

> La tumorigenèse colorectale est associée à l'augmentation progressive de la dysplasie épithéliale et à l'invasion pariétale, évaluées par différentes classifications histologiques, dont l'intérêt pour la prise en charge thérapeutique a été démontré. Une chimiothérapie est utile en cas de métastase ganglionnaire (stade III, chimiothérapie adjuvante) ou viscérale (stade IV). En revanche, son intérêt pour le traitement des tumeurs de stade II est mal connu, et un tiers des tumeurs de stades II-III, indépendamment de leur traitement, va évoluer défavorablement. Une clé pour améliorer la qualité de la décision thérapeutique est l'identification de paramètres pronostiques indépendants de l'évaluation morphologique et histologique. Dans une étude préliminaire, nous avons réalisé la caractérisation génomique de 401 cancers coliques, et avons identifié les chromosomes 5q et 8p comme porteurs d'éléments déterminant la dissémination ganglionnaire ou à distance. Une première analyse du transcriptome de 47 tumeurs a permis de valider l'étroite corrélation entre l'inactivation biallélique de quelques gènes-clés et leur niveau d'expression. Grâce à la contribution multicentrique à une ressource commune d'échantillons tumoraux provenant de patients ayant au moins 3 ans de suivi, nous avons programmé une caractérisation complète du génome et du transcriptome d'au moins 185 cancers sporadiques, en association avec les paramètres cliniques et morphologiques. Nous corrélons ces informations aux mutations somatiques de gènes sélectionnés, à des analyses par RT-PCR en temps réel et à l'expression de protéines par immunohistochimie. Une recherche des mécanismes de réponse au traitement adjuvant fournira des pistes pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. <

## Projets scientifiques faisant appel aux collections des tumorothèques du canceropôle PACA

### Identification des facteurs génétiques associés à l'évolution des cancers coliques

#### Impact sur la prise en charge thérapeutique

Sylviane Olschwang<sup>1</sup>, Frédéric Viret<sup>1</sup>,  
Geneviève Monges<sup>1</sup>, Jean-François Seitz<sup>2</sup>,  
Nicolas Sevenet<sup>3</sup>, Emmanuel Tiret<sup>4</sup>,  
Gérard Milano<sup>5</sup>, Daniel Birnbaum<sup>1</sup>,  
François Bertucci<sup>1</sup>



#### Contexte de la recherche

Le cancer colorectal est la seconde cause de cancer dans les pays développés, étant responsable au niveau mondial d'environ 500 000 décès par an. En France, chaque année, plus de 36 200 nouveaux cas sont diagnostiqués et plus de 16 000 décès sont reliés à ce cancer. Cette

<sup>1</sup>Institut Paoli-Calmettes, Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Provence-Alpes-Côte d'Azur, et Inserm UMR 599, 232, boulevard Sainte Marguerite, 13273 Marseille Cedex 9, France.

<sup>2</sup>AP-HM La Timone, Marseille, France.

<sup>3</sup>AP-HP Lariboisière, Paris, France.

<sup>4</sup>AP-HP Saint-Antoine, Paris, France.

<sup>5</sup>Centre Antoine Lacassagne, Nice, France.

[olschwangs@marseille.fnclcc.fr](mailto:olschwangs@marseille.fnclcc.fr)



fréquence, cette gravité, ainsi que son retentissement sur les plans humain et socio-économique en font un enjeu prioritaire de santé publique. La chirurgie est le traitement de référence pour environ trois quarts des patients. Toutefois, même si la résection est considérée comme curative, près de la moitié des patients vont développer des rechutes non curables. De ce fait, la survie globale à 5 ans n'est que de 50 %. Les facteurs pronostiques actuels, histologiques, cliniques et moléculaires, ont peu évolué depuis une quinzaine d'années et sont insuffisants pour rendre compte de l'hétérogénéité évolutive de la maladie, conduisant un certain nombre de patients vers des thérapeutiques inadaptées, toxiques, inutiles ou inefficaces. Il apparaît crucial d'améliorer les classifications pronostiques pour affiner les indications des traitements actuels, développer de nouvelles thérapeutiques ciblant des molécules discriminantes et améliorer la survie grâce à un traitement « à la carte » mieux adapté. Face aux limites des approches conventionnelles, il est apparu que de nouvelles percées thérapeutiques ne seraient possibles qu'à travers une caractérisation moléculaire globale, détaillée et objective de la maladie. Aujourd'hui, les nouvelles techniques d'analyse moléculaire à haut débit permettent d'aborder la complexité des tumeurs. Plusieurs études rétrospectives pronostiques réalisées sur différents cancers, ont rapporté des résultats encourageants avec l'identification, fondée sur les profils d'expression génique définis sur puces à ADN, de nouvelles classes pronostiques - non identifiables par les moyens conventionnels - dans des groupes de tumeurs d'apparence histoclinique homogène, mais en fait hétérogènes sur le plan évolutif.

Le projet d'analyse moléculaire à haut débit des cancers coliques mené en région PACA est en cours de mise en place et réunit deux équipes : la première est en place à l'Institut Paoli-Calmettes depuis de nombreuses années et a une expérience solide dans l'analyse du transcriptome des cancers de diverses localisations. La seconde a préférentiellement abordé un autre aspect de la caractérisation des cellules tumorales, qui concerne l'analyse génomique. La réunion des deux équipes permet d'aborder l'étude des cancers coliques avec l'ensemble des outils d'analyse moléculaire des cellules tumorales. Le but du projet, à travers l'identification d'un certain nombre de facteurs génétiques dont le rôle dans l'évolution des cancers coliques aura été démontré, est d'analyser l'impact de leur détermination systématique sur la prise en charge d'une thérapeutique, et de sélectionner les paramètres décisifs dans la démarche en pratique médicale quotidienne.

## État des lieux

La revue de la littérature sur la caractérisation du transcriptome sur puces à ADN dans le cancer du colon détecte à peu près 300 publications sur le site de référence *PubMed*. La plupart des études ont été réalisées sur des lignées cellulaires, plus rarement sur des tissus tumoraux, et ont cherché à mettre en évidence des signatures moléculaires capables d'améliorer nos capacités de diagnostic d'un certain nombre de tumeurs pour lesquelles, effectivement, la prise en charge dépend de l'identification du diagnostic précis du type tumoral. Moins d'une trentaine d'études cliniques sur puces à ADN ont été rapportées

dans la littérature. La plupart ont comparé les profils transcriptionnels du tissu normal à du tissu tumoral bénin (adénome) ou malin (adénocarcinome). Seules 4 études récentes, publiées en 2004 et 2005, se sont intéressées à l'identification de facteurs pronostiques ou prédictifs de la réponse thérapeutique.

La première en date est celle que nous avons menée à l'Institut Paoli-Calmettes dans le groupe de Daniel Birnbaum [1]. Cette étude a permis la comparaison de lignées de cancers colorectaux/coliques, d'une part, et de tissus tumoraux appariés sur le tissu sain des mêmes patients, d'autre part. Ces 50 ARN, qui avaient passé les contrôles de qualité nécessaires à ce type d'approche, ont été analysés sur des puces de nylon contenant environ 8 000 gènes. Par analyse supervisée, nous avons identifié une signature multigénique pronostique discriminant les cancers coliques avec métastases *versus* sans évolution métastatique. Le caractère purement descriptif de cette étude pose maintenant le problème du lien avec les mécanismes biologiques sous-jacents. Une première voie de recherche vers la validation fonctionnelle des observations initiales est, par exemple, de réaliser une analyse immunohistochimique des protéines correspondantes sur un échantillon tumoral de taille beaucoup plus importante, technique tout à fait simple de mise en œuvre sur des *tissue microarrays* qui sont des lames sur lesquelles des centaines de micro-prélèvements, issus de matériel fixé et inclus en paraffine, ont été réunis. Dans l'exemple présent, cette approche a été appliquée à la protéine codée par le gène *NM23* qui présentait, au niveau de l'ARN, une expression différentielle significative selon le paramètre « métastase ». Un *tissue microarray* contenant une série de 191 cancers du côlon nous a permis de valider cette corrélation au niveau protéique, avec un immunomarquage très fort dans les tumeurs provenant de patients n'ayant pas rechuté et un marquage très faible ou absent dans les tumeurs des patients ayant développé des métastases à distance. Cette étude a été la première à démontrer l'intérêt potentiel de ces approches à haut débit (puces à ADN et *tissue microarray*) dans la classification pronostique du cancer du colon.

La seconde étude a porté sur un nombre de cancers plus important : 64 cancers ont été sélectionnés sur le fait qu'ils étaient de stade II, donc sans envahissement ganglionnaire [2]. Les patients correspondant avaient été traités par chirurgie seule, sans chimiothérapie adjuvante, comme c'est souvent le cas dans les tumeurs coliques de ce stade. Là encore, une analyse supervisée a été menée sur la survenue ou non d'une rechute dans les trois ans suivant l'exérèse chirurgicale. L'étude s'est déroulée en deux temps successifs : un premier groupe de tumeurs (groupe d'identification) a permis d'iden-





tifier une signature combinant 23 gènes prédictifs de la rechute. L'impact pronostique de cette signature multigénique a été ensuite validé sur un second groupe indépendant de tumeurs (groupe de validation) avec un impact majeur en analyse multivariée face aux facteurs pronostiques histo-cliniques conventionnels.

La troisième étude concerne une série de 30 cancers du rectum localement avancés traités par radiothérapie-chimiothérapie première avant l'exérèse chirurgicale [3]. L'objectif était d'identifier une signature moléculaire associée au degré de réponse histologique au traitement. L'analyse supervisée s'est faite en deux étapes. Dans un premier groupe de tumeurs (groupe d'identification), les auteurs ont identifié une signature de 54 gènes discriminants associée à la réponse, signature validée par une technique de *leave-one-out cross-validation* avec 83 % de classification correcte. La signature a ensuite été validée sur le groupe de validation avec un taux de bonnes classifications de 86 %. Enfin, la dernière étude, publiée très récemment, concerne une série de 75 cancers du côlon, de stades I à III, c'est-à-dire, non métastatiques d'emblée [4]. L'analyse supervisée portait sur la survie globale, visant à identifier une signature prédictive de la survie à trois ans de l'exérèse chirurgicale. Un modèle combinant 43 gènes a été défini qui permettait de classer de façon correcte 90 % des tumeurs. Il a ensuite été validé sur une série indépendante de 95 tumeurs. La critique que l'on peut faire à cette étude est qu'elle ne mentionne pas, en dehors du traitement chirurgical, l'existence et la nature du traitement adjuvant des patients, y compris pour les tumeurs de stade III.

En résumé, que peut-on envisager comme pistes de recherche pour affiner ces premières observations ? Est-ce que nos capacités de classification des tumeurs sur la base de leur évolution pronostique nous permettent d'être suffisamment précis pour envisager une adaptation de la stratégie thérapeutique au moment du diagnostic ?

### Élaboration du projet

L'analyse synthétique de ces quatre études fait ressortir, en première approche, qu'il n'y a pas de gènes communs aux différentes signatures publiées. Plusieurs différences existent entre ces études et peuvent expliquer, au moins en partie, ce manque de concordance : tumeurs, stades et traitements différents entre les séries, technologie de puces à ADN, jeux de gènes analysés et méthodes d'analyses différents, question posée différente. Une autre explication pourrait être le nombre limité de tumeurs analysées ; même si les

observations semblent robustes dans un contexte expérimental particulier, elles ne sont pas forcément généralisables. Les effectifs étaient toujours inférieurs à la centaine, et les critères de sélection n'étaient pas identiques d'une étude à l'autre. La description des patients, et en particulier de leur traitement, était souvent approximative. Toutefois, ces études préliminaires sont encourageantes et incitent à poursuivre l'approche.

Le premier objectif apparaît donc une étape de validation, qui nécessitera l'analyse de séries beaucoup plus importantes de patients, avec des critères de sélection précis et un recueil minutieux des paramètres pris en considération dans l'analyse statistique, au diagnostic et après un minimum de trois ans de surveillance en cas d'évolution favorable. Le second objectif concerne la caractérisation couplée du génome et du transcriptome des tumeurs, peu utilisée à ce jour. Ces approches à haut débit ne peuvent se limiter à l'analyse du transcriptome, et doivent se compléter par une analyse du génome et du protéome des tumeurs. Historiquement, la caractérisation du génome était initialement basée sur le génotypage comparatif tumoral et constitutionnel des patients, qui mettait en évidence des pertes alléliques dans les tumeurs. Les méthodes, d'abord de type *Southern*, nécessitaient de grosses quantités d'ADN et l'utilisation de « sondes » radioactives, qui ne fournissaient individuellement que peu d'informations. Ces méthodes se sont progressivement sophistiquées avec l'apparition du génotypage fluorescent et de l'électrophorèse capillaire après amplification de l'ADN par « PCR », permettant l'étude d'un nombre beaucoup plus important de tumeurs, de locus et une meilleure informativité. D'une efficacité comparable, pour un abord expérimental plus simple, la technique de *CGH-array* a également permis l'analyse de grandes séries de prélèvements. Enfin, l'arrivée des SNP (*single nucleotide polymorphisms*) et des puces de génotypage est en train de révolutionner l'approche expérimentale, en fournissant des informations à un degré de résolution jusqu'alors inenvisageable.

### Hypothèses initiales

Le travail que nous avons réalisé dans le but d'identifier des facteurs génomiques, prédictifs du risque de métastase hépatique, a concerné 3 séries successives de cancers coliques, soit un peu de plus de 400 tumeurs, prélevées chez des patients sélectionnés pour le type tumoral (MSS) et pour la durée de suivi (supérieure à 3 ans) [5]. La première analyse sur 200 tumeurs a mis en évidence un paramètre indépendant du stade histologique prédictif de la survenue de métastase hépatique, spécifique aux tumeurs de stade II. Le résultat a été testé sur une seconde série de 150 tumeurs et validé sur une troisième série de 50 tumeurs, provenant pour ces dernières uniquement de patients métastatiques. Ce paramètre concerne le chromosome 5, l'absence de perte allélique étant associée à un accroissement important du risque de métastase, et le statut allélique du chromosome 5 détectant à lui seul 83 % des tumeurs de stade II évoluant vers un processus métastatique. Ce résultat est actuellement le seul qui ait résisté à une réplification, en conservant de plus un fort degré de signification, puisque le seuil reste inférieur à 1 pour 1 000.



En s'intéressant de près à ce résultat, des hypothèses peuvent être formulées quant à la contribution fonctionnelle du gène *APC* à l'observation suivante : (1) l'inactivation biallélique du gène *APC* ne se fait pas au hasard, la nature du 1<sup>er</sup> événement conditionnant le second ; et (2) la position des mutations somatiques, acquises au cours du processus tumoral entraîne des conséquences variables sur les capacités de liaison et de dégradation d'une autre protéine, la  $\beta$ -caténine, essentielle dans l'adhésion des cellules et dans la régulation de l'expression de gènes, qui contrôlent directement le cycle cellulaire (Figure 1).

L'ensemble de ces informations nous conduit aujourd'hui à proposer un projet double : peut-on préciser le mécanisme responsable du développement des métastases à distance dans les cancers coliques de stade II, et peut-on proposer un marqueur discriminant utilisable en routine ? Peut-on identifier une signature prédictive de l'évolution des cancers coliques de stade III, lorsque les patients ont reçu une chimiothérapie adjuvante classique, à base de 5FU ? Cette signature sera-t-elle à même de fournir des hypothèses sur les mécanismes de chimiorésistance et sur l'existence de cibles thérapeutiques nouvelles ? Pour répondre à ces questions, nous souhaitons travailler en harmonie avec les études menées par d'autres équipes en France, les puissances respectives de ces études pouvant tirer avantage d'une approche concertée.

### Avancement des travaux

Où en est-on de notre collecte de tumeurs dans les différents centres de la région qui traitent les cancers colorectaux ? Nous nous focalisons actuellement sur les cancers coliques de stade II ou III. Nous disposons aujourd'hui de 185 tumeurs congelées et stockées dans des tumorothèques dans des conditions correctes pour l'extraction des acides nucléiques, étape quasiment achevée, à l'issue de laquelle la qualité des acides nucléiques a été validée. Ces tumeurs disposent de toutes les annotations cliniques et histologiques requises pour une étude pronostique. Ces données conformes aux recommandations du programme national « Carte d'Identité des Tumeurs », sont présentes dans des bases de données informatisées régulièrement mises à jour. Tous les patients ont un suivi supérieur à 36 mois, garantissant une analyse fiable en terme de survie.

Les sous-groupes de patients avec évolution métastatique sont d'effectif restreint, et la valeur statistique des observations risque d'en

être pénalisée : par exemple, dans les tumeurs de stade II, nous disposons actuellement d'un sous-groupe sans métastase de 65 cas pour un sous-groupe de patients avec métastase de seulement 15 cas. Nous sommes donc très désireux d'augmenter la série de tumeurs de stade II, et une collaboration plus étroite avec les hôpitaux de Nice est bien sûr très précieuse dans ce contexte.

En l'état actuel de notre collection, nous prévoyons de réserver la caractérisation complète génome-transcriptome aux tumeurs de stade II et de débiter par une caractérisation simple du transcriptome dans les tumeurs de stade III. La caractérisation du génome ne se limitera pas à une approche de type allélotype, mais visera également à une description complète des mutations somatiques affectant les gènes impliqués dans les étapes précoces de la tumorigenèse colique. Cette approche utilisera des puces à SNP (*single nucleotide polymorphisms*) de type Affymetrix, dont la densité reste à définir, en fonction de ses capacités ou non à affranchir le génotypage de son approche comparative avec le génotype constitutionnel correspondant. Une estimation préliminaire permet d'envisager un génotypage des seuls échantillons tumoraux quelle que soit la densité des puces (10K ou 50K). Un autre argument important à considérer est celui du coût de telles études, l'approche SNP se révélant beaucoup plus économique et plus résolutive que l'approche CGH (*comparative genomic hybridization*). L'analyse du transcriptome sera réalisée sur des puces « pan-génome » de la société Affymetrix. Toutes ces analyses seront réalisées sur la plateforme de l'Institut Paoli-Calmettes, actuellement opérationnelle pour les deux approches expérimentales.

L'abord de la deuxième question tire parti d'une série de 105 tumeurs de stade III, sélectionnées pour un traitement chirurgical curatif suivi d'une chimiothérapie adjuvante à base de 5-FU. Les profils d'expression seront également mesurés sur des puces « Pan-génome » hybridées sur la

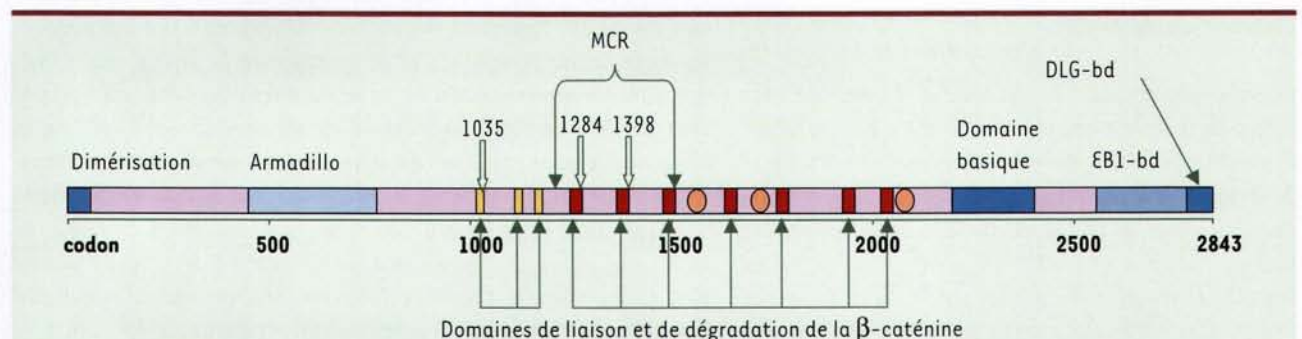


Figure 1. Domaines fonctionnels connus de la protéine APC.





plateforme de l'IPC. Quelques publications récentes mentionnent en outre que le statut du récepteur *EGFR* pourrait influencer la réponse au traitement par les nouvelles molécules anti-*EGFR*. Afin de ne pas négliger cette voie de recherche, l'analyse du transcriptome sera couplée à une analyse immunohistochimique qui s'appuiera sur les *tissue microarrays* déjà disponibles à l'Institut, afin d'identifier d'éventuelles signatures plus spécifiques de ce paramètre. Enfin, pour terminer, nous nous intéresserons à la classification nosologique des cancers coliques, l'analyse morphologique ne permettant pas à elle seule de distinguer de manière sensible et spécifique des sous-classes associées à une évolution particulière. On sait par exemple distinguer sur des arguments cytologiques les adénocarcinomes de type colloïde, dont la composante inflammatoire est importante, mais la connaissance de ces paramètres n'est pas prise en compte dans la décision thérapeutique, bien que des critères de gravité y aient été associés.

## Conclusion

Il est évident que toutes ces questions et portes d'entrée à l'analyse des cancers coliques se recoupent, et que les mécanismes d'évolution ne sont pas variés à l'infini. Les informations fournies par les différentes approches devront donc toujours être testées et validées en fonction de l'ensemble des caractéristiques anatomocliniques des tumeurs. Étant donnée l'évolution rapide des techniques, elles devront être confirmées autant que possible par des méthodes différentes, menées parallèlement sur les mêmes échantillons (allélotypage/*CGH* pour l'analyse du génome, transcriptome/*RT-PCR* pour les analyses du transcriptome, immunohistochimie/*ARNi* pour l'analyse des protéines). L'utilisation de ces approches combinées permet en outre de formuler et tester quasiment simultanément des hypothèses fonctionnelles.

Après ce panorama sur le cancer colique, on peut s'interroger, comme dans le cancer du sein, sur les raisons susceptibles d'expliquer l'absence d'études de grande envergure sur ces types tumoraux jusqu'à aujourd'hui. Ces études, si l'on souhaite qu'elles produisent des résultats, sont soumises à des conditions très strictes : la qualité constante du matériel biologique, le recueil systématique et précis de nombreuses informations cliniques, le respect strict des critères de sélection au regard des questions posées, la disponibilité d'équipements lourds. À cela s'ajoutent le coût très élevé des expériences et la nécessité d'une expertise solide de la part des investigateurs. Il est donc difficile de fédérer des grosses équipes de recherche au plan national, dont l'objectif puisse être de produire des données totalement miscibles. Ce projet a donc débuté sur le

site de l'Institut Paoli-Calmettes avec l'équipement disponible, grâce au concours de plusieurs centres hospitaliers, dont le nombre, nous l'espérons, ira croissant sur la région. Une vingtaine d'investigateurs participent déjà actuellement à sa réalisation. ♦

## SUMMARY

### Genetic factors and colorectal cancers development : therapeutic impact

Colorectal tumorigenesis is associated with the progressive increase of epithelium dysplasia and wall invasion. These criteria are evaluated through histological staging, that enables a reliable estimation of patient prognosis, and is the best tool for therapeutic decision. Adjuvant chemotherapy is systematically proposed in case of lymph nodes and/or distant metastases (stages III and IV respectively). Its benefit in stage II tumors however remains unclear. Independently of the nature of the treatment, one third of all stage II-III tumors will metastasize. One important element to improve our tools for therapeutic decision is the identification of prognostic parameters, independent of the histological and morphological classifications. In a preliminary study, we allelotyped a series of 401 colon tumors and have shown that 5q and 8p allelic status were significantly predictive of the patients evolution. As a first approach, analysis of 47 tumors using microarray expression measures has allowed to validate the strong correlation between RNA levels and genomic status (*i.e.* mutation and allelic status) of known genes (*APC*, *SMAD4*, *TP53*, *MLH1*). We are now planning to characterize a series of 185 stage II-III colon tumors at both genomic and transcriptomic levels, in combination with the clinicopathological findings. Disease-free patients were followed at least 3 years after surgical resection. A tight collaboration of 5 departments of digestive oncology allowed to collect all clinical and biological resources for this project. Depending on our findings, correlations will be made between gene expression levels and somatic mutations of the corresponding genes. Real time *RT-PCR* and immunohistochemical analyses will be performed on selected genes. Finally, biological mechanisms will be investigated to look for new therapeutic targets. ♦

## RÉFÉRENCES

1. Bertucci F, Salas S, Eysteries S, et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 2004 ; 23 : 1377-91.
2. Wang Y, Jatko T, Zhang Y, et al. Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol* 2004 ; 22 : 1564-71.
3. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 1826-38.
4. Eschrich S, Yang I, Bloom G, et al. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 3526-35.
5. Zeitoun G, Buecher B, Bayer J, et al. Retention of chromosome arm 5q in stage II colon cancers identifies 83 % of liver metastasis occurrences. *Gene Chromosome Cancer* 2005 (sous presse).

## TIRÉS À PART

S. Olschwang