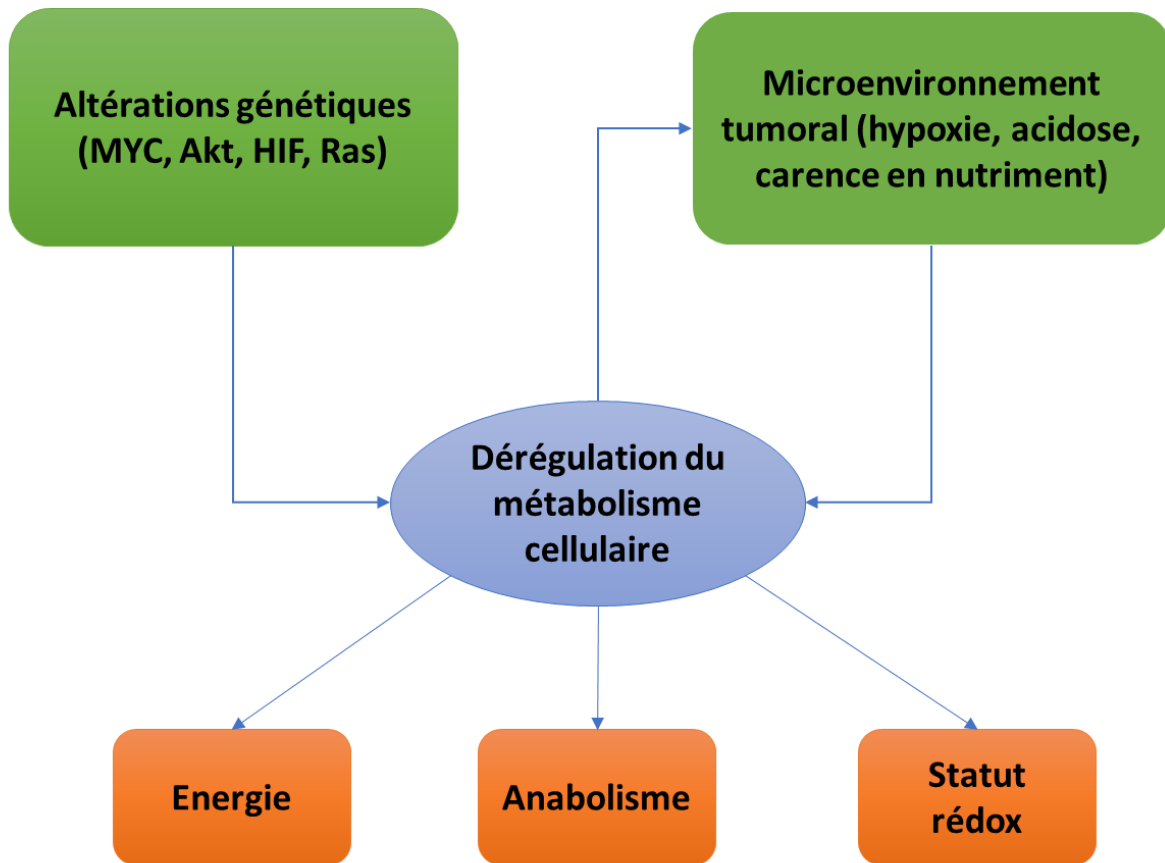


Figure 12 : Déterminants du phénotype métabolique des tumeurs.

Le métabolisme tumoral est régulé par des mutations génétiques intrinsèques et par une réponse au microenvironnement tumoral. Des signaux oncogéniques stimulés par la perte de suppresseur de tumeur ou l'activation d'oncoprotéines (Akt, Ras, Myc, HIF) résultent en une altération de la signalisation qui modifie le métabolisme. Un environnement anormal comprenant de l'hypoxie, de l'acidose et la carence en nutriments induit des réponses cellulaires qui affectent également l'activité métabolique. Ces adaptations optimisent le métabolisme cellulaire pour fournir l'énergie, les ressources anaboliques et maintenir le statut rédox de façon à promouvoir la prolifération cellulaire.

3. Le méthylglyoxal

a) Origine et caractéristiques chimiques

Le méthylglyoxal (MG, $C_3H_4O_2$) est un dicarbone également appelé pyruvaldéhyde ou 2-oxopropanal qui est principalement formé dans les cellules lors de la glycolyse (**Figure 13**). Plus précisément, cette molécule est un sous-produit formé au cours de la quatrième réaction de la glycolyse. C'est la perte spontanée d'un groupement phosphate à partir des trioses phosphates, glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) et dihydroxyacétone phosphate (DHAP), qui engendre la création de MG (Phillips & Thornalley 1993.).

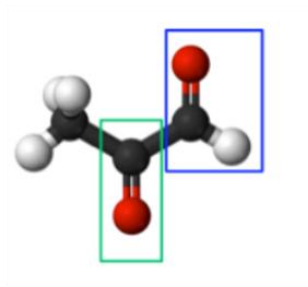


Figure 13 : Structure chimique du méthylglyoxal.

Le méthylglyoxal est un dicarbone comprenant un groupe aldéhyde en bleu et un groupe cétone en vert.

L'enzyme glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est importante pour la régulation du taux de formation de MG car elle catalyse la réaction suivante de la glycolyse, transformant les trioses phosphates en 1,3-bisphosphoglycérate. Une activité faible de GAPDH favorise l'accumulation des trioses phosphates et ainsi la production spontanée de MG (Beisswenger, *et al.* 2003) (**Figure 14**). L'activité de cette enzyme clé est notamment régulée par sa modification par le MG suggérant que le MG exercerait un rétrocontrôle sur sa propre

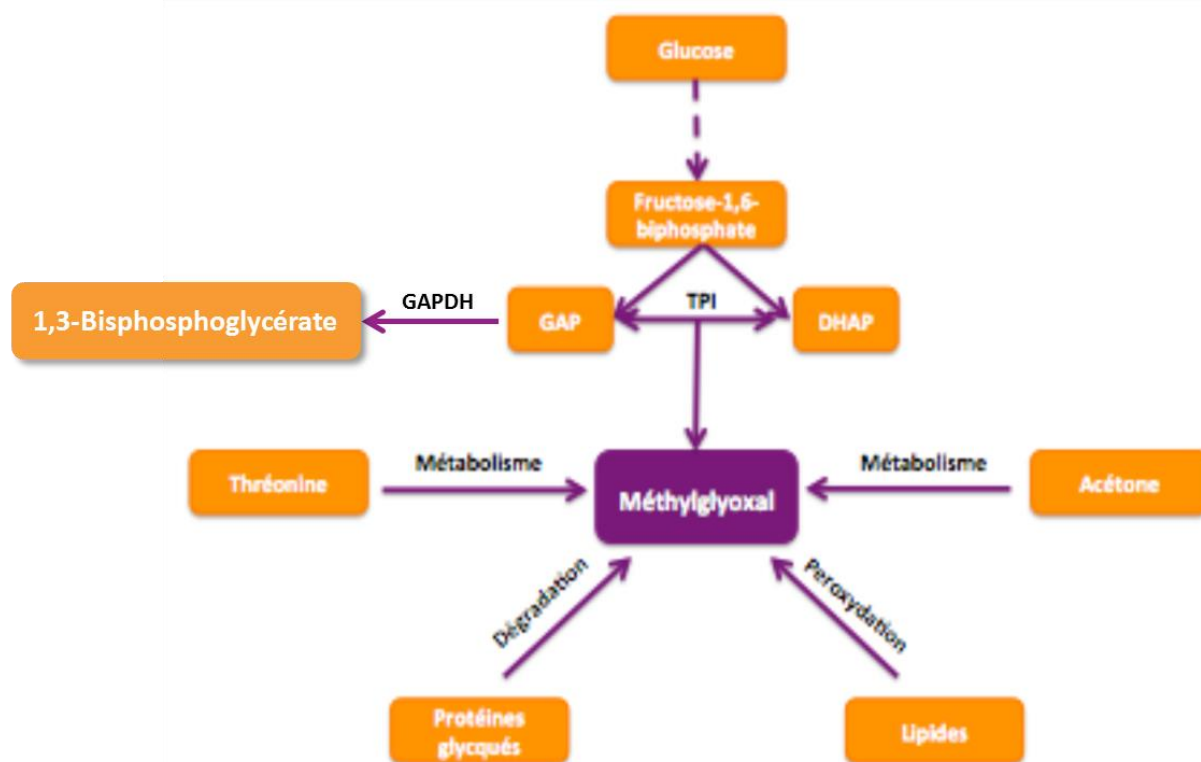


Figure 14 : Voies de production du méthylglyoxal.

La source principale du MG est la glycolyse, à partir des trioses phosphates (GAP et DHAP) qui sont maintenus en équilibre par la TPI. Ces deux métabolites sont convertis en 1,3 bisphosphoglycérate par la GAPDH. Si la GAPDH est saturée, ou que son activité est faible, on observe une augmentation de la production de méthylglyoxal. Le MG peut aussi être produit lors du métabolisme de l'acétone et de la thréonine, de la peroxydation de lipides et de la dégradation de protéines glyquées. *D'après Beisswenger et al 2003.*

production. La glycolyse ne produit, cependant, que relativement peu de MG, qui représente environ 0.1% du flux glycolytique. Cette proportion peut augmenter jusqu'à 1% dans les conditions d'hyperglycémie associées au diabète (Rabbani & Thornalley 2011).

D'autres voies conduisent à la formation de MG comme l'oxydation de l'acétone lors du catabolisme des corps cétoniques (Casazza, *et al.* 1984) et l'oxydation de l'aminocétone dans le catabolisme de la thréonine (Lyles & Chalmers 1992). La dégradation oxydative des lipides (peroxydation) (Esterbauer, *et al.* 1982), celles des protéines glycosylées par le glucose ou des monosaccharides (Thornalley, *et al.* 1999) contribue également à la formation de MG (**Figure 14**). La famille des dicarbonyles compte deux autres membres majeurs, le glyoxal (GO) et le 3-déoxyglucosone (3-DG). Ils sont principalement formés lors de la dégradation non-enzymatique du glucose et des protéines glycosylées par le glucose (Thornalley, *et al.* 1999). La peroxydation lipidique (Loidl-Stahlhofen & Spiteller 1994) et la dégradation de nucléotides peuvent aussi former le GO alors que le 3-DG peut être produit par la dégradation du fructosamine-3-phosphate lors de la réparation des protéines glycosylées ou lors de la dégradation du fructose-3-phosphate (Lal, *et al.* 1997 ; Delpierre, *et al.* 2000). Dans les résultats qui seront présentés par la suite, les effets du MG seront considérés comme représentatifs du stress dicarbone dans son ensemble.

b) Le stress dicarbone

Le MG possédant deux groupements carbonyles (une cétone et un aldéhyde), il présente une très grande réactivité. Il est notamment capable de réagir avec les groupes amines et guanides des macromolécules biologiques pour former les produits de glycation avancés (AGEs). Ces produits de glycations ont été impliqués dans l'étiologie de nombreuses maladies chroniques, telle que le diabète et ses complications (Bierhaus, *et al.* 2012), les maladies neurodégénératives (Kuhla, *et al.* 2007), le vieillissement prématuré, l'obésité, l'insuffisance rénale, les maladies

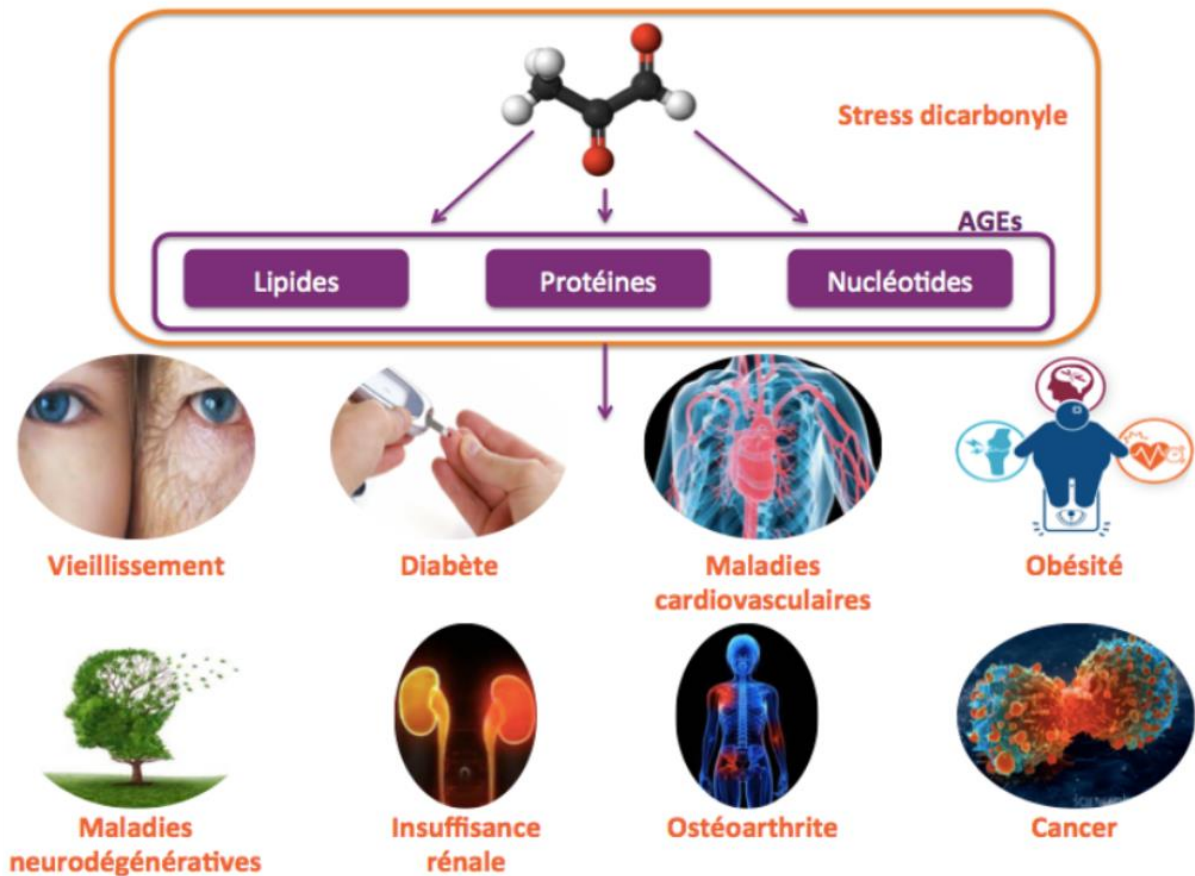


Figure 15 : Implication du stress dicarbone dans des pathologies chroniques.

L'accumulation de MG et de ses AGEs induit un stress dicarbone qui a été impliqué dans l'étiopathologie de nombreuses maladies chroniques représentées dans ce schéma. D'après Rabbani *et al* 2015

cardiovasculaires, l'ostéoarthrite et, dans une moindre mesure, le cancer (Santarius, *et al.* 2010; pour revue voir Rabbani & Thornalley 2015) (**Figure 15**).

On considère donc le MG comme un agent glyquant extrêmement réactif. Son activité de modification des protéines est ainsi par exemple 10 000 à 50 000 fois supérieure à celle du glucose. Contrairement à la glycosylation, la glycation est un processus qui ne requiert pas d'activité enzymatique. La glycation se déroule en une succession de réactions non-enzymatiques regroupées sous le nom de réaction de Maillard. Ce procédé met en jeu des

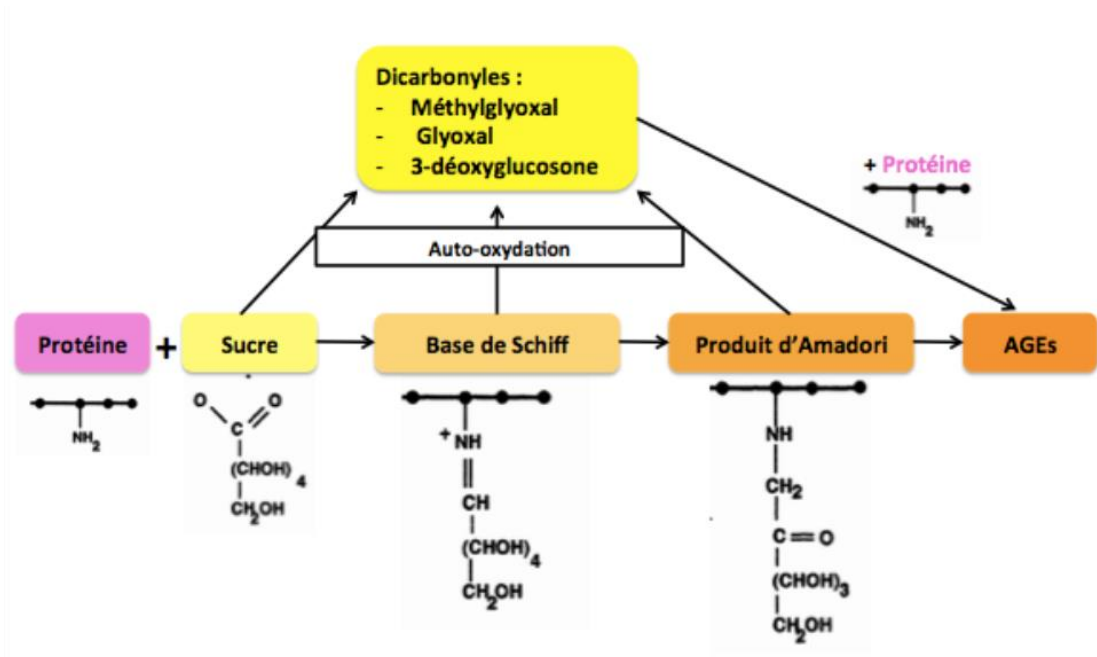


Figure 16 : Glycation des protéines par la réaction de Maillard.

groupements carbonyles et amines, menant à la formation d'AGEs et s'apparente à une caramélisation (**Figure 16**).

Les adduits de glycation formés par le MG réagissent principalement avec les résidus amines libres des protéines, des nucléotides et des lipides. La proportion des molécules modifiées par le MG est de 0,1-1% des résidus lysine et arginine des protéines, 1/100000 des nucléotides et 0,1% des phospholipides basiques (Thornalley, *et al.* 2003). Les hydroimidazolones (MG-H1/2/3), les argpyrimidines, les tétrahydropyrimidines (THF) sont les adduits formés par le MG sur les arginines. La formation d'adduits du MG à partir de lysine résulte en Nε-(carboxyethyl)lysine (CEL) ou en dimères 1,3-di(Nε-lysino)-4-méthyl-imidazolium (MOLD). L'adduction de lysine et d'arginine ensemble par le MG forme les adduits MODIC (methylglyoxal-derived imidazolium cross-link) (**Figure 17**). Puisque le MG est présent dans toutes les cellules, et est le dicarbonyle le plus réactif *in vivo*, l'identification de ses cibles est d'un intérêt scientifique certain. L'accumulation des adduits formés au niveau des macromolécules biologiques entraîne un nouveau type de stress cellulaire : le stress dicarbonyle.

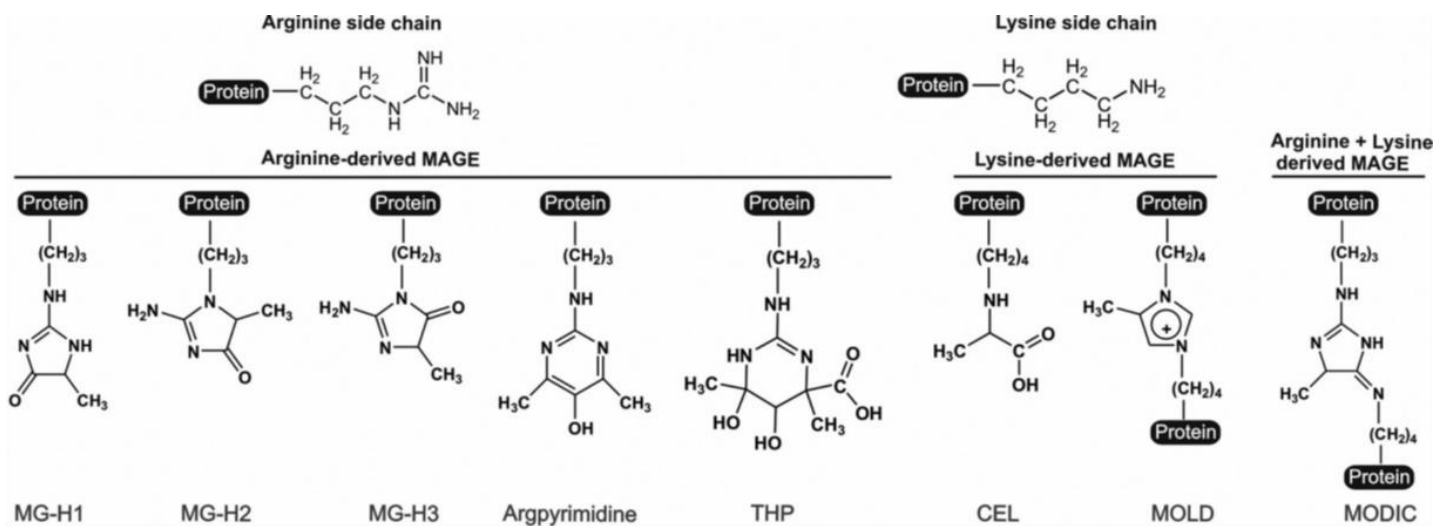


Figure 17 : MG-AGEs, adduits du méthylglyoxal sur les acides aminés.

L'adduction du MG sur les résidus arginines permet la formation de MG-H1, MG-H2, MG-H3, argpyrimidine et THP. L'adduction du MG sur les acides amines lysines permet la formation de CEL et MOLD. La condensation de lysine et d'arginine par le MG donne les adduits MODIC.

c) Détoxification du MG

Le stress cellulaire induit par le MG a de nombreux effets délétères avec notamment un impact sur la structure et la fonction des protéines et la stabilité génétique. Physiologiquement, cette toxicité est compensée par des voies de détoxification, dont la principale est la voie des glyoxalases. Ce système comprend deux enzymes glyoxalases (Glo1 et Glo2) qui détoxifient le MG en D-lactate. Le glutathion réduit (GSH) joue ici le rôle de cofacteur en formant spontanément un hémithioacétal avec le MG, qui sera converti en S-D-lactoylglutathion par GLO1, puis en D-lactate par Glo2 avec régénération du GSH (**Figure 18**).

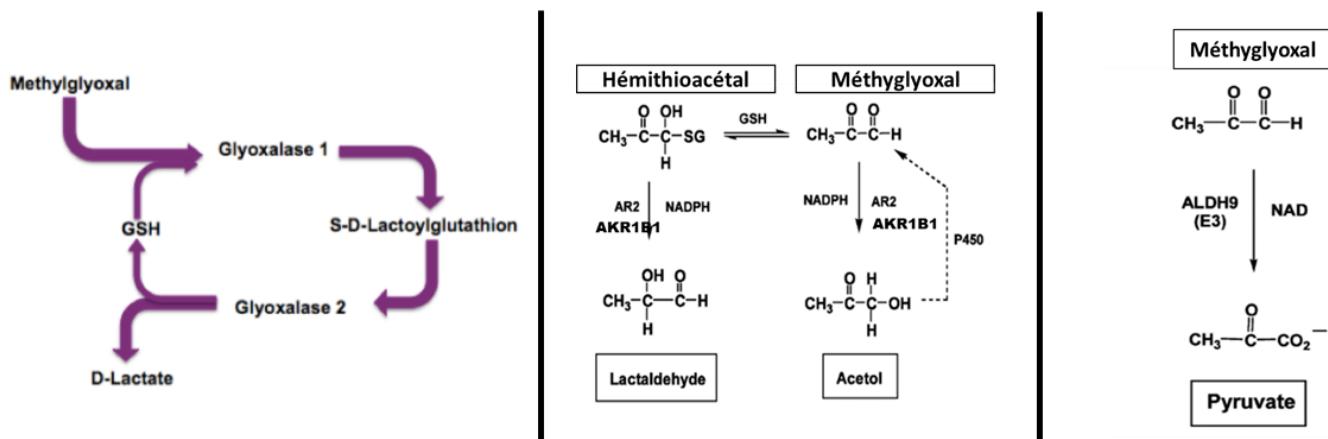


Figure 18 : Principales voies de détoxification du methylglyoxal.

Le methylglyoxal (MG) est principalement détoxifié par la voie des glyoxalases (GLO) (à gauche) pour former du S-D-Lactoylglutathion via l'enzyme GLO1 en utilisant du glutathion réduit (GSH) comme cofacteur, puis du D-lactate via GLO2 avec régénération de GSH. Le MG peut également être détoxifié par la voie des Aldoses Réductases pour former principalement de l'acétol (en cas de faible concentration de GSH) ou du lactaldéhyde (en cas de forte concentration de GSH) en utilisant le NADPH comme cofacteur; mais également par la voie des aldéhydes déshydrogénases pour former du pyruvate, en utilisant du NAD comme cofacteur. *D'après Baba et al 2009 et Izaguirre et al 1998*

Le lactate ainsi formé peut quitter la cellule par diffusion passive au travers de la membrane, ou via un transporteur spécifique. L'inhibition de cette voie de détoxification conduit à une accumulation de MG dans la cellule. D'un point de vue structural, Glo1 est une isomérase homodimérique dépendante du Zn^{2+} . Elle est régulée par des mécanismes de modifications post-traductionnelles parmi lesquels on peut citer la glutathionylation qui induit une inhibition de son activité en réponse au statut rédox de la cellule. Glo2 est une thiolesterase monomérique qui contient un site de liaison pour des métaux binucléaires, comme le zinc ou le fer, ce qui est essentiel à la liaison du substrat et à son activité catalytique. Elle est à la fois exprimée dans le cytosol et dans la mitochondrie, bien que son rôle dans cette dernière ne soit pas encore élucidé (Talesa, *et al.* 1988).

Le MG peut également être pris en charge par les enzymes de la superfamille des aldoses réductases qui peuvent le réduire. Elle se décompose en deux classes : la classe A (AKR1A) qui comprend les aldéhydes réductases (EC 1.1.1.2) et la classe B (AKR1B) qui est composée des aldo-kéto réductases (EC 1.1.1.21). Cette dernière possède une activité de réduction du MG 100 fois plus efficace que celle des AKR1A (142). Parmi les AKR1B, l'isoenzyme AKR1B1 est la plus active pour détoxifier le MG (Rabbani & Thornalley 2012 ; Baba, *et al.* 2009). Dans les cellules endothéliales, la contribution à la détoxification du MG a été évaluée à 60% par le

système Glo1 et à 40% par AKR1B1 dans des conditions de faible concentration en MG (1-20 μ M) (Baba, *et al.* 2009) alors qu'à de plus fortes concentrations de MG, la contribution de Glo1 augmente. La détoxification du MG par les AKRs nécessite la présence de NADPH comme co-facteur et peut mener à la production de 2 produits différents en fonction de la disponibilité de GSH. En cas d'absence de GSH dans le milieu, les produits principalement formés sont l'acétol à 95% et le lactaldéhyde à 5%. Alors qu'en présence de GSH, AKR forme principalement le lactaldéhyde (Vander Jagt, *et al.* 2001).

Le MG peut également être détoxifié par les enzymes appartenant au groupe des aldéhydes déshydrogénases (ALDH). En particulier, l'isoenzyme ALDH9 oxyde le MG en pyruvate en présence de NAD⁺ (Izaguirre, *et al.* 1998) (**Figure 18**).

Les cellules cancéreuses glycolytiques produisent une quantité de MG significativement supérieure à celle des cellules saines. L'adaptation des cellules tumorales à une forte concentration en MG, notamment via une augmentation de l'activité des mécanismes de détoxification, est donc un mécanisme important pour leur survie (Wang, *et al.* 2012).

d) « MG scavenger »

Dans le but de moduler la concentration de MG intracellulaire et le stress dicarbone, il est possible d'utiliser des molécules capables de capturer le MG, empêchant ainsi la glycation des macromolécules et la formation des AGEs. Ces molécules sont appelées des « MG scavengers ». Parmi les molécules ayant déjà fait montre d'une action inhibitrice sur le MG on peut notamment détailler :

La carnosine, qui est un dipeptide naturel (β -alanyl-L-histidine) produit au niveau du cerveau, du foie, des reins et des muscles. La carnosine est capable de capturer les ROS, les NRS (espèces réactives de l'azote), les dicarbonyles et a un pouvoir chélateur (pour revue voir Boldyrev, *et al.* 2013). La carnosine capture le MG (Hipkiss, *et al.* 1995) et est capable d'interférer à différents niveaux de la réaction de Maillard pour empêcher la formation des AGEs (Szwergold. 2005) et serait également capable d'inverser la formation d'AGEs (Seidler, *et al.* 2004). La carnosine a donc un effet protecteur à différents niveaux vis-à-vis du stress dicarbone et du stress oxydant. Malheureusement, cette molécule est dégradée dans le sérum humain par la carnosinase (Gardner, *et al.* 1991) ce qui restreint son utilisation thérapeutique.

La metformine, qui est une molécule utilisée par le traitement des diabétiques de type II inhibe la néoglucogenèse hépatique et favorise l'absorption cellulaire du glucose ce qui induit une action hypoglycémiant (Viollet, *et al.* 2012). Elle est aussi capable de capturer le MG par liaison entre leurs groupes guanidium et carbonyles (Lo, *et al.* 1994). Le traitement de patients diabétiques à la metformine permet de réduire leur taux plasmatique de MG (Beisswenger, *et al.* 1999) (**Figure 19**), et il est d'ailleurs intéressant de noter que de nombreuses études se sont tournées vers la metformine comme potentiel anticancéreux (Saini & Yang 2017). L'inhibition de la croissance tumorale par la metformine serait cohérente avec sa capacité à réduire la concentration de MG.

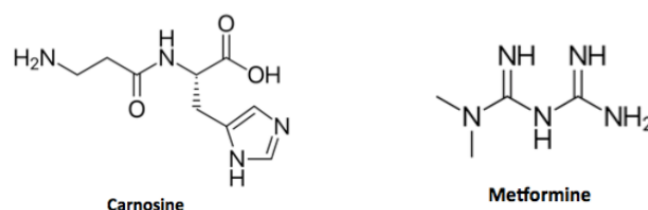


Figure 19 : Structure chimique de la carnosine et de la metformine, deux molécules capables de capturer le MG ou « MG scavengers ».

4. Stress dicarbone et cancer

Alors que l'accumulation de MG et le stress dicarbone qui en résulte conduisent à des effets délétères connus et étudiés depuis longtemps dans le contexte de pathologies telles que le diabète ou la maladie d'Alzheimer, leur rôle dans le processus tumoral n'est encore que peu documenté.

a) **Le MG comme facteur anti-tumoral**

Le MG étant vecteur d'un stress cellulaire, il a d'abord été pensé comme un anti-cancéreux. Son activité anti-tumorale a été démontrée après des injections intra-péritonéales et intraveineuses sur des animaux porteurs de tumeurs xenogreffées (Egyud & Szent-Gyorgyi. 1968). Les diverses études qui ont suivi ont permis de détailler les différents mécanismes anti-tumoraux du MG. Il a ainsi été montré que son activité anti-tumorale reposait sur une inhibition de Myc et de la glycolyse (He, *et al.* 2016), mais aussi sur une inhibition de la GAPDH (Chakrabarti, *et al.* 2014). Le MG peut également induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses *via* différents mécanismes. Ainsi l'augmentation du stress dicarbone génère la production de ROS et induit une carence en GSH (Amicarelli, *et al.* 2003), inhibe la respiration

mitochondriale (Davidson, *et al.* 2002), induit une instabilité génétique *via* des adductions ADN-protéines (Kang, *et al.* 1996), provoque une inhibition des molécules anti-apoptotiques tout en induisant l'expression des molécules pro-apoptotiques (MAPK ; MMP3 et Bcl-2) (Antognelli, *et al.* 2013) et perturbe la perméabilité de la membrane mitochondriale en facilitant le relargage du cytochrome c. (Speer, *et al.* 2003). En outre, des études plus récentes ont montré la capacité du MG à diminuer le potentiel migratoire et invasif des cellules cancéreuses de côlon (He, *et al.* 2016) et de foie (Loarca, *et al.* 2013).

Néanmoins, la trop grande toxicité du MG envers les cellules saines a mis un terme à son utilisation en clinique. Ainsi donc, pour induire une concentration toxique de MG dans les cellules cancéreuses, la stratégie adoptée a été d'inhiber Glo1, cette enzyme ayant été décrite comme surexprimée dans de nombreux cancers, comme le cancer du sein (Rulli, *et al.* 2001), du pancréas (Wang, *et al.* 2012), de la prostate (Romanuik, *et al.* 2009), du côlon (Ranganathan & Tew. 1993), des poumons (Sakamoto, *et al.* 2001), ainsi que dans le mélanome (Bair, *et al.* 2011). L'inhibition de Glo1 par le S-p-bromobenzylglutathion cyclopentyl diester (BBGC), une pro-drogue inhibitrice de Glo1 qui peut diffuser au travers de la membrane cellulaire, induit un stress dicarbone élevé qui induit l'apoptose dans des cellules de cancer du poumon (Sakamoto, *et al.* 2001).

b) Le MG comme facteur pro-tumoral

Cependant, l'équipe LRM (laboratoire de Recherche sur les Métastases) du laboratoire GIGA-Cancer et d'autres ont mis en évidence un effet pro-tumoral du MG et du stress dicarbone en général. Ainsi l'accumulation des AGEs ou le traitement par ces molécules induit la prolifération, la migration et l'invasion de cellules cancéreuses mammaires (Sharaf, *et al.* 2015). Une cible privilégiée du MG est la heat-shock-protein 27 (HSP27) qui possède une action anti-apoptotique. Sa glycation renforce son activité (Sakamoto, *et al.* 2002) et protège les cellules de cancer du poumon (van Heijst, *et al.* 2006) et de cancer gastrointestinal (Oya-Ito, *et al.* 2011) de l'apoptose. HSP27 était jusqu'à présent considérée comme la seule cible du MG dans les cellules cancéreuses, mais le laboratoire a récemment démontré qu'une autre chaperonne, HSP90, subissait également une glycation par le MG dans des cellules de cancer du sein (P J Thornalley. 2003). Cette glycation va notamment entraîner une altération de l'activité ATPase de la protéine, ce qui va conduire à une diminution de l'expression de la protéine LATS1, une kinase clé de la voie Hippo ayant des effets anti-tumoraux. L'utilisation de MG scavengers, notamment la carnosine, apparaît comme une stratégie prometteuse pour inhiber les effets cancérogènes du MG et réduire la croissance tumorale. Dans le même ordre d'idée, Glo1 qui

était jusqu'à maintenant plutôt considérée comme une protéine codée par un oncogène, apparaît avoir dans une certaine mesure un rôle suppresseur de tumeur notamment dans les hépatocarcinomes et dans les carcinomes du sein. En accord avec cette hypothèse, le laboratoire a montré qu'une inhibition de l'expression de Glo1 via shRNAs dans des cellules de cancer du sein (Nokin, *et al.* 2016) et de CCR (Chiavarina, *et al.* 2017) induisait une augmentation de la croissance tumorale *in vitro* et *in ovo* dans une modèle CAM (chick embryo chorioallantoic membrane).

c) Le MG : un facteur hormétique

Ces effets apparemment contradictoires du MG ont conduit très récemment le laboratoire à démontrer le caractère hormétique du MG et du stress dicarbone. Ainsi, à faible concentration, l'instabilité cellulaire engendrée par le MG est plutôt propice à l'acquisition de caractéristiques tumorales et au développement d'un phénotype invasif. A l'inverse, à de fortes concentrations, les effets cytotoxiques du stress dicarbone sont fatals pour la cellule cancéreuse (Nokin, *et al.* 2017) (**Figure 20**).

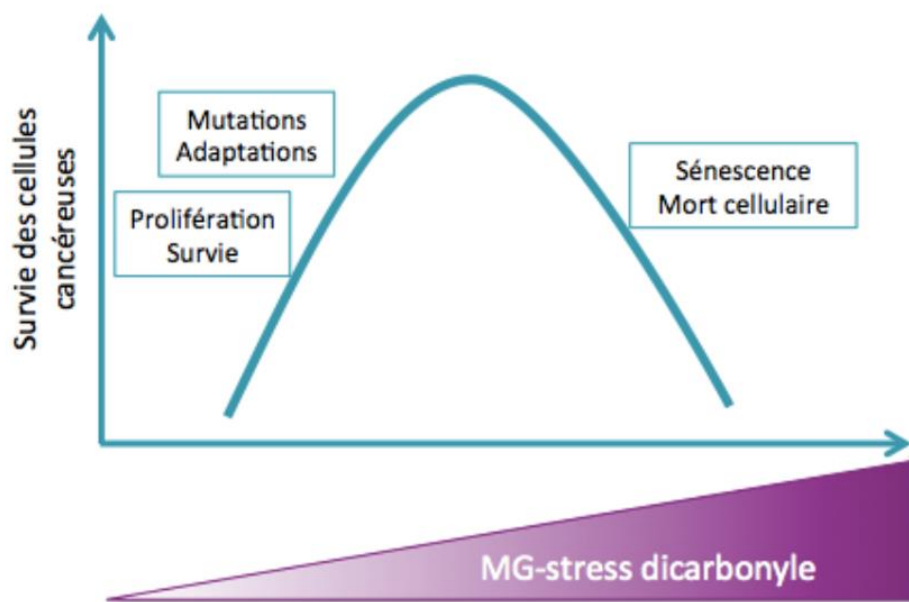


Figure 20 : Effet hormétique du stress dicarbone.

De faibles concentrations en MG peuvent être bénéfiques aux cellules cancéreuses et favoriser leur prolifération, leur survie et leur progression en provoquant l'instabilité génétique et les adaptations métaboliques. Des stress trop élevés ne sont plus contrôlés par les cellules cancéreuses et deviennent toxiques, induisant la sénescence et la mort. *D'après Nokin et al 2017.*

Le MG apparaît comme une potentielle cible thérapeutique, dont l'inhibition, notamment *via* des MG scavengers, pourrait s'avérer être une stratégie efficace pour inhiber la croissance tumorale comme le laboratoire l'a déjà montré *in vitro* et *in ovo* (Chiavarina, *et al.* 2017). A terme, l'utilisation de MG scavengers pourrait constituer un réel espoir dans le management de cancers à mauvais pronostic comme les CCR KRAS mutés.

5. Objectifs du stage de Master 2

Comme expliqué dans l'introduction, le CCR, et notamment le CCR KRAS muté, se trouve actuellement dans une impasse thérapeutique. Le développement de stratégies originales visant à réduire le développement tumoral constitue donc un enjeu de santé public. Dans ce contexte, la modulation de la concentration de MG intracellulaire, notamment *via* l'utilisation de MG scavenger apparaît comme une piste très prometteuse.

À ce titre, notre objectif consistait à caractériser le profil énergétique et l'importance du stress dicarbone dans différentes lignées cellulaires humaines de cancer du côlon, présentant l'une ou l'autre des mutations KRAS : les SW480 présentant la mutation G12V, les Lovo présentant la mutation G13D et les HCT116 qui présentent cette même mutation mais qui présentent également une mutation du gène *PI3K* leur conférant un avantage prolifératif.

Mon travail s'est basé sur l'hypothèse selon laquelle le type de mutation KRAS (G12V ou G13D) a une influence sur le métabolisme énergétique des cellules de CCR et donc sur leur capacité à gérer le stress dicarbone.

Dans un premier temps, il a été important de caractériser nos différentes lignées dans un contexte de stress dicarbone en étudiant leur tolérance au MG, puis la présence d'adduits spécifique au MG (Argpyrimidines et MGH1) dans ces différentes lignées. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au système de détoxification du MG notamment à l'activité et à la présence de Glo1 (aussi bien sa transcription que sa traduction). En parallèle nous avons initié une caractérisation de ces lignées sur le plan métabolique, *via* le dosage du L-Lactate, produit final de la glycolyse aérobie, qui donnera une indication sur son importance dans les lignées étudiées.

II. Matériel et Méthode :

1. Culture cellulaire et traitement

Les lignées cellulaires de CCR SW480, HCT116 et Lovo ont été obtenues auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) et cultivées dans un milieu McCoy 5A et HAM respectivement (Lonza, Bâle, Suisse) supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA) et 2 mM de L-Glutamine (Lonza). Les cellules sont maintenues à 37°C, dans une atmosphère à 5% de CO₂ et 21% d'O₂. Le milieu de culture est changé tous les 2 à 3 jours. Une fois les cellules à confluence, le tapis cellulaire est décollé par une solution de trypsine/EDTA (« Etylen diamin tetraacetic acid ») (0,25% trypsine / 1mM EDTA) (GE Healthcare).

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits ou 24 puits à raison de 500 000 cellules par puits pour les Lovo et les HCT 116 et de 400 000 cellules par puits pour les SW480. Les cellules sont incubées dans leur milieu respectif, comme décrit plus haut, overnight à 37°C. Elles sont ensuite traitées, ou non, avec le méthylglyoxal (Sigma) à 300µM pendant 6h, ou selon la gamme de concentration 0, 50, 100, 300, 500, 1000, 2000, 3000µM pendant 24h pour les IC50.

2. Détermination de l'IC50 au MG

On détermine la dose inhibitrice 50 (IC50) au MG par mesure de l'incorporation de l'Hoechst, un intercalant fluorescent de l'ADN, dans les cellules. On ajoute précisément 1ml de PBS par puits puis on sonique à amplitude 50 entre 10 et 15 secondes, le sonicat constitue l'échantillon. La courbe étalon s'effectue à l'aide d'ADN de sperme de saumon (Boehringer). On dépose dans une plaque 96 puits 100 µL d'échantillon dans une solution de PBS + ADN de sperme de saumon puis on dépose une solution de Bis-benzimide « Hoechst » (Calbiochem) dilué 100 fois, à l'obscurité. La lecture de la plaque s'effectue à l'aide du logiciel SoftMaxPro. On mesure la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission suivante : 352nm et 461nm respectivement.

3. Extraction d'ARN et qRT-PCR

L'extraction d'ARN totaux a été réalisée selon le protocole du fabricant (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel, Duren, Allemagne). L'ARN extrait a ensuite été quantifié au NanoDrop ND-1000 (ISOGEN). La « reverse transcription » a été réalisée en utilisant 2µg d'ARN extrait

couplé à 2 µg d'amorce universelle « Random hexamer primer » (Thermo Scientific), complété avec de l'eau « RNase free ». Le mix réactionnel se compose du tampon de réaction 5X (Promega), de « Ribolock RNase » (Thermo Scientific), d'un mix de dNTP (désoxynucléotide triphosphate) (Thermo Scientific) à 10nM et de l'enzyme transcriptase inverse (Promega). Le volume final du mélange est de 40µl. Il est incubé dans un premier temps 5min à 25°C, puis 60 min à 42°C et 5 min à 70°C. 100ng d'ADNc ont été mélangés avec des amorces, une sonde (Universal ProbeLibrary System, Roche) et 2 x FastStart Universal Probe Master Mix (Roche) ou Fast Start SYBR Green Master Mix (Roche). Les Q-PCR ont été réalisées en utilisant le système de PCR en temps réel 7300 et le logiciel du fabricant correspondant (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'expression du gène relatif a été normalisée avec celle de l'ARNr 18S. Les amorces ont été synthétisées par Eurogentec et leurs séquences sont détaillées dans le **tableau IV**. Les échantillons sont déposés en triplicats. Les résultats présentés correspondent à la moyenne des valeurs obtenues.

Tableau IV : Liste des amorces utilisées pour la PCR à temps réel

Gène		Séquence	Modélité d'utilisation
Glyoxalase 1	sens	TGGCTTATGAGGATAAAAATGACA	100nM
	anti-sens	CAGCTCAAGTGTAGGTTTTCTGG	
ARN ribosomal 18S	sens	CTTCCACAGGAGGCCTACAC	100nM
	anti-sens	CGCAAAATATGCTGGAAC TTT	

4. Western Blot

L'extraction protéique a été réalisée dans du tampon « Sodium DodecylSulfate » (SDS à 1% contenant des inhibiteurs de protéase et de phosphatase (Roche)). La concentration en protéines est déterminée en utilisant le test « BiCinchoninic acid Assay » (BCA (Pierce)). 15 µg de protéines ont migré sur un gel SDS-PAGE de 10 ou 12,5% et ont été transférées sur des membranes de PVDF (Roche). Le blocage a été réalisé dans du « Tris Buffered Saline-Tween » (TBS-T 0,1%) contenant 5% de lait écrémé séché (Biorad) pendant 1h. Les membranes ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4°C avec des anticorps primaires. Après rinçage au TBS-T, elles sont incubées pendant 1h en présence d'un anticorps secondaire approprié couplé à la peroxydase. Le détail des anticorps utilisés est présenté dans le **tableau V**. Les bandes immunoréactives ont été détectées en utilisant un substrat Western Blotting ECL (Pierce). La

quantification des bandes par densitométrie et normalisation sur la β -actine a été réalisée en utilisant le logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

Tableau V : Liste des anticorps utilisés pour les expériences de western-blot

Anticorps dirigé contre	Espèce	Dilution	Type	Fournisseurs
Argpyrimidine	Souris	1/10 000	Primaire	Don K.Uchida Université de Nagoya Japon
methyglyoxal (MGH1)	Souris	1/1000	Primaire	Cell Biolabs
glyoxalase 1	Souris	1/1000	Primaire	Novus Biologicals
β -actine	Souris	1/10 000	Primaire	Sigma
Souris (HRP)	Lapin	1/3000	Secondaire	Dako

5. Mesure de l'activité de Glo1

L'activité de Glo1 a été mesurée dans des lignées de cellules cancéreuses du côlon après extraction protéique dans du tampon RIPA (RadioImmunoprecipitation Assay Buffer), en mesurant le taux initial de formation de S-D-lactoylglutathion à partir de l'hémimercaptal obtenu par pré-incubation d'un mélange équimolaire (1mM) de MG (cat # M0252, Sigma) et de GSH (cat # G4251, Sigma) dans un tampon de PBS 50mM, pH 6,8, à 25°C. La formation de S-D-lactoylglutathion a été suivie par spectrophotométrie à une absorbance de 240nm à 25°C. Une unité d'enzyme a été définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la formation de 1 μ mol de S-D-lactoylglutathion par minute à concentration saturante en substrat. La méthode est détaillée dans l'article du laboratoire : Chiavarina et al. 2014.

6. Dosage du L-Lactate

Les cellules sontensemencées dans une boîte de pétri à raison de 1 million de cellules par boîte. Le milieu de culture est changé après 24h, puis les cellules sont laissées dans l'incubateur pendant 48h avant l'analyse. Les concentrations de L-lactate ont été évaluées dans le milieu conditionné, le nombre de cellules dans chaque condition a été compté pour la normalisation. Le milieu conditionné dilué 3 fois a été incubé en présence de NAD⁺, d'hydrazine et de L-lactate déshydrogénase (Sigma). On mesure la formation de NADH à 320nm, en comparaison à l'absorbance d'une courbe étalon, selon la réaction L – Lactate + NAD⁺ \leftrightarrow Pyruvate + NADH.

III. Résultats

1. Étude du profil glycolytique

Afin d'évaluer le profil énergétique des cellules de CRC étudiées, nous avons dosé le L-Lactate, produit final de la glycolyse aérobie, présent dans le milieu de culture après 48 heures d'incubation. Cette mesure donne une bonne indication de l'importance de l'effet Warburg dans le métabolisme cellulaire. Les mesures sont faites en triplicats.

Le dosage du L-Lactate (**Figure 21**), montre une forte propension des SW480 et des HCT116 à générer du L-Lactate, avec des concentrations s'élevant à environ 10mM et 13mM, respectivement. Concernant les Lovo, la concentration de L-Lactate générée apparaît beaucoup plus faible, autour de 6mM.

Ces résultats tendent à montrer que les SW480 et les HCT116 possèdent un métabolisme énergétique plus orienté vers la glycolyse que les Lovo. Il est difficile, à partir de ces résultats, de dégager une tendance concernant l'impact du statut KRAS sur le métabolisme glycolytique car les deux lignées G13D (HCT116 et Lovo) présentent des valeurs de L-Lactate très différentes. Cependant on peut supposer que les SW480 (G12V) présentent un métabolisme plus glycolytique que les lignées G13D, et que la forte production de L-Lactate par les HCT116 (G13D) est liée à leur mutation du gène de la PI3K, une protéine impliquée dans la survie et le métabolisme des cellules cancéreuses.

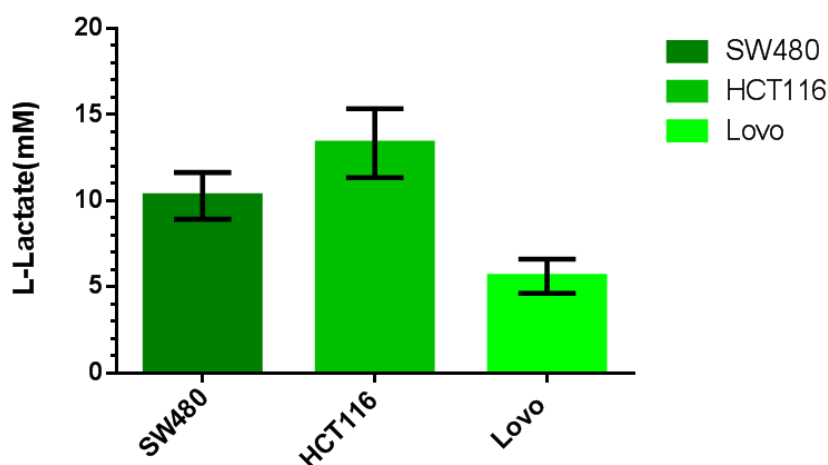


Figure 21 : Dosage du L-Lactate dans les lignées cellulaires de CCR SW480, HCT116 et Lovo.

Les cellules de lignées de CCR SW480, HCT116 et Lovo ont étéensemencées dans des P60, le dosage lactate est réalisé après 48h. La mesure se fait sur le milieu conditionné dilué 3 fois. La concentration en L-Lactate est déterminée en comparant la formation de NADH à 320nm à l'absorbance d'une gamme étalon. Les valeurs sont issues de la moyenne de trois échantillons \pm SD.

2. Étude de la tolérance au MG des différentes lignées du cancer du côlon.

Nous avons ensuite voulu déterminer la tolérance vis-à-vis du MG de nos différentes lignées présentant l'une ou l'autre des mutations sur le gène codant pour la protéine oncogénique KRAS. Nous avons donc déterminé l'IC50 des différentes lignées *via* une mesure de l'incorporation de l'Hoechst dans ces cellules (**Figure 22**).

En ce qui concerne les SW480 (G12V), elles présentent une IC50 moyenne proche de 300 μ M. Elles apparaissent donc comme les moins résistantes des trois lignées étudiées. Si l'on s'intéresse aux HCT116 (G13D), elles présentent une IC50 autour de 600 μ M soit le double de celle des SW480. Concernant la lignée Lovo (G13D), son IC50 s'élève à environ 1000 μ M. Elle apparaît donc significativement plus résistante au MG que les SW480 et les HCT116.

Ces résultats nous montrent une tolérance vis-à-vis du MG significativement plus faible dans les SW480 (G12V) qui apparaissent deux fois moins tolérantes que les HCT116 (G13D) et quatre fois moins que les Lovo (G13D). On aurait pu s'attendre à ce que les SW480 et les HCT116 soient plus résistantes au MG, sous-produit de la glycolyse, du fait de leur profil glycolytique mis en évidence par le dosage du L-Lactate.

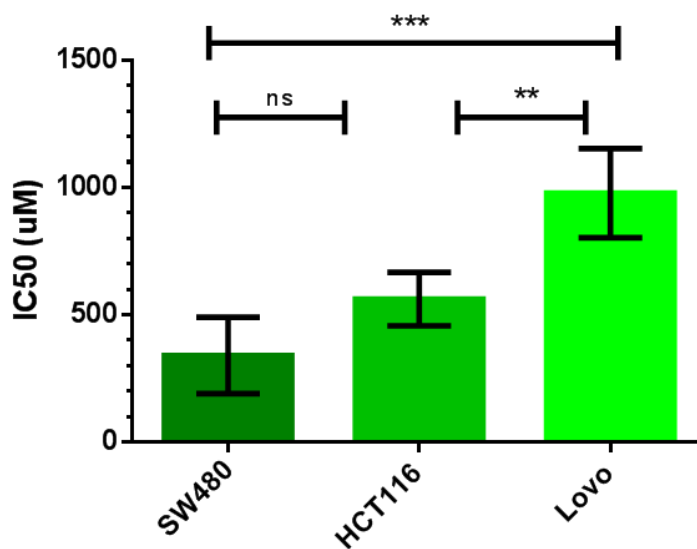


Figure 22 : Détermination de l'IC50 au MG des lignées cellulaires de CCR SW480, HCT116 et Lovo. Les SW480, HCT116 et Lovo sont traitées avec des concentrations croissantes de MG (0, 50, 100, 300, 500, 1000, 2000, 3000 μ M) pendant 24h. On détermine la proportion de cellules vivantes en mesurant l'incorporation de l'Hoechst dans les cellules. On mesure l'absorbance à des valeurs proches des maxima d'émission et d'excitation (respectivement 352nm et 461nm). Les IC50 présentées sont issues de la moyenne \pm SD de résultats d'au moins trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ns = non significatif.

Ces résultats ne suivent pas la tendance dégagée par le dosage du L-Lactate vis-à-vis de l'influence du statut KRAS. En effet, on ne parvient pas ici à identifier un seuil de tolérance propre à l'une ou l'autre des mutations KRAS G12V ou G13D.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la manière dont le MG agit sur les protéines dans nos différentes lignées, qu'elles comportent une mutation G12V ou G13D.

3. Étude des effets du MG sur la formation d'adduits protéiques

Nous avons ensuite cherché à déterminer l'importance de la formation d'adduits du MG, qui constituent la forme majoritaire de glycation des protéines à la suite d'un traitement au MG dans les différentes lignées. L'expression de la β -Actine a servi de témoin de charge pour l'analyse de l'ensemble des données, et les quantifications de chaque traitement sont normalisées par rapport à la condition contrôle correspondante.

Concernant l'expression des adduits de type Argpyrimidine (ArgPyr) (**Figure 23A**), la comparaison de l'expression basale des ArgPyr entre les différentes lignées montre une présence d'adduits plus importante dans les lignées HCT116 et Lovo que dans la lignée SW480. L'expression de la β -Actine ne varie pas, exceptée celle de la condition traitée de HCT116 qui apparaît légèrement plus faible. En ce qui concerne les adduits MGH-1 à l'état basal (**Figure 23B**), il apparaît que les HCT116 et les Lovo présentent une expression de MGH-1 plus importante que les SW480. L'expression de la β -Actine ne varie pas, exceptée pour la condition traitée de SW480 qui apparaît légèrement plus élevée, et la contrôle de HCT116 légèrement plus faible.

Après traitement au MG, on ne distingue pas de différence d'expression d'ArgPyr (**Figure 23A**) entre la condition contrôle et la condition traitée dans les lignées SW480 et Lovo tandis qu'on observe une nette augmentation pour les HCT116. Concernant l'expression des adduits de type MGH-1 (**Figure 23B**), on peut noter une très nette augmentation de leur expression en condition traitée. Cette augmentation est légèrement moins importante chez les Lovo mais reste évidente. Ces résultats sont un reflet de la très forte réactivité du MG. Il est donc cohérent que l'apport de MG exogène ait un effet stimulant sur la formation d'adduits protéiques, de type ArgPyr et MGH-1. Ces résultats présentent une tendance assez similaire à celle dégagée par le dosage du L-Lactate. Les SW480 et les HCT116 présentent une accumulation d'adduits de glycation similaire, et les Lovo en accumulent moins. Ces résultats peuvent donc laisser penser que les cellules de type G12V accumuleraient plus d'adduits que les G13D, et que l'abondance des adduits mesurée dans les cellules HCT116 pourrait être le reflet de leur mutation PI3K.

Dans la cellule, la gestion des adduits dépendant du MG passe par sa détoxification, qui est en grande partie réalisée par Glo1. Nous avons donc poursuivi par l'analyse de cette protéine afin de mieux comprendre le rôle qu'elle pourrait avoir dans nos différentes lignées KRAS mutées G12V ou G13D.

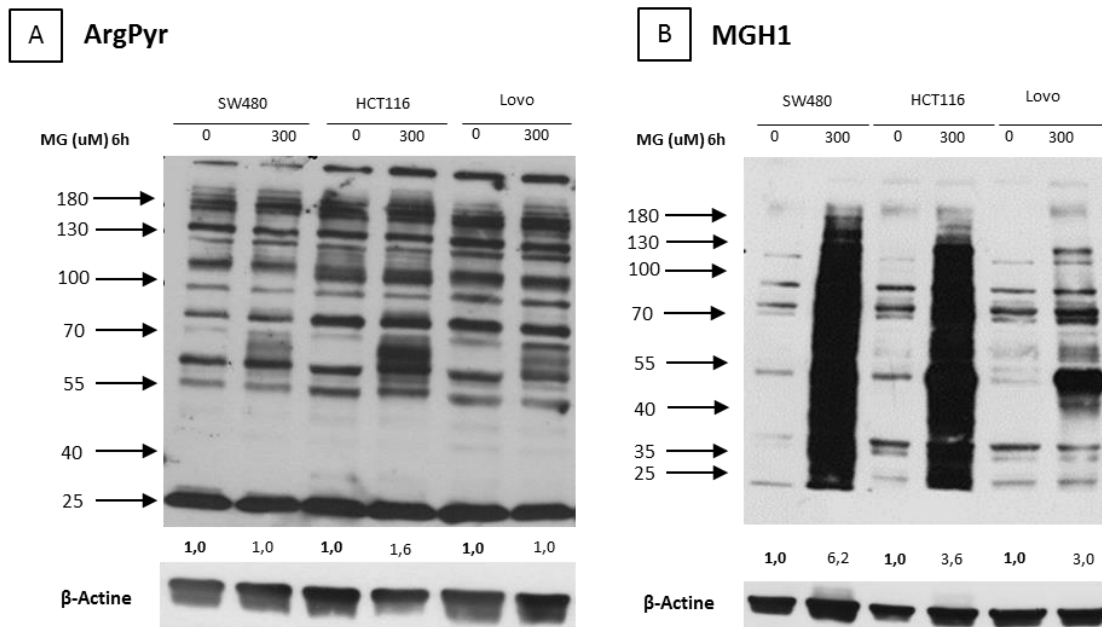


Figure 23 : Etude de la formation des adduits dépendant du MG dans les lignées cellulaires de CCR SW480, HCT116 et Lovo après traitement au MG par western-blot.

Les SW480, HCT116 et Lovo ont été traitées, ou non, au MG à 300 µM pendant 6h. La β-Actine sert de témoin de charge et la quantification a été effectuée par mesure de la densitométrie des bandes. Les données présentées représentent une tendance retrouvée sur deux expériences indépendantes.

4. Étude de l'expression de Glo1 en réponse à un traitement au MG

a) Analyse de l'expression du transcrit de Glo1

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de l'ARNm de Glo1, dans nos différentes lignées en réponse au traitement. Le niveau d'expression de ce transcrit dans les cellules non traitées reflète son niveau d'expression basale. Toutes les mesures sont normalisées avec la moyenne du taux d'expression de l'ARN ribosomal 18S et la condition contrôle choisie ici comme référence et placée arbitrairement à 1.

L'étude du taux moyen d'expression de l'ARNm de Glo1 (**Figure 24**) ne montre pas de réel impact d'un traitement au MG sur les lignées cellulaires HCT116 et Lovo. On constate qu'il y a une légère diminution de l'expression de l'ARNm de Glo1 dans les HCT116 et une légère augmentation dans les Lovo, mais vraisemblablement trop faibles pour constituer une tendance. Concernant les SW480, elles présentent une augmentation du taux d'expression moyen de

l'ARNm de Glo1 dans la condition traitée qui passe de 1 à environ 1,6. Cependant, cette augmentation n'a été constatée que sur une seule des deux expériences, la deuxième n'ayant révélée aucun changement significatif dans l'expression de l'ARNm de Glo1.

Les résultats obtenus n'indiquent aucune différence vis-à-vis de l'expression du transcrite de Glo1 en réponse à un traitement au MG dans aucune des trois lignées étudiées. Les différentes mutations KRAS ne présentent donc pas d'effet sur la transcription de Glo1.

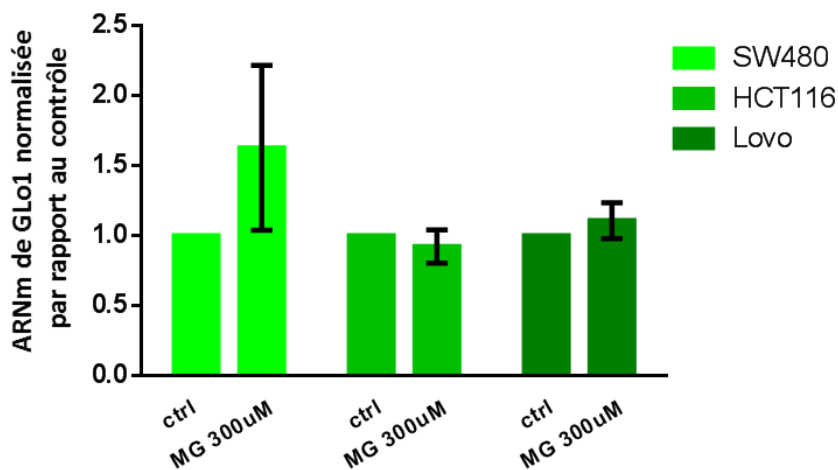


Figure 24 : Etude de l'effet du traitement au MG sur la transcription de l'ARNm de Glo1 dans les lignées SW480, les HCT116 et les Lovo.

Les cellules sont traitées ou non avec du MG (300uM) pendant 6h. Les quantités d'ARNm de Glo1 sont mesurées par RT-PCR en temps réel et les valeurs obtenues sont normalisées par rapport à l'expression de l'ARN ribosomal 18S. Les valeurs sont rapportées vis-à-vis de la condition contrôle et représentent la moyenne de trois échantillons. Les données présentées sont représentatives des résultats obtenus lors de deux expériences indépendantes.

b) Analyse de l'expression protéique de Glo1

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'expression protéique de Glo1 (**Figure 25**). On observe que dans les lignées HCT116 et Lovo il n'y a pas de variation de son expression que les cellules soient en présence de MG ou non. Cependant, elle apparaît plus faible à l'état basal dans la lignée SW480. Ceci permet de dégager une tendance selon laquelle l'expression protéique de Glo1 serait plus élevée à l'état basal dans les cellules présentant une mutation G13D (HCT116 et Lovo) que dans celles présentant une mutation G12V (SW480). L'absence de variation dans l'expression protéique de Glo1 en réponse au MG concorde avec les résultats obtenus au niveau transcriptionnel. Si une étude au niveau transcriptionnel et traductionnel nous informait sur une éventuelle synthèse *de novo* de la protéine en réponse au traitement, la mesure

de l'activité enzymatique nous informe sur une induction potentielle de l'activité enzymatique en réponse à un apport de MG exogène.

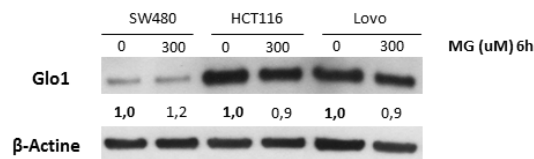


Figure 25 : Etude de l'effet du traitement au MG sur l'expression protéique de Glo1 dans les SW480, les HCT116 et les Lovo.

Les cellules ont été traitées, ou non, au MG à 300uM pendant 6h. On réalise un western-blot afin d'évaluer l'expression de Glo1 en condition traitée par rapport au contrôle. La β -Actine sert de témoin de charge. Les données présentées représentent une tendance retrouvée sur deux expériences indépendantes.

5. Étude de l'activité enzymatique de Glo1 en réponse à un traitement au MG

Nous avons donc voulu mesurer l'activité de Glo1. On estime que la mesure de l'activité dans la condition contrôle (MG 0 μ M) est le reflet de l'activité maximale de Glo1 à l'état basal. On suppose que l'apport de MG exogène *via* le traitement aura un effet sur l'activité de Glo1 en tant que réponse adaptative dans le but de le détoxifier.

L'activité enzymatique de Glo1 dans les SW480 présente une augmentation d'environ 1 A.U/mg dans la condition traitée à 1000 μ M. Celle des HCT16 est légèrement fluctuante pour un minimum d'environ 2,7 A.U/mg après un traitement de 1000 μ M. Enfin l'activité de Glo1 dans les Lovo augmente de 1 A.U/mg à 1,4 A.U/mg après 300 μ M de traitement et se stabilise par la suite à environ 1,2 A.U/mg (**Figure 26**). Ces résultats montrent une faible influence du MG sur l'activité Glo1 dans l'ensemble des lignées cellulaires étudiées.

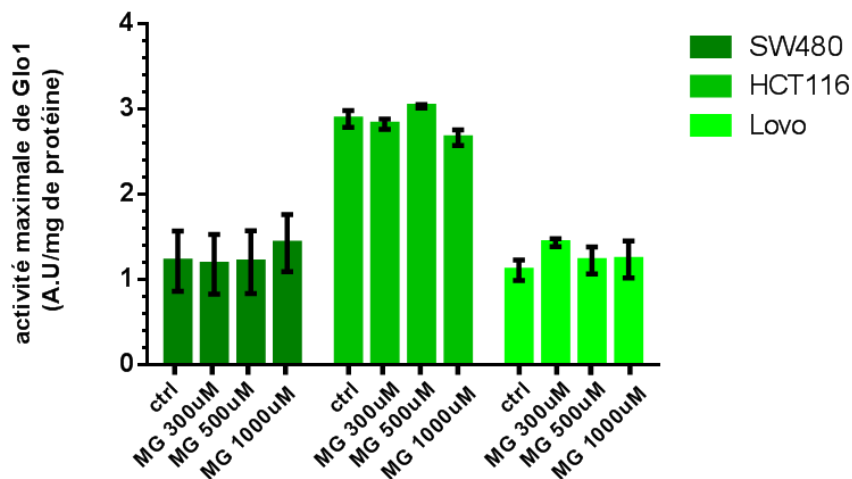


Figure 26 : Etude de l'activité enzymatique de Glo1 dans les SW480, les HCT116 et les Lovo après traitement au MG pendant 6h.

Les SW480, les HCT116 et les Lovo sont traitées ou non au MG (300uM) pendant 6h. L'activité de Glo1 est mesurée par spectrophotométrie, en regardant l'augmentation de l'absorbance à 240nm. Les valeurs représentent la moyenne de 3 échantillons \pm SD.

Si l'on cherche à comparer l'intensité de l'activité enzymatique entre les différentes lignées, on constate que les SW480 et les Lovo présentent un taux moyen d'activité de Glo1 similaire quelles que soient les conditions. En revanche l'activité de Glo1 dans les HCT116 apparaît comme sensiblement plus élevée et reste stable autour de 3 A.U./mg.

D'après ces résultats, les HCT116 apparaissent comme les cellules ayant le meilleur potentiel de détoxification du MG. Néanmoins, cela ne permet pas de conclure quant à l'effet du statut KRAS sur l'activité de Glo1 car les SW480 (G12V) et Lovo (G13D) présentent des profils d'activité très semblables, malgré le fait qu'elles possèdent des mutations KRAS différentes.

IV. Discussion et perspectives

Le cancer colorectal est aujourd'hui le 3^{ème} cancer le plus commun dans le monde. Malgré une politique de dépistage organisée ayant permis une augmentation significative de la survie au cours des dernières années, le CCR reste actuellement la 2^{ème} cause de décès par cancer en Europe et aux USA (Xie et al., 2020). Les formes avancées de CCR se trouvent aujourd'hui dans une impasse thérapeutique, les traitements spécifiques comme le Cetuximab ne sont pas toujours administrables, c'est le cas des patients présentant une mutation KRAS pour lesquels un inhibiteur de l'EGFR n'a aucun effet. Au final, seule une faible proportion de patients (entre

8% et 23%) bénéficie réellement du Cetuximab (Lièvre, *et al.* 2008). Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour faire face aux formes avancées de CCR constitue donc un enjeu important de santé publique.

L'effet Warburg est au centre de la dérégulation du métabolisme de nombreux cancers. L'orientation du métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse vers un phénotype plus glycolytique est un aspect du développement tumoral qui est étudié depuis longtemps. Il est, en revanche, assez nouveau de mettre en parallèle le stress engendré par cette dérégulation, et notamment le stress dicarbone, et la cancérogénèse. Récemment, le laboratoire LRM et d'autres ont montré que l'inhibition du MG, principal vecteur du stress dicarbone, notamment *via* l'utilisation de « MG scavengers » comme la carnosine, avait un effet inhibiteur sur le développement et la croissance tumorale. Connaître le profil énergétique des cellules cancéreuses, ainsi que leur comportement vis-à-vis du MG, constitue donc une information de première importance dans le développement de stratégies thérapeutiques basées sur ce principe. L'objectif de ce stage était donc de caractériser le profil énergétique et de comparer le comportement vis-à-vis d'un apport de MG de trois lignées cellulaires de cancer colorectal en fonction de leurs mutations KRAS : G12V ou G13D.

L'étude du métabolisme énergétique par dosage du L-Lactate tend à montrer que les SW480 et les HCT116 se reposent bien plus sur la glycolyse que les Lovo. Si l'on met ces résultats en lien avec ceux des IC50, cela apparaît en désaccord avec le postulat du laboratoire selon lequel les cellules présentant un métabolisme glycolytique seraient plus tolérantes au MG, les Lovo présentant pourtant une forte résistance au MG, et ce malgré leur profil glycolytique apparemment plus faible que celui des autres lignées. De même, les SW480 apparaissent comme ne supportant pas une forte concentration de MG, alors même qu'elles présentent apparemment un bon potentiel glycolytique. Ces résultats ne sont pourtant pas en désaccord avec les observations faites par le laboratoire qui désignent les HCT116 comme une lignée très glycolytique et également les cellules mutées G12V comme plus orientées vers la glycolyse. Nos résultats pourraient donc montrer une orientation préférentielle vers la glycolyse aérobie dans les G12V. Le fort potentiel glycolytique des HCT116 serait donc plutôt le reflet de leur mutation sur PI3K que de leur statut KRAS G13D étant donné que la voie PI3K/Akt/mTOR est connue pour influencer la prolifération, mais aussi la glycolyse dans les cellules cancéreuses (Makinoshima, *et al.* 2015). Le caractère glycolytique des HCT116 a également été confirmé par la littérature, qui atteste de sa forte sensibilité à la carnosine (Iovine, *et al.* 2012), connue pour affecter la glycolyse, ce qui suggère également un rôle crucial du MG dans son

développement. L'analyse du métabolisme aurait pu être étayée par une mesure du MG endogène au Methyl diaminobenzene-BODIPY (MBo), une sonde fluorescente spécifique du MG développée par l'équipe de A. Spiegel (Wang, *et al.* 2013). La mesure du MG endogène se fait typiquement après une incubation des cellules dans un milieu de culture soit riche en glucose ou pauvre en glucose. On mesure ainsi la production de MG intracellulaire en réponse à la concentration en glucose de l'environnement cellulaire. Cela donne une indication quant à l'orientation métabolique de la cellule.

La réalisation d'une analyse Seahorse, permettant de visualiser en temps réel la consommation d'oxygène des cellules HCT116, ainsi que leur production d'acides, a bien été réalisée, mais suite à un problème technique avec le « Seahorse analyzer » les résultats n'ont pas pu être exploités.

L'analyse des résultats montre clairement que lorsque l'on expose les lignées cellulaires de CCR étudiées à un traitement au MG de 300 μ M pendant 6h, on observe une nette augmentation de la formation des adduits spécifiques du MG sur les protéines (ArgPyr et MGH-1). Cette augmentation est particulièrement marquée dans les lignées SW480 et les HCT116 mais plus nuancée dans la lignée Lovo. Si l'on met ces résultats en relation avec ceux obtenus lors des IC50 et du dosage du L-Lactate, l'importance apparente de la glycolyse dans les lignées SW480 et les HCT116 pourrait expliquer leur plus forte accumulation d'adduits. Les deux lignées pourraient donc avoir un métabolisme assez proche, bien que les SW480 ne semblent pas supporter une concentration en MG aussi forte que les HCT116. La forte résistance des Lovo au MG pourrait s'expliquer en partie par une accumulation d'adduits moins importante. Cela renforcerait l'hypothèse selon laquelle les cellules G12V présentent un métabolisme énergétique plus dépendant de la glycolyse (et donc pour le MG) que les G13D, et que le fort potentiel glycolytique des HCT116 est une conséquence de leur mutation de PI3K. Là encore, une analyse au MBo serait intéressante dans le cadre d'une réponse à un traitement au MG. On mesurera alors l'incorporation du MG exogène dans la cellule, ce qui permet de suivre avec plus de précision les effets du MG comme la formation d'adduits. Ceci peut également fournir des informations sur l'orientation métabolique de la cellule, en effet, de récents travaux du laboratoire suggèrent que les cellules montrant un métabolisme glycolytique ont tendance à présenter une concentration de MG intracellulaire plus élevée en présence de MG extracellulaire (Nokin, *et al.* 2017).

La gestion du stress dicarbone passe notamment par la détoxification du MG, majoritairement assurée par la voie des glyoxalases. Si l'on s'en réfère à l'expression protéique de Glo1, les

SW480 apparaissent comme présentant une plus faible expression que les autres lignées. Il est tout à fait possible que cette différence contribue à expliquer la plus faible tolérance des SW480 vis-à-vis du stress dicarbone. Cependant, elle ne permet pas d'expliquer la meilleure tolérance apparente des Lovo. Ici la fracture G12V/G13D est évidente, et laisse entendre que les G12V expriment moins Glo1 au niveau protéique. Concernant l'activité, les résultats montrent clairement que les HCT116 présentent une plus forte activité de Glo1 que les autres lignées. Cela pourrait expliquer leur meilleure gestion du stress dicarbone qui se traduit par une sensibilité moins importante au MG. Cependant, malgré leur plus grande tolérance au MG, les Lovo montrent une activité Glo1 similaire à celle des SW480. On peut supposer que la plus faible accumulation d'adduits observée dans les cellules Lovo justifie cette activité plus faible de Glo1. Les résultats ne permettent cependant pas de savoir si cette plus faible proportion d'adduits est le reflet d'une forme alternative de détoxification, ou d'une plus faible incorporation du MG. De même, les SW480 présentent une faible activité de Glo1, malgré un métabolisme plutôt glycolytique, et une faible tolérance au MG. Là encore, il se peut que les SW480 détoxifient le MG en privilégiant d'autres voies que celle des glyoxalases.

En effet, il faut noter que, bien que la voie des glyoxalases soit la voie de détoxification majoritaire du MG, des voies annexes comme celles des AKR et/ou des ALDH peuvent constituer une part non négligeable de la détoxification du MG, contribuant donc à la gestion du stress dicarbone. Une équipe de recherche de l'université de Heidelberg (Morgenstern et al., 2017) a montré que dans des cellules de Schwann Glo1^{-/-} (obtenues grâce à la technologie CRISPR/CAS9), la concentration en MG intracellulaire n'augmentait pas, et que ce phénomène était associé à une augmentation de l'activité de AKR1B1 pour compenser la perte de Glo1. On peut donc supposer que, dans des conditions favorables, les voies annexes de détoxification du MG puissent complètement compenser une très faible activité de Glo1. L'activité de Glo1 étant dépendante de la présence de GSH, un important facteur anti-oxydant, il serait intéressant d'étudier le statut redox des cellules. Le calcul du ratio GSH/GSSG (Glutathion disulfide) en est un bon indicateur (Nokin, *et al.* 2017). Ainsi, une faible présence de GSH diminuera inévitablement la capacité de détoxification de la voie des glyoxalases.

Les résultats de l'activité Glo1 sont plus difficiles à mettre en relation avec le statut KRAS des trois lignées étudiées, les SW480 et les Lovo présentant une activité similaire malgré leurs différences de mutations KRAS. Là encore, la mutation PI3K des HCT116 peut constituer une piste quant à leur profil d'activité particulier. La fracture G12V/G13D n'apparaît cependant pas aussi nette.

Il aurait été intéressant de compléter ces analyses avec un dosage du D-Lactate qui constitue une expérience complémentaire de la mesure de l'activité de Glo1. La mesure du D-Lactate apporte une information sur l'abondance du produit final de la voie des glyoxalases et mesure donc l'efficacité de la réaction enzymatique. Elle permet ainsi de corroborer ou non les résultats obtenus pendant la mesure de l'activité enzymatique.

Mis en commun, les résultats obtenus tendent à montrer que ce sont les cellules HCT116 et SW480 qui présentent la meilleure tolérance au stress dicarbone. Le dosage du L-Lactate les présente comme possédant un métabolisme fortement orienté vers la glycolyse. Cela est également souligné par leur façon similaire d'accumuler les adduits de glycation après une exposition au MG. La forte résistance des Lovo au MG, comme le montrent les résultats d'IC50, pourrait être le reflet d'une plus faible accumulation d'adduits de glycation, ce qui diminuerait leur besoin de détoxification. Cela apparaîtrait cohérent avec les résultats du dosage du L-Lactate qui les identifie comme peu glycolytiques. Traiter les cellules avec des concentrations plus importantes de MG aurait peut-être permis de discerner une tendance plus claire vis-à-vis de l'apparition des adduits ou de l'expression de Glo1. Au final, les expériences menées montrent que les cellules présentant une mutation KRAS G12V s'orientent vraisemblablement davantage vers un métabolisme glycolytique que celles présentant une mutation G13D. Les HCT116, bien qu'étant mutées G13D, présentent un profil particulier très probablement dû à leur mutation de PI3K. La mutation KRAS à elle seule ne permet donc pas de prédire complètement l'orientation métabolique des cellules de CCR et leur tolérance vis-à-vis du MG. Elle doit être mise en relation avec les autres altérations génétiques de la cellule ayant un impact sur le métabolisme.

Si l'on remet les résultats obtenus en perspective avec la littérature sur le CCR et les mutations KRAS, on retrouve des tendances communes, également retrouvées *via* les autres travaux du laboratoire. En effet, les données disponibles mettent en évidence que les cellules de patients ayant une mutation G13D présenteraient un développement tumoral moins agressif ainsi qu'une relative sensibilité au Cetuximab, donnant au traitement un certain bénéfice, totalement absent chez les cellules de patients ayant une mutation G12V, qui présenteraient, par ailleurs, un métabolisme plus glycolytique (Tejpar, *et al.* 2012). Pour étayer ces résultats, il serait particulièrement intéressant de tester la gestion du stress dicarbone, ainsi que l'orientation métabolique de cellules comparables en tous points, à l'exception de leur statut KRAS. L'utilisation d'un modèle isogénique apparaît ici tout indiqué, et c'est sur ce modèle que travaille actuellement le laboratoire.

Pour faire suite à ces résultats il serait intéressant de réaliser des études *in vivo* que ce soit sur un modèle murin ou sur membrane chorioallantoïde de poulet (CAM). Ces dernières ont été particulièrement utilisées dans des publications récentes du laboratoire pour étudier le développement de tumeurs en réponse à un traitement au MG avec ou sans ajout de carnosine (Nokin, *et al.* 2017 ; Chiavarina, *et al.* 2017). Montrer le pouvoir anti-cancéreux de la carnosine sur les tumeurs issues de lignées considérées comme glycolytiques contribuerait à prouver l'importance du stress dicarbone et du MG dans le développement tumoral, en y ajoutant ici le modèle du CCR. Ceci fait d'ailleurs l'objet d'une récente publication du LRM, faisant état de travaux de ces dernières années, et qui permettent de montrer que l'utilisation de la Carnosine comme MG scavenger permet de resensibiliser des cellule de CCR KRAS mutées au traitement par le Cetuximab (Bellier *et al.*, 2020)

L'emploi de la carnosine en tant que potentiel anti-cancéreux est aujourd'hui au cœur des investigations du LRM et constitue une piste particulièrement intéressante dans le traitement des cancers ne disposant que de très peu d'alternatives thérapeutiques. En effet, l'effet Warburg, et plus précisément la glycolyse, étant une cible clairement identifiée par les scientifiques depuis plusieurs années, un certain nombre d'inhibiteurs de cette voie ont donc vu le jour comme potentiels anti-cancéreux. Le 2-desoxyglucose (2-DG), un analogue non métabolisable du glucose, permet d'obtenir de bons résultats *in vitro*, mais son efficacité est réduite en cas d'hypoxie (Maher, *et al.* 2004 ; Maher, *et al.* 2007), situation pourtant fréquente dans le microenvironnement tumoral. Les inhibiteurs de GLUT, un des transporteurs du glucose dans les cellules, présentent des résultats prometteurs mais leur manque de spécificité rend difficile leur utilisation en clinique (Liu, *et al.* 2012). Le Lonidamine est un inhibiteur de l'hexokinase 2 (HK2), une enzyme majeure de la glycolyse, qui réduit la survie des cellules cancéreuses mais induit une toxicité sévère au niveau du pancréas (Price, *et al.* 1996). Toutes ces limitations qui freinent l'utilisation de ces molécules font de la carnosine une alternative particulièrement intéressante comme inhibiteur de la glycolyse à des fins anti-cancéreuses. Sa limitation principale reste sa faible stabilité dans le plasma humain car rapidement dégradée par le dipeptidase carnosinase. Un intérêt particulier a donc été placé par le laboratoire dans le développement d'analogues de synthèse de la carnosine. Ces analogues permettraient d'améliorer la capacité MG scavenger de la carnosine, sa biodisponibilité et surtout sa stabilité dans le sérum. Le développement de tels analogues est en cours au laboratoire, et passe notamment par la collaboration avec le Pr. Philippe Karoyan à Paris (Sorbonne Université).

Caractériser les profils métaboliques des cellules cancéreuses est un enjeu important dans l'amélioration de la compréhension de cette maladie complexe et dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques originales. En réussissant à élucider les principaux axes d'approvisionnement énergétique des différents types de cellules, et à déterminer dans quelle mesure les cellules se reposent sur la glycolyse pour survivre et se développer, il serait possible d'estimer leur réponse à un traitement au MG scavenger, notamment à la carnosine. Cette nouvelle stratégie pourrait constituer une piste de premier plan dans le développement de nouveaux traitements pour les cancers en impasse thérapeutique.

V. Références

- Ahlquist, D. A., Harrington, J. J., Burgart, L. J., & Roche, P. C. (2000). Morphometric Analysis of the " Mucocellular Layer " Overlying Colorectal Cancer and Normal Mucosa : Relevance to Exfoliation and Stool Screening. *Human Pathology*, *31*, 51–57.
- Ahlquist, D. A., Zou, H., Domanico, M., Mahoney, D. W., Yab, T. C., Taylor, W. R., Butz, M. L., Thibodeau, S. N., Rabeneck, L., Paszat, L. F., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Bjerregaard, N. C. H. R., Laurberg, S., Sørensen, H. T., Berger, B. M., & Lidgard, G. P. (2012). Next-Generation Stool DNA Test Accurately Detects Colorectal Cancer and Large Adenomas. *Gastroenterology*, *142*(2), 248–256. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.031>
- Allison, J. E., Sakoda, L. C., Levin, T. R., Tucker, J. P., Tekawa, I. S., Cuff, T., Pauly, M. P., Shlager, L., Palitz, A. M., Zhao, W. K., Schwartz, J. S., Ransohoff, D. F., & Selby, J. V. (2007). Screening for Colorectal Neoplasms With New Fecal Occult Blood Tests : Update on Performance Characteristics. *J Natl Cancer Inst*, *99*(19), 1462–1470. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm150>
- Altendorf-Hofmann, A., & Scheele, J. (2003). A critical review of the major indicators of prognosis after resection of hepatic metastases from colorectal carcinoma. *Surgical Oncology Clinics of North America*, *12*(1), 165–192. [https://doi.org/10.1016/S1055-3207\(02\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S1055-3207(02)00091-1)
- Amicarelli, F., Colafarina, S., Cattani, F., Cimini, A., Di Ilio, C., Ceru, M. P., & Miranda, M. (2003). Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury. *Free Radical Biology and Medicine*, *35*(8), 856–871. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00438-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00438-6)
- Antognelli, C., Mezzasoma, L., Fettucciari, K., Mearini, E., & Talesa, V. N. (2013). Role of glyoxalase i in the proliferation and apoptosis control of human LNCaP and PC3 prostate cancer cells. *Prostate*, *73*(2), 121–132. <https://doi.org/10.1002/pros.22547>
- Arrington, A. K., Heinrich, E. L., Lee, W., Duldulao, M., Patel, S., Sanchez, J., Garcia-Aguilar, J., & Kim, J. (2012). Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 13, Issue 10, pp. 12153–12168). <https://doi.org/10.3390/ijms131012153>
- Baba, S. P., Barski, O. A., Ahmed, Y., O'Toole, T. E., Conklin, D. J., Bhatnagar, A., &

- Srivastava, S. (2009). Reductive metabolism of AGE precursors: A metabolic route for preventing AGE accumulation in cardiovascular tissue. *Diabetes*, 58(11), 2486–2497. <https://doi.org/10.2337/db09-0375>
- Bair, W. B., Cabelllo, C., Uchida, K., Bause, A., & Wondrak, G. T. (2011). GLO1 Overexpression in Human Malignant Melanoma. *Melanoma Res.*, 20(2), 85–96. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e3283364903.GLO1>
- Beisswenger, P. J., Howell, S. K., Smith, K., & Szwegold, B. S. (2003). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity as an independent modifier of methylglyoxal levels in diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1637(1), 98–106. [https://doi.org/10.1016/S09254439\(02\)00219-3](https://doi.org/10.1016/S09254439(02)00219-3)
- Beisswenger, P. J., Howell, S. K., Touchette, A., Lal, S., & Szwegold, B. (1999). Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes*, 48(1), 198–202.
- Bellier, J., Nokin, M. J., Caprasse, M., Tiamiou, A., Blomme, A., Scheijen, J. L., Koopmansch, B., MacKay, G. M., Chiavarina, B., Costanza, B., Rademaker, G., Durieux, F., Agirman, F., Maloujahnoum, N., Cusumano, P. G., Lovinfosse, P., Leung, H. Y., Lambert, F., Bours, V., ... Bellahcène, A. (2020). Methylglyoxal Scavengers Resensitize KRAS-Mutated Colorectal Tumors to Cetuximab. *Cell Reports*, 30(5), 1400-1416.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.012>
- Benson, A. B., Schrag, D., Somerfield, M. R., Cohen, A. M., Figueredo, A. T., Flynn, P. J., Krzyzanowska, M. K., Maroun, J., McAllister, P., Van Cutsem, E., Brouwers, M., Charette, M., & Haller, D. G. (2004). American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22(16), 3408–3419. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.063>
- Bierhaus, A., Fleming, T., Stoyanov, S., Leffler, A., Babes, A., Neacsu, C., Sauer, S. K., Eberhardt, M., Schnölzer, M., Lasischka, F., Neuhuber, W. L., Kichko, T. I., Konrade, I., Elvert, R., Mier, W., Pirags, V., Lukic, I. K., Morcos, M., Dehmer, T., ... Nawroth, P. P. (2012). Methylglyoxal modification of Na v 1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nature Medicine*, 18(6), 926–933. <https://doi.org/10.1038/nm.2750>
- Boldyrev, A. A., Aldini, G., & Derave, W. (2013). Physiology and Pathophysiology of Carnosine. *Physiological Reviews*, 93(4), 1803–1845.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2012>

- Brenner, H., Hoffmeister, M., Arndt, V., Stegmaier, C., Altenhofen, L., & Haug, U. (2010). Protection From Right- and Left-Sided Colorectal Neoplasms After Colonoscopy : Population-Based Study. *J Natl Cancer Inst*, *102*, 89–95. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp436>
- Burch, J. A., John, D. J. B. S., Duffy, S., Smith, S., Kleijnen, J., & Westwood, M. (2007). Diagnostic accuracy of faecal occult blood tests used in screening for colorectal cancer: a systematic review. *J Med Screen*, *14*(3), 132–137.
- Casal, J. I., & Barderas, R. (2010). Identification of cancer autoantigens in serum: Toward diagnosticprognostic testing? *Molecular Diagnosis and Therapy*, *14*(3), 149–154. <https://doi.org/10.2165/11534760-000000000-00000>
- Casazza, J. ., Felver, M. ., & Veech, R. . (1984). The metabolism of acetone in the intact rat. *The Journal of Biological Chemistry*, *259*(1), 231–236.
- Cassidy, J., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., Koski, S., Lichinitser, M., Yang, T. S., Rivera, F., Couture, F., Sirzén, F., & Saltz, L. (2008). Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(12), 2006–2012. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.9898>
- Chakrabarti, A., Talukdar, D., Pal, A., & Ray, M. (2014). Immunomodulation of macrophages by methylglyoxal conjugated with chitosan nanoparticles against Sarcoma-180 tumor in mice. *Cellular Immunology*, *287*(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.11.006>
- Chiavarina, B., Nokin, M.-J., Florence Durieux, F. x, Bianchi, E., Andrei Turtoi, A. x, Peulen, O., Peixoto, P., Irigaray, P., Uchida, K., Belpomme, D., Delvenne, P., Castronovo, V., & Bellahcène, A. (2014). Triple negative tumors accumulate significantly less methylglyoxal specific adducts than other human breast cancer subtypes. *Oncotarget*, *5*(14), 5472–5482. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2121>
- Chiavarina, B., Nokin, M. J., Bellier, J., Durieux, F., Bletard, N., Sherer, F., Lovinfosse, P., Peulen, O., Verset, L., Dehon, R., Demetter, P., Turtoi, A., Uchida, K., Goldman, S., Hustinx, R., Delvenne, P., Castronovo, V., & Bellahcène, A. (2017). Methylglyoxal-

- mediated stress correlates with high metabolic activity and promotes tumor growth in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms18010213>
- Ciccolallo, R., Capocaccia, M. P., Coleman, F., Berrino, J. W., Coebergh, R. A. M., Damhuis, J., Faivre, C., Martinez-Garcia, H., Møller, H., Leon, M. P. De, Launoy, G., Raverdy, N., Williams, E. M. I., & Gatta, G. (2005). Survival differences between European and US patients with colorectal cancer: role of stage at diagnosis and surgery. *Gut*, 3(54), 268–273. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.044214>
- Colucci, G., Gebbia, V., Paoletti, G., Giuliani, F., Caruso, M., Gebbia, N., Cartenì, G., Agostara, B., Pezzella, G., Manzione, L., Borsellino, N., Misino, A., Romito, S., Durini, E., Cordio, S., Di Seri, M., Lopez, M., & Maiello, E. (2005). Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: A Multicenter Study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *Journal of Clinical Oncology*, 23(22), 4866–4875. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.07.113>
- Dam, L. Van, Kuipers, E. J., & Leerdam, M. E. Van. (2010). Best Practice & Research Clinical Gastroenterology Performance improvements of stool-based screening tests. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 24(4), 479–492. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.03.009>
- Danhier, P., Bański, P., Payen, V. L., Grasso, D., Ippolito, L., Sonveaux, P., & Porporato, P. E. (2017). Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1858(8), 556–572. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.02.001>
- Davidson, S. D., Milanese, D. M., Mallouh, C., Choudhury, M. S., Tazaki, H., & Konno, S. (2002). A possible regulatory role of glyoxalase I in cell viability of human prostate cancer. *Urological Research*, 30(2), 116–121. <https://doi.org/10.1007/s00240-002-0244-7>
- Delpierre, G., Vanstapel, F., Stroobant, V., & Van Schaftingen, E. (2000). Conversion of a synthetic fructosamine into its 3-phospho derivative in human erythrocytes. *The Biochemical Journal*, 352 Pt 3, 835–839. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3520835>
- Deschoolmeester, V., Boeckx, C., Baay, M., Weyler, J., Wuyts, W., Van Marck, E., Peeters, M., Lardon, F., & Vermorken, J. B. (2010). KRAS mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis. *British*

Journal of Cancer, 103(10), 1627–1636. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605959>

- DeVos, T., Tetzner, R., Model, F., Weiss, G., Schuster, M., Steiger, K. V, Gru, R., Pilarsky, C., Habermann, J. K., & Fleshner, P. R. (2009). Circulating Methylated SEPT9 DNA in Plasma Is a Biomarker for Colorectal Cancer CONCLUSIONS : *Clinical Chemistry*, 55, 1337–1346. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.115808>
- Díaz-Rubio, E., Tabernero, J., Gómez-España, A., Massutí, B., Sastre, J., Chaves, M., Abad, A., Carrato, A., Queralt, B., Reina, J. J., Maurel, J., González-Flores, E., Aparicio, J., Rivera, F., Losa, F., & Aranda, E. (2007). Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with continuous-infusion fluorouracil plus oxaliplatin as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: Final report of the Spanish Cooperative Group for the treatment of digestive tumors tri. *Journal of Clinical Oncology*, 25(27), 4224–4230. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.8467>
- Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., Diaz, A., Goodman, S. N., David, K. A., Juhl, H., Kinzler, K. W., Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., Diaz, L. A., Goodman, S. N., ... Vogelstein, B. (2005). Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *PNAS*, 102, 16368–16373. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507904102>
- Diehl, F., Schmidt, K., Durkee, K. H., Moore, K. J., Goodman, S. N., Shuber, A. P., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2008). BASIC — ALIMENTARY TRACT Analysis of Mutations in DNA Isolated From Plasma and Stool of Colorectal Cancer Patients. *Gastroenterology*, 135, 489–498. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.039>
- Egyud, L. ., & Szent-Gyorgyi, A. (1968). Cancerostatic action of methylglyoxal. *Science*, 160(3832), 1140.
- El-Kenawi, A., Gatenbee, C., Robertson-Tessi, M., Bravo, R., Dhillon, J., Balagurunathan, Y., Berglund, A., Visvakarma, N., Ibrahim-Hashim, A., Choi, J., Luddy, K., Gatenby, R., Pilon-Thomas, S., Anderson, A., Ruffell, B., & Gillies, R. (2019). Acidity promotes tumour progression by altering macrophage phenotype in prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 121(7), 556–566. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0542-2>
- Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., Zhuang, H., Cinalli, R. M., Alavi, A., Rudin, C. M., & Thompson, C. B. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Research*, 64(11), 3892–3899.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2904>

- Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., Dianzani, M. U., Poli, G., & Slater, T. (1982). Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochemical Journal*, *208*, 129–140.
- Falcone, A., Ricci, S., Brunetti, I., Pfanner, E., Allegrine, G., Barbara, C., Crinò, L., Benedetti, G., Evangelista, W., Fanchini, L., Cortesi, E., Picene, V., Vitello, S., Chiara, S., Granetto, C., Porcile, G., Fioretto, L., Orlandini, C., Andreuccetti, M., & Masi, G. (2007). Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: The gruppo oncologico nor. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(13), 1670–1676. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.0928>
- Farraye, F. A., & Wallace, M. (2002). CLINICAL SIGNIFICANCE OF SMALL POLYPS FOUND DURING SCREENING WITH FLEXIBLE SIGMOIDOSCOPY. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, *12*(1), 41–51.
- Farrington, S. M., Tenesa, A., Barnetson, R., Wiltshire, A., Prendergast, J., Porteous, M., Campbell, H., & Dunlop, M. G. (2005). *Germline Susceptibility to Colorectal Cancer Due to Base-Excision Repair Gene Defects*. 112–119.
- Feng, B., Yeu, F., & ZhengMin-Hua. (2009). Urinary markers in colorectal cancer. *Advances in Clinical Chemistry*, *47*, 45–57.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D., & Bray, F. (2012). *Cancer Incidence and Mortality Worldwide : IARC CancerBase No 11*. GLOBOCAN v1.0. <http://globocan.iarc.fr>
- Fiorentini, G., Aliberti, C., Tilli, M., Mulazzani, L., Graziano, F., Giordani, P., Mambrini, A., Montagnani, F., Alessandroni, P., Catalano, V., & Coschiera, P. (2012). Intra-arterial infusion of irinotecan-loaded drug-eluting beads (DEBIRI) versus intravenous therapy (FOLFIRI) for hepatic metastases from colorectal cancer: Final results of a phase III study. *Anticancer Research*, *32*(4), 1387–1395.
- Fong, Y., Fortner, J., Sun, R. L., Brennan, M. F., & Blumgart, L. H. (1999). Clinical Score for Predicting Recurrence After Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer. *Annals of Surgery*, *230*(3), 309. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1420876/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih>

- Friedman, D. B., Hill, S., Keller, J. W., Merchant, N. B., Levy, S. E., Coffey, R. J., & Caprioli, R. M. (2004). Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 793–811. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300635>
- Gardner, M. L. G., Illingworth, K. M., Kelleher, J., & Wood, D. (1991). Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with permeability to lactulose. *Journal of Physiology*, 439, 411–422.
- Giovannucci, E. (2002). *Modifiable risk factors for colon cancer*. 31, 925–943.
- Girard, P., Ducreux, M., Baldeyrou, P., Rougier, P., Le Chevalier, T., Bougaran, J., Lasser, P., Gayet, B., Ruffié, P., & Grunenwald, D. (1996). Surgery for lung metastases from colorectal cancer: Analysis of prognostic factors. *Journal of Clinical Oncology*, 14(7), 2047–2053. <https://doi.org/10.1200/JCO.1996.14.7.2047>
- Graser, A., Stieber, P., Nagel, D., Schäfer, C., Horst, D., Becker, C., Nikolaou, K., Lottes, A., Geisbüsch, S., Kramer, H., Wagner, A., Diepolder, H., Schirra, J., Roth, H., Seidel, D., Göke, B., Reiser, M., & Kolligs, F. (2009). Comparison of CT colonography, colonoscopy, sigmoidoscopy and faecal occult blood tests for the detection of advanced adenoma in an average risk population. *Gut*, 58, 241–248.
- Grazzini, G., Ventura, L., Zappa, M., Ciatto, S., Confortini, M., Rapi, S., Rubeca, T., Visioli, C. B., & Halloran, S. P. (2010). Influence of seasonal variations in ambient temperatures on performance of immunochemical faecal occult blood test for colorectal cancer screening: observational study from the Florence district. *Gut*, 59, 1511–1515. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.200873>
- Grützmann, R., Molnar, B., Pilarsky, C., Habermann, J. K., Schlag, P. M., Hans, D., Gru, R., Miehle, S., Stolz, T., Model, F., Roblick, U. J., Bruch, H., Liebenberg, V., Song, X., Day, R. H., Sledziewski, A. Z., & Lofton-day, C. (2008). Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. *Plos One*, 3, e3759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003759>
- Haller, D. G., Taberero, J., Maroun, J., De Braud, F., Price, T., Van Cutsem, E., Hill, M., Gilberg, F., Rittweger, K., & Schmoll, H. J. (2011). Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer.

Journal of Clinical Oncology, 29(11), 1465–1471.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.6297>

- Han, M., Choong, T. L., Hong, W. Z., Chao, S., Zheng, R., Kok, T. Y., Song, Z. Y., Hiu, M. L., Xiao, P. G., Li, X. Z., Lin, J. J., Marshall, K. W., & Choong, C. L. (2008). Novel blood-based, five-gene biomarker set for the detection of colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(2), 455–460. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1801>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- He, T., Zhou, H., Li, C., Chen, Y., Chen, X., Li, C., Mao, J., Lyu, J., & Meng, Q. H. (2016). Methylglyoxal suppresses human colon cancer cell lines and tumor growth in a mouse model by impairing glycolytic metabolism of cancer cells associated with down-regulation of c-Myc expression. *Cancer Biology & Therapy*, 17(9), 955–965. <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1210736>
- Hipkiss, A. R., Michaelis, J., & Syrris, P. (1995). Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide l-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Letters*, 371(1), 81–85. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00849-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00849-5)
- Hofheinz, R. D., Wenz, F., Post, S., Matzdorff, A., Laechelt, S., Hartmann, J. T., Müller, L., Link, H., Moehler, M., Kettner, E., Fritz, E., Hieber, U., Lindemann, H. W., Grunewald, M., Kremers, S., Constantin, C., Hipp, M., Hartung, G., Gencer, D., ... Hochhaus, A. (2012). Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: A randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 13(6), 579–588. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70116-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70116-X)
- Imperiale, T. F., Ransohoff, D. F., Itzkowitz, S. H., Turnbull, B. A., & Ross, M. E. (2004). Fecal DNA versus Fecal Occult Blood for Colorectal-Cancer Screening in an Average-Risk Population. *New England Journal of Medicine*, 351, 2704–2714.
- Imperiale, T. F., Wagner, D. R., Ching, M. ., Larkin, G. N., Rogge, J. D., & Ransohoff, D. F. (2000). ACCORDING TO THE DISTAL COLORECTAL FINDINGS. *New England Journal of Medicine*, 343, 169–174.
- Iovine, B., Iannella, M. L., Nocella, F., Pricolo, M. R., & Bevilacqua, M. A. (2012). Carnosine inhibits KRAS-mediated HCT116 proliferation by affecting ATP and ROS production. *Cancer Letters*, 315(2), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.07.021>

- Izaguirre, G., Kikonyogo, A., & Pietruszko, R. (1998). Methylglyoxal as substrate and inhibitor of human aldehyde dehydrogenase: Comparison of kinetic properties among the three isozymes. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *119*(4), 747–754. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)00051-0](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)00051-0)
- Jacobs, S. R., Herman, C. E., MacIver, N. J., Wofford, J. A., Wieman, H. L., Hammen, J. J., & Rathmell, J. C. (2008). Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent and Independent Pathways. *The Journal of Immunology*, *180*(7), 4476–4486. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4476>
- Kahi, C. J., Imperiale, T. F., Juliar, B. E., & Rex, D. K. (2009). Effect of Screening Colonoscopy on Colorectal Cancer Incidence and Mortality. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *7*(7), 770–775. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.12.030>
- Kamphorst, J. J., Cross, J. R., Fan, J., de Stanchina, E., Mathew, R., White, E. P., Thompson, C. B., & Rabinowitz, J. D. (2013). Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(22), 8882–8887. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307237110>
- Kang, Y., Edwards, L. G., & Thornalley, P. J. (1996). Effect of methylglyoxal on human leukaemia 60 cell growth: Modification of DNA, G1growth arrest and induction of apoptosis. *Leukemia Research*, *20*(5), 397–405. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(95\)00162-X](https://doi.org/10.1016/0145-2126(95)00162-X)
- Kapiteijn, E., Marijnen, C. A. ., Colenbrander, A. ., Kranenbarg, E. K., Steup, W. ., van Krieken, J. H. J. ., van Houwelingen, J. ., Leer, J. W. ., & van Velde, C. J. . (1998). Local recurrence in patients with rectal cancer diagnosed between 1988 and 1992 : a population-based study in the west Netherlands. *European Journal of Surgical Oncology*, *24*, 528–535.
- Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, *3*(3), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>
- Klaassen, C. H. ., Jeunink, M. A. ., Prinsen, C. F. ., Ruers, T. J. ., Tan, A. C. I. T. ., Strobbe, L. J. ., & Thunnissen, F. B. J. . (2003). Quantification of Human DNA in Feces as a Diagnostic Test for the Presence of Colorectal Cancer. *Clin Chem*, *49*, 1185–1187.
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L., & Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current

- concepts of cancer metabolism. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 11, Issue 5, pp. 325–337). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc3038>
- Kuhla, B., Boeck, K., Schmidt, A., Ogunlade, V., Arendt, T., Münch, G., & Lüth, H. J. (2007). Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiology of Aging*, 28(1), 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.11.007>
- Lal, S., Randall, W. C., Taylor, A. H., Kappler, F., Walker, M., Brown, T. R., & Szwegold, B. S. (1997). Fructose-3 phosphate production and polyol pathway metabolism in diabetic rat hearts. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 46(11), 1333–1338. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(97\)90240-7](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(97)90240-7)
- Lebleu, V. S., O'Connell, J. T., Gonzalez Herrera, K. N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M. C., De Carvalho, F. M., Damascena, A., Domingos Chinen, L. T., Rocha, R. M., Asara, J. M., & Kalluri, R. (2014). PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nature Cell Biology*, 16(10), 992–1003. <https://doi.org/10.1038/ncb3039>
- Levin, B., Lieberman, D. A., McFarland, B., Smith, R. A., Brooks, D., Andrews, K. S., Dash, C., Giardiello, F. M., Glick, S., Levin, T. R., Pickhardt, P., Rex, D. K., Thorson, A., & Winawer, S. J. (2008). Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps , 2008 : A Joint Guideline from the American Cancer Society , the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer , and the American College of Radiology * †. *Gastroenterology*, 134, 1570–1595. <https://doi.org/10.3322/CA.2007.0018>
- Levin, T. R., Palitz, A., Grossman, S., Conell, C., Finkler, L., Ackerson, L., Rumore, G., & Selby, J. V. (1999). Predicting Advanced Proximal Colonic Neoplasia With Screening Sigmoidoscopy. *JAMA*, 281(17), 1611–1617.
- Lièvre, A., Bachet, J.-B., Boige, V., Cayre, A., Le Corre, D., Buc, E., Ychou, M., Bouché, O., Landi, B., Louvet, C., André, T., Bibeau, F., Diebold, M.-D., Rougier, P., Ducreux, M., Tomasic, G., Emile, J.-F., Penault-Llorca, F., & Laurent-Puig, P. (2008). KRAS Mutations As an Independent Prognostic Factor in Patients With Advanced Colorectal Cancer Treated With Cetuximab. *Journal of Clinical Oncology*, 26(3), 374–379. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.5906>

- Link, A., Balaguer, F., Shen, Y., Nagasaka, T., Lozano, J. J., Boland, C. ., & Goel, A. (2010). Fecal MicroRNAs: Novel Biomarkers for Colon Screening. *Cancer Epidemiology Biomarker Prev*, *19*, 1766–1774. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(10\)60616-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(10)60616-6)
- Liu, Y., Cao, Y., Zhang, W., Bergmeier, S., Qian, Y., Akbar, H., Colvin, R., Ding, J., Tong, L., Wu, S., Hines, J., & Chen, X. (2012). A Small-Molecule Inhibitor of Glucose Transporter 1 Downregulates Glycolysis, Induces Cell-Cycle Arrest, and Inhibits Cancer Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, *11*(8), 1672–1682. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0131>
- Lo, T. W. C., Selwood, T., & Thornalley, P. J. (1994). The reaction of methylglyoxal with aminoguanidine under physiological conditions and prevention of methylglyoxal binding to plasma proteins. *Biochemical Pharmacology*, *48*(10), 1865–1870. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90584-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90584-3)
- Loarca, L., Sassi-Gaha, S., & Artlett, C. M. (2013). Two α -dicarbonyls downregulate migration, invasion, and adhesion of liver cancer cells in a p53-dependent manner. *Digestive and Liver Disease*, *45*(11), 938–946. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2013.05.005>
- Lofton-day, C., Model, F., Devos, T., Tetzner, R., Distler, J., Schuster, M., Song, X., Lesche, R., Liebenberg, V., Ebert, M., & Molnar, B. (2008). DNA Methylation Biomarkers for Blood-Based Colorectal Cancer Screening. *Clinical Chemistry*, *54*, 414–423. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.095992>
- Loidl-Stahlhofen, A., & Spiteller, G. (1994). Alpha-Hydroxyaldehydes, products of lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, *1211*, 156–160.
- Lunt, S. Y., & Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *27*(1), 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>
- Lyles, G. A., & Chalmers, J. (1992). The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery. *Biochemical Pharmacology*, *43*(7), 1409–1414. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90196-P](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90196-P)
- Maher, J. C., Wangpaichitr, M., Savaraj, N., Kurtoglu, M., & Lampidis, T. J. (2007). Hypoxia-inducible factor-1 confers resistance to the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose. *Molecular Cancer Therapeutics*, *6*(2), 732–741. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0407>

- Maher, Johnathan C., Krishan, A., & Lampidis, T. J. (2004). Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 53(2), 116–122. <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0724-7>
- Makinoshima, H., Takita, M., Saruwatari, K., Umemura, S., Obata, Y., Ishii, G., Matsumoto, S., Sugiyama, E., Ochiai, A., Abe, R., Goto, K., Esumi, H., & Tsuchihara, K. (2015). Signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/mammalian target of rapamycin (mTOR) axis is responsible for aerobic glycolysis mediated by glucose transporter in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated lung adenocarcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, 290(28), 17495–17504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.660498>
- Martínez-Zaguilán, R., Seftor, E. a, Seftor, R. E., Chu, Y. W., Gillies, R. J., & Hendrix, M. J. (1996). Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 14(2), 176–186. <https://doi.org/10.1007/BF00121214>
- Maughan, T. S., Adams, R. A., Smith, C. G., Meade, A. M., Seymour, M. T., Wilson, R. H., Idziaszczyk, S., Harris, R., Fisher, D., Kenny, S. L., Kay, E., Mitchell, J. K., Madi, A., Jasani, B., James, M. D., Bridgewater, J., Kennedy, M. J., Claes, B., Lambrechts, D., ... Cheadle, J. P. (2011). Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: Results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *The Lancet*, 377(9783), 2103–2114. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60613-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60613-2)
- Miller, D. M., Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D., & Sedoris, K. (2012). c-Myc and cancer metabolism. *Clinical Cancer Research*, 18(20), 5546–5553. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977>
- Morgenstern, J., Fleming, T., Schumacher, D., Eckstein, V., Freichel, M., Herzig, S., & Nawroth, P. (2017). Loss of glyoxalase 1 induces compensatory mechanism to achieve dicarbonyl detoxification in mammalian Schwann cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292(8), 3224–3238. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.760132>
- Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., & Okumura, K. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 268(2), 297–305. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(92\)90235-T](https://doi.org/10.1016/0027-5107(92)90235-T)

- Nokin, M., Durieux, F., Bellier, J., Peulen, O., Uchida, K., Spiegel, D. A., Cochrane, J. R., Hutton, C. A., Castronovo, V., & Bellahcène, A. (2017). Hormetic potential of methylglyoxal, a side-product of glycolysis, in switching tumours from growth to death. *Scientific Reports*, 7(1), 11722. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12119-7>
- Nokin, M. J., Durieux, F., Peixoto, P., Chiavarina, B., Peulen, O., Blomme, A., Turtoi, A., Costanza, B., Smargiasso, N., Baiwir, D., Scheijen, J. L., Schalkwijk, C. G., Leenders, J., De Tullio, P., Bianchi, E., Thiry, M., Uchida, K., Spiegel, D. A., Cochrane, J. R., ... Bellahcène, A. (2016). Methylglyoxal, a glycolysis side-product, induces Hsp90 glycation and YAP- mediated tumor growth and metastasis. *ELife*, 5(19375), 1–30. <https://doi.org/10.7554/eLife.19375>
- Nordlinger, B., Sorbye, H., Glimelius, B., Poston, G. J., Schlag, P. M., Rougier, P., Bechstein, W. O., Primrose, J. N., Walpole, E. T., Finch-Jones, M., Jaeck, D., Mirza, D., Parks, R. W., Collette, L., Praet, M., Bethe, U., Van Cutsem, E., Scheithauer, W., & Gruenberger, T. (2008). Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *The Lancet*, 371(9617), 1007–1016. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60455-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60455-9)
- Notterman, D. A., Alon, U., Sierk, A. J., & Levine, A. J. (2001). Transcriptional Gene Expression Profiles of Colorectal Adenoma , Adenocarcinoma , and Normal Tissue Examined by Oligonucleotide Arrays. *Cancer Research*, 61, 3124–3130.
- Osthus, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L. A., & Dang, C. V. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 21797–21800. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000023200>
- Ostwald, C., Linnebacher, M., Weirich, V., & Prall, F. (2009). Chromosomally and microsatellite stable colorectal carcinomas without the CpG island methylator phenotype in a molecular classification. *International Journal of Oncology*, 35, 321–327. <https://doi.org/10.3892/ijo>
- Osumi, H., Shinozaki, E., Osako, M., Kawazoe, Y., Oba, M., Misaka, T., Goto, T., Kamo, H., Suenaga, M., Kumekawa, Y., Ogura, M., Ozaka, M., Matsusaka, S., Chin, K., HATAKE, K., & MIZUNUMA, N. (2015). Cetuximab treatment for metastatic colorectal cancer with

- KRAS p.G13D mutations improves progression-free survival. *Molecular and Clinical Oncology*, 3(5), 1053–1057. <https://doi.org/10.3892/mco.2015.602>
- Oya-Ito Tomoko, T., Naito, Y., Takagi, T., Handa, O., Matsui, H., Yamada, M., Shima, K., & Yoshikawa, T. (2011). Heat-shock protein 27 (Hsp27) as a target of methylglyoxal in gastrointestinal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1812(7), 769–781. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.03.017>
- Park, H. J., Lyons, J. C., Ohtsubo, T., & Song, C. W. (1999). Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *British Journal of Cancer*, 80(12), 1892–1897. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690617>
- Phillips, S. A., & Thornalley, P. J. (1993). The formation of methylglyoxal from triose phosphates: Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *European Journal of Biochemistry*, 212(1), 101–105. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17638.x>
- Price, G. S., Page, R. L., Riviere, J. E., Cline, J. M., & Thrall, D. E. (1996). Pharmacokinetics and toxicity of oral and intravenous lonidamine in dogs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 38(2), 129–135. <https://doi.org/10.1007/s002800050460>
- Pulitanò, C., Bodingbauer, M., Aldrighetti, L., De Jong, M. C., Castillo, F., Schulick, R. D., Parks, R. W., Choti, M. A., Wigmore, S. J., Gruenberger, T., & Pawlik, T. M. (2011). Liver resection for colorectal metastases in presence of extrahepatic disease: Results from an international multi-institutional analysis. *Annals of Surgical Oncology*, 18(5), 1380–1388. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-1459-4>
- Quintero, E., Castells, A., Bujanda, L., Ph, D., Cubiella, J., Ph, D., Salas, D., Hernández, C., Sc, B., Jover, R., Ph, D., Montalvo, I., Ph, D., Ponce, M., Andrés, M., Teruel, G., Peris, A., Serradesanferm, A., Ono, A., ... González-navarro, A. (2012). Colonoscopy versus Fecal Immunochemical Testing in Colorectal-Cancer Screening. *The New England Journal of Medicine*, 366(8), 697–706.
- Rabbani, N., & Thornalley, P. J. (2011). Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22(3), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2011.02.015>
- Rabbani, N., & Thornalley, P. J. (2012). Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids*, 42(4), 1133–1142. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0783-0>

- Rabbani, N., & Thornalley, P. J. (2015). Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 458, Issue 2, pp. 221–226). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.140>
- Rabeneck, L., Paszat, L. F., Saskin, R., & Stukel, T. A. (2010). Association Between Colonoscopy Rates and Colorectal Cancer Mortality. *The American Journal of Gastroenterology*, *105*(July 2010), 1627–1632. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.83>
- Ranganathan, S., & Tew, K. D. (1993). Analysis of glyoxalase-I from normal and tumor tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, *1182*(3), 311–316. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(93\)90074-B](https://doi.org/10.1016/0925-4439(93)90074-B)
- Robey, R. B., & Hay, N. (2009). Is Akt the “Warburg kinase”?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, *19*(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.11.010>
- Rockey, D. C., Paulson, E., Niedzwiecki, D., Davis, W., Bosworth, H. B., Sanders, L., Yee, J., Henderson, J., Hatten, P., Burdick, S., Sanyal, A., Rubin, D. T., Sterling, M., Akerkar, G., Bhutani, M. S., Binmoeller, K., Garvie, J., Bini, E. J., Mcquaid, K., ... Halvorsen, R. (2005). Analysis of air contrast barium enema , computed tomographic colonography , and colonoscopy : prospective comparison. *Lancet*, *365*, 305–311.
- Romanuik, T. L., Ueda, T., Le, N., Haile, S., Yong, T. M. K., Thomson, T., Vessella, R. L., & Sadar, M. D. (2009). Novel biomarkers for prostate cancer including noncoding transcripts. *American Journal of Pathology*, *175*(6), 2264–2276. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080868>
- Rulli, A., Carli, L., Romani, R., Baroni, T., Giovannini, E., Rosi, G., & Talesa, V. (2001). Expression of glyoxalase I and II in normal and breast cancer tissues. *Breast Cancer Research and Treatment*, *66*(1), 67–72. <https://doi.org/10.1023/A:1010632919129>
- Saini, N., & Yang, X. (2017). Metformin as an anti-cancer agent: actions and mechanisms targeting cancer stem cells Introduction: Metformin at a Glance. *Acta Biochim Biophys Sin, January*, 1–11. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx106>
- Sakamoto, H., Mashima, T., Sato, S., Lung, H., & Cells, C. (2001). *Selective Activation of Apoptosis Program by S-p-bromobenzylglutathione Cyclopentyl Diester in Glyoxalase I-overexpressing Human Lung Cancer Cells Selective Activation of Apoptosis Program by*

- S - p - bromobenzylglutathione Cyclopentyl Diester in Glyoxalase*. 7(August), 2513–2518.
- Sakamoto, H., Mashima, T., Yamamoto, K., & Tsuruo, T. (2002). Modulation of heat-shock protein 27 (Hsp27) anti-apoptotic activity by methylglyoxal modification. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 45770–45775. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207485200>
- Saltz, L. B., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., Koski, S., Lichinitser, M., Yang, T. S., Rivera, F., Couture, F., Sirzén, F., & Cassidy, J. (2008). Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: A randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology*, 26(12), 2013–2019. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.9930>
- Santarius, T., Bignell, G. R., Greenman, C. D., Widaa, S., Chen, L., Mahoney, C. L., Butler, A., Edkins, S., Waris, S., Thronalley, P. J., Futreal, P. A., & R., S. M. (2010). Glo1-A Novel Amplified Gene in Human Cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 49, 711–725. <https://doi.org/10.1002/gcc>
- Sasaki, H., Shitara, M., Yokota, K., Hikosaka, Y., Moriyama, S., Yano, M., & Fujii, Y. (2012). Overexpression of GLUT1 correlates with Kras mutations in lung carcinomas. *Molecular Medicine Reports*, 5(3), 599–602. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.736>
- Schoen, R. E., Pinsky, P. F., Weissfeld, J. L., Yokochi, L. A., Church, T., Laiyemo, A. O., Bresalier, R., Andriole, G. L., Buys, S. S., Crawford, E. D., Fouad, M. N., Isaacs, C., Carrick, D. M., Wright, P., Riley, T. L., Purdue, M. P., Izmirlian, G., Kramer, B. S., Miller, A. B., ... Project, P. (2012). Colorectal-Cancer Incidence and Mortality with Screening Flexible Sigmoidoscopy. *New England Journal of Medicine*, 366(25), 2345–2357.
- Segnan, N., von Karsa, L., Patnick, J., & Atkin, W. (2015). European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: Overview and introduction to the full Supplement publication. *Endoscopy*, 45(1), 51–59. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1325997>.European
- Seidensticker, R., Denecke, T., Kraus, P., Seidensticker, M., Mohnike, K., Fahlke, J., Kettner, E., Hildebrandt, B., Dudeck, O., Pech, M., Amthauer, H., & Ricke, J. (2012). Matched-pair comparison of radioembolization plus best supportive care versus best supportive care alone for chemotherapy refractory liver-dominant colorectal metastases. *CardioVascular and Interventional Radiology*, 35(5), 1066–1073. <https://doi.org/10.1007/s00270-011-0234-7>

- Seidler, N. W., Yeargans, G. S., & Morgan, T. G. (2004). Carnosine disaggregates glycated α -crystallin: An in vitro study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 427(1), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.04.024>
- Sharaf, H., Matou-Nasri, S., Wang, Q., Rabhan, Z., Al-Eidi, H., Al Abdulrahman, A., & Ahmed, N. (2015). Advanced glycation endproducts increase proliferation, migration and invasion of the breast cancer cell line MDA-MB-231. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(3), 429–441. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.12.009>
- Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Lin, E., Zhang, L., Guo, Y., Hernandez, N. S., Chen, X., Ahmed, S., Konishi, K., Hamilton, S. R., & Issa, J. J. (2007). Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *PNAS*, 104, 18654–18659.
- Shestov, A. A., Liu, X., Ser, Z., Cluntun, A. A., Hung, Y. P., Huang, L., Kim, D., Le, A., Yellen, G., Albeck, J. G., & Locasale, J. W. (2014). Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *ELife*, 3(July2014), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.03342>
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C.-S., Dang, G., Jungmann, R. A., Dalla-Favera, R., & Dang, C. V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13), 6658–6663. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6658>
- Sjöblom, T., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Mandelker, D., Leary, R. J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S. D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J. K. V, Gazdar, A. F., Hartigan, J., ... Bachman, K. E. (2006). *The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers*. 268, 268–274. <https://doi.org/10.1126/science.1133427>
- Sonveaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M. C., Verrax, J., Rabbani, Z. N., De Saedeleer, C. J., Kennedy, K. M., Diepart, C., Jordan, B. F., Kelley, M. J., Gallez, B., Wahl, M. L., Feron, O., & Dewhirst, M. W. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 118(12), 3930–3942. <https://doi.org/10.1172/JCI36843>
- Speer, O., Morkunaite-Haimi, S., Liobikas, J., Franck, M., Hensbo, L., Linder, M. D.,

- Kinnunen, P. K. J., Wallimann, T., & Eriksson, O. (2003). Rapid suppression of mitochondrial permeability transition by methylglyoxal: Role of reversible arginine modification. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 34757–34763. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301990200>
- Su, Y., Wang, M., Aiamkitsumrit, B., Brenner, D. E., & Block, T. M. (2005). Detection of a K-ras mutation in urine of patients with colorectal cancer. *Cancer Biomarkers*, 1, 177–182.
- Sung, J. J. Y., Chan, F. K. L., Leung, W. K., Wu, C. . J., Lau, J. Y. W., Ching, J., To, K. A. F., Lee, Y. U. K. T., Luk, Y. I. U. W., Kung, N. N. S., Kwok, S. P. Y., Li, M. K. W., & Chung, S. C. S. (2003). Screening for Colorectal Cancer in Chinese: Comparison of Fecal Occult Blood Test, Flexible Sigmoidoscopy, and Colonoscopy. *Gastroenterology*, 124, 608–614. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50090>
- Szwergold, B. S. (2005). Carnosine and anserine act as effective transglycating agents in decomposition of aldose-derived Schiff bases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.033>
- Talesa, V., Uotila, L., & Koivusalo, M. (1988). Demonstration of glyoxalase II in rat liver mitochondria. Partial purification and occurrence in multiple forms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 955(33149), 103–110.
- Tamkovich, S. N., & Anna, V. (2006). Circulating DNA and DNase Activity in Human Blood. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1075, 191–196. <https://doi.org/10.1196/annals.1368.026>
- Tejpar, S., Celik, I., Schlichting, M., Sartorius, U., Bokemeyer, C., & Van Cutsem, E. (2012). Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *Journal of Clinical Oncology*, 30(29), 3570–3577. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.2592>
- Thornalley, P. J. (2003). Glyoxalase I - structure, function and a critical role in the enzymatic defense against glycation. *Biochemical Society Transactions*, 31(8), 1343–1348. <https://doi.org/10.1042/BST0311343>
- Thornalley, Paul J., Battah, S., Ahmed, N., Karachalias, N., Agalou, S., Babaei-jadidi, R., & Dawnay, A. (2003). Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochemical Journal*, 375(3), 581–592. <https://doi.org/10.1042/bj20030763>

- Thornalley, Paul J., Langborg, A., & Minhas, H. S. (1999). Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochemical Journal*, *344*(1), 109–116. <https://doi.org/10.1042/bj3440109>
- Tytherleigh, M. G., Warren, B. F., & Mortensen, N. J. M. (2008). Management of early rectal cancer. *British Journal of Surgery*, *95*, 409–423. <https://doi.org/10.1002/bjs.6127>
- Van Cutsem, E., Köhne, C. H., Láng, I., Folprecht, G., Nowacki, M. P., Cascinu, S., Shchepotin, I., Maurel, J., Cunningham, D., Tejpar, S., Schlichting, M., Zubel, A., Celik, I., Rougier, P., & Ciardiello, F. (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: Updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *Journal of Clinical Oncology*, *29*(15), 2011–2019. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.5091>
- van Heijst, J. W. J., Niessen, H. W. M., Musters, R. J., Hinsbergh, V. W. M. van, Hoekman, K., & Schalkwijk, C. G. (2006). Argpyrimidine-modified Heat Shock Protein 27 in human non-small cell lung cancer: A possible mechanism for evasion of apoptosis. *Cancer Letters*, *241*(2), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.10.042>
- Vander Jagt, D. L., Hassebrook, R. K., Hunsaker, L. A., Brown, W. M., & Royer, R. E. (2001). Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal by aldose reductase and by glyoxalase-I: Roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetic complications. *Chemico-Biological Interactions*, *130–132*, 549–562. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00298-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00298-2)
- Vilkin, A., Rozen, P., Levi, Z., Waked, A., Sc, B., Maoz, E., Birkenfeld, S., & Niv, Y. (2005). Performance Characteristics and Evaluation of an Automated-Developed and Quantitative , Immunochemical , Fecal Occult Blood Screening Test. *American Journal of Gastroenterology*, *100*, 2519–2525. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.00231.x>
- Viollet, B., Guigas, B., Garcia, N. S., Leclerc, J., Foretz, M., & Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science*, *122*(6), 253–270. <https://doi.org/10.1042/CS20110386>
- von Wagner, C., Ghanouni, A., Hallingan, S., Smith, S., Dadswell, E., Lilford, R. J., Morton, D., Atkin, W., & Wardle, J. (2012). Patient Acceptability and Psychologic Consequences of CT Colonography Compared with Those of Colonoscopy : Results from a Multicenter Randomized Controlled Trial of Symptomatic Patients. *Radiology*, *263*(3), 723–731.

<https://doi.org/10.1148/radiol.12111523/-/DC1>

- Wang, T., Douglass, E. F., Fitzgerald, K. J., & Spiegel, D. A. (2013). A “ Turn-On ” Fluorescent Sensor for Methylglyoxal.
- Wang, Y., Kuramitsu, Y., Ueno, T., Suzuki, N., Yoshino, S., Iizuka, N., Akada, J., Kitagawa, T., Oka, M., & Nakamura, K. (2012). Glyoxalase I (GLO1) is up-regulated in pancreatic cancerous tissues compared with related non-cancerous tissues. *Anticancer Research*, 32(8), 3219–3222.
- Ward, P. S., & Thompson, C. B. (2012). Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. In *Cancer Cell* (Vol. 21, Issue 3, pp. 297–308). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.014>
- West, N. P., Hohenberger, W., Weber, K., Perrakis, A., Finan, P. J., & Quirke, P. (2010). Complete mesocolic excision with central vascular ligation produces an oncologically superior specimen compared with standard surgery for carcinoma of the colon. *Journal of Clinical Oncology*, 28(2), 272–278. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.1448>
- Winawer, S. J., Stewart, E. T., Zauber, A. G., Bond, J. H., Ansel, H., Wayne, J. D., Hall, D., Hamlin, A., & Schapiro, M. (2000). A COMPARISON OF COLONOSCOPY AND DOUBLE-CONTRAST BARIUM ENEMA FOR SURVEILLANCE AFTER POLYPECTOMY. *New England Journal of Medicine*, 342(24), 1766–1772.
- Wong, S. L., Mangu, P. B., Choti, M. A., Crocenzi, T. S., Dodd, G. D., Dorfman, G. S., Eng, C., Fong, Y., Giusti, A. F., Lu, D., Marsland, T. A., Michelson, R., Poston, G. J., Schrag, D., Seidenfeld, J., & Benson, A. B. (2010). American Society of Clinical Oncology 2009 clinical evidence review on radiofrequency ablation of hepatic metastases from colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(3), 493–508. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.4450>
- Wood, L. D., Silliman, N., Szabo, S., Dezso, Z., Ustyanksky, V., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Karchin, R., Wilson, P. A., Kaminker, J. S., Zhang, Z., Croshaw, R., Willis, J., Dawson, D., Shipitsin, M., & Willson, J. K. V. (2007). The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science*, 318, 1108–1113. <https://doi.org/10.1126/science.1145720>
- Xie, Y. H., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1).

<https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>

- Young, G. P., John, J. B. S. J., Winawer, S. J., & Rozen, P. (2002). Choice of Fecal Occult Blood Tests for Colorectal Cancer Screening : Recommendations Based on Performance Characteristics in Population Studies. *The American Journal of Gastroenterology*, *97*(10), 2499–2507.
- Yun, J., Rago, C., Cheong, I., Pagliarini, R., Angenendt, P., Schmidt, K., Wilson, J. K. V, Markowitz, S., Zhou, S., Jr, L. a D., Velculescu, V., Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Papadopoulos, N. (2009). Glucose Deprivation Contributes to the Development of KRAS Pathway Mutations in Tumor Cells. *Science*, *325*(September), 1555–1559. <https://doi.org/10.1126/science.1174229>.Glucose
- Zavoral, M., Suchanek, S., Zavada, F., Dusek, L., Muzik, J., Seifert, B., & Fric, P. (2009). Colorectal cancer screening in Europe. *World Journal of Gastroenterology*, *15*(47), 5907–5915. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.5907>
- Zou, H., Taylor, W. R., Harrington, J. J., Taher, F., Hussain, N., Cao, X., Loprinzi, C. L., Levine, T. R., Rex, D. K., Ahnen, D., Knigge, K. L., Lance, P., Jiang, X., Smith, D. I., & Ahlquist, D. A. (2009). High Detection Rates of Colorectal Neoplasia by Stool DNA Testing With a Novel Digital Melt Curve Assay. *Gastroenterology*, *136*(2), 459–470. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.023>



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

TITRE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU STRESS DICARBONYLE AU COURS DE LA PROGRESSION CANCEREUSE ET METASTATIQUE DANS LE CAS DU CANCER COLORECTAL KRAS MUTE

Résumé

Le cancer colorectal constitue aujourd'hui la deuxième (ou première selon le sexe) source de décès avant 70ans. Ce cancer constitue un modèle particulièrement intéressant car il est depuis longtemps avéré que son incidence est largement due à des facteurs environnementaux. Il est également l'un des seuls cancers à aujourd'hui faire l'objet d'un dépistage systématique. Cette thèse d'exercice fait le point sur l'ensemble des techniques utilisées pour ce dépistage, des tests biologiques aux différentes techniques d'imagerie, et sur les différents traitements et protocoles de soin du cancer colorectal (CCR). Une seconde partie détaille le métabolisme énergétique du CCR et son implication dans le développement tumoral. Le focus est plus particulièrement fait sur le stress dicarbonyle (SD) comme produit annexe de la glycolyse et majoritairement représenté par le methylglyoxal. L'impact de ce stress est mis en regard de la mutation du gène KRAS très fréquemment présente dans les CCR à des stades avancés. Cette mutation constitue un frein aux thérapies ciblées habituellement utilisées, et une éventuelle sensibilité des CCR mutés KRAS aux altérations du SD pourrait constituer une piste intéressante pour contourner l'obstacle thérapeutique que constitue aujourd'hui la mutation de KRAS. Les résultats obtenus au cours d'un stage de recherche de 6 mois effectué dans le cadre d'un Master 2 au sein du Laboratoire de recherche sur les métastases à Liège sont présentés et analysés à la fin du document comme illustration de l'intérêt potentiel du SD comme levier pour contrôler la survie des cellules tumorales de CCR KRAS mutés.

TITLE

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF DICARBONYL STRESS DURING CANCEROUS AND METASTATIC PROGRESSION IN KRAS MUTATED COLORECTAL CANCER

Summary

Colorectal cancer is now the second (or first depending on sex) source of death before age 70. This cancer is a particularly interesting model because it has long been proven that its incidence is largely due to environmental factors. It is also one of the only cancers to be systematically screened today. This pharmacy thesis details all the techniques used for this screening, from biological tests to all the imaging techniques. Also it describe the different treatments and treatment protocols for colorectal cancer (CRC). A second part details the energy metabolism of CRC and its implication in tumor development. The focus is particularly made on dicarbonyl stress (DS) as a side product of glycolysis and mainly represented by methylglyoxal. The impact of this stress is put side to side with the mutation of the KRAS gene very frequently present in CRC at advanced stages. This mutation constitutes a obstacle to the targeted therapies currently used, and a possible sensitivity of KRAS mutated CRCs to alterations of DS could constitute an interesting avenue for circumventing the therapeutic obstacle which the KRAS mutation constitutes today. The results obtained during a 6-month research internship carried out as part of a Master 2 within the Laboratory for Research on Metastases in Liège are presented and analyzed at the end of the document as an illustration of the potential interest of DS as a lever to control the survival of mutated KRAS CCR tumor cells.

Mots-clés

Cancer colorectal /stress dicarbonyle /methylglyoxal /dépistage /métabolisme /énergétique /recherche
