

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE II

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille

Responsable : Pr Bernard SABLONNIERE

**En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE II**

**Soutenue le 24 Novembre 2015 par
M. Thibault DESURMONT**

**Etude de l'implication des chimiokines et de leurs récepteurs
dans la survenue d'une rechute métastatique chez des patients
atteints d'un cancer du côlon métastatique et traités par
chirurgie hépatique avec ou sans chimiothérapie néoadjuvante**

Thèse dirigée par le Docteur Stéphanie Truant

Devant le jury composé de :

Président :

- Docteur Isabelle Van Seuningen

Rapporteurs :

- Professeur Pierre Balladur

- Professeur Jean-Pierre Richer

Directeur de Thèse :

- Docteur Stéphanie Truant

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité **INSERM UMR-S 1172** (Centre de Recherche Jean Pierre Aubert) dirigée par Monsieur le Docteur Luc Buée, dans l'équipe « Mucines, différenciation et cancérogenèse épithéliales » dirigée par Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen.

Ce travail a été réalisé sous la direction scientifique de Madame le Docteur Stéphanie Truant et de Madame le Docteur Guillemette Huet.

Je remercie pour l'honneur qu'ils me font :

Madame le **Docteur Isabelle Van Seuningen,**

en acceptant de présider ce jury.

Monsieur le **Professeur Pierre Balladur,**
Monsieur le **Professeur Jean-Pierre Richer,**

en acceptant d'être les rapporteurs de cette Thèse.

Madame le **Docteur Guillemette Huet**
Madame le **Docteur Stéphanie Truant,** ma Directrice de Thèse,

en acceptant de juger ce travail.

*Cela fait presque cinq années que ce travail de Thèse a débuté. Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide d'un grand nombre de personnes. Ces journées passées au laboratoire ont permis des rencontres particulièrement enrichissantes tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Les contacts avec chacun des membres de l'équipe ont été sources d'enrichissements et de plaisir. Aussi je tiens à remercier très chaleureusement tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à notre collaboration et à ce travail, avec une attention toute particulière pour **Monsieur le Professeur François-René Pruvot** qui, le premier, lors de mon retour dans le Nord, a su me faire confiance et m'introduire au sein de cette Equipe de Recherche.*

Je tiens à remercier très sincèrement,

Madame le Docteur Guillemette Huet, pour son implication, sa patience et ses grandes qualités scientifiques qui ont rendu possible l'élaboration puis la conduite de ce travail. Guillemette, ce travail est très certainement le vôtre.

Madame le Docteur Stéphanie Truant pour son implication dans ce projet, sa grande rigueur scientifique et ses conseils toujours très constructifs et particulièrement avisés.

Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen pour son accueil toujours bienveillant et avisé au sein de « l'équipe 5 ».

Monsieur le Docteur Luc Buée pour son accueil au sein de l'unité INSERM UMR-S 1172.

Madame le Professeur Emmanuel Leteurre et Monsieur le Professeur Pierre Gosset pour leur aide et leur patience dans l'élaboration des modèles d'Immunohistochimie ainsi que pour leurs conseils dans l'analyse de nos données d'Anatomo-Pathologie.

Monsieur Le Professeur Alain Duhamel, pour son aide précieuse dans l'élaboration et la finalisation de la partie Biostatistique de ce travail.

Monsieur Patrick Dumont, pour l'élaboration et le suivi de nos modèles murins. Patrick, la pertinence de votre travail et votre grande expérience professionnelle ont rendu possible nos expérimentations sur modèles murins.

Monsieur le Docteur Nicolas Jonckheere pour sa présence toujours amicale, son soutien et ses conseils techniques toujours précieux et efficaces. Nicolas, nos longues discussions dans les couloirs du laboratoire, sur des sujets parfois très éloignés de nos projets de recherche, ont été sources d'enrichissements. Soit assuré de mon amitié.

Madame Belinda Duchêne, sans qui grand nombre de nos manipulations n'auraient pu aboutir. Belinda, tes qualités professionnelles sont certainement aussi précieuses au laboratoire que ta grande gentillesse.

Madame Nassima Ramdane, dont la patience et la maîtrise de l'outil statistique ont permis les nombreuses analyses de résultats de ce travail.

Je tiens également à remercier *Fatima Ladhaoui, Anne-Frédérique Dessein, Nicolas Skrypek, Matthieu Corvaisier, Romain Vasseur* et tous les « Thésards » rencontrés au décours de ces années et des couloirs du laboratoire avec qui nous avons partagé certains découragements mais surtout des moments d'entraide et de réussite. J'ai eu grand plaisir à travailler en votre compagnie.

Je remercie enfin **tous les membres de l'Unité** qui m'ont accueilli, ainsi que **les membres de l'équipe administrative**. Je ne peux vous citer tous mais sachez que ce travail est également le vôtre.

A Axelle, Malo et Titouan.

Que ce travail soit pour eux la preuve qu'il ne faut jamais rien lâcher.

A Sophie,
mon épouse,
sans qui mon projet n'aurait certainement pas abouti.

Résumé

Notre objectif était d'analyser l'implication potentielle des voies associées aux récepteurs de chimiokines CXCR2 et CXCR4 dans le cancer colorectal métastatique au foie. Les niveaux d'expression de CXCR2, CXCR4 et de leurs chimiokines étaient évalués dans les métastases hépatiques de cancers colorectaux dans le but d'étudier leurs corrélations avec la survie globale et la survie sans récurrence de patients ayant reçu, ou non, une chimiothérapie néoadjuvante.

Des analyses d'expression pour RT-PCR quantitative et immunohistochimie étaient réalisées en utilisant des prélèvements humains de métastases hépatiques de cancers colorectaux. Les niveaux d'expression de CXCR2, CXCR4 et de leurs ligands étaient statistiquement analysés en fonction des traitements par chimiothérapie néoadjuvante administrés ou non, et en fonction du suivi des patients. Des modèles murins de xénogreffes sous-cutanées et orthotopiques intracaecales ont été mis au point et utilisés pour étudier l'expression de CXCR2, CXCR4 et CXCL7 en relation avec le traitement des souris par chimiothérapie.

Nous avons montré que la surexpression de CXCR2 et CXCL7 était corrélée à de plus courtes survies globales et sans récurrence de nos patients. En analyse multivariée, l'expression de CXCR2 et de CXCL7 étaient des facteurs indépendants de survie globale et sans récurrence. La chimiothérapie néoadjuvante augmentait significativement l'expression de CXCR2, et de CXCL7 de façon proche de la significativité. Les résultats de nos modèles murins ont montré une tendance à la surexpression de nos gènes d'intérêts dans les tissus tumoraux des souris traités.

En conclusion, ces résultats suggèrent l'implication de la voie de signalisation CXCL7/CXCR2 comme facteur prédictif de mauvais pronostic dans le cancer colorectal métastatique. Les chimiothérapies à base de 5 Fluoro-uracile augmentent l'expression de ces gènes dans les métastases hépatiques, fournissant une explication sur l'agressivité des tumeurs métastatiques en échappement thérapeutique. Un blocage sélectif de l'axe CXCR2/CXCL7 pourrait fournir de nouvelles opportunités thérapeutiques.

Summary

Our aim was to analyze the potential role of chemokine receptors CXCR2 and CXCR4 signalling pathways in liver metastatic colorectal cancer (CRC) relapse. Expression levels of CXCR2, CXCR4, and their chemokine ligands were evaluated in liver metastases of colorectal cancer in order to study their correlation with overall and disease-free survival of patients having received, or not received, a neoadjuvant chemotherapy regimen.

Quantitative RT-PCR and CXCR2 immunohistochemical staining were carried out using human CRC liver metastasis samples. Expression levels of CXCR2, CXCR4, and their ligands were statistically analyzed according to treatment with neoadjuvant chemotherapy and patients' outcome. Murine models of subcutaneous and orthotopic intracaecal xenografts have been developed and used to study the expression of CXCR2, CXCR4 and CXCL7 in connection with the treatment of mice with chemotherapy.

We showed that CXCR2 and CXCL7 overexpression are correlated to patient's shorter overall and disease-free survival. By multivariate analysis, CXCR2 and CXCL7 expressions are independent factors of overall and disease-free survival. Neoadjuvant chemotherapy increases significantly the expression of CXCR2 and CXCL7 was overexpressed close to significance. Results of our mouse models have shown a trend over-expression of our interest genes in tumor tissues of the treated mice.

In conclusion, we show the involvement of CXCL7/CXCR2 signalling pathways as a predictive factor of poor outcome in metastatic CRC. 5-Fluorouracil-based chemotherapy regimens increase the expression of these genes in liver metastasis, providing one explanation for aggressiveness of relapsed drug-resistant tumors. Selective blockage of CXCR2/CXCL7 signalling pathways could provide new potential therapeutic opportunities.

Table des matières

Liste des Figures.....	page 6
Liste des tableaux.....	page 8
Liste des Abréviations.....	page 9
Introduction Générale.....	page 12
I Situation du problème.....	page 13
A/ Généralités épidémiologiques sur le cancer colo-rectal.....	page 13
B/ Classifications tumorales.....	page 13
C/ La chirurgie des lésions primitives colorectales.....	page 16
D/ Evaluation radiologique.....	page 17
E/ Critères de résecabilité des métastases hépatiques.....	page 18
F/ indications chirurgicales.....	page 20
1/ Métastases hépatiques résécables	
2/ Métastases hépatiques résécables associées à d'autres localisation secondaires curables	
3/ Métastases hépatiques associées à d'autres localisation secondaires non curables	
G/ Chimiothérapie dans le cancer colo-rectal métastatique.....	page 22
II Le développement métastatique.....	page 24
A/ La dissémination métastatique.....	page 24
B/ La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).....	page 25
C/ La migration cellulaire.....	page 27
D/ L'intravasation puis l'extravasation des cellules tumorales.....	page 29
E/ L'angiogenèse tumorale.....	page 30
F/ Le développement métastatique.....	page 32
G/ Les modifications du microenvironnement.....	page 33
III Chimioquinas et récepteurs de chimiokines.....	page 35
A/ Présentation.....	page 35
B/ Classification des chimiokines.....	page 36
C/ Les récepteurs de chimiokines.....	page 39
D/ Chimiokines et cancer.....	page 42
E/ Chimiokines et adénocarcinome colorectal.....	page 44
IV Le récepteur CXCR2 et ses ligands CXCL7 et CXCL8.....	page 47
A/ CXCR2.....	page 47
B/ CXCL8.....	page 48
C/ CXCL7.....	page 50
Rationnel du travail	page 51
Matériels et Méthodes.....	page 54
A/ Patients.....	page 55

B/ Modèle murin de xéno greffes tumorales sous-cutanées.....	page 56
1/ Lignée cellulaire	
2/ Les souris	
3/ L'inoculation	
4/ Traitement	
C/ Modèle murin de xéno greffes tumorales intracaecales orthotopiques.....	page 58
D/ Biologie moléculaire.....	page 59
1/ Protocole d'extraction des ARN totaux	
2/ Rétro-transcription des ARNm	
3/ Polymerase Chain Reaction (PCR)	
E/ Immunohistochimie.....	page 67
1/ Protocole d'immunohistochimie (IHC) sur métastases hépatiques	
2/ Protocole d'immunohistochimie (IHC) à partir du modèle murin	
F/ Analyse statistique.....	page 69
Résultats.....	page 71
Partie I : Patients.....	page 72
Objectifs de l'étude.....	page 72
A/ Analyse de population.....	page 72
B/ Expression des chimiokines et récepteurs de chimiokines : étude de corrélation avec la survie globale et survie sans récurrence sur la population totale.....	page 75
a/ CXCR2	
b/ CXCL8	
c/ CXCL7	
d/ CXCR4	
e/ Expression des chimiokines et récepteurs de chimiokines : étude de corrélation avec la survie globale et la survie sans récurrence sur deux groupes de patients traités ou non par chimiothérapie néoadjuvante	
C/ Etude de la valeur pronostique de CXCR2 et CXCL7 sur la survie globale et la survie sans récurrence en analyse multivariée.....	page 82
a/ Analyse multivariée de la survie globale et sans récurrence	
b/ CXCR2 et CXCL7	
D/ Comparaison de l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs entre les patients ayant reçu ou non une chimiothérapie néoadjuvante.....	page 84
a/ Expression de gènes d'intérêts selon administration de chimiothérapie néoadjuvante	
b/ Expression des gènes d'intérêts selon administration de chimiothérapie néoadjuvante associée à du bevacizumab	
c/ Etude de l'influence du bevacizumab sur l'expression des gènes d'intérêts	
E/ Analyse immunohistochimique.....	page 92
a/ Scores semiquantitatifs de fixations :	
a1/ CXCR2	
a2/ CXCL7	

Partie II : Modèle murin.....	page 96
A/ Modèle murin de xéno greffes sous cutanées.....	page 96
a/ Analyse anatomopathologique conventionnelle	
b/ Expression de gènes en qRT-PCR	
B/ Modèle murin de xéno greffes ortotopiques intracaecales.....	page 101
a/ Analyse anatomopathologique	
b/ Expression de gènes en qRT-PCR	
c/ Immunohistochimie	
c1/ Expression de cxcr2	
c2 : Expression de cxcl7	
Discussion	page 108
Références bibliographiques.....	page 118
Article de Thèse	
Article de fin de post-Internat	
Article de Master 2 Recherche	
Annexes	

Liste des Figures

Figure 1: Les étapes de la cascade métastatique. **Page 25**

Figure 2: Réseau des voies de signalisation et des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la TEM au sein des cellules carcinomateuses. **Page 27**

Figure 3: Les différents modes de migration cellulaire. **Page 29**

Figure 4: Les étapes métastatiques et la niche prémétastatique. **Page 33**

Figure 5: Représentation schématique des quatre familles de chimiokines. **Page 37**

Figure 6: Les familles de chimiokines et de récepteurs de chimiokines. **Page 40**

Figure 7: Schématisation des voies de signalisations activées par les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CXCR7 et leurs liens avec la survie cellulaire, la prolifération et la migration. **Page 42**

Figure 8: Présentation schématique du fonctionnement des gradients de chimiokines favorisant la migration aberrante de cellules dans un modèle d'épithélium intestinal. **Page 46**

Figure 9: Voies de signalisation intracellulaire activées par l'intermédiaire de CXCR2. **Page 48**

Figure 10: Survie globale et sans-récidive des patients, après hépatectomies à visée curative pour métastases hépatiques de cancer colorectaux. **Page 74**

Figure 11: Survie globale et sans récurrence des patients, après hépatectomies à visée curative pour métastases hépatiques selon administration ou non de chimiothérapie néoadjuvante. **Page 75**

Figure 12: Survie Globale et sans récurrence après hépatectomie selon le niveau d'expression de CXCR2. **Page 77**

Figure 13: Survie Globale et sans récurrence après hépatectomie selon le niveau d'expression de CXCL8. **Page 78**

Figure 14: Survie Globale et sans récurrence après hépatectomie selon le niveau d'expression de CXCL7. **Page 79**

Figure 15: Survie Globale et sans récurrence après hépatectomie selon le niveau d'expression de CXCR4. **Page 80**

Figure 16: Survie sans récurrence après hépatectomie selon le niveau d'expression de CXCR2 et de son ligand CXCL7 en fonction de l'administration ou non d'une chimiothérapie néoadjuvante. **Page 81**

- Figure 17:** Comparaisons entre niveaux d'expression de chimiokines et chimiokines récepteurs (CXCR2, CXCL8 et CXCL7) au sein de métastases hépatiques de patients, traités ou non traités par chimiothérapie néoadjuvante avant hépatectomie. **Page 86**
- Figure 18:** Comparaisons entre niveaux d'expression de chimiokines et chimiokines récepteurs (CXCR2 et CXCL7) au sein de métastases hépatiques de patients, traités ou non traités par chimiothérapie néoadjuvante associé au bevacizumab avant hépatectomie. **Page 89**
- Figure 19:** Comparaison d'expression de CXCR2 et CXCL7 selon adjonction de bevacizumab au protocole de chimiothérapie néoadjuvante. **Page 91**
- Figure 20:** Comparaison d'expression de CXCR4 et CXCL8 selon adjonction de bevacizumab au protocole de chimiothérapie néoadjuvante. **Page 91**
- Figure 21:** Témoin positif. IHC sur coupe de colon normal humain. Marquage de CXCR2. **Page 92**
- Figure 22:** Immunomarquage de CXCR2 sur coupes histologiques de métastases hépatiques d'adénocarcinome colorectal. **Page 94**
- Figure 23:** Immunomarquage de CXCL7 sur coupes histologiques de métastases hépatiques d'adénocarcinome colorectal. **Page 95**
- Figure 24:** A : Courbes de croissance des tumeurs sous cutanées obtenus après xéno greffe sous cutané d'un inoculum de cellules HT29 chez des souris SCID, durant la phase d'administration de la chimiothérapie. B : volumes tumoraux médians de chaque groupe exprimés en mm³. **Page 97**
- Figure 25:** Expression de cxcr2, cxcr4 et cxcl7 en qRT-PCR, au sein des prélèvements de tissus tumoraux issus de xéno greffes sous-cutanées sur souris SCID après inoculation de cellules HT29. **Page 98**
- Figure 26:** Expression de cxcr2 et CXCR2 au sein des prélèvements de tissus tumoraux issus de xéno greffes sous-cutanées sur souris SCID, après inoculation de cellules HT29. **Page 99**
- Figure 27:** Expression de CXCR2, CXCR4 et CXCL7 en qRT-PCR, au sein des prélèvements de tissus tumoraux issus de xéno greffes sous-cutanées sur souris SCID après inoculation de cellules HT29. **Page 100**
- Figure 28:** Coupes histologiques en coloration standard à l'hématoxyline éosine safran (HES), de xéno greffes orthotopiques intracaecales issues de cellules tumorales humaines HT29. **Page 102**
- Figure 29:** Immunomarquage de cxcr2 sur coupes histologiques de xéno greffes orthotopiques intracaecales de cellules HT29 sur souris SCID. **Page 105**
- Figure 30:** Immunomarquage de cxcl7 (flèches) sur coupes histologiques de xéno greffes orthotopiques intracaecales de cellules HT29 sur souris SCID. **Page 107**

Liste des tableaux

- Tableau 1** : Classification TNM –UICC 2009 des cancers coliques et rectaux. **Page 14**
- Tableau 2**: Métastases hépatiques de CCR : Niveaux de difficulté de résécabilité et critères carcinologiques pronostiques péjoratifs. **Page 20**
- Tableau 3**: Nomenclature des chimiokines et fonctions immunorégulatrices. **Page 38**
- Tableau 4**: Nomenclature des récepteurs de chimiokines et fonctions immunorégulatrices. **Page 41**
- Tableau 5**: Données clinicopathologiques et histologiques des prélèvements hépatiques métastatiques provenant des hépatectomies (n=58). **Page 56**
- Tableau 6**: Séquences des amorces utilisées pour la qRT-PCR sur métastases hépatiques humaines d'adénocarcinomes colorectaux. (h : humain). **Page 65**
- Tableau 7**: Séquences des amorces utilisées pour la qRT-PCR sur prélèvements murins (souris SCID) de tumeurs sous-cutanées et caecales développées à partir de xéno greffes de cultures de cellules HT-29 d'adénocarcinome colique d'origine humaine. (m : murin). **Page 66**
- Tableau 8**: Données clinicopathologiques des patients présentant des métastases hépatiques d'adénocarcinome colorectal après chirurgie colique ou rectale. **Page 73**
- Tableau 9**: Analyse multivariée de la survie globale et sans récurrence. **Page 83**
- Tableau 10**: Médiane (minimum et maximum) de niveaux d'expression de CXCR2, CXCR4, CXCL7 et CXCL8 selon l'administration ou non d'une chimiothérapie néoadjuvante. **Page 85**
- Tableau 11**: Médiane (minimum et maximum) de niveaux d'expression de CXCR2, CXCR4, CXCL7 et CXCL8 selon l'administration ou non d'une chimiothérapie néoadjuvante associée à du bevacizumab. **Page 88**
- Tableau 12**: Niveau d'expression (médiane, minimum et maximum) de CXCR2 et CXCL7 selon adjonction de bevacizumab au protocole de chimiothérapie néoadjuvante. **Page 90**
- Tableau 13**: Expression de cxcr2 en immunohistochimie, sur tissus tumoraux de xéno greffes intracaecales de cultures de cellules HT29 sur souris SCID. **Page 104**
- Tableau 14**: Expression de cxcl7 en immunohistochimie, sur tissus tumoraux de xéno greffes intracaecales de cultures de cellules HT29, sur souris SCID. **Page 106**

Liste des Abréviations

CCR :	Cancer colo-rectal
CTAP-III:	Connective-tissue activating peptide-III
CXCL1:	GRO- α
CXCL2:	GRO- β
CXCL3:	GRO- γ
CXCL4:	Platelet factor-4
CXCL5:	Epithelial cell-derived neutrophil activating peptide-78
CXCL6 :	Granulocyte chemotactic protein-2
CXCL8 :	Interleukin-8
CXCL7:	Neutrophil-activating peptid 2
CXCL12:	SDF-1/ Stromal-Cell Derived Factor-1
DAB:	3, 3 –diaminobenzidine
DPBS:	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EGFR :	Epidermal growth factor receptor
EPCs:	Endothelial progenitor cells
ERK:	Extracellular signal-regulated kinase
GAGs:	Glycoaminoglycanes
GAPDH :	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GTP:	Guanosine triphosphate
HBPM :	Héparines de bas poids moléculaire
HES:	Hématoxyline éosine safran
HPCs:	Hematopoietic progenitor cells
HPRT1:	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
MHC :	Métastase hépatique de cancer colo-rectal
ICAM:	Inter cellular adhesion molecule
IHC:	Immunohistochimie
IL:	Interleukine
IRM :	Imagerie par résonance magnétique
MAPK:	Mitogen-activated protein kinases
MBD:	Membrane Desalting Buffer
MMP :	Métalloprotéases matricielles

NAP-2 :	Neutrophil-activating protein-2
NFKB:	Nuclear factor-kappa B
NK:	Natural Killer
PBP:	Platelet basic protein
PDGF:	Platelet-derived growth factor
PI3kinase:	Phosphoinositide 3-kinase
PLC/IP3:	Phospholipase C/ Inositol trisphosphate
RAS :	Retrovirus associated sequences
RCP :	Réunion de concertation pluridisciplinaire
RTK:	Récepteurs tyrosine kinase
SDF-1:	Stromal cell-derived factor-1
SVF:	Sérum de veau foetal
TDM :	Tomodensitométrie
TEM :	Transition épithélio-mésenchymateuse
TEP :	Tomographie par émission de positrons
TGFβ :	Transforming Growth Factor-Beta
TME :	Total mesorectal excision
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
5-FU:	5 fluoro-uracile
β-TG:	β-tromboglobuline

Introduction Générale

I Situation du problème

Ce travail s'attache à étudier les localisations secondaires (métastases) hépatiques des adénocarcinomes du colon ou du rectum. Les autres formes de cancers primitifs du colon ou du rectum (lymphome, tumeurs endocrines digestives...) ne seront pas traitées.

A/ Généralités épidémiologiques sur le cancer colo-rectal :

Le cancer colique et rectal (CCR) en France est fréquent avec environ 33000 nouveaux cas par an. C'est un vrai problème de santé publique puisque la survie globale à 5 ans est de 63%, tous stades confondus, dans les pays occidentaux (1). La survie globale à 5 ans chute à 15% pour les patients atteints d'un cancer colo-rectal de stade IV. Cette maladie est la seconde cause de décès par cancer avec plus d'un demi-million de décès par an à travers le monde (2).

Les métastases hépatiques sont la forme la plus commune de dissémination secondaire et surviennent chez près de 50% des patients métastatiques. Le développement de métastases (principalement hépatiques, mais bien souvent aussi pulmonaires ou péritonéales) est fréquent puisque environ 30% des patients suivis pour CCR présenteront des métastases hépatiques dans les 5 ans qui suivent le diagnostic (3). Les données publiées récemment montrent que les patients, après hépatectomie pour métastases de cancer colo-rectal ont un taux de survie à 5 ans de seulement 36 à 58% (4).

B/ Classifications tumorales :

La prise de décision thérapeutique, hors urgence médico-chirurgicale, repose sur une évaluation précise du niveau d'infiltration tumorale au sein de la paroi du tube digestif et éventuellement des organes adjacents, de l'établissement d'un staging ganglionnaire tumoral et la recherche de métastases à distance. L'ensemble des dossiers de patients atteints d'adénocarcinome du colon ou du rectum sont discutés en réunion de concertation pluridisciplinaire de Cancérologie Digestive (RCP) afin de proposer une attitude

thérapeutique qui tienne compte de l'état général du patient et des référentiels validés de la spécialité. Ces RCP regroupent toutes les spécialités concernées par la pathologie : Gastro-entérologues, Radiothérapeutes, Oncologues, Chirurgiens Digestifs, Radiologues, Anatomopathologistes.

La classification tumorale la plus utilisée est la classification TNM (**Tableau 1**), recommandée par l'Union for International Cancer Control (UICC) et l'American Joint Committee on Cancer (AJCC). La classification TNM se base sur une analyse précise de la lésion tumorale primitive afin de déterminer le niveau d'infiltration tumorale de la paroi du tube digestif (Stade T) ainsi que le degré d'invasion ganglionnaire régional (Stade N). Dans certains cas (adénocarcinome du bas et du moyen rectum) les stades T et N peuvent être estimés en préopératoire à partir d'explorations d'imagerie ou d'endoscopie. Idéalement la détermination des stades T et N est réalisée à partir de l'analyse anatomo-pathologique de la pièce opératoire. L'examen d'au moins douze ganglions régionaux est recommandé. Quel que soit le stade, le pronostic est d'autant meilleur que le nombre de ganglions prélevés et analysés est élevé. L'évaluation métastatique (stade M) est le plus souvent réalisée à partir d'un bilan d'imagerie, plus rarement sur analyse anatomopathologique de fragments biopsiques ou sur pièce opératoire de résection.

Tableau 1 : Classification TNM –UICC 2009 des cancers coliques et rectaux.

(D'après **Thésaurus National de Cancérologie Digestive (Cancer Colique – Mis à jour en 2011 ; Cancer Rectal – Mis à jour en 2013)**)

T- Tumeur primitive

Tis : intra-épithéliale ou intramuqueuse

T1 : sous-muqueuse

T2 : musculieuse

T3 : sous-séreuse

T4a : pénétration du péritoine viscéral

T4b : envahissement d'un organe de voisinage*.

N- Adénopathies régionales

N0 : Absence de métastase ganglionnaire

N1a : 1 ganglion envahi

N1b : 2-3 ganglions envahis

N1c : dépôts tumoraux « satellites » dans la sous-séreuse, ou dans le tissu péri-colique ou péri-rectal non péritonisé, dans le cadre d'une absence de ganglions lymphatiques métastatiques**

N2a : 4-6 ganglions envahis

N2b : > 7 ganglions envahis

M- Métastases

M0 : Absence de métastase

M1a : métastases à distance confinées à un organe

M1b : métastases atteignant plus d'un site métastatique ou atteinte du péritoine

* T4b Une tumeur adhérente macroscopiquement à d'autres organes ou structures est classée CT4b. Cependant, si aucune tumeur n'est présente microscopiquement au niveau de l'adhésion, la classification histopathologique sera pT1 à pT3 selon la profondeur de l'infiltration.

** Les dépôts tumoraux « satellites » correspondent à des nodules macro ou microscopiques dans le tissu adipeux péri-colique ou péri-rectal, à distance du front d'invasion tumoral, sans argument histologique de structure ganglionnaire résiduelle, mais dans le territoire de drainage lymphatique de la tumeur primitive. Ces dépôts peuvent correspondre à une extension discontinue de la tumeur, à une extension extravasculaire d'une invasion veineuse ou à un ganglion lymphatique totalement remanié et non identifiable. Si ces lésions sont observées avec des tumeurs qui seraient classées T1 ou T2, la classification T reste inchangée et les dépôts, ou nodules, sont classés N1c (il s'agit au total d'une population T1, T2, sans ganglion lymphatique positif, mais avec des dépôts tumoraux classés N1c). Au cas où un nodule est considéré comme un ganglion lymphatique totalement remanié par le pathologiste (avec généralement un contour régulier), il est classé comme un ganglion lymphatique envahi et non pas comme un nodule satellite. Il doit de ce fait être compté séparément avec la terminologie pN.

C/ La chirurgie des lésions primitives colorectales :

Très succinctement, la résection de la tumeur primitive comprend l'exérèse du segment digestif siège de la tumeur primitive avec une marge de sécurité proximal et distal supérieure à 5 cm. Pour des raisons de contrôles vasculaires l'exérèse sera élargie à une colectomie droite vraie pour les tumeurs caecales et du colon ascendant, une colectomie droite et transverse pour les tumeurs du colon transverse droit ou médian, une colectomie transverse pour les tumeurs du colon transverse médian ou gauche, une colectomie gauche avec anastomose colo-rectale pour les tumeurs du colon descendant et une résection rectosigmoïdienne pour les tumeurs du colon sigmoïde ou de la jonction rectosigmoïdienne.

L'objectif carcinologique est au contrôle, et à la ligature à l'origine, du pédicule vasculaire irrigant le segment colique tumoral (5). Cet objectif carcinologique impose l'exérèse du mésocolon ou du mésorectum siège éventuel d'adénopathies métastatiques, d'embolies vasculaires tumoraux ou d'engainements tumoraux périnerveux. Le taux de récurrence local serait diminué par un contrôle et l'exérèse complète sans effraction du mésocolon (6). En ce qui concerne les tumeurs du rectum, une exérèse complète et sans effraction du mésorectum est nécessaire afin d'optimiser le risque de récurrence locale.

L'objectif chirurgical oscille techniquement entre contrôle carcinologique de la maladie, obtention d'un staging tumoral de qualité et obtention de segments digestif distaux et proximaux bien vascularisés offrant toutes les chances d'une anastomose digestive étanche et fonctionnelle.

En ce qui concerne la chirurgie du rectum, les tumeurs situées au-dessus du cul de sac de Douglas (haut-rectum) sont à traiter comme les lésions coliques. Les tumeurs sous-Douglassiennes seront éventuellement traitées par radiochimiothérapie néoadjuvante (tumeurs N+ et/ou T3 ou T4 sur le bilan d'imagerie pré-opératoire) afin d'obtenir un contrôle local, un éventuel downstaging tumoral préopératoire et de diminuer le risque de récurrence tumorale locale (7).

Quel que soit la voie d'abord utilisée et le type de résection réalisée (coloproctectomie avec conservation de l'appareil sphinctérien ou avec résection intersphinctérienne pour les tumeurs du très bas rectum, amputation abdomino-périnéale en cas d'envahissement net de

l'appareil sphinctérien), une exérèse complète du mésorectum (TME) sera réalisée par dissection au contact et respect du fascia recti (8). Pour les tumeurs basses une marge d'exérèse distale de sécurité d'au moins 2 cm sur la musculature rectale est à respecter (sur pièce fraîche), pouvant dans certains cas être amenée à 1 cm (9). Une ligature vasculaire à 1,5 cm de l'origine de l'artère mésentérique inférieure sera carcinologiquement suffisante.

D/ Evaluation radiologique :

Le diagnostic, le plus souvent endoscopique et confirmé par analyse anatomopathologique de biopsies tumorales, d'une tumeur colorectale doit amener à un bilan d'extension locorégionale et à distance. Idéalement il sera réalisé un scanner thoraco-abdomino-pelvien. Cet examen permettra la recherche de métastases péritonéales, hépatiques, médiastinales ou broncho-pulmonaires. Au moindre doute un complément de bilan sera réalisé par IRM hépatique, scintigraphie osseuse ou scanner par émission de positons (TEP scanner) (10).

C'est ce bilan d'imagerie qui permettra d'étayer la discussion quant au meilleur choix thérapeutique pour le patient. Et notamment permettra de choisir, pour un patient métastatique, la meilleure séquence associant chirurgie et chimiothérapie systémique plus ou moins associées à des thérapies-ciblées antiangiogéniques, anti-EGFR ou de la radiothérapie.

Evaluation radiologique des métastases hépatiques :

L'évaluation radiologique des métastases hépatique nécessite l'expertise d'un radiologue spécialisé en pathologie hépatique.

Une TDM hépatique avec injection de produit de contraste sera nécessaire. Une IRM avec injection de gadolinium complétera le bilan. En cas de doute une échographie-doppler avec injection de produit de contraste sera réalisée. Une imagerie fonctionnelle par TEP scanner pourra compléter le bilan, notamment pour l'identification de site(s) métastatique(s) abdominaux extra-hépatiques (11) . En cas de doute diagnostique une lésion hépatique suspecte

pourra être biopsiée sous échographie ou scanner avec contrôle histologique(12). L'objectif est une localisation précise des métastases, l'analyse de leur taille et de leurs rapports anatomiques (13).

En cas d'indication de résection hépatique, une volumétrie hépatique pourra être réalisée afin de guider l'hépatectomie et de laisser en place un volume de foie fonctionnel restant suffisant (14). Ce volume de foie fonctionnel restant devra être de 25 à 40% du volume hépatique initial en fonction d'une éventuelle hépatopathie sous-jacente ou de l'administration d'une chimiothérapie néoadjuvante (15). Le bilan d'imagerie recherchera une hépatopathie sous-jacente pouvant modifier ou contre-indiquer une indication chirurgicale.

E/ Critères de résécabilité des métastases hépatiques :

L'exérèse des métastases hépatiques de cancer colorectal ne doit s'envisager que de façon complète. La résection partielle est sans intérêt thérapeutique (16).

Cependant, une résection partielle peut parfois s'inscrire dans une stratégie chirurgicale qui envisage une hépatectomie en deux temps.

Une métastase est définie comme résécable si une hépatectomie enlevant en totalité le tissu tumoral (résection R0) avec un risque opératoire acceptable est possible.

L'évaluation de la résécabilité comporte:

- Une évaluation préopératoire optimale avec détection de toutes les masses tumorales intra et extra-hépatique ainsi que leurs rapports vasculaires.
- Une évaluation peropératoire aussi complète que possible avec exploration visuelle et palpatoire systématique du foie et de la cavité abdominale. Une échographie peropératoire est indispensable pour l'évaluation finale de la résécabilité.

L'exploration coelioscopique avec écho-laparoscopie peut être proposée dans le bilan de résécabilité notamment en cas de forte suspicion préopératoire d'irrésécabilité (évaluation du futur foie restant, recherche de carcinose), évitant ainsi des laparotomies inutiles.

Une ou des métastases sont techniquement résécables si l'hépatectomie laisse un parenchyme restant intact avec sa propre vascularisation et son drainage biliaire, si le

parenchyme fonctionnel restant est suffisant et si les risques de mortalité et de morbidité opératoire prévisionnelle sont minimaux.

L'évaluation des caractéristiques anatomiques des métastases déterminera la faisabilité de la résection. En cas de tumeur unique ou de tumeurs multiples unilobaires, les contre-indications d'ordre technique sont exceptionnelles. En cas de tumeurs multiples bilatérales, le nombre et la localisation des métastases peuvent être un facteur de non résécabilité.

Les rapports vasculaires des différentes tumeurs sont souvent le facteur limitant : atteinte des deux pédicules portaux droit et gauche, envahissement d'un pédicule portal par une métastase et de la ou des veines sus-hépatiques contro-latérales par une autre lésion, enfin atteinte même partielle des trois veines sus-hépatiques.

L'évaluation d'opérabilité doit comporter une évaluation des risques opératoires pour le patient, tant par l'équipe chirurgicale que par l'équipe d'anesthésie, en fonction de ses antécédents et des thérapeutiques administrées en néoadjuvant. L'âge physiologique doit être pris en compte ainsi que les éventuels clampages hépatiques et leurs durées.

L'insuffisance hépato-cellulaire postopératoire et le risque d'hémorragie per-opératoire doit être appréhendé par le choix et la maîtrise de la technique opératoire. Les réhépatectomies seront abordées selon les mêmes modalités.

Cette évaluation technique permet de définir 2 niveaux de résécabilité (**Tableau 2**):

-RESECABILITE DE CLASSE I : Résécabilité évidente par une hépatectomie classique (hépatectomie conventionnelle de 4 segments ou moins, laissant plus de 40% de parenchyme résiduel).

-RESECABILITE DE CLASSE II : Résécabilité possible par une hépatectomie complexe ou très large requérant une procédure difficile et/ou risquée.

Tableau 2 : Métastases hépatiques de CCR : Niveaux de difficulté de résecabilité et critères carcinologiques pronostiques péjoratifs (D'après **Thésaurus National de Cancérologie Digestive** (Cancer colorectal métastatique- Mis à jour le 18/02/2014)).

Résecabilité de classe I	Evidente par une hépatectomie classique (4 segments ou moins, laissant plus de 40 % de parenchyme résiduel)
Résecabilité de classe II	Possible par une hépatectomie complexe ou très large (plus de 4 segments) requérant une procédure difficile et/ou risquée (par exemple hépatectomie centrale sous exclusion vasculaire, hépatectomie droite élargie, reconstruction vasculaire)
Résecabilité impossible	Atteinte des 2 pédicules portaux, atteinte d'un pédicule portal et de la veine sus-hépatique contro-latérale, atteinte des 3 veines sus-hépatiques
Critères carcinologiques pronostiques péjoratifs	Taille > 5 cm, nombre > 3, caractère bilobaire, ganglion pédiculaire envahi, ACE élevé

F/ indications chirurgicales :

1/ Métastases hépatiques résecables :

La décision de résecter d'emblée des MHC (métastase hépatique de cancer colorectal) doit prendre en compte tous les caractères carcinologiques de la maladie. L'objectif du traitement chirurgical est l'exérèse de toutes les métastases hépatiques constatées sur le bilan d'imagerie préopératoire et visibles à l'exploration chirurgicale, complétée par une échographie hépatique per-opératoire. Le nombre de métastases ne doit pas être un facteur limitant. Mais seule une exérèse complète (R0) des métastases en un ou deux temps doit être envisagée. Une exérèse incomplète avec reliquat tumoral microscopique (R1) peut s'envisager en cas de nécessité (17). Une marge de sécurité péri-tumorale en foie sain supérieure au

centimètre est recommandée Quand elle est possible. Mais des études ont montré que l'épaisseur de la marge n'impactait pas la survie en cas de résection R0 (18) (17). La marge carcinologique est l'élément pronostique principal de l'exérèse des métastases hépatiques. La réalisation d'une exérèse anatomique ou d'une résection atypique (Wedge résection) ne modifie pas le pronostic (19).

En cas de résécabilité de classe I, la taille des MHC, leur nombre, un caractère bilobaire, un éventuel envahissement vasculaire ou biliaire ne doit pas modifier l'indication opératoire.

Par contre, en cas de résécabilité de classe II, l'association de plusieurs de ces facteurs péjoratifs peut faire discuter une chimiothérapie pré-opératoire en concertation multidisciplinaire.

En cas de métastase(s) synchrone(s), l'exérèse hépatique (résection de classe I) peut être faite dans le même temps opératoire que la tumeur primitive, en tenant compte des antécédents du patient. Le chirurgien évaluera les possibilités d'une exérèse combinée mais elle n'est pas recommandée en cas d'intervention colique dans un contexte d'urgence, de maladie colorectale localement avancée ou de maladie hépatique de résécabilité de classe II (20). Il est également possible d'envisager une exérèse hépatique 2 à 3 mois après l'exérèse de la tumeur primitive. Une chimiothérapie néoadjuvante à la chirurgie hépatique pouvant être réalisé. Mais avec le risque de voir disparaître les « cibles » hépatiques. Enfin la stratégie inversée en cas de MHC « menaçantes », à la limite de la résécabilité, peut être proposée aux patients présentant une tumeur colique ou rectale asymptomatique : Chimiothérapie première puis chirurgie d'exérèse hépatique et enfin chirurgie de la tumeur primitive possiblement encadrée de chimiothérapie.(21)

La progression tumorale des MHC sous chimiothérapie est un facteur de mauvais pronostic mais ne contre-indique pas formellement une exérèse (22).

2/ Métastases hépatiques résécables associées à d'autres localisation secondaires curables :

En cas de localisation extrahépatique résécable, l'hépatectomie associée à la résection de la maladie extrahépatique ou d'un envahissement de contact est réalisable d'emblée.

Néanmoins, l'existence de plusieurs éléments carcinologiques péjoratifs de la maladie hépatique et/ou la nécessité de faire une hépatectomie de classe II incitent à discuter une chimiothérapie première (23).

L'existence de métastases pulmonaires résécables ne contre-indique pas la chirurgie hépatique. Idéalement la chirurgie d'exérèse pulmonaire, à visée curative, est réalisée 2 à 3 mois après la chirurgie hépatique (24).

Le diagnostic certain pré opératoire d'adénopathie(s) métastatique(s) locorégionales(s) périhépatiques est une contre-indication à la chirurgie d'emblée. Tout ganglion suspect (par sa forme ou ses dimensions) doit être prélevé pour examen extemporané. En cas de ganglion pédiculaire envahi et de résécabilité de classe I, la chirurgie avec curage ne peut être contre-indiquée. Par contre, si la résécabilité est de classe II, la chirurgie n'est pas recommandée.

3/ Métastases hépatiques associées à d'autres localisation secondaires non curables :

Un site tumoral extrahépatique non complètement résécable (non R0) est une contre-indication à l'hépatectomie. Aussi l'existence de métastase(s) pulmonaire(s) non résécable(s), d'une carcinose péritonéale ou de localisation(s) extra-abdominale(s) non pulmonaire(s) (os, cerveau, adénopathies extraabdominales) contre-indique la résection hépatique.

G/ Chimiothérapie dans le cancer colo-rectal métastatique :

Différents protocoles de chimiothérapie sont administrés, soit en néoadjuvant, soit en situation adjuvante à l'hépatectomie. Ces chimiothérapies associent des drogues cytotoxiques (5 fluoro-uracile et acide folinique, irinotecan et oxaliplatine) à des thérapies ciblées (ou biothérapies) (23, 24). Le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), et le cetuximab (anti- Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) sont les principaux chefs de file ces biothérapies. En 2004, Hurwitz et al. ont montré que l'addition de bevacizumab aux chimiothérapies à base de 5 fluoro-uracile, permettait une

amélioration statistiquement significative de la survie des patients traités pour CCR métastatique (25). Le gain de survie étant de 4 à 5 mois, avec une médiane de survie dépassant pour la première fois les 20 mois.

Dans le cas de MHC en résécabilité de classe I, un protocole FOLFOX 4 simplifié comprenant 6 cures en néoadjuvant et 6 cures postopératoires sera classiquement administré. En cas de risque prévisible de disparition des MHC sous chimiothérapie, une chirurgie première sera discutée. En cas de disparition des métastases au décours d'un protocole de chimiothérapie néoadjuvante, une hépatectomie emportant les sites métastatiques pourra être réalisée (26).

Le bevacizumab et le cetuximab n'ont été évalués avant métastasectomie que dans des études non randomisées. Un intervalle libre d'au moins 5 à 6 semaines (2 demi-vies) est nécessaire entre la dernière administration de bévacizumab et la chirurgie (en pratique pas d'administration de bévacizumab associée à la dernière cure de chimiothérapie), au risque d'augmenter la morbidité post-opératoire (27, 28).

Une chimiothérapie postopératoire après hépatectomie, par LV5FU2, FOLFOX 4 simplifié ou par la chimiothérapie d'induction ayant permis la résécabilité, est à discuter pendant 6 mois en l'absence de chimiothérapie néoadjuvante à l'hépatectomie. Cette chimiothérapie adjuvante à l'hépatectomie est à moduler en fonction de l'intensité de la réponse, de la toxicité cumulative et des suites post-opératoires, pendant une durée conduisant à un total de 6 mois péri-opératoire. Ce protocole postopératoire doit débuter au maximum dans les 3 mois suivant l'intervention (29).

Les différents protocoles de chimiothérapies classiquement utilisés, en France, dans un contexte de MHC résécables ou à la limite de résécabilité, sont présentés en Annexe.

II Le développement métastatique

A : La dissémination métastatique :

La cascade métastatique permettant la genèse d'une tumeur secondaire à partir d'une cellule tumorale fait intervenir de nombreux mécanismes. Chacune des étapes de la migration de la cellule tumorale vers son organe cible, son établissement et sa multiplication au sein de cet organe et enfin le développement d'une micro puis d'une macrométastase représente une barrière empêchant la propagation de métastases (30).

Classiquement cette cascade métastatique comprend (31):

- 1 : La transition épithélio-mésenchymateuse d'une cellule tumorale épithéliale et acquisition de propriétés invasives.
- 2 : Le franchissement de la membrane basale.
- 3 : L'intravasation de cette cellule tumorale au sein de néovaisseaux de la tumeur primitive
- 4 : Le transport des cellules tumorales jusque dans un vaisseau capillaire de l'organe cible
- 5 : L'extravasation depuis ce capillaire
- 6 : L'établissement de cellules métastatiques au sein du site secondaire
- 7 : L'apparition d'une micrométastase puis d'une macrométastase

Ces différentes étapes ne se produisent pas nécessairement de façon strictement linéaire. **(Figure 1).**

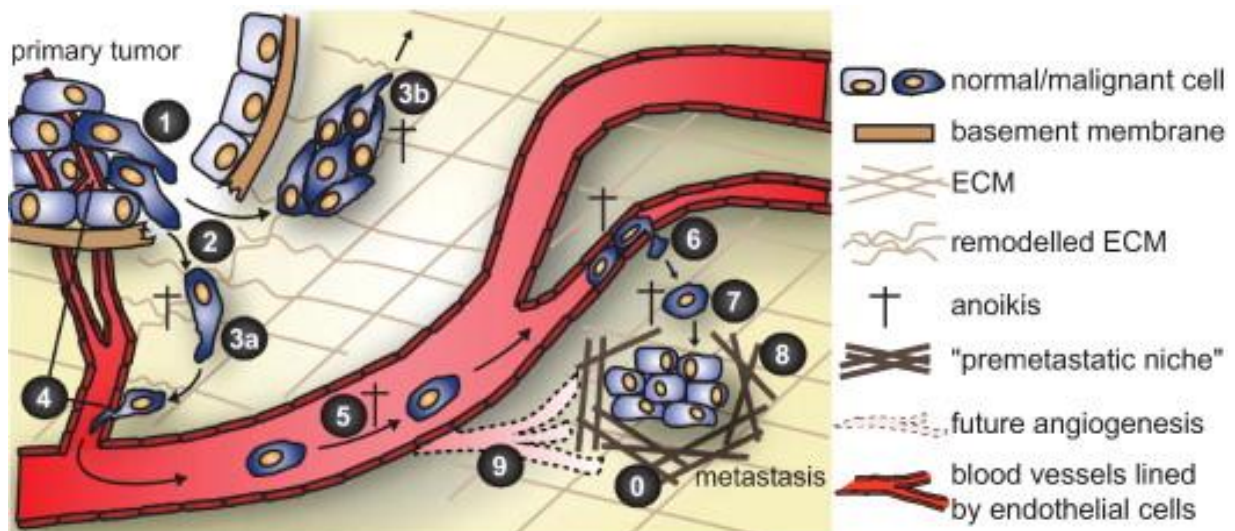


Figure 1 : Les étapes de la cascade métastatique (d'après Geiger R. et al. 2009).

Une niche pré-métastatique se forme avant que la métastase ne devienne évidente ; elle implique la colonisation du site par des cellules de la moelle osseuse. 1 : les cellules de la tumeur primitive entreprennent une transition épithélio-mésenchymateuse et acquièrent des propriétés invasives. 2 : la dégradation de la membrane basale et le remodelage de la matrice extracellulaire par des protéinases facilite l'invasion cellulaire tumorale. 3 : les cellules tumorales envahissent les tissus environnant seules (a) ou collectivement (b). 4 : intravasation des cellules tumorales dans les néovaisseaux à proximité ou au sein de la tumeur. 5 : Transport des cellules tumorales à travers la vascularisation et arrêt dans un lit capillaire où elles extravasent (6). 7 : les cellules extravasées peuvent rester dormantes plusieurs années. 8 : éventuellement certaines cellules extravasées vont former une micrométastase puis une macrométastase, ce qui nécessite une néoangiogénèse et un remodelage de la matrice extra-cellulaire. Les cellules, en dehors de leur environnement normal, peuvent subir une apoptose induite par la perte d'ancrage (ou anoïkis). Cette anoïkis peut survenir aux différentes étapes de la cascade métastatique et entraver l'apparition de métastase.

B/ La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) :

La TEM est un processus permettant à des cellules tumorales épithéliales de développer des caractéristiques de cellules mésenchymateuses avec émissions d'extensions cytoplasmiques et ainsi de développer un phénotype invasif favorisant leur migration à travers les tissus voisins. Ce sont les caractéristiques migratoires associées au phénotype mésenchymateux qui permettraient à des cellules épithéliales d'acquérir une capacité métastatique. La TEM survient de façon normale au cours du développement embryonnaire au stade la blastula lors de la gastrulation (32).

Au cours de la TEM, la cellule perd sa polarité, diminue la synthèse de protéine d'adhésion telle qu'E-cadhérine et augmente la synthèse de protéines mésenchymateuses (N-cadhérine, vimentine) ainsi que de différentes protéases.

La TEM favoriserait le processus métastatique par plusieurs voies (31) :

- La diminution des protéines d'adhésion permettrait la migration cellulaire.

- La production d'enzymes de dégradation protéiques tels que des métalloprotéinases (MMPs), favorisant ainsi le remodelage de la matrice extracellulaire au sein du microenvironnement tumoral.

- L'activation de voies de signalisation (TGF β , RTK, Notch, NF κ B, MAP kinase, PI3kinase) va permettre la migration des cellules tumorales et leur conférer des propriétés de survie (33). **(Figure 2)**.

- La libération de MMP va favoriser la perte d'adhésion intercellulaire. Les MMP (MMP-3 et MMP-7) vont cliver les jonctions intercellulaires constituées principalement de E-cadhérine.

La TEM ne serait qu'un processus transitoire permettant à la cellule tumorale métastatique une fois nichée au sein du tissu de l'organe cible, et par l'effet du microenvironnement, de subir une transition mésenchymato-épithéliale. La cellule métastatique retrouvant des caractéristiques épithéliales identiques à celles de la tumeur primitive (34).

Cependant le rôle de la TEM dans la diffusion cellulaire métastatique, et plus globalement le concept de mobilité cellulaire, n'est encore que partiellement compris et reste à confirmer en analyse histologique de tumeurs humaines (35, 36).

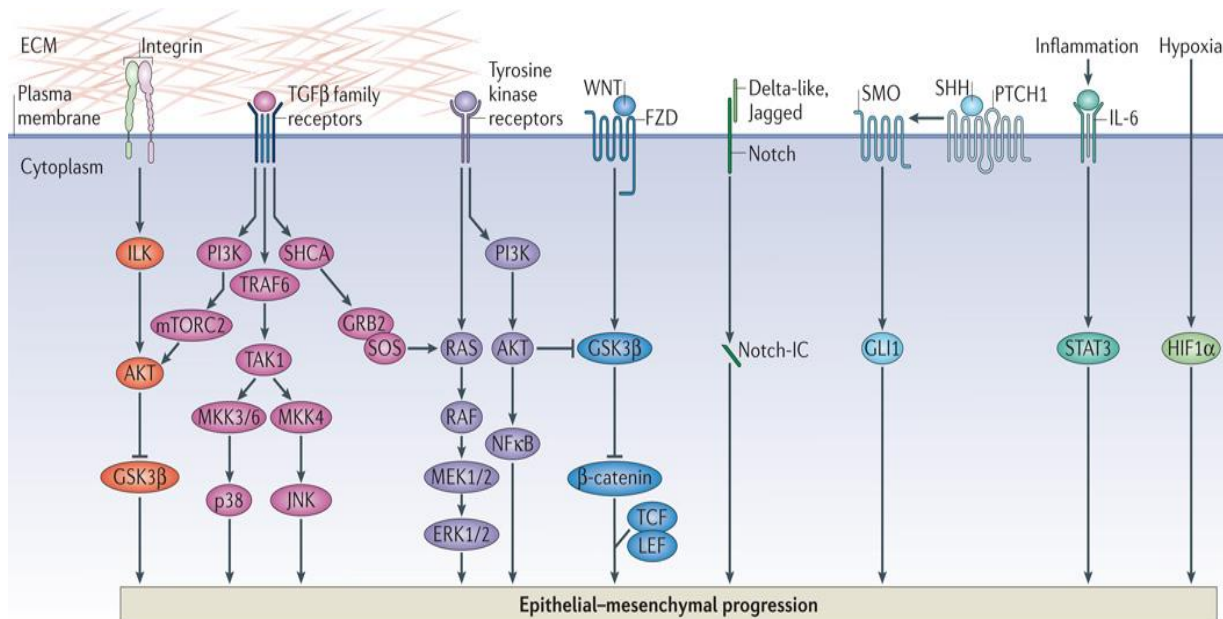


Figure 2 : Réseau des voies de signalisation et des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la TEM au sein des cellules carcinomateuses. (d'après S. Lamouille et al, 2014) (36).

C/ La migration cellulaire :

La tumeur primitive est au départ constituée d'amas de cellules épithéliales adhérentes les unes aux autres et limitée par une barrière physique constituée de la membrane basale. Cela correspond au carcinome in situ. Cette membrane basale est constituée de glycoprotéines, protéoglycanes et collagène. Le développement de la tumeur entraîne la libération d'enzymes protéolytiques, essentiellement des métalloprotéases matricielles (MMP) mais aussi des glycosidases et des cathepsines, permettant la dégradation de la matrice extracellulaire sous forme de cascade protéolytique (37). Les cellules tumorales acquièrent ainsi la capacité de rompre la membrane basale. La protéolyse de la matrice extra cellulaire favorise aussi la libération de facteurs de croissance et de cytokines qui ont un rôle trophique et chimioattractant sur les cellules tumorales, et de facteurs de croissances proangiogéniques. Des boucles de régulation paracrine se créent entre les cellules tumorales et le stroma péri-tumoral (31).

L'afflux de cellules inflammatoires, la stimulation de la néoangiogénèse tumorale, l'« activation » et le remodelage de la matrice extracellulaire vont permettre le développement de la tumeur primitive point de départ nécessaire à la migration de cellules tumorales.

Ces cellules doivent modifier leur caractéristiques afin d'acquérir une capacité migratoire leur permettant une invasion à travers la matrice extracellulaire puis l'intravasation à travers la paroi d'un capillaire sanguin. (31).

Le déplacement des cellules tumorales se fait par émissions de protubérances membranaires et création de nouveaux points d'appuis sur la matrice extracellulaire (38). Ce phénomène est rendu possible grâce à des cycles continus de polymérisation et de dépolymérisation d'actine dans le cytoplasme cellulaire. Les cofilines et les régulateurs de l'actine dans le cytosquelette sont contrôlés par la famille des GTPases RHO (39). Ce mode de migration cellulaire de type mésenchymateux relativement lent est associé à un mode de migration rapide, de type amoéboïde, qui ne nécessite pas l'intervention de protéase ni de remodelage de la matrice extra cellulaire (40). (**Figure 3**). Enfin les cellules peuvent migrer seules ou en groupes (cluster), permettant dans ce cas aux cellules de diminuer l'effet de l'anoïkis et de potentialiser leur capacité migratoire. La constitution d'agrégats de cellules tumorales est favorisée par l'action des plaquettes (41).

L'invasion cellulaire est donc un phénomène dynamique qui fait intervenir de nombreux systèmes de régulation, dont les chimiokines qui sont l'objet de ce travail.

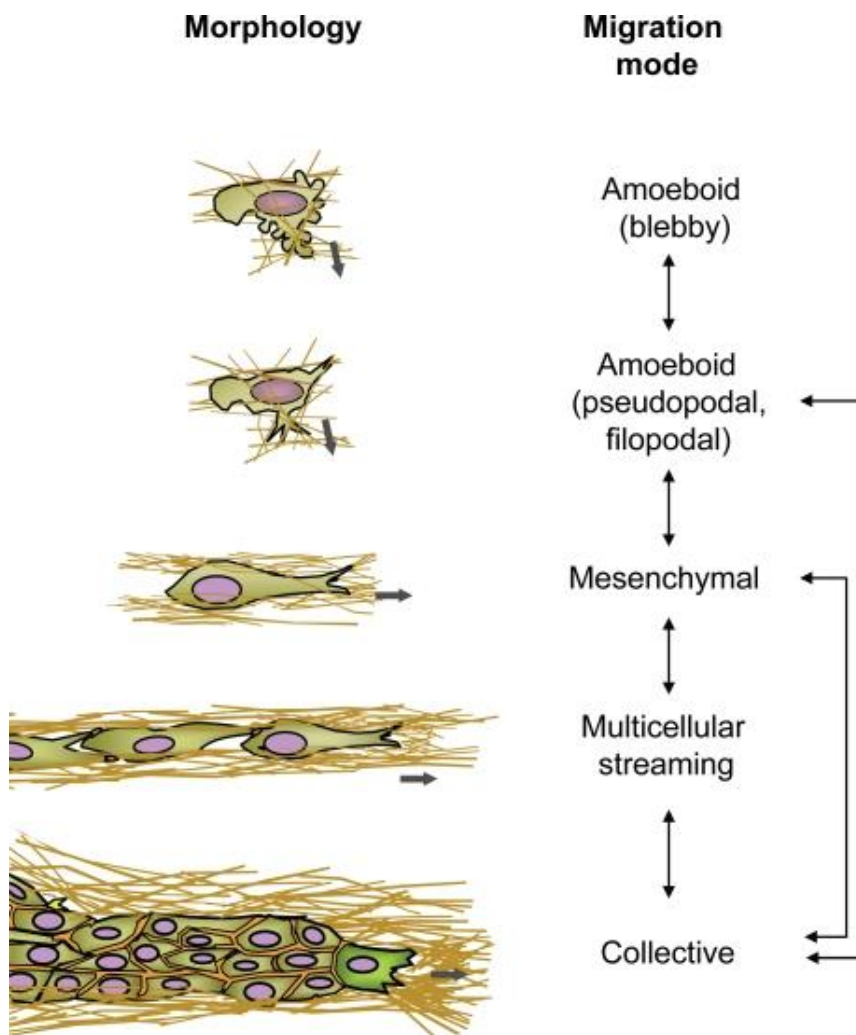


Figure 3 : Les différents modes de migration cellulaire. (d’après Friedl P, J Cell Biol. 2010).

D/ L’intravasation puis l’extravasation des cellules tumorales :

La cellule tumorale au décours de son mécanisme invasif franchit par intravasation la paroi d’un capillaire sanguin. Le rôle des macrophages serait primordial durant cette phase de l’invasion cellulaire. Plusieurs études ont montrées que les macrophages permettraient un guidage des cellules tumorales vers les vaisseaux sanguins et les sites d’intravasation. Ce mécanisme ferait intervenir une boucle de régulation entre les récepteurs CSF1 situés sur les macrophages et les EGFR situés sur les cellules tumorales (42).

L'intravasation est une étape critique de la cascade métastatique. La cellule devant alors résister à l'apoptose induite par la perte d'ancrage et aux modifications de pression osmotique dans la circulation sanguine. La majorité des cellules tumorales intravasées dans la circulation sanguine serait détruites par anoikis, limitant ainsi la diffusion métastatique (43). Le nombre de cellules tumorales circulantes ou présentes dans la moelle osseuse pourrait ainsi représenter un facteur pronostique de l'évolution tumorale de certains cancers (44).

Il existe deux modes d'arrêt des cellules tumorales circulantes. Soit classiquement par un effet passif de filtre capillaire. Ceci expliquant, par exemple, l'apparition de métastases hépatiques ou pulmonaires en cas de CCR (45). Ou par des phénomènes actifs d'adhésion sélective des cellules tumorales circulantes sur les cellules endothéliales de certains organes. Dans ce cas des phénomènes de reconnaissance et d'attraction spécifique interviendraient sur un mode similaire à la chémoattraction des leucocytes, et pourrait expliquer la spécificité d'organe d'apparition de métastases au décours de certains types de cancer.

L'extravasation des cellules tumorales circulante à travers l'endothélium vasculaire interviendrait par des mécanismes similaires à l'intravasation. Les plaquettes sanguines favorisent l'agrégation de cellules tumorales et l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium vasculaire puis leur extravasation expliquerait le rôle protecteur de certaines héparines de bas poids moléculaire (HBPM) à l'apparition de métastases (41, 46).

E/ L'angiogénèse tumorale :

Il y a plus de 40 ans que la première théorie sur l'angiogénèse tumorale et ses implications thérapeutiques a été publiée (47). Trois hypothèses étaient formulées : premièrement l'angiogénèse est essentielle à la croissance tumorale. Deuxièmement, les tumeurs sécrètent un facteur tumoral d'angiogénèse. Troisièmement, l'angiogénèse est une cible thérapeutique potentielle pour traiter le cancer (48).

L'îlot tumoral métastatique ne va pouvoir se développer au-delà d'une taille critique (environ 1 mm de diamètre) qu'en bénéficiant de l'apport en oxygène et en nutriments via un nouveau système vasculaire. En l'absence de développement de ce nouveau réseau vasculaire, la micrométastase entrera en quiescence, ou phase de dormance, pour une durée indéterminée (49).

Dans certains cas, les modifications du microenvironnement liées au développement de la micrométastase par l'action entre autres des MMP, et sous l'effet de l'hypoxie, vont favoriser l'activation d'oncogènes (RAS ou EGFR), stimuler l'action de cytokines pro-angiogéniques (VEGF-A, fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, epidermal growth factor, NAP-2) et freiner les inhibiteurs de l'angiogenèse (thrombospondine, angiostatine). Ces mécanismes vont entraîner un switch angiogénique en faveur de l'angiogenèse et de la création d'une néovascularisation tumorale (50). Par ailleurs, l'hypoxie pourra favoriser le développement de clones cellulaires tumoraux résistant et invasifs. Ce switch proangiogénique est favorisé également par l'ensemble des cellules de la matrice extracellulaire, des cellules endothéliales, des leucocytes mettant en avant le rôle primordial du microenvironnement dans le développement métastatique (51).

Le switch angiogénique est un mécanisme complexe et réversible pouvant influencer dans le sens du développement, ou de l'inhibition, d'une néovascularisation. L'incorporation des précurseurs endothéliaux et la constitution des bourgeons vasculaires puis le développement du nouveau réseau vasculaire tumoral se fait de façon anarchique et chaotique (52). Ces néovaisseaux réagissent anormalement à la pression et à l'hypoxie et leurs parois se constituent, sous la forme de mosaïque à partir d'amas de cellules tumorales et de cellules endothéliales (53). L'agencement de cet amas de néovaisseaux anarchiques entraîne des modifications importantes du flux sanguin, des thrombi, des faux anévrysmes ou des fistules artérioveineuses au sein de la tumeur. Ces phénomènes expliquent la faible efficacité de ce réseau et donc la fréquence de nécroses centrales et le caractère souvent hypervascularisé de la périphérie des tumeurs et des métastases.

Il est maintenant admis que VEGF a un rôle prédominant dans le développement précoce de la néoangiogenèse tumorale (54). Ces données ont été le point de départ de travaux permettant la mise au point des biothérapies anti-VEGF. L'un des effets notables de ces thérapies ciblées anti-VEGF est la normalisation de l'architecture du réseau vasculaire

tumoral, permettant d'améliorer sensiblement l'efficacité des chimiothérapies cytotoxiques classiques par optimisation de la perfusion tumorale (55).

F/ Le développement métastatique :

Dès la fin du XIX^e siècle, Paget avait montré que certains types de cancers métastasaient dans certains types d'organe. Ainsi il avait constaté que le cancer du sein présentait des métastases préférentiellement dans le foie mais pas dans la rate. Il avait également constaté que l'os est un site métastatique fréquent du cancer du sein mais que le cancer de l'estomac ne métastasait quasiment pas à l'os. Ces constatations ont été à l'origine de la théorie du « sol et de la graine » (seed and soil hypothesis) où le choix du site métastatique ne dépend pas seulement de la cellule tumorale métastatique (la graine) mais est aussi largement influencé par la nature de l'organe cible (le sol) (30). Ainsi une métastase ne pourra se développer que si elle se niche au sein d'un tissu et d'un microenvironnement compatible. Cette théorie a permis d'élaborer le concept de niche prémétastatique (56).

C'est la tumeur primitive, qui en produisant des chimiokines spécifiques, va permettre la transformation du microenvironnement de l'organe cible et favoriser l'intégration de cellules métastatiques puis l'apparition d'une micrométastase (57) : (Figure 4)

- 1- La tumeur primitive va produire des chimiokines, qui par l'intermédiaire entre autre de VEGF-A et du TGF β , vont stimuler l'activation de cellules HPCs (hematopoietic progenitor cells) et EPCs (endothelial progenitor cells) (58). Ces cellules vont diffuser dans les sites métastatiques via leur récepteur du VEGF (VEGFR1).
- 2- Les cellules HPCs vont proliférer dans la circulation sanguine et vont synthétiser une intégrine entraînant une adhésion à la fibronectine présente dans les tissus cibles. Elles vont également synthétiser des MMP, entraînant une dégradation de la membrane basale dans la niche métastatique.

- 3- La résultante est une modification du microenvironnement au niveau de la niche prémétastatique avec production de chimiokines favorisant l'attraction et l'attachement des cellules tumorales puis leur survie.
- 4- La niche prémétastatique devient alors une micrométastase.
- 5- Les EPCs, attirées vers le site métastatique via le VEGFR, stimulent alors la néoangiogénèse et la transformation en métastase comme nous l'avons vu préalablement (59).

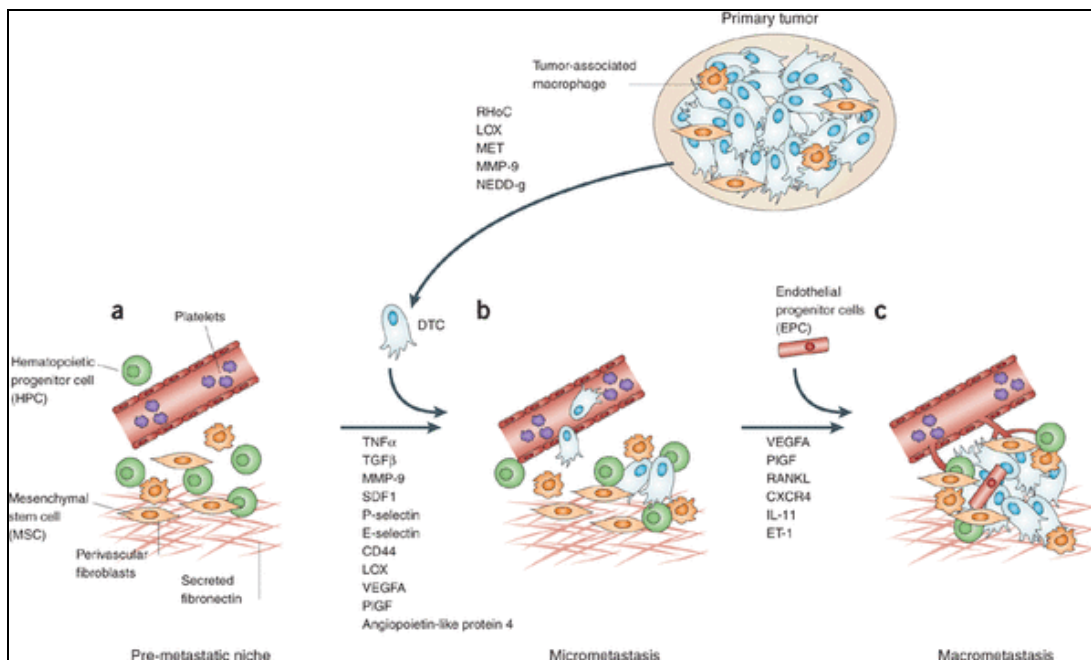


Figure 4 : Les étapes métastatiques et la niche prémétastatique. D'après Mack S et al, 2010. (58)

G/ Les modifications du microenvironnement :

La description de la cascade métastatique, ainsi que les différentes théories tendant à expliquer le processus métastatique, soulignent à quel point les interactions entre la tumeur primitive, le microenvironnement du site métastatique et les cellules tumorales circulantes

sont importantes. En effet la cellule tumorale qui a perdu ses capacités d'adhésions cellulaires, afin de pouvoir migrer, devra bénéficier d'un système complexe lui permettant d'adhérer à nouveau à la paroi de l'endothélium vasculaire de l'organe cible (chémoattraction, formation d'agrégats plaquettaires, captation par des macrophages...) avant d'extravaser et de se nicher au sein d'un environnement favorable.

Ensuite cette micrométastase pourra entrer en phase quiescente ou de dormance avec l'installation d'un équilibre entre faible taux de mitoses cellulaires et apoptose. En cas de rupture de cet équilibre en faveur du processus mitotique, sous l'effet de l'induction d'une néoangiogenèse tumorale et d'une modification de son microenvironnement, l'îlot micrométastatique pourra sortir d'un éventuel état de dormance et se développer en métastase.

Bien que les caractéristiques propres de la cellule métastatique soit importantes pour expliquer sa résistance au processus destructeur que représente la cascade métastatique, le rôle du microenvironnement tumoral demeure primordial. Ces interactions font intervenir de multiples voies de signalisations, des facteurs pro ou antiangiogéniques et un certain nombre de couple chimiokines-récepteurs de chimiokines.

Ce sont certaines de ces chimiokines protumorales et leurs récepteurs qui ont intéressé notre travail.

III Chimioquinas et récepteurs de chimiokines

A/ Présentation:

Il est maintenant bien établi que six altérations dans la physiologie cellulaire sont nécessaires au développement d'une tumeur primitive ou d'une métastase : l'autoproduction de facteurs de croissance, l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance, l'échappement à l'apoptose, l'absence de limite au pouvoir de réplication, une néoangiogenèse adaptée aux besoins cellulaires et l'acquisition d'un potentiel migratoire. Il faut aussi ajouter la réaction inflammatoire produite par la tumeur elle-même (60).

La constitution de la tumeur nécessite un support (ou microenvironnement) afin que les cellules tumorales puissent s'établir et croître. Ce tissu de soutien est constitué de cellules du stroma et d'une matrice extracellulaire. Cette matrice est composée de glycosaminoglycanes, de protéines d'adhésion telles que laminine ou fibronectine, de collagène et d'élastine. Les cellules de la matrice comprennent des fibroblastes, des myofibroblastes, des cellules endothéliales, des péricytes et de nombreux leucocytes ou macrophages (45).

L'ensemble de ces cellules de la matrice extracellulaire entrent en interaction avec les cellules tumorales, en modulant leur profil d'expression de récepteur. Toutes ces cellules vont produire des facteurs de modulation de la croissance tumorale, de la néoangiogenèse, et de l'attraction et d'infiltration des leucocytes. Les chimiokines ont été identifiées comme étant des facteurs de modulation majeurs de la cascade métastatique et du développement tumoral (61).

A l'origine, les chimiokines, ou cytokine à pouvoir chimiotaxique, ont été identifiées comme des protéines favorisant l'attraction des leucocytes et donc comme des protéines médiatrices de l'inflammation. Plus récemment les chimiokines ont été identifiées comme jouant un rôle majeur dans l'attraction des cellules tumorales vers les sites métastatique mais aussi dans le recrutement et l'activation des nombreuses cellules du microenvironnement péri-tumoral (62). C'est cette importante activité de synthèse et de diffusion de chimiokines

(trafficking des anglo-saxons) qui permettrait la croissance tumorale en amplifiant la réaction inflammatoire liée au développement de cellules tumorales (63).

B/ Classification des chimiokines :

Large famille de protéines impliquées dans la chimiotaxie, les chimiokines (cytokines chimiotactiques) sont divisées en 4 groupes selon la position de leurs résidus cystéines (C, CC, CXC, CX3C) en position N-terminale. **(Figure 5)**

La famille de chimiokine CXC, ou alpha chimiokines, possède un acide aminé (X) séparant deux des quatre résidus cystéine conservés. La famille de chimiokines CC, ou beta chimiokines, possède deux résidus cystéines adjacents. La famille de chimiokines C, ou gamma chimiokines, possède un seul résidu cystéine. Les CX3C chimiokines, composées d'un seul membre : la fractalkine, possède trois acides aminés séparant deux des quatre résidus cystéines.

Une seconde division intervient, divisant les CXC chimiokines en 2 groupes (ELR+ et ELR-) selon qu'elles possèdent ou non, un motif conservé de trois acides-aminés (Glu-Leu-Arg), qui précède la séquence d'acides aminés placés dans leur domaine N-terminal avant le dernier résidu cystéine (64). Le caractère ELR+ confère à la chimiokine un potentiel angiogénique et chimiotactique auprès des neutrophiles. Le caractère ELR- confère un caractère angiostatique et attractif pour les lymphocytes et les cellules NK (65, 66).

(Tableau 3)

Les chimiokines interagissent par l'intermédiaire de protéines G trans-membranaires couplées à des récepteurs. Il existe 10 récepteurs de types CCR, 7 de type CXCR en plus des récepteurs de type XCR1 et CXC3CR1 (61). Plusieurs récepteurs interagissent avec une chimiokine et plusieurs chimiokines activent un type de récepteur suggérant d'importante redondance en termes de fonction. Mais suggérant aussi une modulation de l'activité en fonction du niveau d'expression des chimiokines et de leurs récepteurs. En plus des récepteurs de chimiokines, les chimiokines interagissent directement avec les glycoaminoglycane

(GAGs), présents dans la matrice extracellulaire, dont le rôle est essentiel pour la présentation des chimiokines aux cellules endothéliales et pour la migration des leucocytes (67).

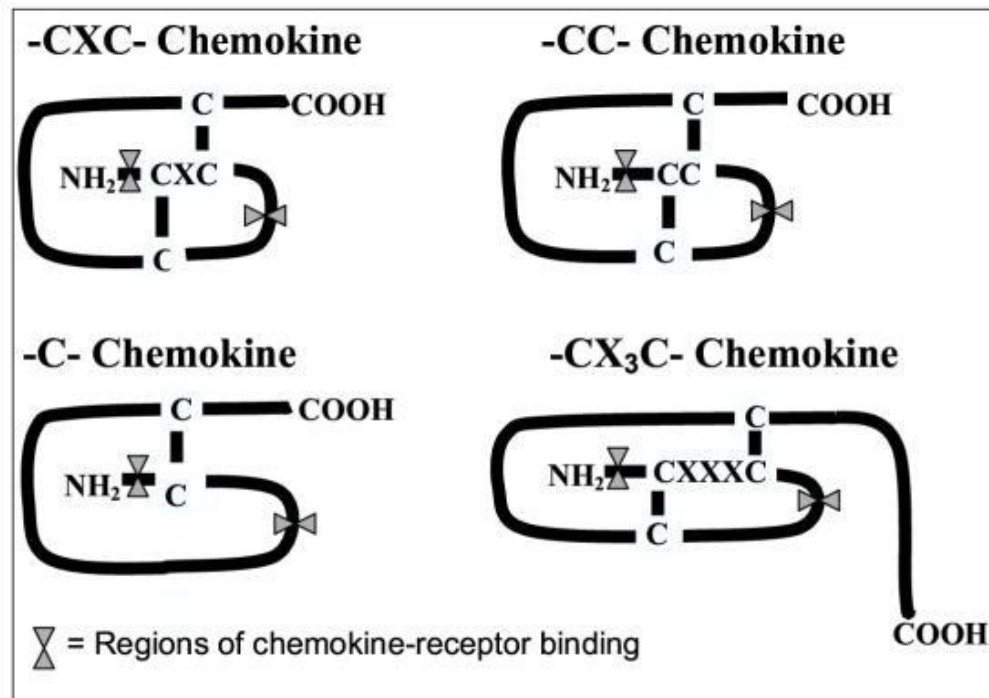


Figure 5 : Représentation schématique des quatre familles de chimiokines.

(D'après Tomwson DH, *Reprod Biol Endocrinol.* 2003). Les chimiokines sont des polypeptides possédant un motif conservé de résidus cystéines situé près du domaine NH₂ terminal. La position du résidu cystéine est la base pour la classification en 4 familles. Les régions d'interaction avec les récepteurs de chimiokines sont également indiquées.

Tableau 3: Nomenclature des chimiokines et fonctions immunorégulatrices. (D'après Bachelierie F., Pharmacol Rev. 2014)

Standard Name	Common Aliases	Accession Number		Key Immunoregulatory Functions
		Human	Mouse	
CXCL1	GRO α , MGSA Mouse: KC	P09341	P12850	Neutrophil trafficking
CXCL2	Gro β ; MIP-2 α Mouse: MIP-2	P19875	P10889	Neutrophil trafficking
CXCL3	Gro γ ; MIP-2 β ,	P19876	Q6W5C0	Neutrophil trafficking
CXCL4	Platelet Factor-4	P02776	Q9Z126	Procoagulant
CXCL4L1	PF4V1	P10720		Procoagulant
CXCL5	ENA-78 Mouse: LIX	P42830	P50228	Neutrophil trafficking
CXCL6	GCP-2	P80162	NA	Neutrophil trafficking
CXCL7	NAP-2	P02775	Q9EQI5	Neutrophil trafficking
CXCL8	IL-8	P10145	NA	Neutrophil trafficking
CXCL9	Mig	Q07325	P18340	Th1 immune response
CXCL10	γ IP-10	P02778	P17515	Th1 immune response
CXCL11	I-TAC	Q14625	Q8R392	Th1 immune response
CXCL12	SDF-1 α ^a	P48061	P40224	Myelopoiesis; B lymphopoiesis; HPC, neutrophil homing to marrow
CXCL13	BLC	Q43927	O55038	B and T-cell trafficking in lymphoid tissue
CXCL14	BRAK	Q95715	Q6AXC2	Macrophage migration
Cxcl15	lungkine	NA	Q9WVL7	Neutrophil trafficking
CXCL16	SR-PSOX	Q9H2A7	Q8BSU2	NKT cell trafficking and survival
CXCL17		Q6UXB2	Q8R3U6	Mo and DC chemotaxis
CCL1	I-309	P22362	P10146	Th2 response
CCL2	MCP-1 Mouse: JE	P13500	P10148	Innate immunity Th2 response
CCL3	MIP-1 α	P10147	P10855	T cell and monocyte/macrophage trafficking
CCL3L1		P16619	P10855	Innate immunity
CCL3L3		P16619		Th1 and Th2 immune responses
CCL4	MIP-1 β	P13236	P14097	T/DC interaction
CCL4L1		Q8NHW4	NA	HIV suppression
CCL4L2		Q8NHW4	NA	
CCL5	RANTES	P13501	P30882	innate and adaptive immunity
Ccl6	C10, MRP-1	NA	P27784	ND
CCL7	MCP-3	P80098	Q03366	Th2 immune response
CCL8	MCP-2	P80075	Q9Z121	Th2 immune response
Ccl9	MRP-2, MIP-1 γ	NA	P51670	ND
CCL10 (reserved)		NA	NA	NA
CCL11	Eotaxin	P51671	P48298	Th2 immune response
Ccl12	Mcp-5	NA	Q62401	Eo, Ba, MC trafficking, and degranulation
CCL13	MCP-4	Q99616	NA	ND

Standard Name	Common Aliases	Accession Number		Key Immunoregulatory Functions
		Human	Mouse	
CCL14	HCC-1	Q16627	NA	ND
CCL15	HCC-2	Q16663	NA	ND
CCL16	HCC-4	Q15467	NA	DC maturation factor
CCL17	TARC	Q92583	Q9WUZ6	Th2 immune response
CCL18	PARC	P55774	NA	DC attraction of T and B cells Hematopoiesis
CCL19	ELC	Q99731	O70460	T cell and DC homing to lymph node
CCL20	MIP-3 α , LARC	P78556	O89093	GALT development B and DC homing to GALT Th17 immune response IgA humoral response in gut
CCL21	SLC	O00585	P84444	T cell and DC homing to lymph node
CCL22	MDC	O00626	O88430	Th2 immune response
CCL23	MPIF-1	P55773	NA	ND
CCL24	Eotaxin-2	O00175	Q9JKC0	Eo migration
CCL25	TECK	O15444	O35903	Thymocyte migration Homing of memory T cells to gut
CCL26	Eotaxin-3	Q9Y258	Q5C9Q0	Th2 immune response
CCL27	CTACK	Q9Y4X3	Q9Z1X0	Homing of T cells to skin
CCL28	MEC	Q9NRJ3	Q9JIL2	Homing of T cells to mucosal surfaces
XCL1	Lymphotactin α	P47992	P47993	Ag cross-presentation by CD8 ⁺ DCs
XCL2	Lymphotactin β	Q9UBD3	NA	Ag cross-presentation by CD8 ⁺ DCs
CX ₃ CL1	Fractalkine	P78423	O35188	NK, Monocyte, M Φ and Th1 cell migration

^aStromal cell-derived factor-1 (SDF-1) α , β , γ , δ , ϵ and θ are splice variants of the same human gene. IP-10, interferon-induced protein of 10 kDa; I-TAC, interferon-inducible T-cell α -chemoattractant; PF, platelet factor; TECK, thymus expressed chemokine; Ag, antigen; Ba, basophil; Eo, eosinophil; GALT, gut-associated lymphoid tissue; GCP, granulocyte chemotactic protein; HPC, hematopoietic progenitor cell; Mo, monocyte; M Φ , macrophage; MC, mast cell; NA, not applicable; NAP, neutrophil-activating protein; ND, not determined; Th1, type 1 helper T cells.

C/ Les récepteurs de chimiokines :

En correspondance des quatre familles de chimiokines, il existe également une subdivision des récepteurs de chimiokines en 4 familles : CXCR3, CXCR, CCR et XCR. (**Figure 6**). Par l'intermédiaire de leurs récepteurs couplées aux protéines G, les chimiokines

vont moduler différentes voies de régulation impliquées dans le chimiotactisme tel que les voies PLC/IP3, PI3K/AKT, Ras/Raf/ERK 1/2 (68, 69). (Figure 7).

Il est également intéressant de constater que les récepteurs de chimiokines sont l'objet de phénomènes de phosphorylation, ce qui module leur activité et constitue un autre niveau de régulation.

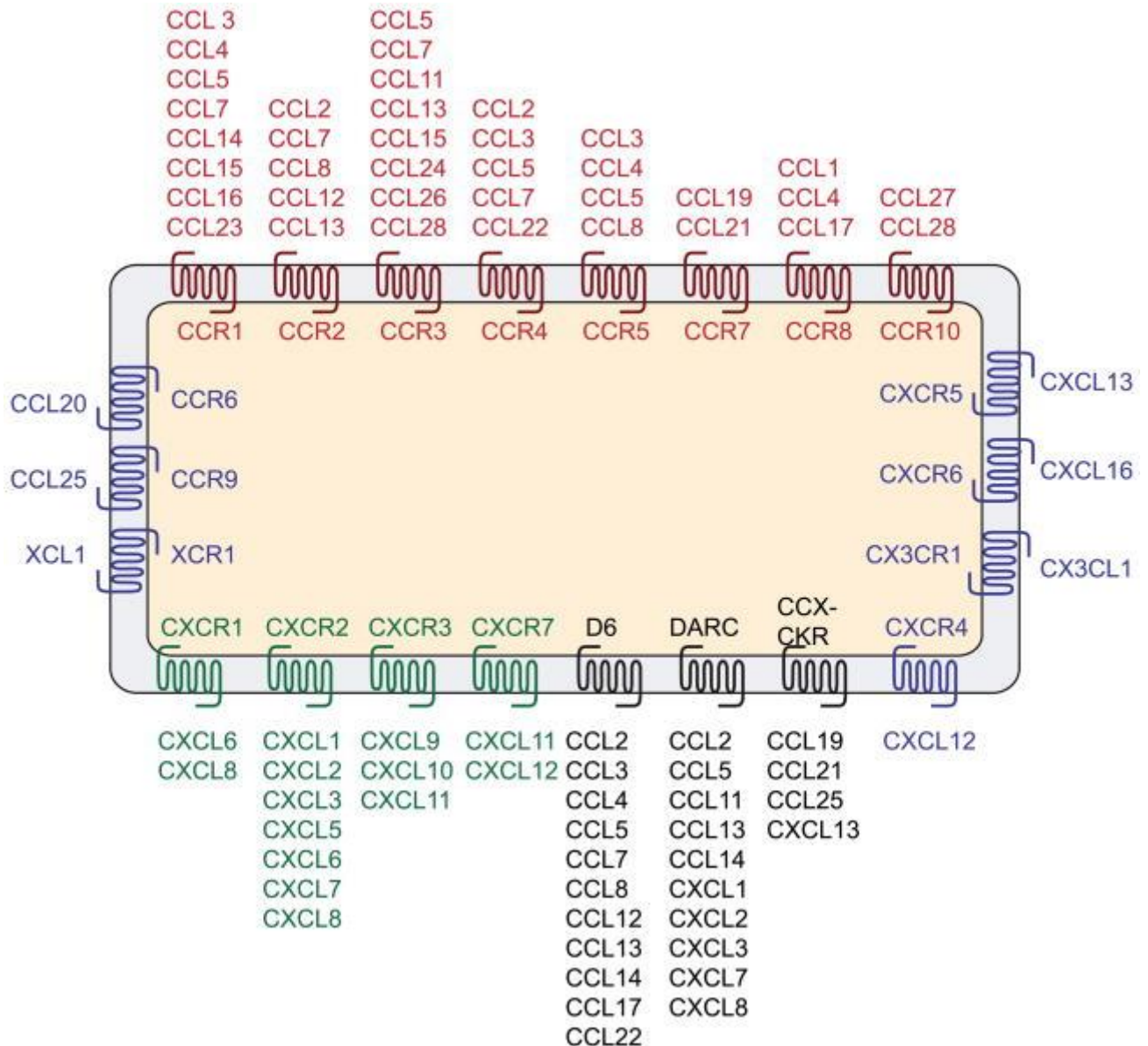


Figure 6 : Les familles de chimiokines et de récepteurs de chimiokines. (D'après G Lazennec et al. Trends Mol Med 2010)

Plusieurs chimiokines peuvent interagir avec le même récepteur, et un seul récepteur peut interagir avec de multiples chimiokines.

Name	CD#	Common Aliases	Accession Number		Key Immunoregulatory Functions
			Human	Mouse	
G Protein-Coupled Chemokine Receptors					
CXCR1	CD181	IL8R _A	P25024	Q810W6	Neutrophil trafficking
CXCR2	CD182	IL8R _B	P25025	P35343	B-cell lymphopoiesis Neutrophil egress from bone marrow Neutrophil trafficking in innate immunity
CXCR3	CD183	IP10/Mig R	P49682	O88410	Type 1 adaptive immunity
CXCR4	CD184	fusin	P61073	P70658	Hematopoiesis Organopoiesis Adaptive Immunity
CXCR5	CD185	BLR-1	P32302	Q04683	B and T-cell trafficking in lymphoid tissue to B-cell zone/follicles
CXCR6	CD186	BONZO, STRL33	O00574	Q9EQ16	Innate lymphoid cell function Adaptive immunity
CCR1	CD191	CC CKR1, MIP-1 α /RANTES R	P32246	P51675	Innate Immunity Adaptive Immunity
CCR2	CD192	CC CKR2, MCP-1-R	P41597	P51683	Monocyte trafficking Type 1 adaptive immunity
CCR3	CD193	CC CKR3, Eotaxin receptor	P51677	P51678	Type 2 adaptive immunity Eosinophil distribution and trafficking
CCR4	CD194	CC CKR4	P51679	P51680	Homing of resident memory T cells to skin Thymopoiesis; Th2 immune response
CCR5	CD195	CC CKR ₅	P51681	P51682	Type 1 adaptive immunity
CCR6	CD196		P51684	O54689	iDC trafficking; GALT development Th17 adaptive immune responses
CCR7	CD197	EBI-1, BLR-2	P32248	P47774	mDC, and B and T-cell trafficking in lymphoid tissue to T-cell zone Egress of T cells from tissue
CCR8	CDw198		P51685	P56484	Thymopoiesis Immune surveillance in skin Type 2 adaptive immunity
CCR9	CDw199		P51686	Q9WUT7	Thymopoiesis; Homing of T cells to gut. GALT development and function
CCR10			P46092	Q9JL21	Humoral immunity at mucosal sites Immune surveillance in skin
XCR1			P46094	Q9R0M1	Ag cross-presentation by CD8 ⁺ DCs
CX ₃ CR1		Fractalkine receptor	P49238	Q9Z0D9	Patrolling monocytes in innate immunity Microglial cell and NK cell migration Type 1 adaptive immunity
Atypical Chemokine Receptors (New Nomenclature)					
ACKR1	CD234	DARC; Duffy	Q16570	Q9QUI6	Chemokine transcytosis Chemokine scavenging
ACKR2		D6, CCR9 (unofficial), CCR10 (unofficial)	O00590	Y12879	Chemokine scavenging
ACKR3		CXCR7; RDC1	P25106	P56485	Heart valve development Shaping chemokine gradients for CXCR4
ACKR4		CCRL1; CCX-CKR, CCBP2, CCR11	Q9NPB9	Q924I3	Chemokine scavenging
CCRL2 (ACKR5)		CKRX, CRAM-A, L-CCR, CRAM-B, HCR, CCR11	O00421	O35457	Not defined
PITPNM3 (ACKR6)		Nir1	AAI28584.1		Breast cancer metastasis

Tableau 4: Nomenclature des récepteurs de chimiokines et fonctions immunorégulatrices. (D'après F. Bachelerie, Pharmacol Rev. 2014)

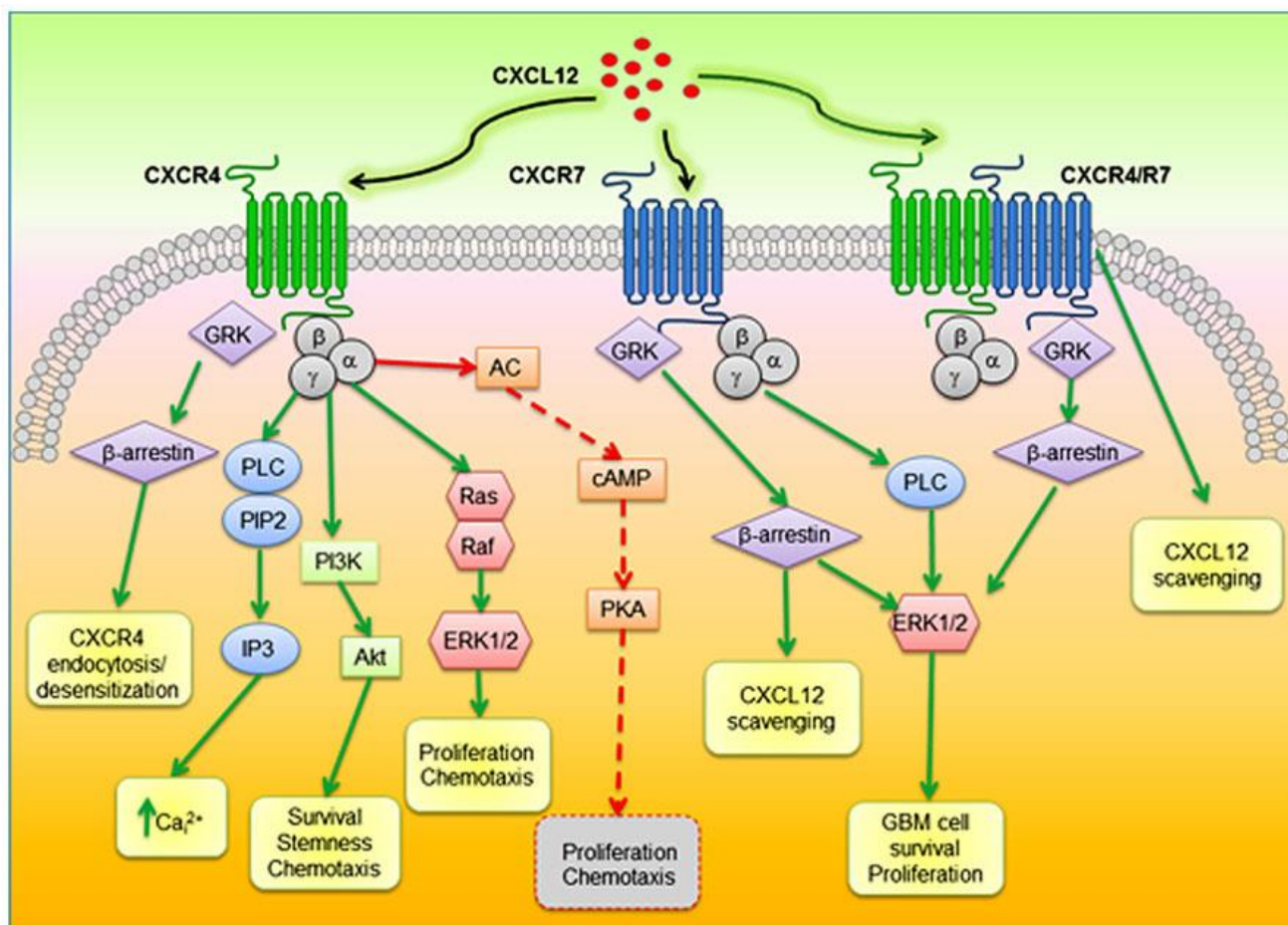


Figure 7 : Schématisation des voies de signalisations activées par les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CXCR7 et leurs liens avec la survie cellulaire, la prolifération et la migration (d'après Wurth et al. Front cell neurosci 2014).

D/ Chimiokines et cancer :

Les chimiokines modulent l'évolution tumorale par plusieurs mécanismes importants : la régulation de la néoangiogénèse, l'activation d'une réponse immunologique spécifique à la tumeur, une stimulation directe de la croissance tumorale par des boucles de régulation autocrine ou paracrine et une activation de la dissémination métastatique (70).

La régulation de l'angiogénèse résulte d'un équilibre entre facteurs angiogéniques et angiostatiques. Les chimiokines ELR⁺ (GRO-α/CXCL1, GRO-β/CXCL2, GRO-γ/CXCL3,

epithelial cell-derived neutrophil activating peptide-78/CXCL5, granulocyte chemotactic protein-2/CXCL6, interleukin-8/CXCL8 et neutrophil-activating peptid 2/CXCL7) sont impliquées dans les deux processus de développement d'un nouveau réseau vasculaire que sont l'angiogenèse (croissance de vaisseaux à partir d'un réseau existant) et vasculogenèse (création de structures vasculaires par recrutement de précurseurs des cellules endothéliales présents dans la moelle osseuse). SDF-1/CXCL12 bien qu'ayant perdu son motif ELR possède des propriétés pro-angiogénique et favorise la vasculogenèse par attraction des cellules précurseurs endothéliales.

Le récepteur CXCR3 activé par des chimiokines ELR- (platelet factor-4/CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11) possède des propriétés angiostatiques.

Le développement tumoral nécessite un défaut d'efficacité du système immunitaire et l'échappement d'un certain nombre de cellules tumorales à la destruction par les macrophages M1 ou les lymphocytes cytotoxiques Th1. Ce processus d'échappement au système immunitaire n'est pas simplement lié à un manque ou un défaut de ce dernier, mais est aussi lié à l'activation d'une immunité protumorale. L'activation de cette immunité protumorale bloque l'immunité antitumorale et rend la réaction immunitaire inefficace. Ainsi des macrophages M2, des neutrophiles et des lymphocytes Th2, protumoraux peuvent inhiber la différenciation et la prolifération de macrophages M1 et de lymphocytes cytotoxiques Th1 antitumoraux. La sécrétion de CXC chimiokines ELR+ stimulent l'attraction de leucocytes protumoraux, alors que les CXC chimiokines ELR- favorisent l'attraction des leucocytes anti-tumoraux. De la même façon, la stimulation de récepteur CXCR1 et CXCR2 par des chimiokines ELR+ module l'infiltration de neutrophiles protumoraux, alors que l'activation de CXCR3 par des chimiokines ELR- stimule l'infiltration par des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK (71, 72). **(Tableau 4).**

La disparition de la tumeur (ou de la métastase) ou son évolution va dépendre de la balance entre infiltration de leucocytes pro ou antitumoraux. L'évolution tumorale est liée à une réponse immunologique antitumorale trop faible et inefficace et probablement l'apparition de systèmes de défense de la tumeur vis-à-vis du système immunitaire. Le profil de transcriptions de gènes dans lequel les chimiokines protumorales ELR+ attirant les neutrophiles sont surexprimées et l'expression de chimiokines ELR- antitumorales

sousexprimées, correspond à un décalage vers une réponse immunitaire innée de type II, favorisant angiogénèse, croissance tumorale et apparition de métastases (61, 72).

Une autre illustration du rôle des chimiokines dans l'immunomodulation et l'évolution tumorale est la différenciation de monocytes en macrophages M2 sous l'effet d'IL-4, de TGFβ, d'IL-10 ou IL-13 ce qui favorise la croissance tumorale par le largage de cytokines proangiogéniques telles que VEGF, de chimiokines telles CXCL8 ou CXCL12, d'enzymes de destruction de la matrice extracellulaires. Une synthèse des actions immunomodulatrices des chimiokines et de leurs récepteurs est présentée **tableau 3 et 4** (61).

E/ Chimiokines et adénocarcinome colorectal :

Le rôle des couples chimiokines-récepteurs de chimiokines dans l'apparition et le développement d'une tumeur primitive puis la cascade métastatique, la survie et la prolifération de métastases est primordial. Le mécanisme d'action et de régulation de ces couples est encore largement inconnu.

L'un des récepteurs de chimiokine le plus étudié est CXCR4 associé à l'un de ses ligands Stromal cell derived factor 1 (CXCL12). Plusieurs études ont mis en évidence le rôle important de l'axe CXCR4/CXCL12 dans la progression tumorale et la survie des patients en favorisant la chimiotaxie, l'angiogénèse, la survie et la prolifération cellulaire (73-75). CXCR4 est exprimé par de nombreux types de cellules cancéreuses incluant les cancers de la peau, du sein, de l'ovaire, du colon et du pancréas mais aussi les leucémies aiguës lymphoblastiques et les leucémies myéloïdes chroniques. Des corrélations ont été faites entre augmentation d'expression de CXCR4 et mauvais pronostic en cas de cancer du sein ou du colon (76, 77). Ottaiano et al. ont montré que CXCR4 est hyperexprimé dans les tissus d'adénocarcinome colorectaux et dans les métastases hépatiques en comparaison des tissus de la muqueuse colique normale (78). De façon similaire l'expression de CXCR4 est significativement plus importante au sein d'une tumeur gastrique que dans la muqueuse gastrique normale (79). Les travaux préliminaires au sein de notre équipe avaient montré une surexpression de CXCR4 au sein de cellules tumorales de cancer colique humain HT29 chimiorésistantes (77).

Différents travaux ont montrés que l'expression de CXCL12, par l'intermédiaire de son récepteur CXCR4, régulaît le pouvoir métastatique de tumeurs coliques primitives (80). Ainsi, le rétablissement de l'expression de CXCL12 en culture cellulaire de lignées de cellules de cancer colorectal entraînerait une anoïkis (81). Une diminution d'expression de CXCL12 par les cellules tumorales favoriserait leur migration par l'intermédiaire de gradients locaux de concentration (gradient paracrine). La réaction inflammatoire locale liée à l'évolution tumorale favoriserait, par l'intermédiaire de fibroblastes et de cellules endothéliales de la matrice extracellulaire, la production de CXCL12. Certaines cellules de la tumeur, ayant perdu leur capacité d'expression de CXCL12 mais conservant l'expression de CXCR4, vont acquérir un pouvoir migratoire en suivant un gradient de concentration local de CXCL12 (82-84). Ce phénomène migratoire va favoriser le détachement de la tumeur primitive, la mobilité cellulaire puis l'intravasation vasculaire. Une fois dans le système vasculaire, ces cellules tumorales ne produisant pas de CXCL12, seront attirées par un second gradient de concentration toujours par l'intermédiaire de leurs récepteurs CXCR4 (gradient endocrine). Ces cellules seront attirées vers des organes cibles produisant naturellement de fortes concentrations de CXCL12 tel que le foie, le poumon ou l'os. Une fois dans l'organe cible, les cellules tumorales pourront traverser la paroi endothéliale et migrer dans l'organe en suivant un nouveau gradient de CXCL12 produit par les cellules endothéliales et du microenvironnement (85).

Ces phénomènes de migration, suivant des gradients de concentration de chimiokines, expliquent une partie des phénomènes de spécificité d'organe d'apparition de métastases en fonction, des différents types de cancer (homing métastatique) (61). (**Figure 8**).

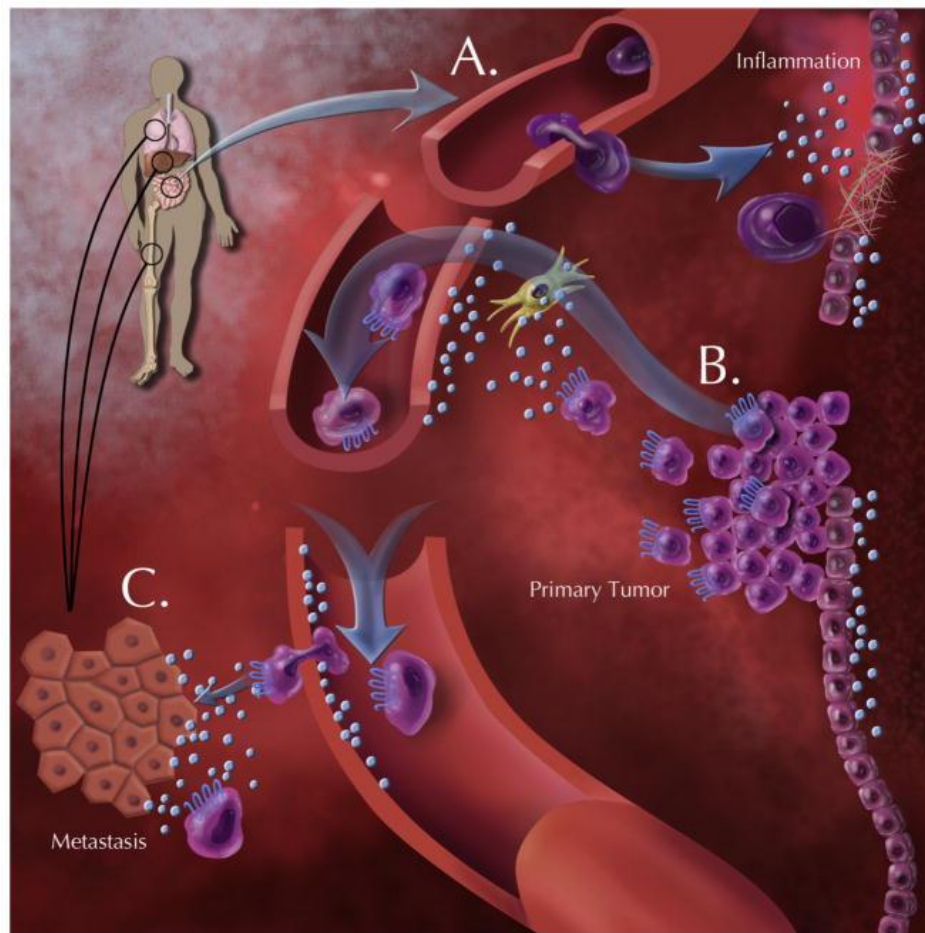


Figure 8: Présentation schématique du fonctionnement des gradients de chimiokines favorisant la migration aberrante de cellules dans un modèle d'épithélium intestinal. (D'après Roy I, Surgery 2014)

A : Augmentation de sécrétion de chimiokines en réaction à une infection locale, une rupture de la barrière épithéliale ou de tout autre stimulus et une réaction inflammatoire. Le gradient de chimiokine local attire les cellules immunitaires vers le site d'inflammation. B : Gradient de concentration de l'axe CXCL12/CXCR4 en cas de cancer colique ou rectal. Les cellules tumorales exprimant CXCR4 mais ayant perdu leur capacité d'expression de CXCL12 suivent un gradient de concentration local de CXCL12 alors produit par des fibroblastes et des cellules endothéliales du microenvironnement. Elles suivent ensuite un autre gradient jusque dans la lumière vasculaire. C : Les cellules tumorales migrent vers des sites distants produisant de façon constitutive de forte concentration de CXCL12. Les cellules traversent les parois vasculaires de ces organes et engendreront des métastases.

L'évolution des travaux et des publications au sein de notre équipe, a fait porter l'attention de nos recherches vers un récepteur de chimiokines ELR+, CXCR2 ainsi que vers ses principaux ligands dont CXCL7 et CXCL8.

IV Le récepteur CXCR2 et ses ligands, CXCL7 et CXCL8

A/ CXCR2 :

Deux récepteurs sont activés par les chimiokines ELR+ : CXCR1 et CXCR2. CXCR1 est activé seulement par CXCL6 et CXCL8. Alors que CXCR2 supporte le signal de toutes les chimiokines ELR+.

L'activation de CXCR2 entraîne la dissociation du complexe protéique hétéro-trimérique $G\alpha\beta\gamma$ en sous-unités α et $\beta\gamma$, qui modulent plusieurs voies de signalisation intracellulaires telles que PI3kinases/AKT ou Ras/Raf/MEK/ERK et p38MAPK qui activent les voies de NF-KB (86). (**Figure 9**). Ces voies de signalisation jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire, la migration et l'inhibition de l'apoptose (87, 88).

Différentes études ont montrés que CXCR2 était le récepteur exclusif modulant la chimiotaxie des cellules endothéliales. Le rôle de CXCR2 dans l'angiogenèse a été initialement mis en évidence à partir de modèles animaux d'angiogenèse sur cornée de rats CXCR2 $-/-$. L'angiogenèse liées aux chimiokines ELR+ était inhibée sur les cornées de rat n'exprimant pas CXCR2 ainsi qu'en présence d'anticorps neutralisant CXCR2 (89). Heidemann et al. ont ainsi montré que les cellules endothéliales réagissaient à la chimiokine CXCL8 par la production rapide d'un réseau de fibres, par une multiplication cellulaire et par la phosphorylation du signal extra cellulaire ERK1/2 (90)

Au vue de ces premiers résultats montrant que CXR2 était suffisant et nécessaire pour relayer l'effet angiogénique des chimiokines ELR+, plusieurs études précliniques concernant le cancer ont été menées (86). Ainsi, à partir d'un modèle murin de cancer du poumon utilisant des souris CXCR2 $-/-$ comparées à des souris CXCR2 $+/+$, il a été montré que des tumeurs du poumon (orthotopiques ou hétérotopiques) des souris CXCR2 $-/-$ présentaient une croissance réduite, une nécrose tumorale plus importante, une angiogénèse tumorale diminuée et un potentiel métastatique réduit. Ces conclusions sur le rôle de CXCR2 dans l'angiogenèse

tumorale étaient confirmées par analyse des tumeurs de souris CXCR2 +/+ traités par anticorps anti-CXCR2 (86, 91).

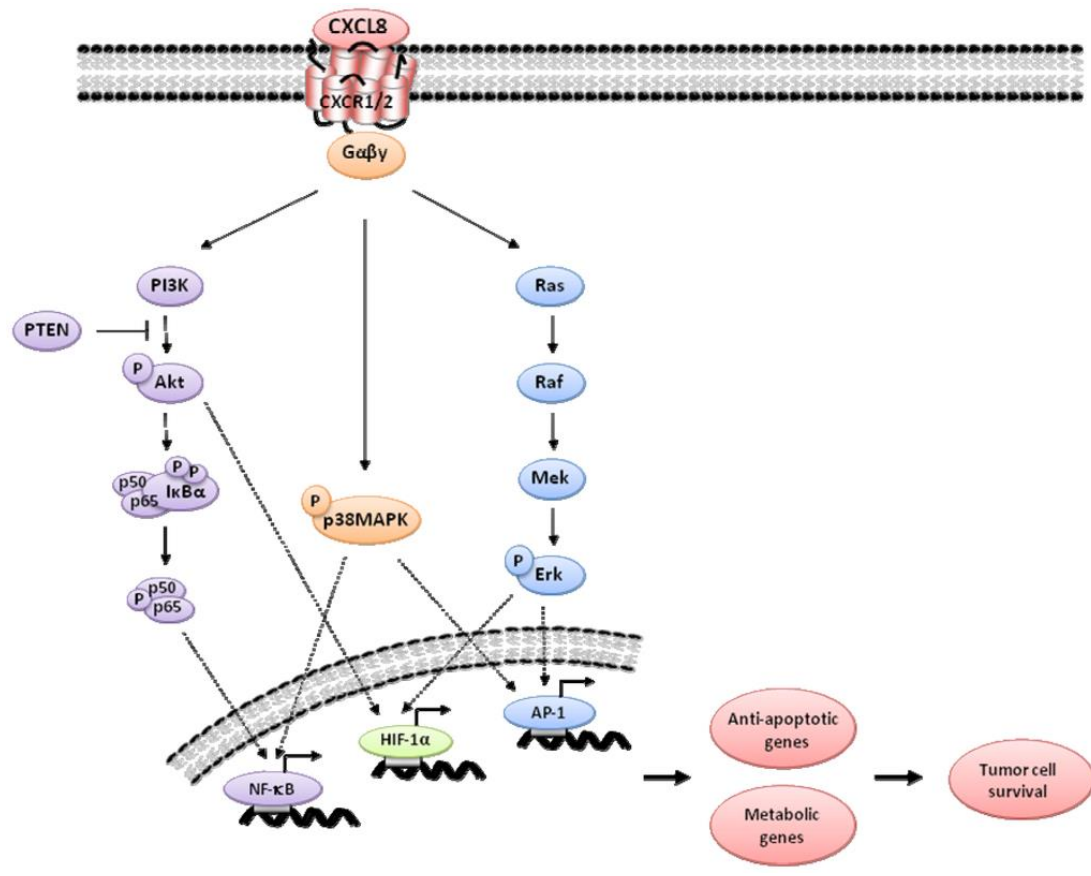


Figure 9 : Voies de signalisation intracellulaire activées par l'intermédiaire de CXCR2 (d'après Laura M. Campbell, Pharmaceuticals 2013).

Ces données ont orientées nos recherches sur le possible rôle de CXCR2 dans le contexte de métastases hépatiques de cancers colorectaux.

B/ CXCL8

La chimiokine ELR+ IL-8 (CXCL8) possède des caractéristiques puissantes de chimiotaxie protumorale et d'activation des neutrophiles par l'intermédiaire des récepteurs CXCR1 et CXCR2. CXCL8 stimule l'angiogenèse par l'intermédiaire de son récepteur CXCR2 (92).

Plusieurs études ont montré que CXCL8 est surexprimé dans les cellules de cancer colorectal ainsi que dans le microenvironnement tumoral par rapport au tissu sain environnant (93). Au sein du tissu tumoral, CXCL8 est principalement localisé au sein des fibroblastes, des neutrophiles et sur les cellules endothéliales, alors que son récepteur est principalement détecté au niveau de la microvascularisation. CXCL8 est également détecté sur les cellules du stroma au niveau du front d'invasion tumoral (94). Par ailleurs, CXCL8 est plus exprimé dans le tissu d'adénocarcinome colorectal que dans le tissu d'adénome colorectal, où il est plus exprimé que dans la muqueuse saine (95). D'autres études ont montré que le niveau d'expression de CXCL8 au sein des adénomes colorectaux était corrélé au niveau de dysplasie (95). Il a également été constaté une expression de CXCL8 plus importante au sein de métastases de cancer colorectaux que dans les tissus correspondants de tumeurs primitives (93). Même si ces données ne sont pas confirmées par toutes les équipes (96), des niveaux élevés de CXCL8 dans le tissu tumoral sont associés aux tailles tumorales, l'importance de l'infiltration, le stade des tumeurs et la présence de métastases hépatiques. Un haut niveau d'expression de CXCL8 dans la tumeur est significativement associé à une diminution de survie globale (61, 93, 97).

CXCL8 joue de multiples rôles dans la progression de l'adénocarcinome colique. Tout d'abord CXCL8 induit la migration des neutrophiles à travers l'endothélium vasculaire par augmentation de l'expression des protéines d'adhésion. CXCL8 va également favoriser l'adhésion des leucocytes sur les cellules tumorales en stimulant l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1(61). De plus CXCL8 favorise la libération d'enzymes proangiogéniques et de dégradation de la matrice favorisant la progression tumorale. CXCL8 pourrait également agir directement comme un facteur autocrine de croissance des cellules tumorales (98). En plus de favoriser le développement de la tumeur primitive, CXCL8 stimulerait la prolifération des cellules cancéreuses par augmentation de l'activité mitotique. L'action chimiotactique de CXCL8 serait en grande partie dépendante des interactions avec les récepteurs CXCR1 mais pas avec CXCR2 (99). La stimulation des capacités d'adhésion des cellules tumorales aux cellules de la matrice, par augmentation des protéines d'adhésion sur les cellules tumorales, serait modulée directement par CXCL8 (99)

Ces données indiquent que la surexpression de CXCL8 favoriserait la croissance tumorale, l'angiogenèse tumorale, la cascade métastatique et la chimiorésistance. CXCL8

pourrait être une cible thérapeutique dans la prise en charge de l'adénocarcinome colorectal métastatique ou non. Nous avons donc décidé d'orienter une partie de nos travaux sur l'implication de CXCL8 (61).

C/ CXCL7

Neutrophil activating protein-2 (NAP-2 / CXCL7) est obtenu par clivage d'un précurseur inactif platelet basic protéine (PBP), synthétisant également deux autres dérivés : connective-tissue activating peptide-III (CTAP-III) et β -tromboglobuline (β -TG). Ce processus de dégradation de PBP pour obtenir CXCL7 est secondaire à la libération de protéases par les monocytes et les neutrophiles. Longtemps, l'expression de CXCL7 semblait limitée aux cellules mégacariocytes (lymphocytes et neutrophiles), mais plusieurs études ont montré que d'autres types de cellules pouvaient produire CXCL7, et notamment des cellules de cancer pulmonaire. CXCL7 serait également un marqueur évolutif au décours de syndrome myélodysplasique (100).

CXCL7 serait également un modulateur du développement des réseaux lymphatiques par la régulation de VEGF-C et VEGF-D qui sont deux facteurs de croissances majeurs des cellules endothéliales lymphatiques (101).

CXCL7 possède, de façon similaire à CXCL8, avec qui il partage le même récepteur CXCR2, une capacité d'attraction des neutrophiles et de libération d'élastase. CXCL7 participe ainsi à la destruction et au remodelage de la matrice extracellulaire et de la membrane basale facilitant l'angiogenèse et la cascade métastatique (102). En conséquence CXCL7, de par ses caractéristiques proangiogéniques et proinflammatoires, pourrait jouer un rôle important dans l'évolution tumorale et le développement de métastases. Crépin et al. ont ainsi montré que le niveau d'expression de CXCL7 était un facteur pronostique indépendant de survie globale dans le carcinome rénal à cellules claires (103).

Il existe très peu de publications dans la littérature concernant le rôle de l'axe CXCR2/CXCL7 comme acteur évolutif en cancérologie (104). Il était donc particulièrement intéressant d'étudier cette chimiokine.

Rationnel du travail

Comme nous l'avons vu en introduction, le cancer colorectal demeure un problème majeur de santé publique avec une survie à 5 ans de 63% tous stades confondus (1). Le foie, premier site métastatique du CCR, sera siège de métastases chez près de la moitié des patients dans les cinq ans qui suivent le diagnostic (3). Une résection en marge saine est le seul traitement actuellement potentiellement curatif en cas de métastases hépatiques de CCR avec une survie à 5 ans dans ce contexte de 36 à 58% (4). Les chimiothérapies adjuvantes à la chirurgie d'exérèse colorectale ou périopératoire à l'hépatectomie font classiquement intervenir des drogues cytotoxiques, à base principalement de 5-FU et de leucovorine associées à de l'irinotecan ou de l'oxaliplatine. Sont également associées des biothérapies (ou thérapies ciblées) telles que le bevacizumab, un anticorps ciblé sur le VEGF, ou le cetuximab, un anticorps anti EGFR (23, 24). En cas de CCR métastatique l'adjonction de bevacizumab à la chimiothérapie conventionnelle à base de 5 FU, a permis une amélioration significative de la survie globale (25).

Quoiqu'il en soit la principale limitation de l'efficacité à long terme des chimiothérapies et thérapies ciblées, outre l'apparition d'effets secondaires à dose souvent cumulative, est l'apparition de résistances aux traitements favorisant la progression tumorale ou la récurrence métastatique.

Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer une résistance au bevacizumab : survie de quelques cellules tumorales produisant, en réaction à l'ischémie induite, un taux important de VEGF-A que les anti-VEGF introduits ne peuvent neutraliser (48) ; mutation du récepteur cible ; sélection de cellules endothéliales résistantes (105)? Une autre possibilité est l'activation de voies alternes à la néoangiogenèse, que celles activées par VEGF. Avec activation et production de facteurs de croissance et de chimiokines telles que PDGF- β , CXCL8, CXCL6, SDF1- α /CXCL12 et d'autres, en interaction avec leurs récepteurs (50). Une dernière hypothèse est la mise en dormance de cellules tumorales par inhibition de l'angiogenèse puis réévolution secondaire de ces cellules.

La conséquence de ces possibles mécanismes de réactivation de la néoangiogenèse sous thérapeutique anti-VEGF est un phénomène d'échappement de la maladie tumorale. Avec prolifération des clones cellulaires tumoraux, et évolution des métastases. La finalité étant l'échec thérapeutique et une diminution de survie des patients.

Plusieurs publications ont mis en évidence le rôle des chimiokines dans la croissance tumorale, la cascade métastatique et la résistance aux chimiothérapies (61, 65, 77). En particulier, le rôle du couple CXCR4/CXCL12 a été démontré en ce qui concerne la

progression tumorale et la survie des patients. CXCR4 favorisant la progression tumorale à plusieurs niveaux de malignité incluant la croissance tumorale, l'angiogénèse, la diffusion métastatique et l'attraction des cellules métastatiques au sein de tissus cibles (ou niches prémétastatiques) riches en CXCL12 (82-84).

Un haut niveau d'expression de CXCL8 au sein de tissu de cancer colorectal a été associé avec un faible niveau de survie globale (97). Le niveau d'expression de CXCR2 est supérieur dans le CCR que dans le tissu adénomateux colique et que dans le tissu muqueux colique normal (93). L'activation de CXCR2 par ses ligands, tels que CXCL8, dans le microenvironnement tumoral pourrait modifier le comportement évolutif des cellules tumorales et favoriser la croissance de la tumeur colorectale primitive et l'évolution métastatique (90, 92, 106). Dans l'adénocarcinome gastrique, il a été montré une relation entre pronostic de la maladie et niveau d'expression de CXCR2 au sein de la tumeur (107). Peu d'études ont été menées sur le rôle de NAP-2/ CXCL7, mais le pronostic du carcinome pancréatique semble lié à son niveau d'expression plasmatique (108).

Nos précédents travaux ont montré qu'un traitement chronique par chimiothérapie, à base de 5-FU, de la lignée cellulaire HT29, issues de cellules de CCR, favorise l'émergence de clones cellulaires surexprimant CXCR4, et que CXCR4 joue un rôle dans la dissémination métastatique. Nous avons également montré la présence de CXCR4 à taux élevé, au sein de métastases hépatiques de CCR, chez des patients opérés et traités par chimiothérapie néoadjuvante (77).

Dans ce travail nous avons étudié l'expression des principales chimiokines et de leurs récepteurs dans une série de prélèvements tumoraux humains de métastases hépatiques issues de patients ayant reçu ou non un traitement par chimiothérapie néoadjuvante ou chimiothérapie anti-VEGF. Nous avons complété nos données par l'analyse d'expression de ces chimiokines et de leurs récepteurs à l'aide d'un modèle murin de xélogreffe sous-cutanées ou intracaecales de cellules humaines de cancer colorectal HT29, chez des individus traités ou non par chimiothérapie ou chimiothérapie anti-VEGF. Notre objectif était de pouvoir rechercher la présence de corrélations éventuelles avec la rechute tumorale, la survie globale et d'analyser l'effet des traitements sur l'expression de ces facteurs.

Matériels et Méthodes

A/ Patients

De Février 2002 à mai 2009, les données cliniques de 55 patients opérés à visée curative, au sein du Service de Chirurgie Digestive et Transplantation (Pr FR Pruvot) du CHRU de Lille, de résection hépatique pour traitement de métastases de cancer colique ou rectal, ont été colligées et intégrées dans notre étude. A partir des pièces opératoires, des échantillons de tumeurs hépatiques ont été recueillis et conservés la banque de cellules et de tissus tumoraux du centre de référence régional en Cancérologie (Tumorotheque du CHRU de Lille - autorisation AC-2013-1847, délivrée par le Ministère français de la Recherche). Avant d'envisager l'utilisation des prélèvements, à visée scientifique, tous les patients ont été interrogés, informés et ont donné leur consentement éclairé par écrit en accord avec le droit français et européen. Notre projet de recherche a été approuvé par le Comité Scientifique de la Tumorotheque du C2RC de Lille.

Les données cliniques et histologiques de ces patients ont été colligées dans une base de données informatisée (Prométhée), à partir des informations disponibles au sein de la Tumorotheque et à partir des dossiers patients. Tous les patients ont eu un suivi régulier avec examen clinique et imagerie abdominale ou thoracique tous les 3 à 6 mois par leur chirurgien référent ou par leur oncologue.

Notre étude a porté sur 58 prélèvements de métastases hépatiques. Cinquante-deux prélèvements provenaient de patients différents. Deux biopsies indépendantes étaient prélevées chez deux patients avant et après chimiothérapie néoadjuvante. Pour un dernier patient, deux prélèvements étaient réalisés sur des métastases différentes et distantes. Pour chaque pièce post-opératoire, plusieurs fragments étaient prélevés après fixation de la pièce et inclus en paraffine pour une analyse anatomopathologique conventionnelle.

Après analyse histologique des prélèvements de métastases hépatiques, la proportion moyenne de nécrose tissulaire était de $30.8 \pm 25.9\%$. La proportion moyenne de cellules tumorales au sein du tissu tumoral était de $88.4 \pm 16.7\%$. (**Tableau 5**).

Pour les patients qui ont reçu une chimiothérapie avant la résection hépatique, le protocole de chimiothérapie incluait de la capecitabine seule ou du 5 Fluoro-uracile et de

l'acide folinique associés ou non avec de l'oxaliplatine (FOLFOX), de l'irinotecan (FOLFIRI), ou de l'irinotecan et du bevacizumab (FOLFIRI-bevacizumab).

	Nombre de patients	%
Origine du prélèvement hépatique (n=58)		
Tumorectomie/ segmentectomie	26	44.8
Hépatectomie droite	22	38
Hépatectomie gauche	5	8.6
Hépatectomie majeure	5	8.6
Chimiothérapie néoadjuvante (n=34)		
FOLFOX ou capécitabine	19	55.9
FOFIRI	2	5.9
FOLFIRI et bevacizumab	13	38.2
Chimiothérapie néoadjuvante avec bevacizumab (n=58)		
oui	13	22.4
non	45	77.6
Survie, mois, Moy. ± Ecart-type		
Délai entre colectomie et hépatectomie	21.54 ± 21.85	
Survie globale après hépatectomie	58.20 ± 3.10	
Survie sans récurrence après hépatectomie	26.2 ± 2.08	
Durée de suivi après hépatectomie	60.95 ± 20.76	
Statut tumoral à date de fin		
Rémission	28	48.3
Métastatique	30	51.7
Caractéristiques anatomopathologiques, %, moy. ± Ecart-type		
Nécrose au sein du prélèvement hépatique (n=47)	30.8 ± 25.9	
Tissu tumoral au sein du prélèvement hépatique (n=47)	88.4 ± 16.7	

Tableau 5 : Données clinicopathologiques et histologiques des prélèvements hépatiques métastatiques provenant des hépatectomies (n=58).

B/ Modèle murin de xénogreffes tumorales sous-cutanées :

Le développement du modèle murin de xénogreffes sous-cutanées sur souris SCID a été élaboré et suivi en collaboration étroite avec Monsieur Patrick Dumont de l'Institut Biologie de Lille (IBL, Lille). Les manipulations et le suivi des souris ont été effectués au sein de l'animalerie du Centre Pasteur de Lille. Ces expérimentations ont été réalisées dans le

respect des règles en vigueur concernant la bioéthique animale. L'ensemble des intervenants (S. Truant, P. Dumont) sur notre protocole, au sein de l'animalerie, possèdent le diplôme de niveau 1 en expérimentation animale.

1/ Lignée cellulaire :

Nous avons utilisé la lignée HT-29 issue d'un adénocarcinome colique humain peu différencié. Ces cellules sont mises en culture dans une atmosphère à 37°C enrichie en CO₂ (10%). Le milieu de culture (D-MEM à 4,5 g/L de glucose, supplémenté par 10% de SVF et 1% de glutamine) est changé quotidiennement. Les cellules sont réensemencées chaque semaine après traitement du tapis cellulaire par une solution de trypsine-EDTA. La viabilité cellulaire est vérifiée par l'absence de cellules en suspension et l'utilisation d'un colorant d'exclusion- le bleu Trypan- lors de la numération.

L'inoculum est constitué de 1 million de cellules HT-29 pour réaliser une xélogreffe.

2/ Les souris :

Les souris utilisées sont des souris SCID de fond génétique CB17/lcr-Prkdc scid/Crl (CB17/lcr) immunodéficientes en cellules B et T, élevées en macro-isolateurs au sein de l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille. Les souris sont âgées de 8 semaines environ au moment de l'inoculation.

3/ L'inoculation :

L'injection d'un inoculum d'environ 1 million de cellules HT-29 est réalisé directement en sous-cutané, dans les flancs droit ou gauche de souris SCID immunodéprimées.

Il s'en suit une phase de surveillance, d'une durée de 3 semaines, permettant une croissance tumorale jusqu'à obtention d'un volume tumoral satisfaisant d'environ 1 cm³. Il est veillé à ne pas laisser une tumeur évoluer jusqu'à atteindre le stade de nécrose cutanée. En tel cas les règles d'éthiques sur l'expérimentation animale imposent le sacrifice (euthanasie) de l'individu concerné.

4/ Traitement :

Le recueil des mesures (poids, taille et aspect tumoral) et l'administrations des chimiothérapies par voie intra-péritonéale est réalisée aux J1, J5, J9 et J13.

Au total, 36 souris SCID sont utilisées et divisées en 6 groupes de 6 individus.

- 6 souris, témoins
- 6 souris, 5 FU seul
- 6 souris, irinotécan seul
- 6 souris, 5FU + irinotécan
- 6 souris, bevacizumab seul
- 6 souris, 5 FU+ irinotécan+bevacizumab

Le sacrifice des individus est réalisé à J21 du début de la chimiothérapie, par dislocation cervicale. Des prélèvements tumoraux sont effectués des biopsies envoyés pour analyses anatomo-pathologiques et immunohistochimiques. Des fragments tumoraux sont conservés à – 80°C pour évaluation de l'expression par qRT-PCR des gènes d'intérêts.

C/ Modèle murin de xénogreffes tumorales intracaecales orthotopiques :

Le principe de la xénogreffe intracæcale est l'obtention d'une tumeur caecale d'origine colorectale.

Dans un premier temps des xénogreffes sous-cutanées sont réalisées dans les flancs droits et gauches de souris immunodéficientes SCID âgées d'environ 8 semaines, en utilisant un inoculum d'environ 1 million de cellules HT29 selon des modalités similaires au protocole de xénogreffes sous-cutanées. Après une période de surveillance de 21 jours permettant l'obtention de tumeurs sous-cutanées d'environ 1 cm³, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les tumeurs sont alors immédiatement prélevées. Les zones d'aspect nécrotique sont supprimées et les tumeurs sont fragmentées en morceaux de 5X5 mm.

Ces fragments tumoraux sont alors immédiatement xénogreffés de façon orthotopique, par laparotomie, dans le caecum d'un nouveau groupe de souris SCID âgées de 8 semaines environ. L'anesthésie générale de chacun des individus est réalisée par administration de

kétamine (100 mg/Kg) et de xylazine (10 mg/Kg) diluée dans une solution de sérum salé et administrée en intrapéritonéal à 0.1 mL/10g.

Après une période de surveillance de 24 jours, de la croissance tumorale, par palper abdominal bidigital, jusqu'à obtention d'un volume tumoral satisfaisant (1cm³ environ), les souris survivantes sont réparties de façon aléatoire en deux groupes (contrôle et chimiothérapie).

La chimiothérapie et le bevacizumab sont administrés en injections intrapéritonéales en deux cycles séparés par une semaine (injections aux jours 1,5,9,13,16 puis jours 22,26,30,33. Dans le groupe contrôle, une solution saline est injectée en intrapéritonéal selon les mêmes modalités.

- Groupe 1 (groupe contrôle) : . 4 individus.
. Injections de sérum salé.

- Groupe 2 (groupe chimiothérapie) : .6 individus.
. 5FU (40 mg/kg) + Irinotecan (40 mg/kg) + acide folinique (50 mg/kg) + bevacizumab (5 mg/kg).

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale au 35^{ème} jour. Les tumeurs intracaecales sont prélevées puis des fragments tumoraux sont fixés puis inclus en paraffine pour analyse anatomopathologique et immunohistochimique. D'autres fragments tumoraux sont conservés dans l'azote liquide à -80°C en vue d'une analyse d'expression de gènes d'intérêts par qRT-PCR.

D/ Biologie moléculaire :

1/ Protocole d'extraction des ARN totaux :

Les ARN totaux issus de broyages de tissus congelés sont extraits en utilisant le kit *NucleoSpin RNA Midi* (Macherey Nagel, Düren, Allemagne) selon le protocole proposé par le fournisseur.

Les tissus sont broyés au putter puis, après avoir retiré le milieu par aspiration et lavé le broyat avec du D-PBS 1X stérile, les tissus sont repris par 350 µl de tampon RA1 contenant 1 % (v/v) de β-mercaptoéthanol.

Le lysat est clarifié de ses débris cellulaires en le filtrant avec la colonne *NucleoSpin® Filter*. Celle-ci est centrifugée 1 min à 11 000 x g.

Les acides nucléiques présents dans l'éluat sont précipités par 1.8 mL d'éthanol à 70 % (v/v), l'ensemble est homogénéisé jusqu'à disparition du trouble. Ce mélange est transféré dans une colonne comprenant une membrane de silice (*NucleoSpin® RNA II Column*) puis est centrifugé 30 s à 11 000 x g. Cette étape permet la fixation des acides nucléiques sur la membrane. La membrane est ensuite lavée pour éliminer les sels par 2.2 mL de tampon *Membrane Desalting Buffer* (MBD) puis centrifugée 1 min à 11 000 x g.

Afin de digérer l'ADN contaminant, la rDNase fournie est diluée (1/10) dans le tampon fourni (*Reaction Buffer for rDNase*), puis 250 µl du mélange sont ajoutés sur la membrane. L'ensemble est incubé pendant 15 min à Température ambiante. 2.6 mL de tampon RA2 sont alors utilisés pour interrompre la réaction. Le liquide est éliminé par centrifugation à 11 000 x g pendant 30 s.

La membrane est ensuite lavée par 2.6 mL de tampon RA3, centrifugée 30 s à 11 000 x g et lavée une dernière fois par 2.6 mL de tampon RA3 et centrifugée 2 min à 11 000 x g.

La colonne est transférée sur un tube de 1,5 ml et 500 µl d'eau RNase-free sont déposés au centre de la membrane. Les ARN sont élués par une centrifugation de 1 min à 11000 x g.

La concentration des ARN (mesurée à 260 nm, avec 1 unité de DO = 40 µg/ml pour l'ARN ou 50 µg/ml pour l'ADN) et la qualité des échantillons (mesurée par le calcul des rapports A_{260nm}/A_{280nm} et A_{260nm}/A_{230nm}) sont déterminées par analyse sur spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). L'absorbance à 280 nm est spécifique des acides aminés aromatiques (Tryptophane > Tyrosine), le rapport A_{260nm}/A_{280nm} permet de mesurer la contamination par les protéines. Ces rapports doivent être compris entre 1,8 et 2 pour une qualité optimale. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2/ Rétro-transcription des ARNm :

Les ADN complémentaires (ADNc), sont synthétisés à partir de 1 µg d'ARN totaux dans un volume total de 14 µl complété par de l'eau RNase-free.

Les ARN messagers sont spécifiquement rétro-transcrits en ajoutant 1 µl (35 µg/ml) d'oligonucléotides composés de 15 résidus de désoxythymidine (oligo(dT)₁₅; Promega) s'hybridant au niveau de la queue polyadénylée des ARNm. Les structures secondaires sont dénaturées en incubant 5 min à 70 °C dans un bain-Marie et en refroidissant ensuite dans la glace quelques minutes. L'ensemble est récupéré en centrifugeant brièvement.

Le mélange réactionnel (25 µl) préparé contient :

Eau stérile <i>nuclease-free</i>	16,5 µl
dNTP (20mM ; Eurogentec)	2,5 µl
Tampon M-MLV RT 5X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl ₂ 3 mM; DTT 10 mM; Promega)	5 µl
Rétro-transcriptase (200 U ; Promega)	1µl

La rétro-transcription est démarrée en incubant les tubes dans un bain-Marie à 42 °C pendant 1 h. L'arrêt de la synthèse d'ADNc se fait par dénaturation à 94 °C pendant 5 min puis refroidissement pendant quelques minutes sur glace avant une centrifugation rapide.

Chaque tube est complété par 60 µl d'eau stérile (volume final = 100 µl) puis stocké à -80 °C.

3/ Polymerase Chain Reaction (PCR) :

a/ Amplification :

L'expression de transcrit de gènes d'intérêt dans les tissus, issus de patients ou de xéno greffes sur souris SCID, a été étudiée par PCR quantitative (qRT-PCR).

Pour une amplification optimale, les amorces doivent avoir une taille comprise entre 20-25 pb avec une température d'hybridation (T[°]m) proche et un pourcentage en bases

Guanine et Cytidine (GC) entre 40-60 %. L'absence de structure secondaire est vérifiée grâce au site : <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>

Le mélange réactionnel (25 µl) se compose :

Eau stérile <i>nuclease-free</i>	13,5 µl
Tampon enzyme 10X (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl ₂ 15 mM; Roche Diagnostic)	2,5 µl
dNTP (20 mM ; Eurogentec)	1 µl
Amorce sens 5 µM (MWG ou Eurogentec)	1 µl
Amorce anti-sens 5 µM (MWG ou Eurogentec)	1 µl
Taq DNA Polymérase (250 U ; Roche Diagnostic)	1 µl
ADNc	2,5 µl

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur en suivant le programme de base suivant :

1 cycle	n cycles			1 cycle	
94°C	94°C	T ^m (°C)	72°C	72°C	8°C
2 min	45 s	1 min	1 min	10 min	∞

A la fin du programme, les tubes sont récupérés et peuvent être conservés à 4 °C.

b/ PCR quantitative : SYBR® Green

b.1. Principe et mise au point

Pour les qRT-PCR nous utilisons la technologie SYBR® Green. L'ajout d'un intercalant fluorescent (intercalant spécifique de l'ADN double brin) dans le mélange réactionnel permet de mesurer à chaque cycle la quantité d'ADN amplifiée. Lors de l'analyse,

un seuil de détection est déterminé (*Ct*: *Cycle threshold*) correspondant à la valeur d'expression du gène pour l'échantillon. Cette valeur *Ct* permettra de comparer l'expression du gène entre échantillons après normalisation par la valeur *Ct* des gènes de référence, la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1). Le choix des amorces est crucial et doit suivre plusieurs règles :

- Taille de l'amorce comprise entre 10-20 pb
- Taille de la séquence amplifiée entre 50-200 pb
- Température d'hybridation entre 58/60 °C (le $T^{\circ}m$ des amorces ne doit pas différer de plus de 2°C).
- Un pourcentage en GC entre 20-80 % en ayant au maximum 5 résidus Guanine en 3' de l'amorce.
- Un minimum de structures secondaires : <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>

Pour chaque couple d'amorce deux paramètres doivent être déterminés :

- La concentration optimale en ADNc à utiliser, qui doit permettre d'obtenir une valeur seuil *Ct* comprise entre 25 et 35 pour les échantillons d'intérêt.
- L'efficacité d'amplification (E), qui traduit la quantité d'amplicon obtenue à chaque cycle à partir d'un brin matrice. Dans les conditions optimales, un brin matrice donne 2 amplicons ($E = 100\%$). Cette efficacité doit être la même pour tous les échantillons étudiés pour un même gène.

Pour cela, une gamme de concentration en ADNc est préparée pour chaque couple d'amorce à tester, en réalisant une dilution en cascade dans de l'eau stérile, suivant les concentrations : 1:1, 1:10, 1:100 et 1:1000. Chaque condition est réalisée en triple.

L'analyse des résultats avec le logiciel CFX Manager™ permet de sélectionner la dilution optimale des ADNc ainsi que d'obtenir une courbe standard de chaque échantillon permettant de déterminer l'efficacité grâce à la pente de la courbe.

b.2. Amplification

Les amplifications sont réalisées dans une plaque à 96 puits à fond transparent en utilisant le mélange réactionnel SsoFast™ EvaGreen® (Bio-Rad), en utilisant le protocole décrit ci-dessous (volume par puits = 20 µl). Chaque échantillon est réalisé en triple.

Eau stérile <i>nuclease-free</i>	6 µl
SsoFast™ EvaGreen® 2X (Bio-Rad)	10 µl
Amorce sens 5 µM (MWG ou Eurogentec)	1 µl
Amorce anti-sens 5 µM (MWG ou Eurogentec)	1 µl

Dans chaque puits, 18 µl du mélange réactionnel et 2 µl d'ADNc sont disposés.

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur C1000™ Thermal cycler avec le bloc CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad) en suivant le programme de base suivant :

1 cycle	45 cycles		Courbe de dissociation
95 °C	95 °C	T ^m °C	50 → 95 °C (incrément 0,5°C)
30 s	4 s	4 s	2 s

A la fin du programme, une courbe de dissociation est réalisée permettant de visualiser la spécificité de l'amplification. Les amplicons sous forme double brin (fluorescent avec l'intercalant SYBR Green) sont progressivement chauffés. La perte de la fluorescence traduit alors la dissociation des brins d'ADN. La température de dissociation est dépendante de la taille et la nature de l'amplicon et est donc spécifique. L'analyse de la courbe doit se traduire par une seule chute de fluorescence ou par un seul pic de fluorescence.

Les séquences des amorces et les conditions utilisées sont indiquées dans les tableaux 6 et 7. Les gènes GAPDH et HPRT1 sont utilisés comme contrôle interne.

Gènes	Amorces (5' → 3')	Température d'hybridation (°C)
hCXCL7	Sens GGCTTCCTCCACCAAAGGAC	58
	Antisens TCTTTGCCTTTTCGCCAAGTT	
hCXCL8	Sens GCCGTGGCTCTCTTGGC	58
	Antisens ACCTTCACACAGAGCTGCAGAA	
hCXCR2	Sens GCCCTGCCCATCTTAATTCTAC	58
	Antisens ACCCTCAAACGGGATGTATTGT	
hCXCR4	Sens GACTGGCATAGTCGGCAATG	58
	Antisens AGAAGGGGAGTGTGATGACAAA	
GAPDH	Sens CCACATCGCTCAGACACCAT	58
	Antisens CCAGGCGCCCAATACG	
HPRT1	Sens CTCAACTTTAACTGGAAAGAATGT	58
	Antisens TCCTTTTCACCAGCAAGC	

Tableau 6: Séquences des amorces utilisées pour la qRT-PCR sur métastases hépatiques humaines d'adénocarcinomes colorectaux. (h : humain).

Gènes	Amorces (5' → 3')	Température d'hybridation (°C)
mcxcl7	Sens CTCAGACCTACATCGTCCTGC	61
	Antisens TTTCCAGCTGTAAGGGGAGCCA	
mcxcr2	Sens GCCCTGCCCATCTTAATTCTAC	60
	Antisens ACCCTCAAACGGGATGTATTGT	
mcxcr4	Sens GACTGGCATAGTCGGCAATG	59
	Antisens AGAAGGGGAGTGTGATGACAAA	
GAPDH	Sens CCACATCGCTCAGACACCAT	58
	Antisens CCAGGCGCCCAATACG	
HPRT1	Sens CTCAACTTTAACTGGAAAGAATGT	58
	Antisens TCCTTTTCACCAGCAAGC	

Tableau 7: Séquences des amorces utilisées pour la qRT-PCR sur prélèvements murins (souris SCID) de tumeurs sous-cutanées et caecales développées à partir de xénogreffes de cultures de cellules HT-29 d'adénocarcinome colique d'origine humaine. (m : murin).

Pour l'analyse de nos gènes d'intérêts en qRT-PCR, à partir du modèle murin de xénogreffes, nous avons utilisé des amorces d'origines humaines qui permettent une analyse des cellules tumorales d'origine humaine, et des amorces d'origine murine qui permettent une analyse du stroma tumoral et péri-tumoral d'origine murin.

b.3. Analyse des résultats

Un plan de plaque est établi dans le logiciel d'analyse CFX Manager™ (Bio-Rad) (File>New>Plate) en sélectionnant les puits contenant les échantillons, le type d'échantillon, le type de fluorescence et le nombre de répliques.

Les résultats sont récupérés sous format électronique (.zpcr) dans l'appareil et traités avec le logiciel en sélectionnant le plan de plaque précédemment préparé. Celui-ci va automatiquement éditer les résultats et donner pour chaque puits le Ct correspondant. Le seuil de détection peut être ajusté en s'assurant qu'il soit toujours au-dessus du bruit de fond et dans la zone d'amplification exponentielle.

Les variations d'expression d'un gène entre plusieurs échantillons sont calculées en trois phases :

Normalisation : $\Delta Ct = Ct_{\text{gène intérêt}} - Ct_{\text{gène rapporteur GAPDH}}$

Comparaison : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon traité}} - \Delta Ct_{\text{échantillon contrôle}}$

Ecart : $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Le groupe contrôle, en vue de l'analyse des résultats de qRT-PCR, a été constitué à partir des individus n'ayant jamais reçu de chimiothérapie au cours de leur histoire, ni adjuvante à la résection de la tumeur colique ou rectale primitive, ni néoadjuvante à l'hépatectomie.

Pour le modèle murin les groupes contrôles sont constitués à partir des individus non traités par chimiothérapie après xénotransgreffe.

Dans notre protocole les résultats d'expression de gènes d'intérêts sont exprimés en se référant aux individus qui n'ont pas reçu de chimiothérapie : Les résultats du groupe contrôle sont moyennés et ramenés à 1 en vue de comparaison de l'expression de gènes des individus ayant reçu une chimiothérapie.

E/ Immunohistochimie :

Les analyses immunohistochimiques étaient réalisées sur coupes de 4 µm d'épaisseur obtenues à partir des blocs en paraffine. L'étude était conduite sur un automate Benchmark XT (Ventana, Strasbourg, France). Après inhibition des peroxydases endogènes et marquages, les sections de tissus étaient incubées avec un anticorps polyclonal de souris anti CXCR2 ou

de lapin anti CXCL7 durant 36 mn. Le produit de la réaction était visualisé par incubation avec du DAB (colorant en marron les sites d'immunoréactivité) pour les tissus murins et avec des phosphatases alcalines (coloration rouge) pour les tissus hépatiques issus de patients. Une contre-coloration a été effectuée avec de l'hématoxyline Harris. Les contrôles négatifs consistaient en des sections similaires, traitées sans l'anticorps primaire. Et les contrôles externes positifs consistaient à marquer CXCR2 et CXCL7 sur des sections de muqueuse colique normale.

L'analyse histologique était réalisée par deux observateurs. Les cellules étaient considérées comme positivement marquées si un marquage cytoplasmique ou membranaire était présent. Pour chaque échantillon, la proportion de cellules tumorales marquées positivement et l'intensité du marquage étaient analysées, et étaient catégorisées en quatre classes semi-quantitatives : 0 négatif, + faible, ++ modéré, +++ important. La périphérie, le centre de la tumeur et le tissu normal environnant étaient étudiés.

Les anticorps utilisés étaient :

- CXCR2 (souris) de chez R et D Systems. Référence : MAB331. Lot n°AKT0310011. Essais de dilution de 1/20 à 1/60.
- CXCL7 (lapin) de chez Antibodies on line, Atlanta, GA30346, United states. Référence :ABIN359713. Lot n°SH080324H. Essais de dilution de 1/10 à 1/40.

1/ Protocole d'immunohistochimie (IHC) sur métastases hépatiques :

Cinq patients présentant des niveaux d'expressions de CXCR2 élevés en qRT-PCR au sein des métastases hépatiques de cancers colorectaux, et présentant un faible taux de nécrose tumorale parmi les patients traités en néoadjuvant par une association de Folfiri-bevacizumab, ont été sélectionnés.

De la même façon, cinq patients présentant des niveaux d'expression de CXCR2 faibles parmi les patients jamais traités par chimiothérapie (groupe contrôle) et présentant un faible taux de nécrose tumorale ont également été sélectionnés

Une analyse immunohistochimique a été réalisée sur les échantillons de métastases hépatiques ces deux groupes de cinq patients.

2/ Protocole d'immunohistochimie (IHC) à partir du modèle murin :

Des prélèvements de tumeurs issus des xéno greffes intracaecales sur souris SCID ont été analysés en IHC de façon similaire aux échantillons de métastases hépatiques humaines. Les tumeurs intracaecales étaient obtenus par xéno greffes de fragments de tumeurs issues de greffes sous-cutanées de cultures de cellules HT29 sur souris SCID.. Ces fragments de tumeurs intracaecales ont été obtenus à partir des deux groupes de souris SCID soumises ou non à un traitement par chimiothérapie.

F/ Analyse statistique :

Les analyses statistiques ont été réalisées en étroite collaboration avec le département de Biostatistiques EA2694 de l'Université de Lille Nord de France au sein du CHRU de Lille.

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm déviation standard, médiane, maximum et minimum pour les variables continues et en fréquence et pourcentage pour les variables catégorielles.

La survie sans récurrence après hépatectomie était définie comme la durée entre la date d'hépatectomie et la date de dernière nouvelle ou de récurrence. Aucun patient n'est décédé

avant la récurrence tumorale. La survie globale était calculée comme la durée entre la date d'hépatectomie et la date de dernière nouvelle ou de décès.

Les comparaisons de pourcentages ou fréquences étaient réalisées en utilisant le test du Chi² ou le test de Fisher.

Pour les paramètres continus, l'hypothèse de normalité était testée par le test Shapiro-Wilk. Pour les paramètres continus avec une distribution normale, la comparaison de groupes était réalisée en utilisant le t-test de Student ou le test ANOVA. Dans les autres cas nous avons utilisé le U-test de Mann-Whitney ou le test de rang de Kruskal-Wallis.

Les courbes de survie sans récurrence et de survie globale étaient estimées en utilisant la méthode de Kaplan-Meier (survies actuarielles) et comparées, en fonction des groupes, en utilisant le test du Log-rank. Pour les paramètres continus, nous avons utilisé le modèle à risque proportionnel de Cox et les rapports de risque étaient calculés avec un indice de confiance de 95%.

Les paramètres suivants étaient testés pour leur association avec la survie en analyse bivariée : expression de gènes d'intérêts en qRT-PCR, traitements par chimiothérapie, facteurs de confusion (T,N,M, localisation de la tumeur primitive colorectale, résection hépatique synchrones ou non à la colectomie, âge au moment de la chirurgie colorectale, caractère synchrones ou métachrones des métastases hépatiques, chimiothérapie administrée dans un délai supérieur à 6 mois avant hépatectomie. Quand un lien significatif entre survie et paramètre d'expression de gène en qRT-PCR était constaté, nous avons identifié un cut-off optimal afin de maximiser le rapport de risque. Les variables quantitatives étaient dichotomisées par identification du cut-off qui maximisait le test du log-rank.

Le modèle multivarié de régression de Cox était utilisé afin d'analyser les relations entre survie et traitements après ajustement sur d'autres paramètres en lien avec la survie. Les paramètres inclus dans cette analyse multivariée étaient les paramètres avec un $p < 0.05$ en analyse bivariée.

Un $p < 0.05$ était considéré comme statistiquement significatif. Toutes les analyses statistiques étaient réalisées en utilisant le logiciel SAS (SAS institute Inc., Cary, NC, USA).

Résultats

Partie I : Patients

Objectifs de l'étude :

Plusieurs travaux ont montré l'implication de voies de signalisation associées aux chimiokines et à leurs récepteurs dans le développement tumoral, la dissémination métastatique et la chimiorésistance, en particulier l'axe SDF1/CXCR4 et IL8/CXCR2. Les travaux antérieurs de l'équipe avaient montré la surexpression de CXCR4 et d'un ligand non canonique, MIF, dans les cellules tumorales coliques chimiorésistantes. MIF est un ligand potentiel pour les récepteurs CXCR4 et CXCR2. Ainsi, le but de notre étude a été de comparer ces gènes ainsi que d'autres ligands et récepteurs associés sur des prélèvements de tumeurs issues de patients atteints du cancer du côlon.

Nous avons réalisé notre étude sur une collection de métastases hépatiques de cancers colorectaux issues de patients ayant reçu ou non une chimiothérapie néoadjuvante. Le but était d'étudier s'il existait une corrélation entre l'expression de ces gènes et la récurrence et la survie, et si le traitement par chimiothérapie jouait un rôle dans la régulation de ces gènes.

A/ Analyse de population :

L'âge moyen au moment de la résection de la tumeur primitive était de 61±10.6 ans. La localisation de la tumeur primitive était colique droite ou transverse dans 10 cas, colique gauche dans 28 cas et rectale dans 17 cas. De nombreux patients (38 sur 55 ; 69.1%) ont reçu une chimiothérapie adjuvante après la résection de la tumeur primitive (**Tableau 8**).

En ce qui concerne les 58 prélèvements de métastases hépatiques, 34 (58.6%) provenaient de patients traités en préopératoire par un protocole FOLFOX ou par de la capécitabine seule (n=19 ; 55.9%), par un protocole FOLFIRI (n=2 ; 5.9%), ou par un protocole FOLFIRI associé à du bevacizumab (n=13 ; 38.2%).

	Nombre de patients	%
Age au moment de la colectomie, années (Moy. ± Ecart-type)	61± 10.6	
Genre (n=55)		
Homme	38	69.1
Femme	17	30.9
Infiltration pariétale de la tumeur primitive, pT (n=50)		
T1+T2	8	16.0
T3	34	68.0
T4	8	16.0
Statut ganglionnaire de la tumeur primitive, pN (n=50)		
N0	25	50.0
N1 + N2	25	50.0
Statut métastatique de la tumeur primitive, pM (N=55)		
M0	34	61.8
M1	21	38.2
Hépatectomie synchrone de la colectomie (N=55)		
Oui	8	14.5
Non	47	85.8
Chimiothérapie adjuvante à la colectomie (n=55)		
Oui	38	69.1
Non	17	30.9

Tableau 8 : Données clinicopathologiques des patients présentant des métastases hépatiques d'adénocarcinome colorectal après chirurgie colique ou rectale. (n=55)

Le suivi moyen après hépatectomie était de 60.9 ± 20.8 mois. La moyenne de survie globale après hépatectomie à visée curative était de 58.2 ± 3.1 mois, et la moyenne de survie sans récurrence était de 26.2 ± 2.1 mois (**Tableau 5 – Figure 10**). Un patient est décédé de péritonite post-opératoire après la résection hépatique et a été exclu de l'analyse de survie.

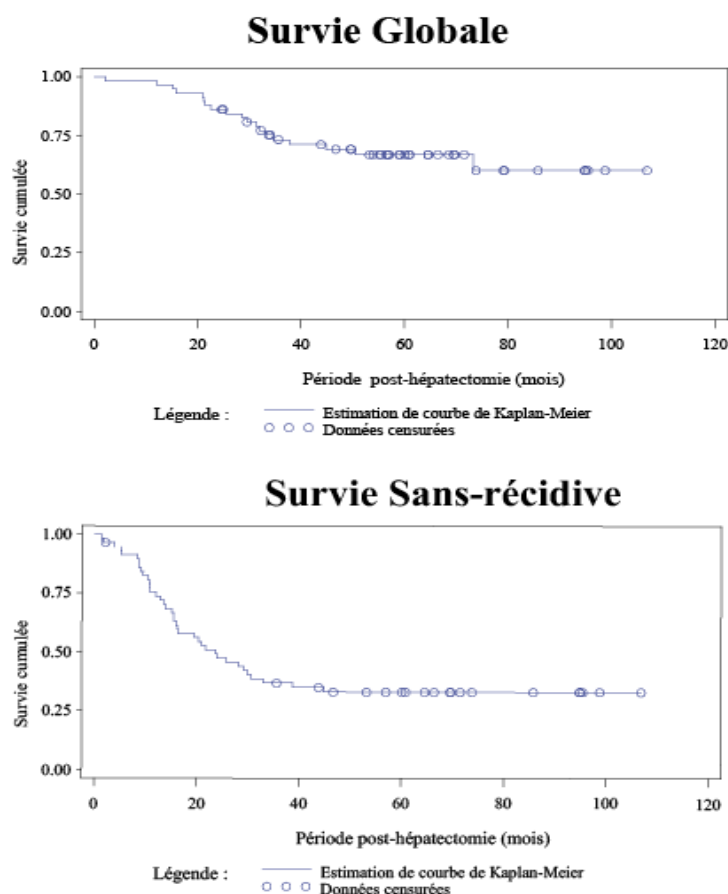


Figure 10 : Survie globale et sans-récidive des patients, après hépatectomies à visée curative pour métastases hépatiques de cancer colorectaux.

L'administration de chimiothérapie néoadjuvante ne modifiait pas significativement la survie globale de nos patients : 44 ± 2.63 mois dans le groupe sans chimiothérapie ($n=24$) versus $57,83 \pm 34$ mois dans le groupe chimiothérapie ($n=34$), ($p=0.65$). Par contre la survie sans récurrence était significativement meilleure, 25.8 ± 1.92 mois, dans le groupe sans chimiothérapie par rapport au groupe chimiothérapie néoadjuvante, 22.58 ± 2.71 mois, ($p=0.02$). (**Figure 11**). Les thérapeutiques de chimiothérapies néoadjuvantes étaient administrées dans les cas les plus sévères qui auraient certainement présenté une moindre survie sans traitement néoadjuvant.

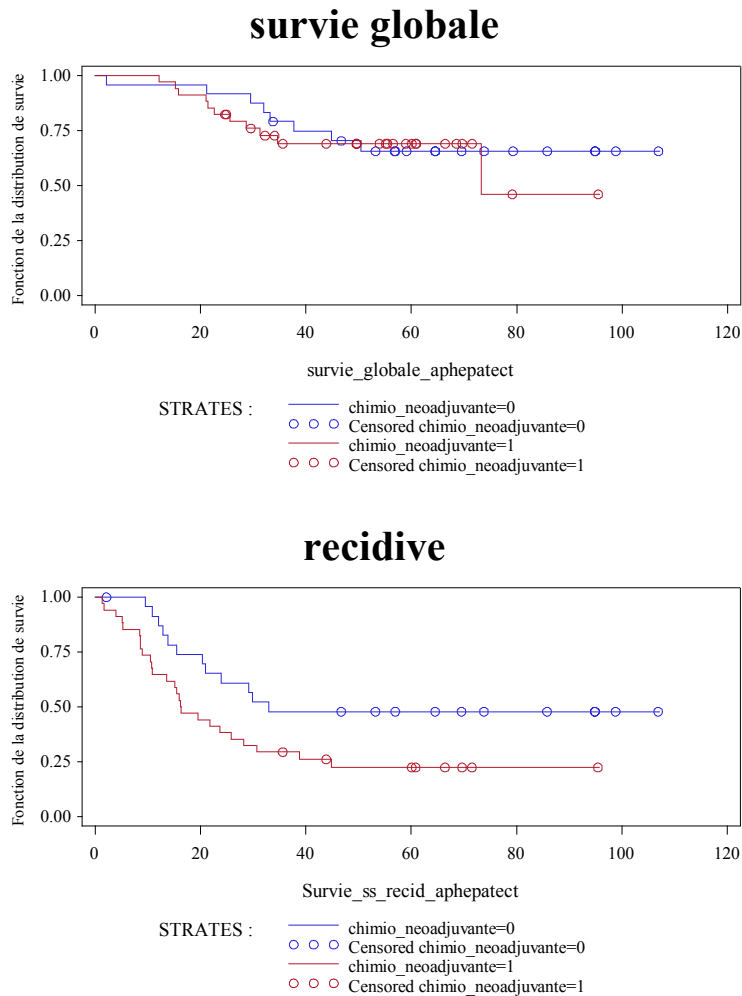


Figure 11 : Survie globale et sans récurrence des patients, après hépatectomies à visée curative pour métastases hépatiques selon administration ou non de chimiothérapie néoadjuvante. (Courbe bleue : pas de chimiothérapie, courbe rouge : chimiothérapie).

B/ Expression des chimiokines et récepteurs de chimiokines : étude de corrélation avec la survie globale et survie sans récurrence sur la population totale :

Nous avons débuté notre travail par une comparaison de survie en fonction des niveaux d'expression en qRT-PCR des différents gènes d'intérêts sélectionnés. Nous avons ainsi analysés l'expression des récepteurs CXCR2 et CXCR4 ainsi que leurs principaux

ligands, à savoir CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 et CXCL12 et Macrophage Inhibitory Factor (MIF).

Les niveaux d'expression de CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6, CXCL12 et MIF ont été testés en relation avec la récurrence et la survie. Leur expression n'amenant pas de modification de survie ou de résultats exploitables intéressants, ils n'ont pas fait l'objet d'analyse plus avant.

Des différences de survie globale ou de survie sans récurrence étaient constatées selon le niveau d'expression de CXCR2 et de ses ligands CXCL7 et CXCL8. Ces résultats seront donc présentés dans ce travail.

a/ CXCR2 :

Une corrélation a été trouvée entre le niveau d'expression de CXCR2 au sein du tissu métastatique et la durée de survie après hépatectomie, pour l'ensemble de nos patients. Une surexpression de CXCR2, avec un cut-off calculé à 2, était associée avec une réduction significative à la fois de la survie globale et de la survie sans récurrence de nos patients. (**Figure 12**).

La survie moyenne était de 65.4 ± 3.3 mois pour les patients présentant un niveau d'expression inférieur à 2 (n=32) comparée à 29.8 ± 1.7 mois pour le groupe d'expression de CXCR2 supérieur à 2 (n=19), (p= 0.012).

De façon similaire, avec un cut-off à 2, la survie sans récurrence moyenne était significativement plus élevée dans le groupe d'expression faible de CXCR2, que dans le groupe à expression élevée de CXCR2 : 31.8 ± 2.6 mois versus 15.4 ± 2 mois ; p=0.002.

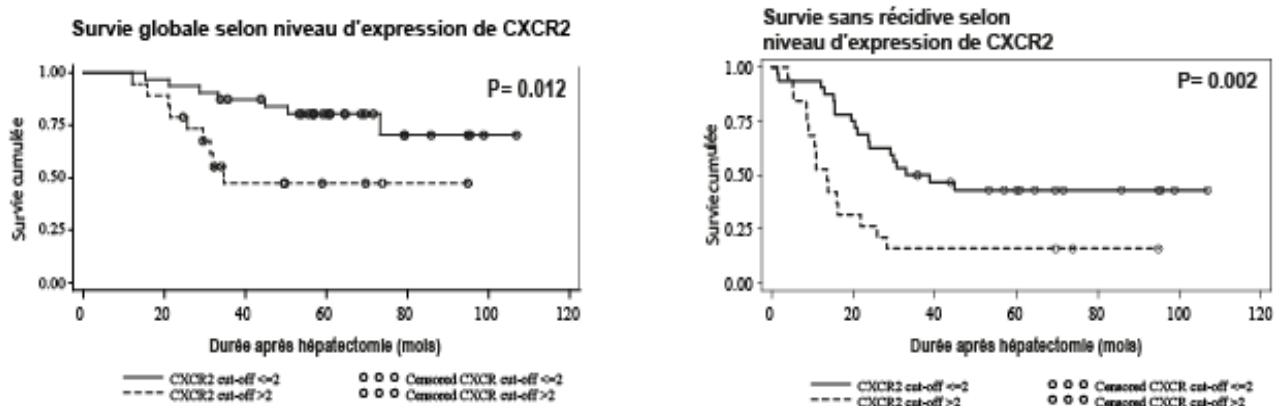


Figure 12 : Survie Globale et sans récurrence après hépatectomie selon le niveau d'expression de CXCR2 (cut-off calculé à 2).

Nous avons comparé la survie globale et la survie sans récurrence des patients selon le niveau d'expression de deux des principaux ligands de CXCR2 à savoir CXCL7 et CXCL8.

b/ CXCL8 :

CXCL8 est le ligand typique du récepteur CXCR2. La surexpression de CXCL8 était significativement corrélée à une plus faible survie globale mais n'impactait pas la survie sans récurrence. Le cut-off discriminant d'expression de CXCL8 a été identifié comme étant 1. Avec ce cut-off, la survie globale moyenne était 62.8 ± 30.1 mois pour le groupe de faible expression (n=44) comparée à 31 ± 4.9 mois dans le groupe de forte expression de CXCL8 (n=8 ; p=0.0008). (**Figure 13**).

La survie sans récurrence moyenne était également plus faible dans le groupe d'expression forte de CXCL8 par rapport au groupe de faible expression (11.2 ± 2.0 mois versus 27.7 ± 2.3 mois respectivement) mais sans atteindre la significativité (p=0.19).

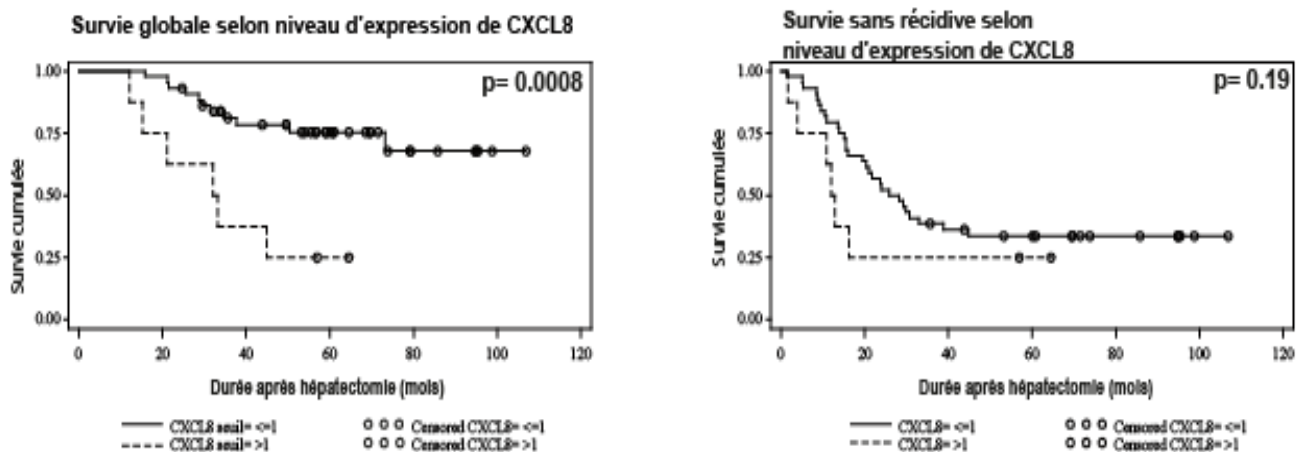


Figure 13 : Survie Globale et sans récurrence après hépatectomie selon le niveau d'expression de CXCL8 (cut-off calculé à 1).

c/ CXCL7 :

Peu de travaux ont été effectués sur CXCL7. Cependant ce ligand a été décrit dans les syndromes myélodysplasiques (100) et comme marqueur évolutif de l'adénocarcinome pancréatique (108).

La surexpression de CXCL7 était significativement corrélée à la fois avec une faible survie globale et une faible survie sans récurrence. Le cut-off pour CXCL7 était mesuré à 1. (Figure 14).

La moyenne de survie globale était 64.4 ± 3 mois pour les patients montrant un niveau d'expression de CXCL7 inférieur à 1 versus $28,02 \pm 4,67$ mois pour les patients montrant un niveau d'expression de CXCL7 supérieur à 1 (n=9 et n=41 respectivement ; $p < 0.0001$). La moyenne de survie sans récurrence était également significativement plus faible dans le groupe de forte expression de CXCL7 par rapport au groupe à faible expression avec un cut-off de CXCL7 à 1 : 9.9 ± 1.8 mois versus 29.2 ± 2.4 mois respectivement, $p=0,0015$.

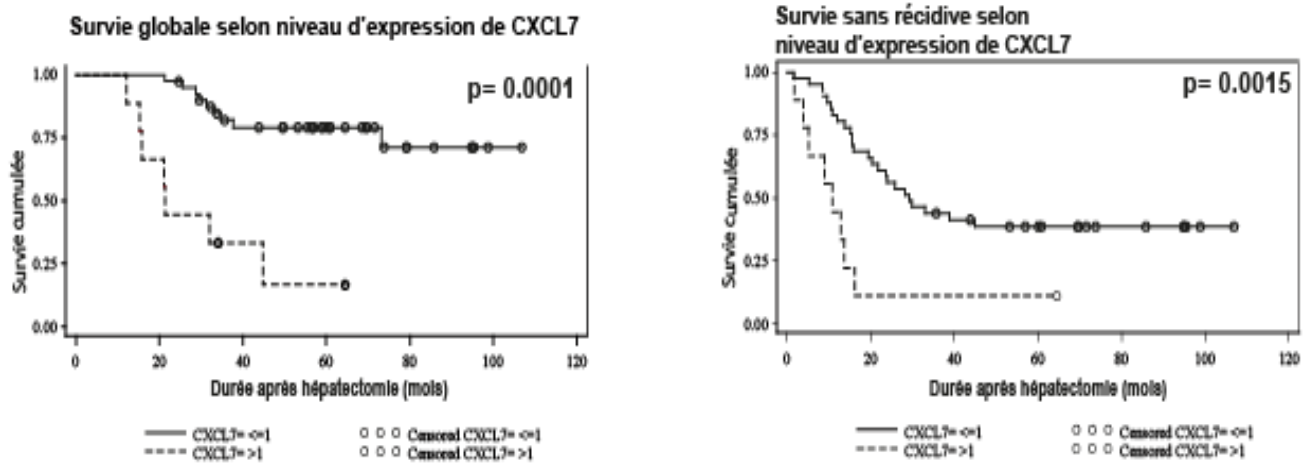


Figure 14 : Survie Globale et sans récidive après hépatectomie selon le niveau d'expression de CXCL7 (cut-off calculé à 1).

d/ CXCR4 :

La survie globale des patients n'était pas significativement différente selon le niveau d'expression de CXCR4, avec un cut-off calculé à 1. La moyenne de survie globale était de 38.72 ± 2.19 mois pour les patients à faible expression de CXCR4 (n=29) et de 41.13 ± 3.18 mois pour le groupe à forte expression (n=21), (p=0.52). (**Figure 15**).

La moyenne de survie sans récidive était de 24.03 ± 2.57 mois dans le groupe à faible expression de CXCR4 et de 26 ± 3.6 mois dans le groupe à forte expression (p=0.98). Nos résultats ont montré que l'expression de CXCR4 dans les métastases hépatiques de cancerx colorectaux n'était pas corrélée à une altération de survie des patients.

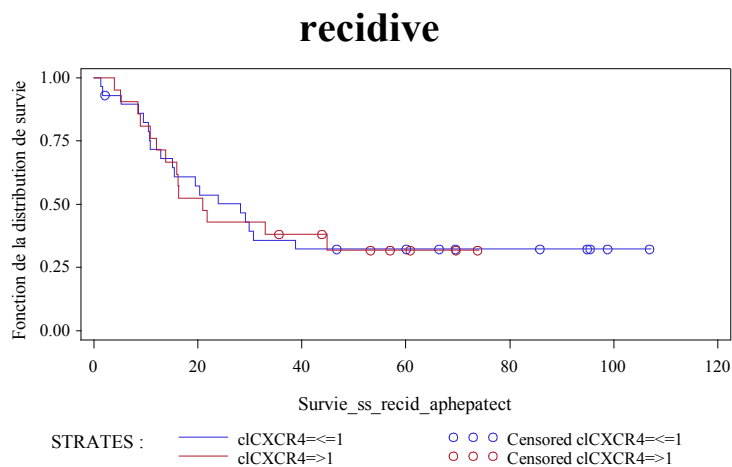
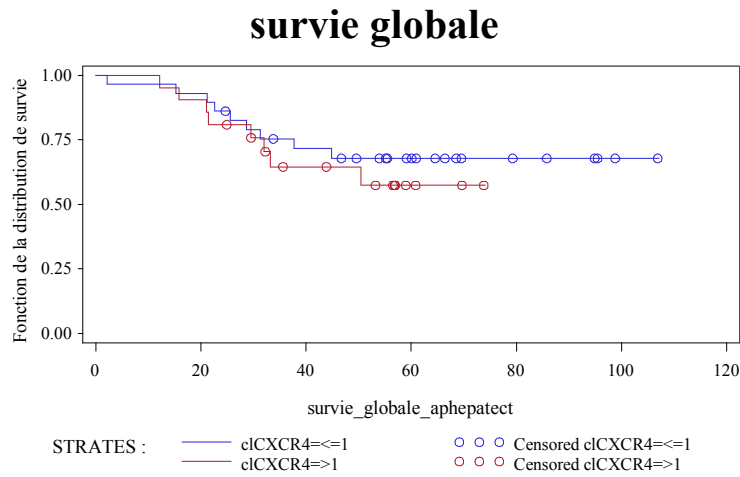


Figure 15: Survie Globale et sans récurrence après hépatectomie selon le niveau d’expression de CXCR4 (cut-off calculé à 1).

En conclusion, ces premiers résultats, mettent en évidence un lien entre niveau d’expression de CXCR2 et de son ligand CXCL7 sur la survie globale et la survie sans récurrence. Cette première analyse avait été effectuée sur la population totale c’est-à-dire à partir des patients traités ou non par chimiothérapie néoadjuvante. Ces données nous ont amenées à affiner notre analyse. Nous nous sommes ensuite intéressés à comparer ce lien dans les deux sous-groupes distincts de patients, ayant reçu ou non une chimiothérapie néoadjuvante. Notre étude comparative de plusieurs récepteurs de chimiokines et de leurs ligands nous a permis de dégager le couple CXCR2/CXCL7 comme associé à la reprise de progression tumorale et une réduction de la survie.

e/ Expression des chimiokines et récepteurs de chimiokines : étude de corrélation avec la survie globale et la survie sans récurrence sur deux groupes de patients traités ou non par chimiothérapie néoadjuvante :

Nous avons constaté que les surexpressions de CXCR2 et de son ligand CXCL7 étaient corrélées, avec une survie globale et une survie sans récurrence plus courte dans le sous-groupe de patients traités par chimiothérapie néoadjuvante avant hépatectomie. (**Figure 16**). De plus les corrélations de CXCR2 et de CXCL7 avec la survie globale et la survie sans récurrence présentaient un haut niveau de significativité, mais pas dans le sous-groupe de patients traités par chirurgie seule.

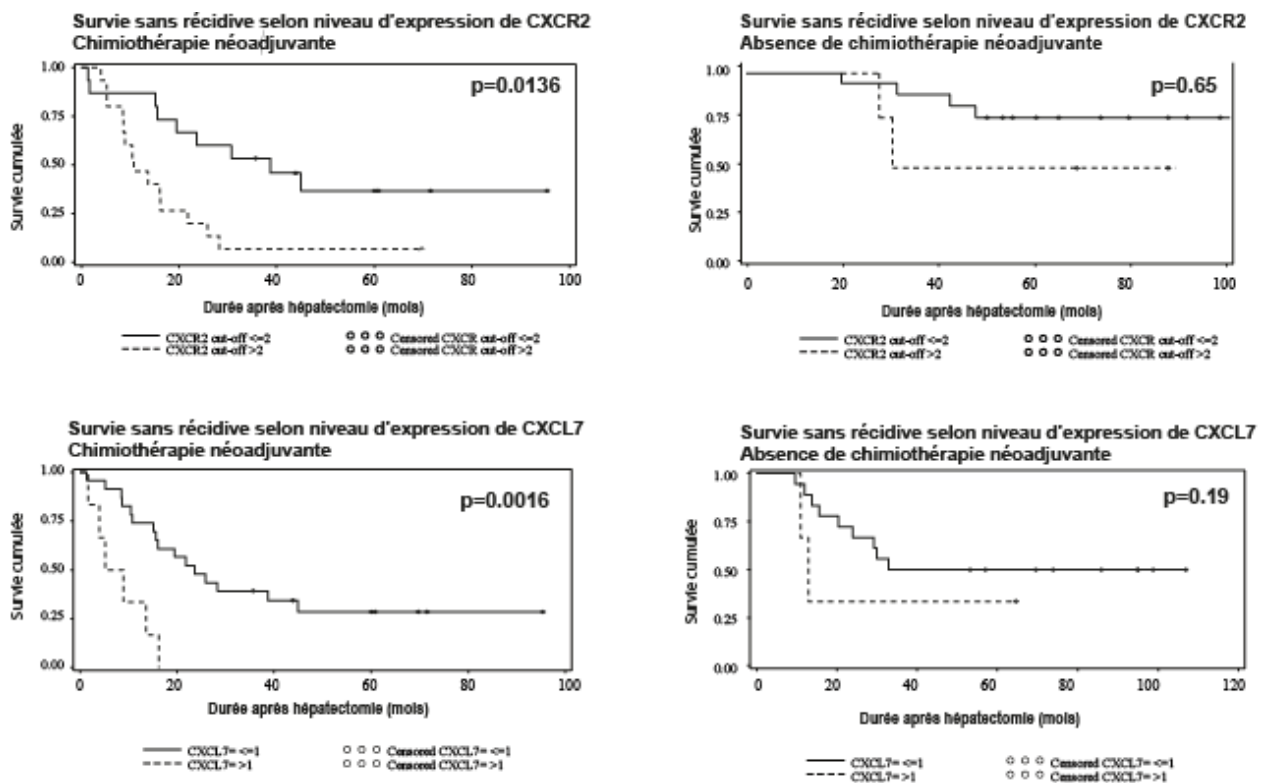


Figure 16 : Survie sans récurrence après hépatectomie selon le niveau d'expression de CXCR2 et de son ligand CXCL7 en fonction de l'administration ou non d'une chimiothérapie néoadjuvante. Pour CXCR2 le cut-off était mesuré à 2 ; pour CXCL7 à 1.

Ces résultats montrent que l'augmentation des niveaux d'expression des transcrits de CXCR2 ou CXCL7 est associé à un plus mauvais pronostic chez les patients qui ont reçu une chimiothérapie néoadjuvante. Ceci suggère que la chimiothérapie néoadjuvante pourrait jouer un rôle dans la dérégulation de l'axe CXCR2/CXCL7 qui viendrait à son tour activer la prolifération et l'invasion tumorale.

C/ Etude de la valeur pronostique de CXCR2 et CXCL7 sur la survie globale et la survie sans récurrence en analyse multivariée :

a/ Analyse multivariée de la survie globale et sans récurrence :

Les paramètres suivants ont été testés pour leur association avec la survie globale ou la survie sans récurrence en analyse bivariée : expression de gènes d'intérêt en qRT-PCR, traitements par chimiothérapie en adjuvant à la chirurgie colorectale initiale, facteurs de confusion (stades T,N,M, localisation de la tumeur primitive colorectale, résection hépatique synchronisée ou non à la colectomie, âge au moment de la chirurgie colorectale, caractère synchronisé ou métachrone des métastases hépatiques, chimiothérapie administrée en néoadjuvant à l'hépatectomie. (**Tableau 9**).

Les paramètres inclus dans l'analyse multivariée de survie étaient les paramètres avec un $p < 0.05$ en analyse bivariée. Le faible nombre de patients ne permettait d'inclure, dans chaque analyse multivariée, que 2 variables confondantes en plus du gène d'intérêt.

	Paramètres	p
<u>Survie Globale</u>	Hépatectomie synchrone	0.99
	Bevacizumab en néoadjuvant	0.03
	Chimiothérapie adjuvante à la colectomie	0.9
<u>Survie sans récurrence</u>	Stade TNM T3	0.43
	Stade TNM T4	0.054
	Stade TNM N0	0.065
	Hépatectomie synchrone	0.21
	Absence de chimiothérapie adjuvante à la colectomie	0.16
	Chimiothérapie néoadjuvante	0.59

Tableau 9: Analyse multivariée de la survie globale et sans récurrence. Les paramètres utilisés étaient préalablement sélectionnés en analyse bivariée avec un $p < 0.05$.

b/ CXCR2 et CXCL7 :

Nous nous sommes attachés à déterminer si l'expression de CXCR2 et de son ligand CXCL7 pouvaient être des facteurs indépendants modulant la survie globale ou sans récurrence de nos patients.

En analyse multivariée, l'expression de CXCR2 était un facteur indépendant de faible survie globale et sans récurrence ($p=0.008$ et $p=0.004$ respectivement) après ajustement avec l'administration de chimiothérapie néoadjuvante et le caractère synchrone ou métachrone des métastases hépatiques. L'estimation de survie sans récurrence n'était pas significativement liée au niveau d'expression de CXCL7 ($p=0,15$), après ajustement avec l'administration de chimiothérapie néoadjuvante et le caractère synchrone ou métachrone des métastases hépatiques.

L'estimation de survie sans récurrence était significativement moins bonne en cas d'hyperexpression de CXCR2 ($p=0,019$), une fois exclus les facteurs de confusion liés au stade

tumoral T de la tumeur primitive et le caractère synchrone ou métachrone des métastases hépatiques. Le risque relatif de récurrence (avec un intervalle de confiance à 95%) était alors de 1.036 (1.006- 1.066) chaque fois que CXCR2 augmente de 1 unité.

Avec un niveau de cut-off d'expression de CXCR2 à 2, CXCR2 était indépendamment associé avec une diminution de survie globale et sans récurrence ($p=0.029$ et $p=0.01$ respectivement) après ajustement sur l'administration d'une chimiothérapie néoadjuvante et de bevacizumab. L'estimation de survie sans récurrence n'est pas significativement liée au niveau d'expression de CXCL7 ($p=0,16$) après ajustement sur l'administration d'une chimiothérapie néoadjuvante et de bevacizumab.

La survie actuarielle globale après hépatectomie était significativement liée au niveau d'expression de CXCR2 et de son ligand CXCL7, quand les résultats sont ajustés à l'administration de bevacizumab en néoadjuvant ($p=0.001$ et $p=0.007$ respectivement).

L'analyse multivariée réalisée sur le sous-groupe de patients qui ont reçu une chimiothérapie néoadjuvante a aussi identifié le niveau d'expression de CXCR2 et CXCL7 comme facteurs pronostiques indépendants de faible survie globale et sans récurrence dans ce sous-groupe.

En analyse multivariée, CXCR4 et CXCL8 n'étaient pas associés à la survie globale et sans récurrence.

Désormais, l'axe CXCR2/CXCL7 apparaît comme une voie favorisant la récurrence métastatique chez des patients traités par chimiothérapie néoadjuvante puis hépatectomie pour métastases de cancer colorectal.

D/ Comparaison de l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs entre les patients ayant reçu ou non une chimiothérapie néoadjuvante :

Nous avons mesuré les médianes d'expression, en qRT-PCR, de CXCR2, CXCR4 et de leurs ligands CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 et CXCL12 et MIF au sein des métastases hépatiques de nos patients. Nous avons ainsi pu comparer l'expression de

ces gènes entre les deux sous-groupes de patients en fonction de l'administration ou non de chimiothérapie néoadjuvante à l'hépatectomie avec ou sans association à du bevacizumab. L'objectif était de déterminer si l'administration d'une chimiothérapie néoadjuvante à l'hépatectomie pouvait influencer le niveau d'expression des gènes d'intérêts.

a/ Expression de gènes d'intérêts selon administration de chimiothérapie néoadjuvante :

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative pour l'expression de CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6 et CXCL12 et MIF chez les patients ayant reçu ou non un traitement par chimiothérapie. Les résultats ne seront pas présentés.

Les résultats obtenus pour CXCR2, CXCR4, CXCL7 et CXCL8 sont présentés dans le tableau 10 et la figure 17.

Chimiokines ou chimiokines récepteurs	Pas de chimiothérapie néoadjuvante Médiane (min- max)	Chimiothérapie néoadjuvante Médiane (min- max)	p
CXCR2	0.55 (0.07- 3.22) n=21	1.89 (0.02- 50.92) n=30	0.016
CXCR4	0.78 (0,06- 4.73) n=22	0.87 (0.16- 10.15) n=28	0.183
CXCL7	0.15 (0.01- 7.88) n=21	0.40 (0.00- 7.85) n=29	0.127
CXCL8	0.36 (0.03- 7.98) n=22	0.24 (0.06- 2.48) n=30	0.516

Tableau 10. Médiane (minimum et maximum) de niveaux d'expression de CXCR2, CXCR4, CXCL7 et CXCL8 selon l'administration ou non d'une chimiothérapie néoadjuvante.

La médiane d'expression de CXCR2 était plus de trois fois supérieure dans le groupe traitement (n=30) que dans le groupe contrôle (n=21) : 1.89 (0.02- 50.92) versus 0.55 (0.007- 3.22) respectivement, p=0.0016.

La médiane de niveau d'expression de CXCL7 était presque trois fois supérieure dans le groupe traité (n=29) que dans le groupe contrôle (n=21), 0.40 (0.00-7.85) versus 0.15 (0.001-7.88) respectivement, mais sans atteindre la significativité (p=0.127).

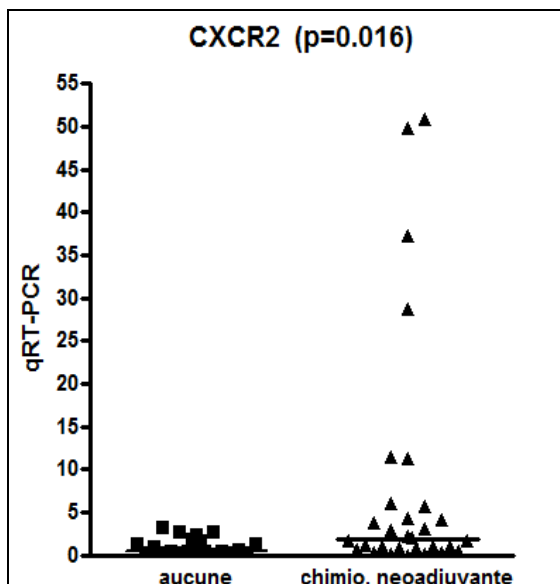
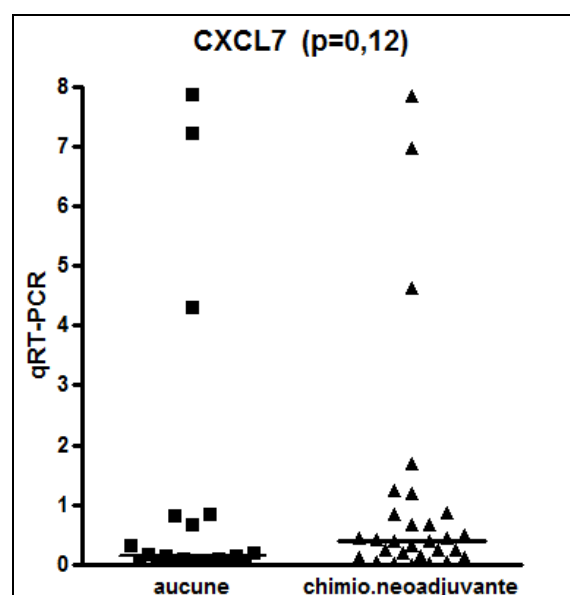
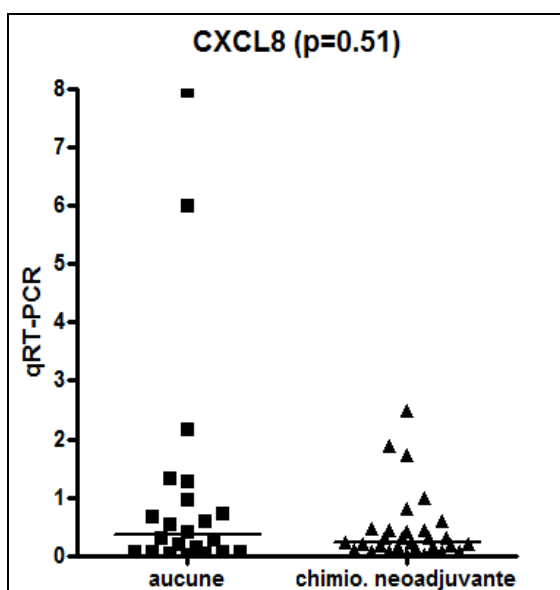


Figure 17 : Comparaisons entre niveaux d'expression de chimiokines et chimiokines récepteurs (CXCR2, CXCL8 et CXCL7) au sein de métastases hépatiques de patients, traités ou non traités par chimiothérapie néoadjuvante avant hépatectomie. Les valeurs de qRT-PCR correspondent aux niveaux de mRNA exprimés en $2^{-\Delta\Delta Ct}$.



L'administration d'une chimiothérapie néoadjuvante ne modifiait pas le niveau d'expression de CXCL8 au sein des métastases hépatiques ($p=0.516$). La médiane d'expression de CXCL8 était de 0.24 (0.06- 2.48) dans le groupe chimiothérapie ($n=30$) versus 0.36 (0.03- 7.98) dans le groupe contrôle ($n=22$).

Ainsi les résultats montrent qu'après traitement par chimiothérapie, les tumeurs présentent des niveaux plus élevés de CXCR2 et de CXCL7. Ce qui suggère que les traitements par chimiothérapie sélectionnent des cellules tumorales présentant une dérégulation de l'axe CXCL7/CXCR2.

b/ Expression des gènes d'intérêts selon administration de chimiothérapie néoadjuvante associée à du bevacizumab :

Du bevacizumab était administré, en association avec les drogues de chimiothérapies conventionnelles, chez 13 des 34 (38.2%) des patients traités en néoadjuvant. Nous nous sommes donc intéressés au sous-groupe de patients traités par chimiothérapie néoadjuvante associée à du bevacizumab ($n=13$). Nous avons comparées l'expression de CXCR2, CXCR4 et des ligands CXCL7, CXCL8 au sein des métastases hépatiques de ces patients, sous l'effet d'une chimiothérapie néoadjuvante associée à du bevacizumab, à l'expression de gènes des patients du groupe contrôle. (**Tableau 11**).

Gène	Pas de chimiothérapie néoadjuvante Médiane (min- max)	Chimiothérapie néoadjuvante avec bevacizumab Médiane (min- max)	p
CXCR2	0,55 (0,07- 3,22) n=21	2,96 (0,02- 37,23) n=12	0,020
CXCR4	0,78 (0,06- 4,73) n=22	0,65 (0,17- 6,43) n=13	0,442
CXCL7	0,15 (0,01- 7,88) n=21	0,42 (0,02- 7,85) n=12	0,081
CXCL8	0,36 (0,03- 7,98) n=22	0,21 (0,06- 2,48) n=12	0,886

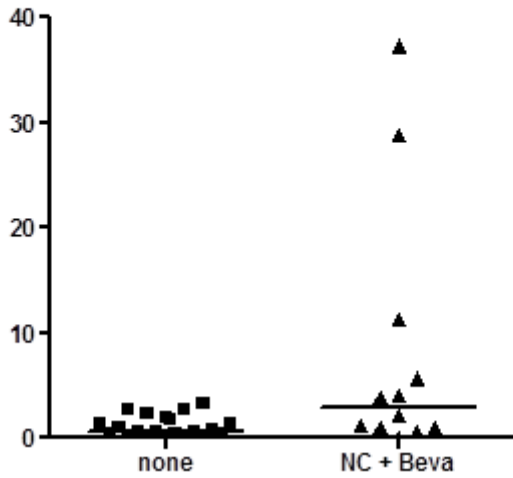
Tableau 11 : Médiane (minimum et maximum) de niveaux d'expression de CXCR2, CXCR4, CXCL7 et CXCL8 selon l'administration ou non d'une chimiothérapie néoadjuvante associée à du bevacizumab.

La médiane de niveau d'expression de CXCR2 était significativement supérieure dans le groupe traitée par chimiothérapie néoadjuvante associée au bevacizumab (n=12), 2,96(0,02-37,23), par rapport au groupe contrôle (n=21), 0,55 (0,07- 3,22), p=0.02.

La médiane d'expression du ligand CXCL7 était également supérieur dans le groupe traité par chimiothérapie associée au bevacizumab (n=12), 0,42 (0,02- 7,85), versus 0,15 (0,01- 7,88) dans le groupe contrôle (n=22) mais sans atteindre la significativité (p=0.081). (Figure 18).

Il n'était pas constaté de différence significative pour l'expression de CXCL8 et CXCR4.

**CXCR2 expression:
neoadjuvant chemotherapy with bevacizumab
versus no neoadjuvant chemotherapy
(p=0.02)**



**CXCL7 expression:
neoadjuvant chemotherapy with bevacizumab
versus no neoadjuvant chemotherapy
(p=0.081)**

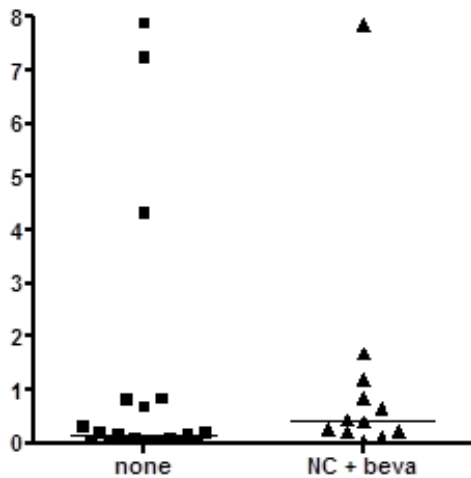


Figure 18 : Comparaisons entre niveaux d'expression de chimiokines et chimiokines récepteurs (CXCR2 et CXCL7) au sein de métastases hépatiques de patients, traités ou non traités par chimiothérapie néoadjuvante associé au bevacizumab avant hépatectomie. Les valeurs de qRT-PCR correspondent aux niveaux de mRNA exprimés en $2^{-\Delta\Delta Ct}$.
none : contrôle ; NC+Beva : chimiothérapie néoadjuvante associée à du bevacizumab.

Les résultats obtenus sont donc proches de ceux obtenus avec la comparaison des groupes chimiothérapie versus contrôle.

c/ Etude de l'influence du bevacizumab sur l'expression des gènes d'intérêts :

Dans le but d'analyser les effets de l'addition d'une biothérapie anti-VEGF, et du bevacizumab en particulier, sur l'expression de CXCR2, CXCR4, CXCL7 et CXCL8, nous

avons comparé l'expression de ces gènes au sein des métastases hépatiques de patients traités par chimiothérapie néoadjuvante avec ou sans bevacizumab. Notre intérêt se portait particulièrement sur l'expression de CXCR2 et CXCL7. (**Tableau 12**).

Nos résultats montrent l'absence de surexpression de CXCR2 ou de son ligand CXCL7 en fonction de l'adjonction ou non de bevacizumab (p=0.53 et p=0.57 respectivement). (**Figure 19**).

Gènes	chimiothérapie néoadjuvante sans bevacizumab Médiane (min- max)	Chimiothérapie néoadjuvante avec bevacizumab Médiane (min- max)	p
CXCR2	1,64 (0,04- 50,92) n=18	2,96 (0,02- 37,23) n=12	0,53
CXCR4	1 (0,16- 10,15) n=15	0,65 (0,17- 6,43) n=13	0,42
CXCL7	0,38 (0- 6,97) n=17	0,42 (0,02- 7,85) n=12	0,57
CXCL8	0,27 (0,01- 0,98) n=18	0,21 (0,06- 2,48) n=12	0,93

Tableau 12: Niveau d'expression (médiane, minimum et maximum) de CXCR2 et CXCL7 selon adjonction de bevacizumab au protocole de chimiothérapie néoadjuvante.

Ainsi, les effets de sélection de cellules tumorales avec dérégulation de l'axe CXCR2/CXCL7 semblent induits par les traitements de chimiothérapie plutôt que par le bevacizumab.

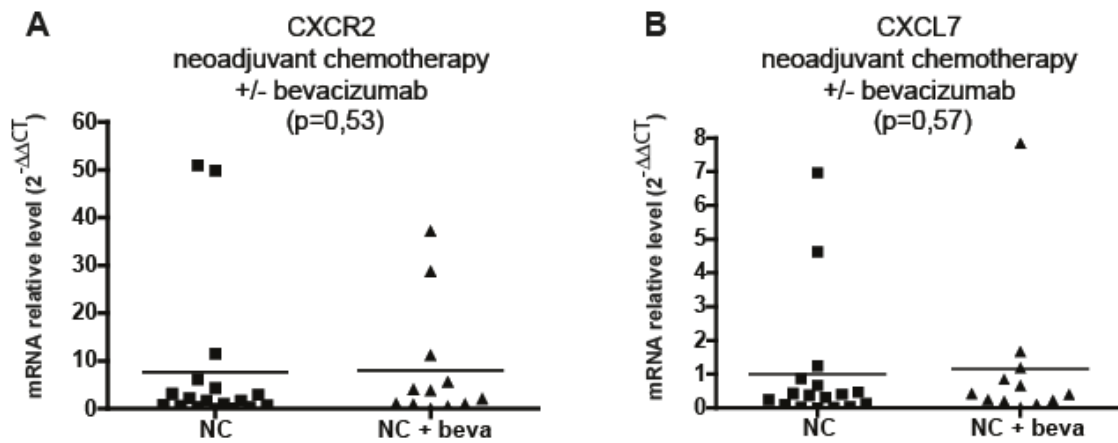
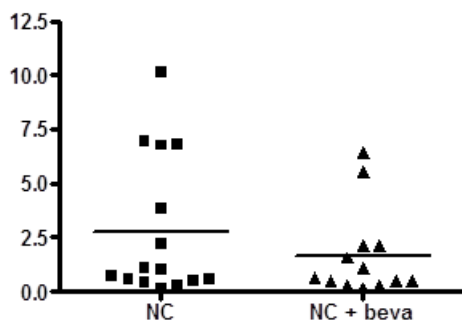


Figure 19 : Comparaison d'expression de CXCR2 et CXCL7 selon adjonction de bevacizumab au protocole de chimiothérapie néoadjuvante. (NC :chimiothérapie néoadjuvante ; NC+ beva : chimiothérapie néoadjuvante associée au bevacizumab).

Comme pour la chimiothérapie, l'adjonction de bevacizumab ne modifie pas l'expression du couple CXCR4/CXCL8. (**Figure 20**).

CXCR4, NC with versus without beva (p=0,42)



CXCL8, NC with versus without beva (p=0,93)

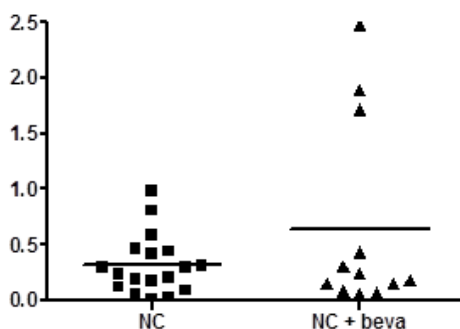


Figure 20 : Comparaison d'expression de CXCR4 et CXCL8 selon adjonction de bevacizumab au protocole de chimiothérapie néoadjuvante.

(NC : chimiothérapie néoadjuvante ; NC + beva : chimiothérapie néoadjuvante associée au bevacizumab)

Ainsi, les effets sur la surexpression de ces chimiokines et récepteurs de chimiokines semblent essentiellement induits par les agents de chimiothérapie.

E/ Analyse immunohistochimique :

Le premier objectif de ces analyses en IHC était de vérifier, au niveau protéique, l'expression de CXCR2 et de son ligand CXCL7. Le second objectif était de déterminer un site préférentiel d'immunofixation pour le récepteur CXCR2. L'analyse de la littérature (rôle de CXCR2 dans la chimiotaxie des cellules endothéliales, rôle de CXCR2 dans l'angiogénèse, CXCR2 récepteurs des chimiokines ELR...) et notre hypothèse de travail nous laissait penser à une immunofixation sur les vaisseaux et capillaires du tissu tumoral et du microenvironnement péri-tumoral.

L'élaboration du modèle d'IHC s'est avérée difficile. Le niveau de dilution de l'anticorps primaire a été difficile à déterminer pour obtenir un marquage fiable et interprétable. (**Figure 21**).

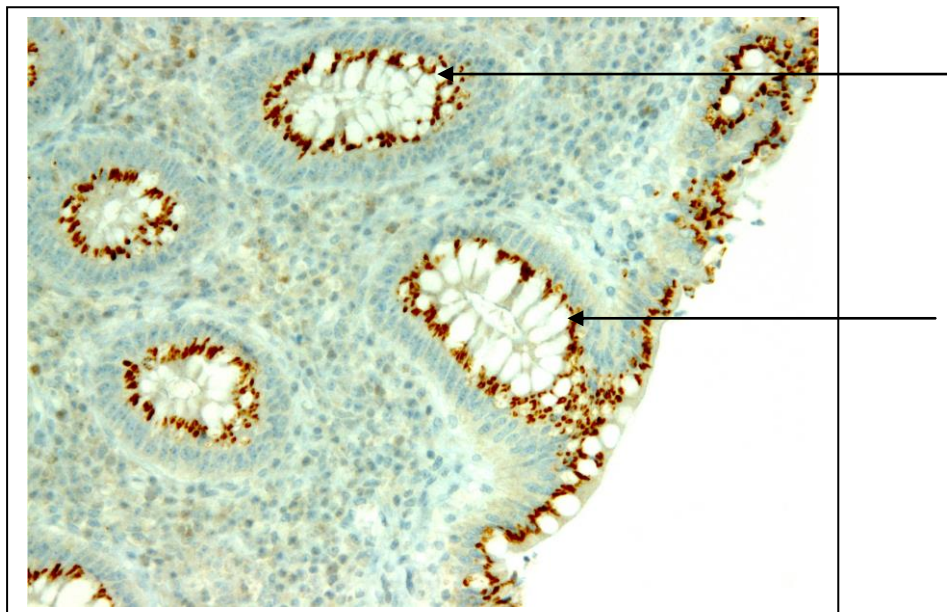


Figure 21: Témoin positif. IHC sur coupe de colon normal humain. Marquage de CXCR2. Coupes histologiques en coloration à l'hématoxyline éosine safran et bleu Astra avec marquage de CXCR2 (flèche). Grossissement X100. CXCR2 apparaît principalement exprimé au sein des cellules bordantes des cryptes glandulaires coliques.

a/ Scores semiquantitatifs de fixations :

a1/ CXCR2 :

Les données d'IHC pour l'un des patients du groupe chimiothérapie n'ont pas été exploitables (marquage diffus ininterprétable) et il a été exclu de l'analyse.

L'analyse immunohistochimique des échantillons de métastases hépatiques a montré un marquage intense de CXCR2 dans les cellules tumorales épithéliales des patients traités. Un faible marquage était constaté au niveau des capillaires tumoraux ou des cellules endothéliales. L'immunomarquage de CXCR2 était faible ou indétectable dans le parenchyme hépatique sain péri tumoral.

L'immunomarquage de CXCR2 était plus prononcé dans le groupe de patients traités par chimiothérapie néoadjuvante combiné au bevacizumab que dans le groupe contrôle, aussi bien en termes d'importance de fixation que d'intensité de fixation. (**Figure 22**).

Ainsi la surexpression de CXCR2 chez les patients ayant reçu une chimiothérapie néoadjuvante concerne les cellules tumorales suggérant le rôle éventuel de ce récepteur dans la prolifération tumorale et la dissémination métastatique de ces cellules.

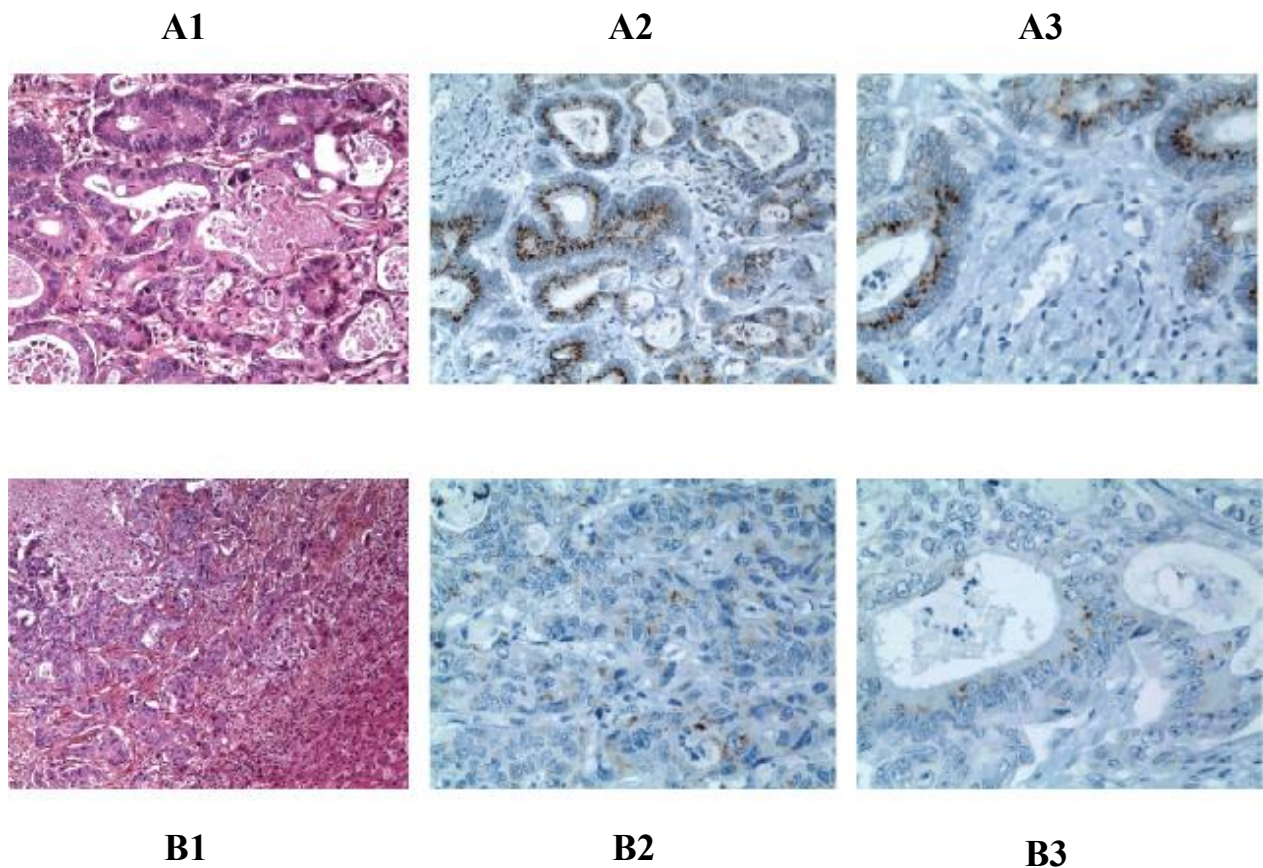


Figure 22: Immunomarkage de CXCR2 sur coupes histologiques de métastases hépatiques d'adénocarcinome colorectal. Patient ayant reçu (A) ou non (B) une chimiothérapie néoadjuvante associée à du bevacizumab. 1 : coupes histologiques en coloration standard à l'hématoxyline éosine safran (HES). 2 et 3: Coupes histologiques en coloration à l'hématoxyline éosine safran et bleu Astra avec marquage de CXCR2. 1 et 2: grossissement X100 ; 3 : grossissement X400.

a2/ CXCL7 :

Une analyse en IHC a été réalisée sur les coupes histologiques de métastases hépatiques sur la même sélection de patients.

Il a été globalement difficile d'obtenir un marquage de bonne qualité. (**Figure 23**). Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer cette absence de résultat : un manque

d'efficacité de l'anticorps anti-CXCL7 utilisé (seul anticorps disponible à la vente sur le marché au moment de la réalisation de ces analyses) ou un manque de sensibilité de l'anticorps anti-CXCL7 utilisé du fait des très faibles concentrations produites de CXCL7 au sein des tissus.

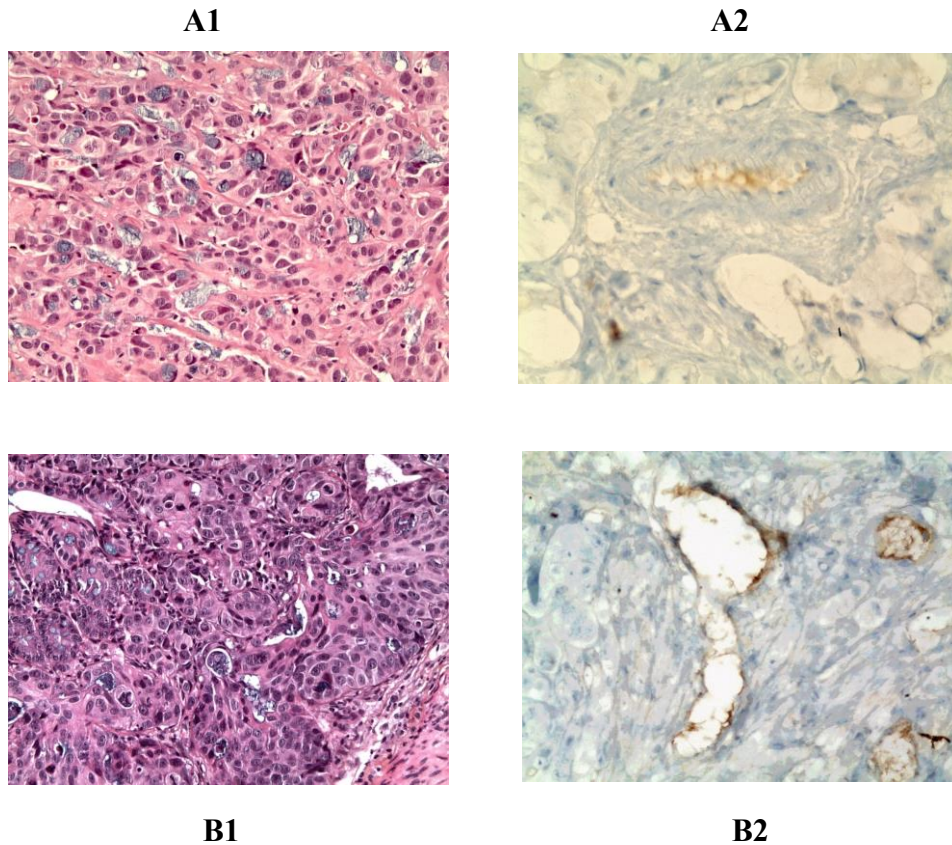


Figure 23: Immunomarquage de CXCL7 sur coupes histologiques de métastases

hépatiques d'adénocarcinome colorectal. A : patient 4 du groupe contrôle. B : patient 2 du groupe chimiothérapie. 1 : Coupes histologiques en coloration standard à l'hématoxyline éosine safran (HES) 2 : Coupes histologiques en coloration à l'hématoxyline éosine safran et bleu Astra avec marquage de CXCL7. Grossissement X100

Partie II : Modèle murin

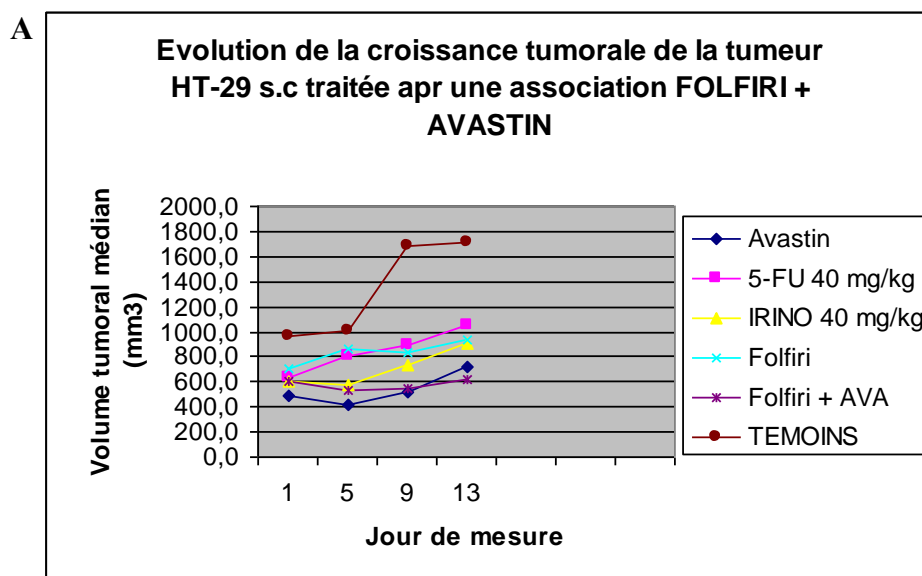
En complément des résultats obtenus à partir de l'analyse sur tissus de patients, nous avons cherché à mettre au point un modèle murin de chimiorésistance pour pouvoir étudier éventuellement le rôle de l'axe CXCR2/CXCL7 dans le développement tumoral.

A/ Modèle murin de xénogreffes sous-cutanées :

L'injection de l'inoculum de cellules tumorales d'adénocarcinome humain, HT29, a été réalisée en sous-cutané au flanc droit chez 36 souris SCID.

Sur les 36 individus, 30 ont reçu un protocole de chimiothérapie par injection directe intrapéritonéale. Six individus n'ont pas été traités et ont constitué le groupe contrôle. Aucun décès n'a été constaté durant la période de surveillance. Après une période de croissance tumorale de 8 semaines environ, les individus des groupes traitements ont reçu des injections intrapéritonéales de chimiothérapie à J1, J5, J9, J13. Il était initialement envisagé de réaliser une seconde série de 4 injections de chimiothérapie à partir de J20, mais la taille importante des tumeurs et leur croissance rapide avec risque d'ulcération, notamment dans le groupe contrôle, a nécessité l'interruption du protocole. Tous les individus ont été sacrifiés 21 jours après la première injection de chimiothérapie. (**Figure 24**).

Ces données montrent une croissance des xénogreffes sous-cutanées régulière chez tous les individus. On note une croissance tumorale rapide dans le groupe contrôle avec un volume tumoral quasiment deux fois plus important dans le groupe contrôle par rapport aux autres groupes, au jour de la dernière injection. Ces constatations sont probablement liées à l'efficacité des différents protocoles de chimiothérapie permettant de limiter la croissance tumorale.



B

Protocole	J1	J5	J9	J13
Avastin	489,0	415,1	514,9	716,6
5-FU 40 mg/kg	629,6	798,8	891,0	1056,7
IRINO 40 mg/kg	605,3	569,0	739,1	909,5
Folfiri	700,5	861,3	840,7	934,0
Folfiri + AVA	602,9	527,3	553,1	612,5
TEMOINS	958,8	1005,0	1681,6	1715,6

Figure 24: A : Courbes de croissance des tumeurs sous-cutanées obtenus après xénogreffe sous cutané d'un inoculum de cellules HT29 chez des souris SCID, durant la phase d'administration de la chimiothérapie. B : volumes tumoraux médians de chaque groupe exprimés en mm³.

a/ Analyse anatomopathologique conventionnelle:

L'analyse des coupes histologiques des prélèvements de xénogreffes tumorales sous-cutanées a montré une prolifération tumorale d'aspect peu différenciée associée à de larges plages de nécrose. La différenciation entre zones tumorales, zones de nécrose et tissu sain s'est avérée difficile. Les zones tumorales étaient constituées d'amas de cellules tumorales sans réelle organisation du microenvironnement.

b/ Expression de gènes en qRT-PCR :

Trente-six fragments de tumeurs ont été analysés en qRT-PCR pour l'expression des gènes murins *cxcr2*, *cxcr4* et *cxcl7* au sein du stroma tumoral et des gènes humains *CXCR2*, *CXCR4* et *CXCL7*. Les résultats sont exprimés en $2^{-\Delta\Delta C_t}$, puis calculés en prenant comme résultats de référence la moyenne des résultats des témoins (souris non traités) ramenée à 1.

L'analyse en qRT-PCR a été réalisée en utilisant des amorces murines et des amorces humaines afin de différencier l'origine des modifications éventuelles d'expressions entre les cellules tumorales et les cellules du stroma. Nous avons distingués les groupes de souris en fonction du type de traitement administré : Contrôle, 5 FU seul, Irinotecan seul, Bevacizumab seul, FOLFIRI et FOLFIRI-Bevacizumab.

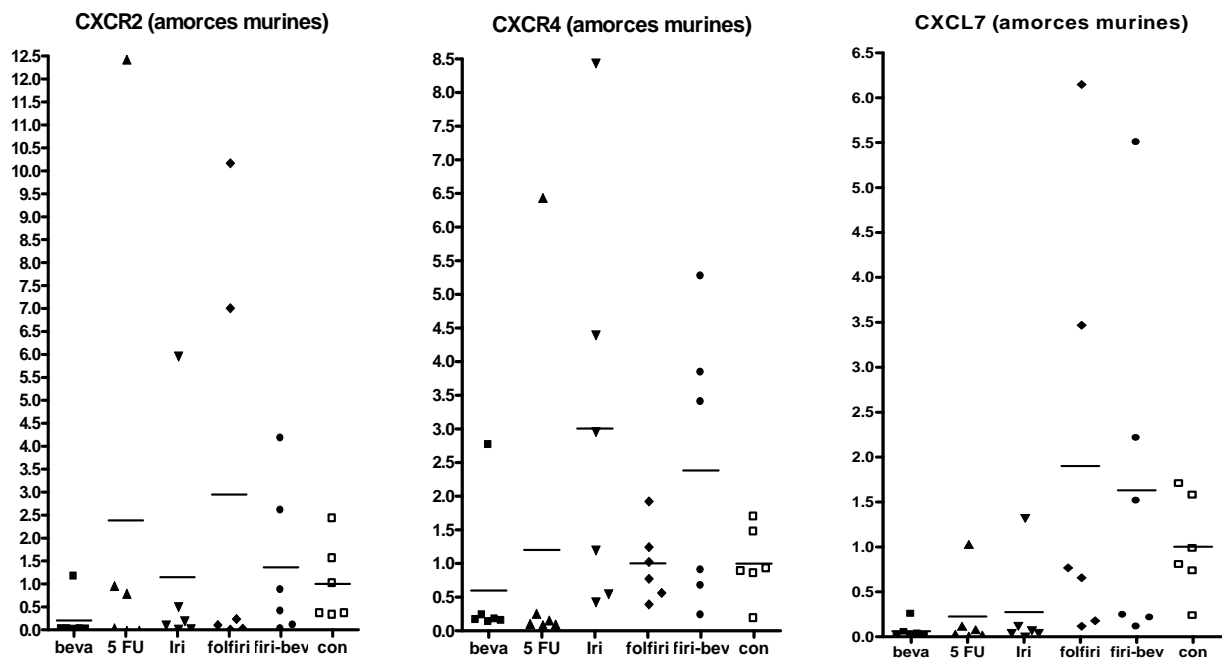


Figure 25 : Expression de *cxcr2*, *cxcr4* et *cxcl7* en qRT-PCR, au sein des prélèvements de tissus tumoraux issus de xénogreffes sous-cutanées sur souris SCID après inoculation de cellules HT29. Les niveaux d'expression d'ARNm des gènes d'intérêts sont exprimés en $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Amorces de qRT-PCR d'origine murine.

A l'aide des amorces murines de qRT-PCR, il est montré une tendance à la surexpression de *cxcr2* et de *cxcl7* pour deux individus dans le groupe traité par chimiothérapie à base de FOLFIRI mais sans significativité. Il est également montré une tendance à la surexpression de *cxcr2*, *cxcr4* et *cxcl7* dans le groupe traité par FOLFIRI combiné à du bevacizumab mais sans significativité. Ainsi *cxcl7* présente une nette tendance à la surexpression pour certains individus des deux groupes FOLFIRI et FOLFIRI-bevacizumab par rapport au groupe contrôle. (Figure 25).

Nous avons ensuite examiné les souris traitées dans leur ensemble.

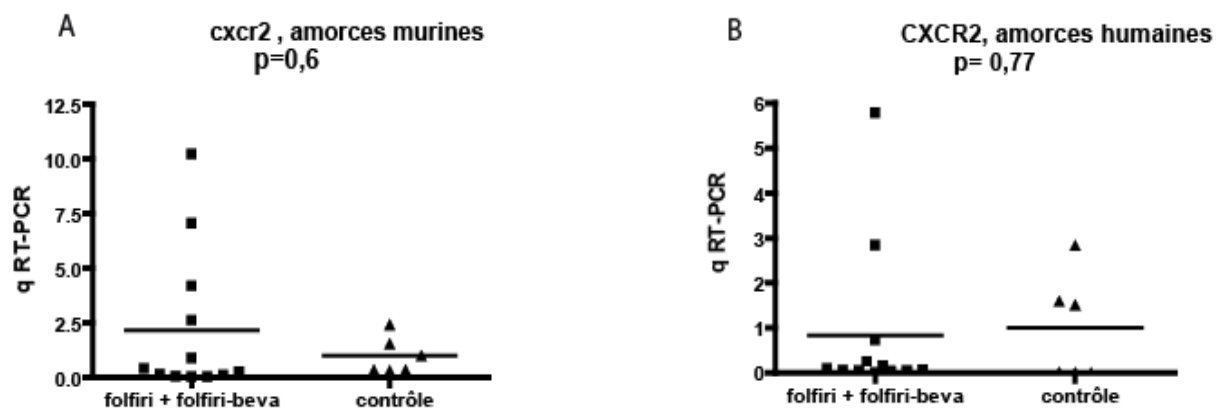


Figure 26 : Expression de *cxcr2* et *CXCR2* au sein des prélèvements de tissus tumoraux issus de xénogreffes sous-cutanées sur souris SCID, après inoculation de cellules HT29. Les niveaux d'expression d'ARNm des gènes d'intérêts sont exprimés en $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Amorces de qRT-PCR d'origine murine pour *cxcr2* (A) et humaine pour *CXCR2* (B). Comparaison des groupes d'individus traités par FOLFIRI et FOLFIRI associé à du bevacizumab au groupe contrôle.

Avec les amorces d'origine murine, le niveau d'expression de *cxcr2* en qRT-PCR était plus élevé, mais sans atteindre la significativité, dans le groupe des individus traités par chimiothérapie que dans le groupe contrôle. Le niveau moyen d'expression de *cxcr2* dans le groupe chimiothérapie était de 2.15 ± 3.34 versus 1 ± 0.8 dans le groupe contrôle ($p=0.6$). (Figure 26).

A l'aide des amorces humaines de qRT-PCR, l'analyse des résultats montre des niveaux d'expression très faible pour CXCR2, CXCR4 et CXCL7. Aucun des groupes traités ne présente de niveau d'expression significativement supérieur au groupe contrôle. (**Figure 27**).

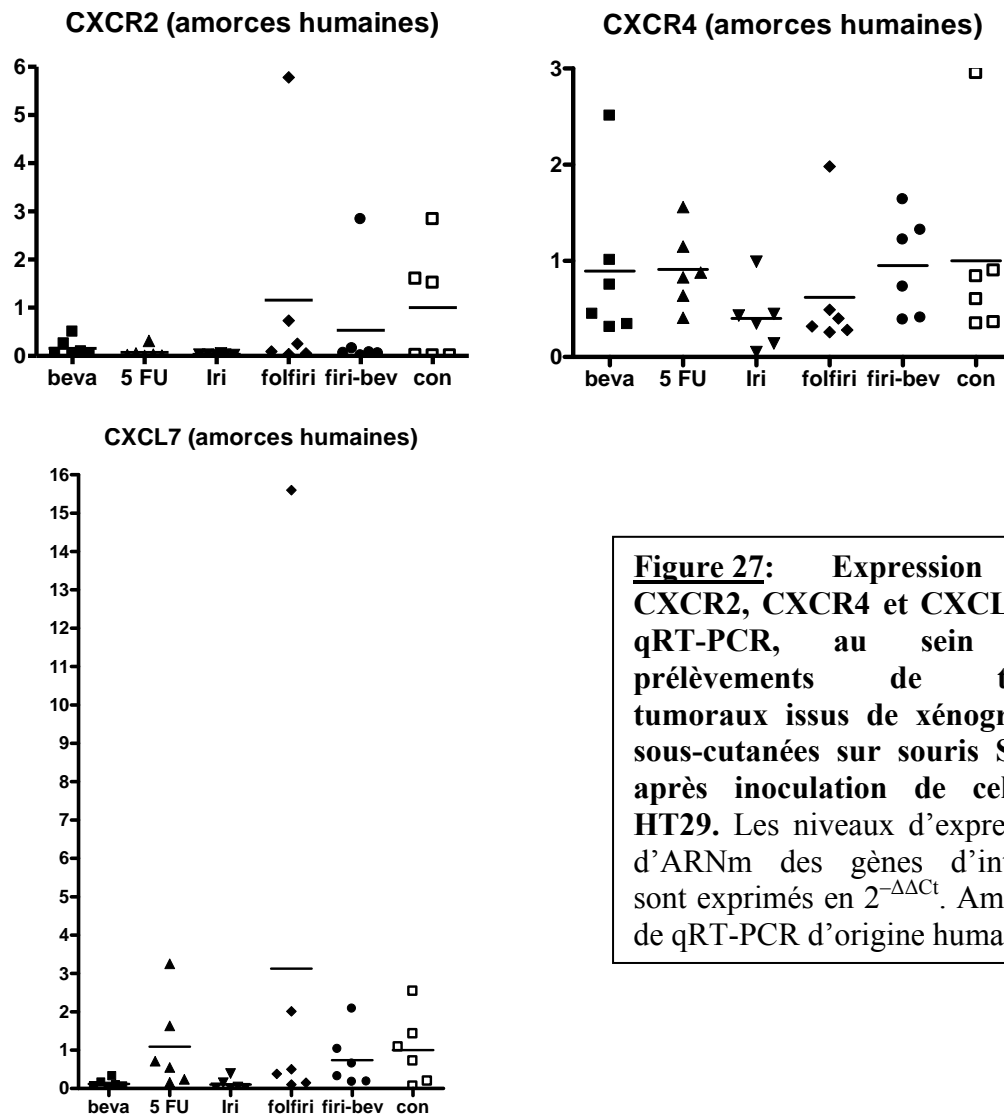


Figure 27: Expression de CXCR2, CXCR4 et CXCL7 en qRT-PCR, au sein des prélèvements de tissus tumoraux issus de xénogreffes sous-cutanées sur souris SCID après inoculation de cellules HT29. Les niveaux d'expression d'ARNm des gènes d'intérêts sont exprimés en $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Amorces de qRT-PCR d'origine humaine.

A l'aide des amorces d'origine humaine, il n'y avait pas de différence d'expression de CXCR2 entre le groupe contrôle (n=6) et le groupe d'individus traités par chimiothérapie (Groupes FOLFIRI et FOLFIRI associé au bevacizumab, n=12) : La moyenne d'expression était $1 \pm 1,17$ et $0,84 \pm 1,74$ respectivement (p=0.77).

Les faibles niveaux d'expression sont probablement en lien avec l'importance des zones de nécrose constatées en analyse anatomopathologique conventionnelle, la faible proportion de cellules tumorales viables au sein du tissu tumoral ou encore le caractère peu différencié des cellules tumorales exprimant peu, de façon constitutive, nos gènes d'intérêts.

B/ Modèle murin de xénogreffes ortotopiques intracaecales :

Aux vues des résultats peu contributifs du protocole de xénogreffes sous-cutanées de cellules humaines d'adénocarcinome colique HT29, nous avons décidé de la réalisation d'un protocole de xénogreffes, toujours de cellules HT29 sur souris SCID, mais en situation orthotopique. L'objectif des xénogreffes en situation orthotopique intracaecale était de faire intervenir le microenvironnement colique dans le développement des tumeurs. Le microenvironnement péritumoral pouvant alors favoriser la production de CXCR2, CXCR4 et CXCL7 (109).

L'une des difficultés du modèle tenait dans l'importante mortalité per opératoire en lien avec une fragilité des souris à l'anesthésie, et une mortalité post-opératoire précoce en rapport avec des complications chirurgicales. Tout comme pour le protocole de xénogreffes sous-cutanées nous avons constaté une progression tumorale rapide des xénogreffes tumorales intracaecales. Les tumeurs ont entraîné le décès d'un individu dans le groupe chimiothérapie à J19 et tardivement de 3 individus dans le groupe contrôle à J25, J32, J33. Du fait de la franche altération de l'état général des individus survivants avec risque de décès rapide et prématuré pour certains, en accord avec le protocole éthique fixé pour le modèle, il a été décidé d'interrompre le protocole avant la fin du second cycle de chimiothérapie. L'ensemble des individus ont été sacrifiés à J33. Une seconde série de xénogreffes intracaecales a été réalisée afin d'obtenir un groupe contrôle de 5 individus.

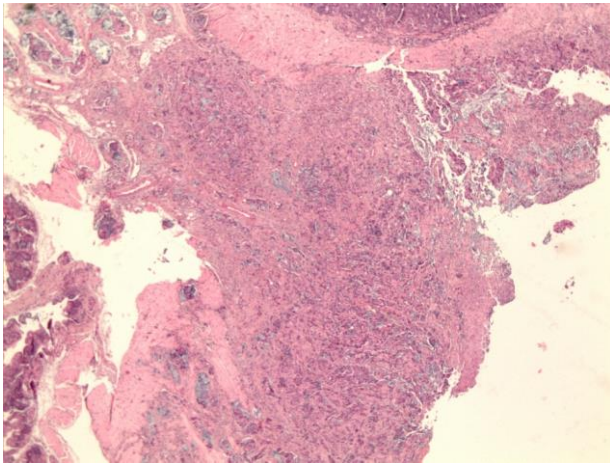
Au total des fragments de tumeurs ont été prélevés sur 10 individus.

a/ Analyse anatomopathologique :

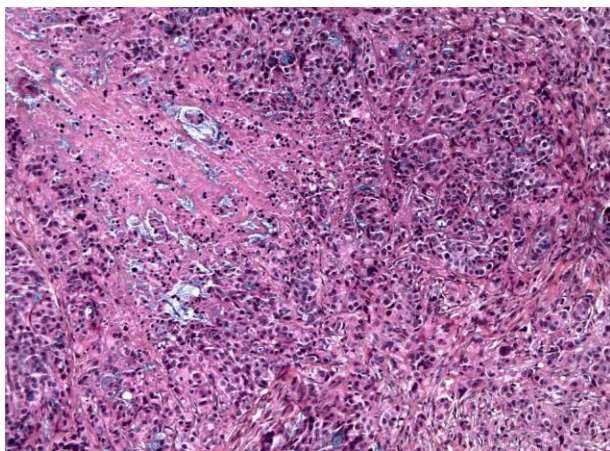
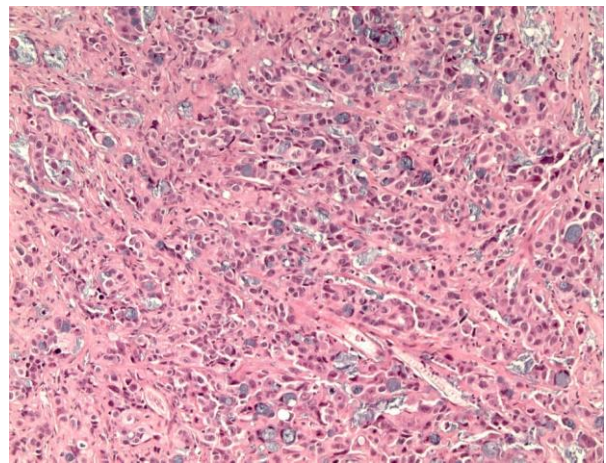
L'analyse anatomopathologique des tumeurs issues de xénogreffes intracaecales a montré des tumeurs d'aspect peu différencié, associant des plages de nécrose et des amas de

cellules tumorales associées sans réelle organisation semblant infiltrer un tissu sain. (**Figure 28**). Il était retrouvé des structures pouvant évoquer des capillaires, vaisseaux sanguins ou lymphatiques probablement issus des tissus sains péri-tumoraux.

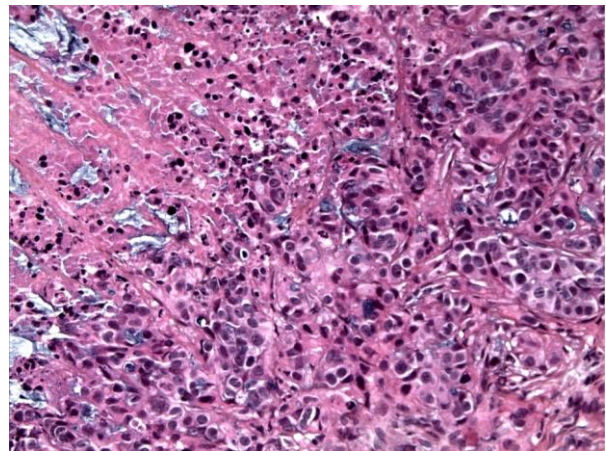
A1 (X50)



A2 (X100)



B1 (X100)



B2 (X400)

Figure 28 : Coupes histologiques en coloration standard à l'hématoxyline éosine safran (HES), de xénogreffes orthotopiques intracaecales issues de cellules tumorales humaines HT29. A : coupes de xénogrefe issues d'un individu du groupe contrôle. B : coupes de xénogreffes issues d'un individu du groupe chimiothérapie.

b/ Expression de gènes en qRT-PCR :

L'analyse en qRT-PCR des fragments tumoraux issus des xénogreffes orthotopiques a été réalisée pour chacun des individus en utilisant des amorces d'origine humaine afin d'analyser l'expression de nos gènes d'intérêts au sein des cellules tumorales, et des amorces d'origine murine afin d'analyser l'expression de gène au sein du microenvironnement tumoral d'origine murine.

Au total les tissus tumoraux de 5 souris traitées (FOLFIRI-bevacizumab) et de 5 souris contrôles ont été utilisés. Les résultats bruts ont montré un niveau d'expression des gènes d'intérêts exploitable. Après analyse des résultats, les données de l'un des individus du groupe contrôle se sont avérées aberrantes, et l'individu a été exclu.

L'analyse en qRT-PCR avec les amorces d'origines murines n'a pas été possible sur l'un des individus du groupe chimiothérapie. Le groupe chimiothérapie a donc été réduit à 4 individus pour cette analyse.

L'analyse des résultats d'expression de gènes, que ce soit à l'aide d'amorces d'origines murines ou d'amorces humaines, montre un très faible niveau d'expression de nos gènes d'intérêts pour l'ensemble des individus et en particulier pour les souris du groupe chimiothérapie. Les niveaux de concentration d'ARN mesurés au sein des tumeurs intracaecales se sont avérés ininterprétables. L'une des explications pourrait-être une dégradation des ARN au sein de ces tumeurs intracaecales.

c/ Immunohistochimie :

Une analyse d'expression de CXCR2 et CXCL7 a été réalisée par immunohistochimie. Les données sont exprimées par score semi-quantitatif. Les lames histologiques marquées pour la souris témoin 2 se sont avérées ininterprétables et la souris a été exclue du protocole. En ce qui concerne l'analyse d'immunomarquage de CXCL7, les lames de la souris chimiothérapie 1 se sont avérées ininterprétables et cette souris a été exclue.

c1/ Expression de cxcr2 :

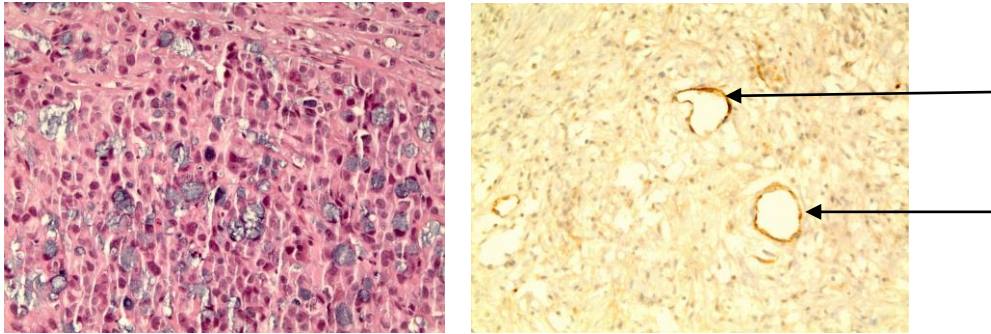
L'analyse semi-quantitative d'immunomarquage de cxcr2 semble montrer une expression plus marquée pour les souris du groupe chimiothérapie que pour les souris du groupe contrôle, que ce soit au niveau des zones tumorales ou au niveau des zones saines, en importance de fixation et intensité de fixation. (**Tableau 13**).

cxcr2	Zone tumorale		Zone saine		Nécrose tumorale (%)
	Intensité de fixation	Importance de fixation	Intensité de fixation	Importance de fixation	
Souris T1	++	+	++	++	0
Souris T3	+	+	+	+	30
Souris T4	++	+	+	+	5
Souris C1	+++	++	++	++	0
Souris C2	+++	++	+++	+++	0
Souris C3	+++	+++	+++	+++	0
Souris C4	++	+	++	+	0
Souris C5	+++	+++	++	+	0

Tableau 13: Expression de cxcr2 en immunohistochimie, sur tissus tumoraux de xénogreffes intracaecales de cultures de cellules HT29 sur souris SCID. Score semi-quantitatif évaluant l'expression de 0 : absence d'expression, à +++ : très forte expression. Les souris T correspondent aux individus témoins, les souris C aux individus traités par chimiothérapie avant sacrifice. L'importance de la nécrose tumorale est évaluée sur les coupes histologiques utilisées pour l'analyse anatomopathologique.

Il est constaté un immunomarquage présent au niveau de ce qui semble être des cellules endothéliales de capillaires sanguins et des cellules bordantes de canaux lymphatiques, pouvant témoigner du rôle de cxcr2 dans la néovascularisation tumorale. (**Figure 29**).

Souris T1 :



Souris C5 :

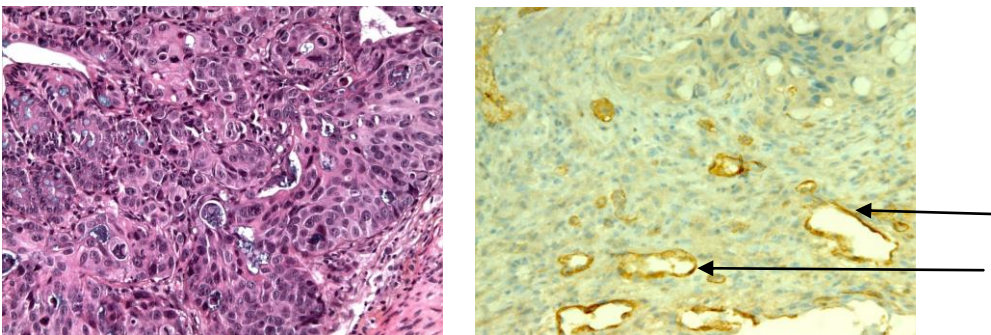


Figure 29: Immunomarquage de *cxcr2* sur coupes histologiques de xénogreffes orthotopiques intracaecales de cellules HT29 sur souris SCID. Haut : souris T1 du groupe témoin. Bas: souris C5 du groupe chimiothérapie. A gauche, coupes histologiques en coloration standard à l'hématoxyline éosine safran (HES). A droite, coupes histologiques en coloration à l'hématoxyline éosine safran et bleu Astra avec marquage de *cxcr2*. Grossissement : X400. Flèches : repérage des cellules endothéliales de capillaires sanguins et des cellules bordantes de canaux lymphatiques.

c2 : Expression de *cxcl7* :

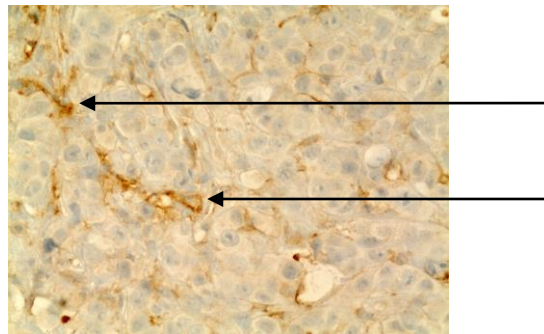
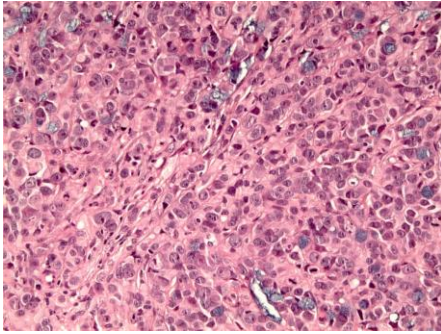
De façon similaire aux données concernant l'immunomarquage de *cxcr2*, il a été constaté un immunomarquage semblant plus important et plus intense pour *cxcl7* au sein des zones tumorales. (Tableau 14 – Figure 30).

cxcl7	Zone tumorale		Zone saine		Nécrose tumorale (%)
	Intensité de fixation	Importance de fixation	Intensité de fixation	Importance de fixation	
Souris T1	++	+	++	+	0
Souris T3	++	+	+	+	30
Souris T4	+	+	0	0	5
Souris C2	++	++	++	++	0
Souris C3	+++	+++	++	++	0
Souris C4	+	+	++	+	0
Souris C5	++	++	++	+	0

Tableau 14: Expression de cxcl7 en immunohistochimie, sur tissus tumoraux de xénogreffes intracaecales de cultures de cellules HT29, sur souris SCID. Score semi-quantitatif évaluant l'expression de 0 : absence d'expression, à +++ : très forte expression. Les souris T correspondent aux individus témoins, les souris C aux individus traités par chimiothérapie avant sacrifice. L'importance de la nécrose tumorale est évaluée sur les coupes histologiques utilisées pour l'analyse anatomopathologique

Toutefois, l'interprétation des données de marquages pour cxcl7 s'est avérée difficile pour certains individus avec un marquage peu spécifique et parfois diffus et un aspect de « bruit de fond » important.

Souris T3 :



Souris C5 :

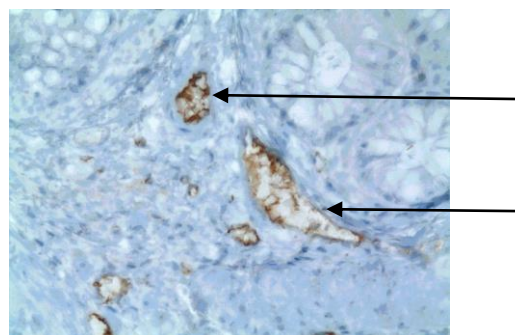
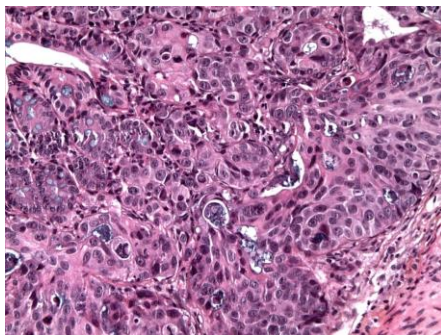


Figure 30: Immunomarquage de cxcl7 (flèches) sur coupes histologiques de xénogreffes orthotopiques intracaecales de cellules HT29 sur souris SCID. Haut : souris T3 du groupe témoin. Bas: souris C5 du groupe chimiothérapie. A gauche, coupes histologiques en coloration standard à l'hématoxyline éosine safran (HES). A droite, coupes histologiques en coloration à l'hématoxyline éosine safran et bleu Astra avec marquage de cxcl7. Grossissement : X400.

En conclusion, les modèles de xénogreffes établis n'ont permis d'obtenir que des données préliminaires. Nous avons noté certaines tendances à une augmentation d'expression de nos gènes d'intérêts chez les souris traitées mais sans significativité statistique. Le modèle de xénogreffe intracaecale n'a pas montré de supériorité par rapport au modèle de xénogreffe sous-cutanée, au contraire. Le manque de résultats significatifs pourrait être dû à la faible durée de traitement par chimiothérapie chez la souris ne permettant pas une réelle sélection des cellules CXCR2⁺.

Discussion

Classiquement, le traitement des métastases hépatiques, synchrones ou métachrones, de cancer colorectal nécessite une chimiothérapie néoadjuvante avant chirurgie hépatique d'exérèse. L'administration d'une chimiothérapie néoadjuvante est d'autant plus intéressante quand les métastases hépatiques, de par leur nombre, leurs tailles ou leurs localisations apparaissent initialement non résécables ou résécables avec risque de marges de sécurité insuffisantes après étude du bilan d'imagerie réalisé. Les protocoles de chimiothérapie utilisés conventionnellement associent du 5 FU avec de l'acide folinique et de l'irinotécan ou de l'oxaliplatine administrés en 6 cures préopératoires (110). Le traitement chirurgical des métastases hépatiques est entrepris 2 à 5 semaines après la dernière administration de chimiothérapie ou après 5 à 6 semaines en cas d'administration conjointe d'un anti-VEGF tel que le bevacizumab (111, 112).

La chimiothérapie néoadjuvante est bien souvent administrée aux patients présentant un risque évolutif plus péjoratif. La chirurgie étant souvent proposée d'emblée aux patients présentant une ou plusieurs métastases facilement résécables (113). Quoiqu'il en soit les résultats sont souvent décevants. Les données de la littérature ne semblent pas montrer de bénéfice de survie globale ou sans récurrence en cas d'administration de chimiothérapie néoadjuvante (114-116).

Nous avons montré que le niveau d'expression de CXCR2 et de CXCL7 dans les métastases hépatiques de cancers colorectaux était plus élevé chez les patients ayant reçu une chimiothérapie néoadjuvante à base de 5FU. L'augmentation du niveau de transcrits de CXCR2 au sein des métastases hépatiques étant particulièrement significative. Nos résultats suggèrent que la chimiothérapie pourrait sélectionner des clones cellulaires tumoraux plus agressifs dont la voie de signalisation de CXCR2 serait dérégulée. Une partie de ces mécanismes pourraient expliquer certains phénomènes de résistance précoces ou tardifs aux chimiothérapies et de progression tumorale. Il est intéressant de constater que notre travail montre que l'administration de thérapeutique anti-VEGF tel que le bevacizumab ne modifie pas le profil d'expression de CXCR2 et de ses ligands au sein des métastases hépatiques de cancer colorectaux.

En effet, il aurait été suggéré que l'une des voies de résistance au traitement anti-VEGF était l'activation de voies alternes de néoangiogenèse et notamment la voie CXCL8/CXCR2 (86,

89, 90). Néanmoins, il est possible que l'augmentation de l'expression de CXCR2 sous chimiothérapie ou sous thérapie anti-VEGF stimule la néoangiogénèse et favorise la récurrence tumorale en partie par ce mécanisme. CXCR2 supportant le signal de toutes les chimiokines proangiogéniques ELR+ et la chimiotaxie des cellules endothéliales.

Nos résultats ont aussi montré que le niveau d'expression de CXCR2 était corrélé avec une survie sans récurrence et une survie globale réduite chez les patients présentant des métastases hépatiques de cancers colorectaux. Deux ligands de CXCR2, CXCL7 et CXCL8 ont également un niveau d'expression corrélée à la survie globale, et à la survie sans récurrence pour CXCL7. Ces résultats suggèrent que la voie CXCL7/CXCR2 est activée dans les cellules chimiorésistantes résiduelles et que cette voie joue un rôle dans la rechute tumorale.

L'identification d'une surexpression de CXCR2 au sein de métastases hépatiques comme facteur prédictif de récurrence tumorale et de plus faible survie était confirmée en analyse multivariée après exclusion de facteurs de confusion tels que l'administration d'une chimiothérapie néoadjuvante ou l'administration néoadjuvante de biothérapie anti-VEGF telle que le bevacizumab. Notre analyse statistique multivariée a également identifié le niveau d'expression de CXCR2 et de son ligand CXCL7 au sein des métastases hépatiques, comme facteurs pronostiques indépendants de faible survie globale et de survie sans récurrence dans le sous-groupe de patients ayant reçu une chimiothérapie néoadjuvante. Ces résultats supportent l'implication potentielle d'une voie de signalisation dépendante de CXCR2 dans la récurrence tumorale, et ceci particulièrement dans le sous-groupe de patients ayant reçu un traitement par chimiothérapie.

En ce qui concerne notre modèle murin de xéno-greffes sous-cutanées, les résultats d'expression de gènes en qRT-PCR se sont avérés difficiles à interpréter, du fait du très faible niveau d'expression de nos gènes. Néanmoins, à l'aide d'amorces murines, une tendance à la surexpression de *cxcr2* et de son ligand *cxcl7* dans le groupe de souris traitées par FOLFIRI par rapport au groupe contrôle a été observée. Des données similaires sont constatées avec le groupe de souris traitées par FOLFIRI associé à du bevacizumab. Ces résultats suggèrent l'implication de *cxcr2* et de *cxcl7* au sein du microenvironnement tumoral d'origine murin sous la pression de la chimiothérapie. En revanche, peu de différence d'expression ont été observées avec les amorces d'origine humaine. Il a été décrit que l'expression de CXCR2 au sein des cellules tumorales coliques était dépendante du microenvironnement tumoral (106).

Nous avons ainsi entrepris la mise au point de modèle de xénogreffes orthotopiques de tumeurs d'origine colique humaine au sein de caecum de souris SCID. Les tissus tumoraux greffés étaient des fragments macroscopiquement viables de tumeurs sous cutanées obtenus par injection en sous-cutanées de cellules HT29 sur souris SCID. La difficulté rencontrée était, comme constaté avec notre modèle de xénogreffe sous-cutanée, une évolution rapide des tumeurs dans le groupe contrôle nécessitant finalement une diminution de la durée d'administration de la chimiothérapie et un sacrifice des individus avant le terme échu afin de ne pas risquer la perte complète du protocole.

Finalement les résultats des xénogreffes orthotopiques étaient plutôt décevants. Les résultats obtenus par qRT-PCR ne se sont pas avérés exploitables, les niveaux d'expression de nos gènes d'intérêts restant très faibles. Par contre en IHC une différence a été constatée. Ces résultats préliminaires nécessitent d'être confortés.

Plusieurs alternatives peuvent être proposées pour améliorer la pertinence des modèles de xénogreffes : premièrement, prolonger au maximum la durée d'administration de la chimiothérapie en organisant une période de pause thérapeutique de plusieurs jours avant le sacrifice, afin de lever l'état de sidération des cellules tumorales lié à l'administration de la chimiothérapie. Deuxièmement, envisager des transplantations en série sur différents animaux afin de pouvoir administrer plus longtemps la chimiothérapie et obtenir des tumeurs chimiorésistantes. Troisièmement, utiliser un modèle de développement métastatique dans le foie, par injection directe de cultures de cellules cancéreuses humaines dans la veine porte. Ce dernier modèle présente l'avantage de favoriser le développement de métastases hépatiques et donc de permettre l'analyse des phénomènes liés à leur développement et à leur évolution sous traitement. Avec une morbidité acceptable, les injections intraportales de cellules HT29 permettrait le développement de métastases hépatiques chez 89% des individus (117). Seulement la transplantation en série dans ce cas serait plus délicate.

Les données de la littérature ont montré la présence du récepteur CXCR2 dans les cellules tumorales, les cellules endothéliales, les neutrophiles et les macrophages au sein des tumeurs (118). Ning et al. ont montré que la transfection de CXCL8, au sein de cellules de cancer colique humain, augmentait leur capacité de prolifération, de migration et d'invasion (119). Le blocage de la voie de signalisation de CXCR2 par un antagoniste de CXCR2, le

SCH-527123, dans des cellules humaines de cancer colorectal HCT116 et Caco2 surexprimant de façon constitutive CXCL8, inhibe la prolifération, la croissance et l'invasion de ces cellules dans un essai in vitro et dans des modèles de xénogreffes sur souris immunodéficientes (120). Après obtention de tumeurs de volume d'approximativement 100 mm³ les souris étaient divisées en plusieurs groupes : contrôle, SCH-527123, oxaliplatine et association SCH-527123-oxaliplatine. Ils ont montré un effet antiprolifératif dose-dépendant de SCH-527123 sur les cultures cellulaires. Ils ont également montré in vivo que SCH-527123 diminuait la croissance tumorale et la densité de microvaisseaux au sein des tumeurs en comparaison avec le groupe contrôle. Leurs résultats précliniques concluaient que l'association de SCH-527123 avec de l'oxaliplatine entraînait une diminution de la prolifération cellulaire, de la croissance tumorale, de l'angiogénèse et une augmentation de l'apoptose de façon plus importante qu'avec l'oxaliplatine seule.

Wang et al ont confirmé la présence de CXCL1 et de CXCL2, deux ligands de CXCR2, au sein de tissus tumoraux de cancer de l'œsophage en qRT-PCR et en immunohistochimie (121). Leurs résultats suggèrent que les voies de signalisation CXCL1/CXCR2 et CXCL2/CXCR2 contribuent significativement à la prolifération des cellules tumorales œsophagiennes et que cette voie de signalisation doit être impliquée dans la tumorigénèse œsophagienne. A l'aide d'une lignée cellulaire de cellules de cancer de l'œsophage, la lignée WHCO1, ils ont montré que le blocage de CXCR2 par un antagoniste tel que le SB255002 ou l'inhibition de CXCL2 par un antagoniste spécifique diminuait l'activité de la voie de signalisation ERK 1/2 normalement activée par l'intermédiaire de CXCR2. Ils ont montré également que les cultures de clones cellulaires stables de WHCO1 transfectées par un siRNA de CXCL1 ou CXCL2, présentaient une diminution de l'activation de la voie ERK 1/2 (80% de réduction pour CXCL2 siRNA). Ces clones cellulaires exprimant CXCL1 siRNA et CXCL2 siRNA présentaient une diminution de prolifération de 20% et 50% respectivement.

Au sein des métastases hépatiques de nos patients, nos résultats d'IHC ont montré la présence majoritaire de CXCR2 dans les cellules épithéliales tumorales suggérant l'implication de ce récepteur dans le comportement des cellules tumorales après activation par leurs ligands. Un faible marquage de CXCR2 au sein des cellules endothéliales bordant les vaisseaux ou capillaires visibles sur les coupes histologiques a aussi été noté. La constatation d'un signal plus important, de CXCR2, en IHC au sein des cellules épithéliales tumorales des prélèvements de patients traités par chimiothérapie néoadjuvante par rapport aux patients non

traités, pourrait témoigner d'une activation des voies de signalisation de CXCR2 sous l'effet de la chimiothérapie. Il s'agit là peut-être d'une activation de voie de défense de la cellule tumorale épithéliale sous la pression de la chimiothérapie. La surexpression de CXCR2 au sein des métastases hépatiques sous l'effet de la chimiothérapie, la constatation d'un signal plus marqué de CXCR2 en IHC dans le tissu tumoral des individus traités par chimiothérapie ainsi que le plus mauvais pronostic de survie des patients présentant une expression tumorale forte de CXCR2 laissent à penser que l'axe CXCR2/ligand joue très certainement un rôle dans la chimiorésistance. Les mécanismes sont encore inconnus. Mais le caractère proangiogénique de CXCR2 peut orienter vers l'existence d'une voie de néoangiogenèse tumorale, alternative à la voie classique du VEGF et activée par l'intermédiaire de ce récepteur. Le rôle de la voie de CXCR2 dans la chimiorésistance, sera une très probable piste de recherche dans le but d'obtenir de nouvelles thérapeutiques pour les patients en évolution métastatique sous chimiothérapie.

Il a été montré que l'activation de CXCR2 présent au sein du microenvironnement tumoral favorisait la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et l'invasion tissulaire (106). Ainsi, Lee et al. ont utilisé des souris immunodéficientes (Nude) transgéniques exprimant cxcl8 de façon spécifique dans la peau (souris K14-hIL-8/nu) pour évaluer la croissance tumorale et le développement métastatique après xénogreffes souscutanées de cellules de cancer colique murin CT26 ou de cellules de cancer colique humain HCT116. Ils ont également utilisé un second modèle de xénogreffes de cellules CT26 ou HCT116 sur souris cxcr2 KO pour étudier la contribution de CXCR2 dans le microenvironnement à la croissance tumorale. Enfin ils ont utilisé un modèle de développement métastatique par injection d'un inoculum d'un million de cellules HCT116 injectées directement dans la circulation veineuse, au niveau de la queue, de souris contrôles et de souris K14-hIL-8/nu. Ils ont ainsi montré qu'un niveau élevé de cxcl8 dans le sérum et le microenvironnement tumoral augmentait de façon importante la croissance des cellules de cancer colique humain et murin avec une majoration de l'angiogenèse péri-tumorale et favorisait également l'extravasation de cellules tumorales dans le poumon et le foie. La croissance tumorale était par contre inhibée chez les souris cxcr2 KO avec une réduction significative de l'angiogenèse tumorale et une augmentation de la nécrose tumorale. Au final leurs résultats permettaient de conclure qu'une augmentation d'expression de CXCL8 dans le microenvironnement tumoral favorisait la croissance tumorale et le développement de métastases, et que l'absence de récepteur CXCR2

dans le microenvironnement inhibait la croissance des cellules cancéreuses. Cette étude témoigne du rôle critique du couple CXCL8/CXCR2 au sein du microenvironnement dans la pathogénèse du cancer colique (106). Ainsi, les récepteurs CXCR2 exprimés sur les cellules du microenvironnement ont également une part dans la progression tumorale. Jamieson et al. ont montré que la déficience ou l'inhibition de *cxcr2* réduisait la tumorigenèse liée à l'inflammation et l'apparition spontanée d'adénocarcinome dans un modèle murin de carcinogénèse intestinale (122). CXCR2 serait un puissant récepteur de chimiokines protumorales qui dirige le recrutement de leucocytes et favorise le développement tumoral dans les tissus (122). Tazzyman et al. ont montré à l'aide d'un modèle *in vitro* et *in vivo* (xénogreffes sous cutanées) de cellules tumorales de cancer de poumon que l'administration d'un antagoniste de CXCR2 (le AZ10397767) réduisait significativement le nombre de neutrophiles infiltrés au sein des tumeurs et était associé avec une croissance tumorale plus lente. Ainsi, le recrutement de neutrophiles par CXCR2 contribue au développement tumoral (123). A l'aide d'un modèle murin d'adénocarcinome pancréatique, Ijichi et al. ont démontrés que CXCR2 présent sur les fibroblastes péri-tumoraux favorisait des interactions au sein du stroma tumoral et stimulant ainsi la progression tumorale (124). Ces résultats complètent les données de la littérature qui montrent que, dans le microenvironnement, l'expression de CXCR2 sur les cellules endothéliales est liée à l'angiogenèse tumorale (89).

Bien que nos résultats d'IHC sur métastases hépatiques montrent que la surexpression de CXCR2 soit majoritairement localisée dans les cellules tumorales, la présence de CXCR2 au niveau du microenvironnement a aussi été visualisée. De plus, nos résultats sur xénogreffes ont montré une surexpression de *cxcr2* murin chez les souris traitées par chimiothérapie. Dans notre modèle murin d'IHC sur coupes de xénogreffes intracaecales de tumeurs issus de cellules de cancer colique humain HT29, nous avons montré une expression de *cxr2* un peu plus marquée au niveau des zones cellulaires tumorales mais présente également dans le stroma péri-tumoral. Nous avons constaté un marquage de *cxcr2* concentré au sein des cellules bordantes, probablement endothéliales, de capillaires ou de lymphatiques. Ces constatations pourraient témoigner d'une activation du microenvironnement et du stroma tumoral par la prolifération des cellules cancéreuses et illustre l'importance des interactions et de la communication qui s'installe entre le stroma péri-tumoral et les cellules cancéreuses pour favoriser le développement cellulaire, la néoangiogenèse tumorale et la transition

épithéliomésenchymateuse. Ces résultats suggèrent une contribution du CXCR2 du microenvironnement dans la propagation des cellules tumorales coliques.

Nos résultats montrent que CXCR2 est principalement retrouvé dans les cellules tumorales des métastases hépatiques de cancer colorectal mais est aussi présent dans le stroma tumoral. La corrélation entre l'expression de CXCR2, la rechute tumorale et une moindre survie témoigne de l'importance de ce récepteur dans la progression maligne.

Ces résultats et les conclusions de notre travail laissent à penser que cibler CXCR2 par des antagonistes pourrait permettre de bloquer la prolifération tumorale, la migration et l'angiogénèse tumorale. Un anticorps anti-CXCR2 pourrait aussi permettre de potentialiser l'effet des chimiothérapies conventionnelles et peut-être de limiter les phénomènes d'échappement évolutif sous chimiothérapie et biothérapie.

Les ligands de CXCR2 incluent CXCL1, CXCL2, CXCL3, épithélial cell-derived neutrophil-activating peptide-78/CXCL5, granulocyte chemotactic protein-2/CXCL6, CXCL7 et CXCL8. Ces chimiokines peuvent promouvoir la croissance tumorale à travers le recrutement de neutrophiles protumoraux et stimuler l'angiogénèse (66, 86, 92).

L'importance du rôle de CXCL8 était notamment mise en évidence par un modèle d'expression de CXCL8 humain au sein de souris qui ne possèdent pas un homologue de CXCL8 (106, 122). Parmi les ligands de CXCR2 analysés dans notre étude, nous avons identifié CXCL7 comme étant un facteur prédictif de plus courte survie sans récurrence et survie globale pour nos patients traités pour métastases hépatiques de cancer colorectaux. Peu d'études ont été menées sur le rôle potentiel de ce ligand de CXCR2 dans la tumorigénèse. Tang et al. ont montré à partir d'un modèle de lignée cellulaire de cellules tumorales mammaire que l'expression de CXCL7 et de CXCR2 était supérieure au sein des cellules tumorales qu'au sein des cellules pré-tumorales. Ils ont également montré que la transfection de CXCL7 au sein des cellules tumorales augmentait le caractère invasif des cellules sur un test d'invasion de Matrigel. De plus l'administration d'un anticorps anti-CXCL7 inhibait cette invasion (104). Pour Yu et al. toujours à l'aide d'un modèle de cellules tumorales mammaires, la transfection d'un siRNA CXCL7 au sein des cellules diminue leur capacité de sécrétion d'héparanase, de VEGF C et D et réduit de façon significative les capacités d'invasion cellulaire sur test de Matrigel. Ils ont également montré qu'une inhibition spécifique du ligand

de CXCR2, par un anticorps spécifique (SB225002) bloquait l'expression et la sécrétion des facteurs lymphangiogéniques VEGF-C et VEGF-D (101). Ils en concluent que l'axe CXCR2/CXCL7 est important dans l'invasion cellulaire et l'expression d'héparanases ainsi que de VEGF C/D, tous liés à l'invasion tumorale.

De façon intéressante, signalons enfin que la production de CXCL7 par les cellules souches mésenchymateuses a été récemment montrée comme étant induite par l'interaction avec des cellules souches de cancer du sein. Les cellules souches mésenchymateuses, issues de la moelle osseuse, pourraient accélérer la croissance tumorale de cancers du sein en générant des boucles de régulations positives par l'intermédiaire de chimiokines telles qu'IL6 ou CXCL7, régulant ainsi l'activité des cellules souches tumorales (123). Un faisceau croissant de preuves suggère que les sous-populations de cellules tumorales résistantes aux traitements par chimiothérapie pourraient être enrichies par des cellules souches tumorales.

Notre travail montre pour la première fois le rôle de la voie de signalisation CXCL7/CXCR2, au sein des métastases hépatiques, comme facteur prédictif de récurrence métastatique et de faible pronostic de survie en cas de métastases hépatiques de cancer colorectal. Par ailleurs, les chimiothérapies à base de 5FU augmentent le niveau d'expression de CXCL7 et de CXCR2, qui sont tous deux étroitement corrélées avec un mauvais pronostic. Ce phénomène fournirait une explication sur l'agressivité plus importante, et le potentiel métastatique élevé, des tumeurs récidivées ou des métastases se développant sous chimiothérapie.

Par ailleurs la dormance des cellules tumorales a été récemment proposée comme un mécanisme permettant aux cellules souches cancéreuses résistantes aux chimiothérapies de subsister sous un état latent dans l'organisme avant de favoriser une récurrence tumorale (124). Il est possible que la régulation de l'axe CXCL7/CXCR2 puisse jouer un rôle dans ce cadre.

Notre travail met en évidence le lien qui existe entre le microenvironnement tumoral ou métastatique et les cellules tumorales en développement. L'absence ou l'inhibition de certains récepteurs, tel que CXCR2, ou la dérégulation de certains de leurs ligands, tel que CXCL7 ou CXCL8, pourraient modifier les voies d'activation et de signalisation tumoral. Le blocage de l'une des voies de signalisation telles que l'axe CXCL7/CXCR2 pourrait permettre

de modifier l'évolution thérapeutique de la maladie néoplasique colorectale métastatique et favoriser le retour à une réponse thérapeutique chez des patients en échappement sous chimiothérapie conventionnelle.

Références bibliographiques

1. Majek O, Gondos A, Jansen L, Emrich K, Holleczeck B, Katalinic A, et al. Survival from colorectal cancer in Germany in the early 21st century. *Br J Cancer*. 2012 May 22;106(11):1875-80.
2. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*. 2007 Mar;18(3):581-92.
3. Rees JR, Blazeby JM, Fayers P, Friend EA, Welsh FK, John TG, et al. Patient-reported outcomes after hepatic resection of colorectal cancer metastases. *J Clin Oncol*. 2012 Apr 20;30(12):1364-70.
4. Chan KM, Chiang JM, Lee CF, Yu MC, Lee WC, Chen JS, et al. Outcomes of resection for colorectal cancer hepatic metastases stratified by evolving eras of treatment. *World J Surg Oncol*. 2011;9:174.
5. Hohenberger W, Weber K, Matzel K, Papadopoulos T, Merkel S. Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation--technical notes and outcome. *Colorectal Dis*. 2009 May;11(4):354-64; discussion 64-5.
6. West NP, Hohenberger W, Weber K, Perrakis A, Finan PJ, Quirke P. Complete mesocolic excision with central vascular ligation produces an oncologically superior specimen compared with standard surgery for carcinoma of the colon. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 10;28(2):272-8.
7. Lefevre JH, Parc Y, Tiret E. Increasing the Interval Between Neoadjuvant Chemoradiotherapy and Surgery in Rectal Cancer. *Ann Surg*. 2014 May 30.
8. Carlsen E, Schlichting E, Guldvog I, Johnson E, Heald RJ. Effect of the introduction of total mesorectal excision for the treatment of rectal cancer. *Br J Surg*. 1998 Apr;85(4):526-9.
9. Tilly C, Lefevre JH, Svrcek M, Shields C, Flejou JF, Tiret E, et al. R1 rectal resection: look up and don't look down. *Ann Surg*. 2014 Nov;260(5):794-9; discussion 9-800.
10. Ruers TJ, Wiering B, van der Sijp JR, Roumen RM, de Jong KP, Comans EF, et al. Improved selection of patients for hepatic surgery of colorectal liver metastases with (18)F-FDG PET: a randomized study. *J Nucl Med*. 2009 Jul;50(7):1036-41.
11. Truant S, Huglo D, Hebbar M, Ernst O, Steinling M, Pruvot FR. Prospective evaluation of the impact of [18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography of resectable colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2005 Mar;92(3):362-9.
12. Kijima S, Sasaki T, Nagata K, Utano K, Lefor AT, Sugimoto H. Preoperative evaluation of colorectal cancer using CT colonography, MRI, and PET/CT. *World J Gastroenterol*. 2014 Dec 7;20(45):16964-75.

13. Sahani DV, Bajwa MA, Andrabi Y, Bajpai S, Cusack JC. Current status of imaging and emerging techniques to evaluate liver metastases from colorectal carcinoma. *Ann Surg.* 2014 May;259(5):861-72.
14. Cieslak KP, Runge JH, Heger M, Stoker J, Bennink RJ, van Gulik TM. New perspectives in the assessment of future remnant liver. *Dig Surg.* 2014;31(4-5):255-68.
15. Pulitano C, Crawford M, Joseph D, Aldrighetti L, Sandroussi C. Preoperative assessment of postoperative liver function: the importance of residual liver volume. *J Surg Oncol.* 2014 Sep;110(4):445-50.
16. Tranchart H, Chirica M, Faron M, Ballardur P, Lefevre LB, Svrcek M, et al. Prognostic impact of positive surgical margins after resection of colorectal cancer liver metastases: reappraisal in the era of modern chemotherapy. *World J Surg.* 2013 Nov;37(11):2647-54.
17. de Haas RJ, Wicherts DA, Flores E, Azoulay D, Castaing D, Adam R. R1 resection by necessity for colorectal liver metastases: is it still a contraindication to surgery? *Ann Surg.* 2008 Oct;248(4):626-37.
18. Pawlik TM, Vauthey JN. Surgical margins during hepatic surgery for colorectal liver metastases: complete resection not millimeters defines outcome. *Ann Surg Oncol.* 2008 Mar;15(3):677-9.
19. Zorzi D, Mullen JT, Abdalla EK, Pawlik TM, Andres A, Muratore A, et al. Comparison between hepatic wedge resection and anatomic resection for colorectal liver metastases. *J Gastrointest Surg.* 2006 Jan;10(1):86-94.
20. Reddy SK, Pawlik TM, Zorzi D, Gleisner AL, Ribero D, Assumpcao L, et al. Simultaneous resections of colorectal cancer and synchronous liver metastases: a multi-institutional analysis. *Ann Surg Oncol.* 2007 Dec;14(12):3481-91.
21. Mentha G, Majno PE, Andres A, Rubbia-Brandt L, Morel P, Roth AD. Neoadjuvant chemotherapy and resection of advanced synchronous liver metastases before treatment of the colorectal primary. *Br J Surg.* 2006 Jul;93(7):872-8.
22. Vigano L, Capussotti L, Barroso E, Nuzzo G, Laurent C, Ijzermans JN, et al. Progression while receiving preoperative chemotherapy should not be an absolute contraindication to liver resection for colorectal metastases. *Ann Surg Oncol.* 2012 Sep;19(9):2786-96.
23. Andreou A, Aloia TA, Brouquet A, Vauthey JN. Recent advances in the curative treatment of colorectal liver metastases. *Gastrointest Cancer Res.* 2011 Jul;4(4 Suppl 1):S2-8.
24. Sorbye H, Mauer M, Gruenberger T, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, et al. Predictive factors for the benefit of perioperative FOLFOX for resectable liver metastasis in colorectal cancer patients (EORTC Intergroup Trial 40983). *Ann Surg.* 2012 Mar;255(3):534-9.

25. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun 3;350(23):2335-42.
26. Benoist S, Brouquet A, Penna C, Julie C, El Hajjam M, Chagnon S, et al. Complete response of colorectal liver metastases after chemotherapy: does it mean cure? *J Clin Oncol*. 2006 Aug 20;24(24):3939-45.
27. Okines A, Puerto OD, Cunningham D, Chau I, Van Cutsem E, Saltz L, et al. Surgery with curative-intent in patients treated with first-line chemotherapy plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer First BEAT and the randomised phase-III NO16966 trial. *Br J Cancer*. 2009 Oct 6;101(7):1033-8.
28. Wong R, Cunningham D, Barbachano Y, Saffery C, Valle J, Hickish T, et al. A multicentre study of capecitabine, oxaliplatin plus bevacizumab as perioperative treatment of patients with poor-risk colorectal liver-only metastases not selected for upfront resection. *Ann Oncol*. 2011 Sep;22(9):2042-8.
29. Portier G, Elias D, Bouche O, Rougier P, Bosset JF, Saric J, et al. Multicenter randomized trial of adjuvant fluorouracil and folinic acid compared with surgery alone after resection of colorectal liver metastases: FFCD ACHBTH AURC 9002 trial. *J Clin Oncol*. 2006 Nov 1;24(31):4976-82.
30. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):453-8.
31. Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Dec;1796(2):293-308.
32. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Feb;7(2):131-42.
33. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grunert S, Sommer A, Pehamberger H, et al. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2004 Aug;114(4):569-81.
34. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):442-54.
35. Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):5991-5; discussion 5.
36. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Mar;15(3):178-96.
37. Overall CM, Kleinfeld O. Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2006 Mar;6(3):227-39.

38. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol.* 2010 Jan 11;188(1):11-9.
39. Ghosh M, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS, Condeelis JS. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science.* 2004 Apr 30;304(5671):743-6.
40. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 2003 May;3(5):362-74.
41. Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA, et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res.* 2004 Dec 1;64(23):8613-9.
42. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res.* 2004 Oct 1;64(19):7022-9.
43. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994 Feb;124(4):619-26.
44. Wyckoff JB, Jones JG, Condeelis JS, Segall JE. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res.* 2000 May 1;60(9):2504-11.
45. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002 Aug;2(8):563-72.
46. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *Lancet Oncol.* 2002 Jul;3(7):425-30.
47. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971 Nov 18;285(21):1182-6.
48. Sitohy B, Nagy JA, Dvorak HF. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target. *Cancer Res.* 2012 Apr 15;72(8):1909-14.
49. Gimbrone MA, Jr., Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med.* 1972 Aug 1;136(2):261-76.
50. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):401-10.
51. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell.* 1998 Sep 18;94(6):715-25.
52. McDonald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):713-25.
53. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):249-57.

54. Inai T, Mancuso M, Hashizume H, Baffert F, Haskell A, Baluk P, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol.* 2004 Jul;165(1):35-52.
55. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005 Jan 7;307(5706):58-62.
56. Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 2006 Nov 17;127(4):679-95.
57. Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res.* 2006 Dec 1;66(23):11089-93.
58. Mack GS, Marshall A. Lost in migration. *Nat Biotechnol.* 2010 Mar;28(3):214-29.
59. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature.* 2005 Dec 8;438(7069):820-7.
60. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
61. Verbeke H, Struyf S, Laureys G, Van Damme J. The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Oct-Dec;22(5-6):345-58.
62. Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol.* 2004 Apr;1(2):95-104.
63. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):436-44.
64. Townson DH, Liptak AR. Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 Nov 10;1:94.
65. Oladipo O, Conlon S, O'Grady A, Purcell C, Wilson C, Maxwell PJ, et al. The expression and prognostic impact of CXC-chemokines in stage II and III colorectal cancer epithelial and stromal tissue. *Br J Cancer.* 2011 Feb 1;104(3):480-7.
66. Strieter RM, Belperio JA, Phillips RJ, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol.* 2004 Jun;14(3):195-200.
67. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998 Feb 12;338(7):436-45.
68. Thelen M, Stein JV. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol.* 2008 Sep;9(9):953-9.
69. Wurth R, Bajetto A, Harrison JK, Barbieri F, Florio T. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:144.

70. Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett.* 2007 Oct 28;256(2):137-65.
71. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 2007 May;121(1):1-14.
72. Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev.* 2008 Feb;18(1):11-8.
73. Rombouts EJ, Pavic B, Lowenberg B, Ploemacher RE. Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood.* 2004 Jul 15;104(2):550-7.
74. Kim J, Takeuchi H, Lam ST, Turner RR, Wang HJ, Kuo C, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol.* 2005 Apr 20;23(12):2744-53.
75. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood.* 2006 Mar 1;107(5):1761-7.
76. Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, Jayasinghe C, Gonner U, Wilsberg V, et al. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Mar 1;11(5):1743-50.
77. Dessein AF, Stechly L, Jonckheere N, Dumont P, Monte D, Leteurtre E, et al. Autocrine induction of invasive and metastatic phenotypes by the MIF-CXCR4 axis in drug-resistant human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2010 Jun 1;70(11):4644-54.
78. Ottaiano A, di Palma A, Napolitano M, Pisano C, Pignata S, Tatangelo F, et al. Inhibitory effects of anti-CXCR4 antibodies on human colon cancer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2005 Aug;54(8):781-91.
79. Zhao BC, Wang ZJ, Mao WZ, Ma HC, Han JG, Zhao B, et al. CXCR4/SDF-1 axis is involved in lymph node metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2011 May 21;17(19):2389-96.
80. Wendt MK, Johanesen PA, Kang-Decker N, Binion DG, Shah V, Dwinell MB. Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis. *Oncogene.* 2006 Aug 17;25(36):4986-97.
81. Drury LJ, Wendt MK, Dwinell MB. CXCL12 chemokine expression and secretion regulates colorectal carcinoma cell anoikis through Bim-mediated intrinsic apoptosis. *PLoS One.* 2010;5(9):e12895.
82. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010 Jun 1;16(11):2927-31.
83. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):50-6.

84. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett.* 2008 Aug 28;267(2):226-44.
85. Roy I, Evans DB, Dwinell MB. Chemokines and chemokine receptors: update on utility and challenges for the clinician. *Surgery.* 2014 Jun;155(6):961-73.
86. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer.* 2006 Apr;42(6):768-78.
87. Sugden PH, Clerk A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal.* 1997 Aug;9(5):337-51.
88. Campbell LM, Maxwell PJ, Waugh DJ. Rationale and Means to Target Pro-Inflammatory Interleukin-8 (CXCL8) Signaling in Cancer. *Pharmaceuticals (Basel).* 2013;6(8):929-59.
89. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol.* 2000 Nov 1;165(9):5269-77.
90. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem.* 2003 Mar 7;278(10):8508-15.
91. Keane MP, Belperio JA, Xue YY, Burdick MD, Strieter RM. Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. *J Immunol.* 2004 Mar 1;172(5):2853-60.
92. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem.* 1995 Nov 10;270(45):27348-57.
93. Rubie C, Frick VO, Pfeil S, Wagner M, Kollmar O, Kopp B, et al. Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2007 Oct 7;13(37):4996-5002.
94. Brew R, Southern SA, Flanagan BF, McDicken IW, Christmas SE. Detection of interleukin-8 mRNA and protein in human colorectal carcinoma cells. *Eur J Cancer.* 1996 Nov;32A(12):2142-7.
95. Cui G, Yuan A, Goll R, Vonen B, Florholmen J. Dynamic changes of interleukin-8 network along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Nov;58(11):1897-905.
96. Doll D, Keller L, Maak M, Boulesteix AL, Siewert JR, Holzmann B, et al. Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival. *Int J Colorectal Dis.* 2010 May;25(5):573-81.
97. Terada H, Urano T, Konno H. Association of interleukin-8 and plasminogen activator system in the progression of colorectal cancer. *Eur Surg Res.* 2005 May-Jun;37(3):166-72.

98. Sturm A, Baumgart DC, d'Heureuse JH, Hotz A, Wiedenmann B, Dignass AU. CXCL8 modulates human intestinal epithelial cells through a CXCR1 dependent pathway. *Cytokine*. 2005 Jan 7;29(1):42-8.
99. Bates RC, DeLeo MJ, 3rd, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR-1-mediated chemotaxis. *Exp Cell Res*. 2004 Oct 1;299(2):315-24.
100. Aivado M, Spentzos D, Germing U, Alterovitz G, Meng XY, Grall F, et al. Serum proteome profiling detects myelodysplastic syndromes and identifies CXC chemokine ligands 4 and 7 as markers for advanced disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 23;104(4):1307-12.
101. Yu M, Berk R, Kosir MA. CXCL7-Mediated Stimulation of Lymphangiogenic Factors VEGF-C, VEGF-D in Human Breast Cancer Cells. *J Oncol*. 2010;2010:939407.
102. Hoogewerf AJ, Leone JW, Reardon IM, Howe WJ, Asa D, Heinrikson RL, et al. CXC chemokines connective tissue activating peptide-III and neutrophil activating peptide-2 are heparin/heparan sulfate-degrading enzymes. *J Biol Chem*. 1995 Feb 17;270(7):3268-77.
103. Grepin R, Guyot M, Giuliano S, Boncompagni M, Ambrosetti D, Chamorey E, et al. The CXCL7/CXCR1/2 axis is a key driver in the growth of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2014 Feb 1;74(3):873-83.
104. Tang Z, Yu M, Miller F, Berk RS, Tromp G, Kosir MA. Increased invasion through basement membrane by CXCL7-transfected breast cells. *Am J Surg*. 2008 Nov;196(5):690-6.
105. Jubb AM, Harris AL. Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer. *Lancet Oncol*. 2010 Dec;11(12):1172-83.
106. Lee YS, Choi I, Ning Y, Kim NY, Khatchadourian V, Yang D, et al. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. *Br J Cancer*. 2012 May 22;106(11):1833-41.
107. Cheng WL, Wang CS, Huang YH, Tsai MM, Liang Y, Lin KH. Overexpression of CXCL1 and its receptor CXCR2 promote tumor invasion in gastric cancer. *Ann Oncol*. 2011 Oct;22(10):2267-76.
108. Matsubara J, Honda K, Ono M, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, et al. Reduced plasma level of CXC chemokine ligand 7 in patients with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011 Jan;20(1):160-71.
109. Tsukui H, Pocard M, Salmon RJ, Lefrancois D, Languille-Mimoune O, Dutrillaux B, et al. [Orthotopic implantation of human colon cancers into nude mice. Methodology and physiopathological value]. *Gastroenterol Clin Biol*. 1994;18(12):1112-8.
110. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, et al. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013 Nov;14(12):1208-15.

111. Klinger M, Eipeldauer S, Hacker S, Herberger B, Tamandl D, Dorfmeister M, et al. Bevacizumab protects against sinusoidal obstruction syndrome and does not increase response rate in neoadjuvant XELOX/FOLFOX therapy of colorectal cancer liver metastases. *Eur J Surg Oncol*. 2009 May;35(5):515-20.
112. Millet G, Truant S, Leteurtre E, Hebbar M, Zerbib P, Huet G, et al. Volumetric analysis of remnant liver regeneration after major hepatectomy in bevacizumab-treated patients: a case-matched study in 82 patients. *Ann Surg*. 2012 Nov;256(5):755-61; discussion 61-2.
113. Bonney GK, Coldham C, Adam R, Kaiser G, Barroso E, Capussotti L, et al. Role of neoadjuvant chemotherapy in resectable synchronous colorectal liver metastasis; An international multi-center data analysis using LiverMetSurvey. *J Surg Oncol*. 2015 May;111(6):716-24.
114. Faron M, Chirica M, Tranchard H, Balladur P, de Gramont A, Afchain P, et al. Impact of preoperative and postoperative FOLFOX chemotherapies in patients with resectable colorectal liver metastasis. *J Gastrointest Cancer*. 2014 Sep;45(3):298-306.
115. Zhu D, Zhong Y, Wei Y, Ye L, Lin Q, Ren L, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy in patients with resectable colorectal liver metastases. *PLoS One*. 2014;9(1):e86543.
116. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2008 Mar 22;371(9617):1007-16.
117. Thalheimer A, Otto C, Bueter M, Illert B, Gattenlohner S, Gasser M, et al. Tumor cell dissemination in a human colon cancer animal model: orthotopic implantation or intraportal injection? *Eur Surg Res*. 2009;42(3):195-200.
118. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Nov 1;14(21):6735-41.
119. Ning Y, Manegold PC, Hong YK, Zhang W, Pohl A, Lurje G, et al. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int J Cancer*. 2011 May 1;128(9):2038-49.
120. Ning Y, Labonte MJ, Zhang W, Bohanes PO, Gerger A, Yang D, et al. The CXCR2 antagonist, SCH-527123, shows antitumor activity and sensitizes cells to oxaliplatin in preclinical colon cancer models. *Mol Cancer Ther*. 2012 Jun;11(6):1353-64.
121. Wang B, Hendricks DT, Wamunyokoli F, Parker MI. A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. *Cancer Res*. 2006 Mar 15;66(6):3071-7.
122. Asfaha S, Dubeykovskiy AN, Tomita H, Yang X, Stokes S, Shibata W, et al. Mice that express human interleukin-8 have increased mobilization of immature myeloid cells, which

exacerbates inflammation and accelerates colon carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2013 Jan;144(1):155-66.

123. Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res*. 2011 Jan 15;71(2):614-24.

124. Sosa MS, Avivar-Valderas A, Bragado P, Wen HC, Aguirre-Ghiso JA. ERK1/2 and p38alpha/beta signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease. *Clin Cancer Res*. 2011 Sep 15;17(18):5850-7.

Article de Thèse d'Université

Overexpression of chemokine receptor CXCR2 and ligand CXCL7 in liver metastases from colon cancer is correlated to shorter disease-free and overall survival.

Desurmont T, Skrypek N, Duhamel A, Jonckheere N, Millet G, Leteurtre E, Gosset P, Duchene B, Ramdane N, Hebbar M, Van Seuningen I, Pruvot FR, Huet G, Truant S.

Cancer Sci. 2015 Mar;106(3):262-9. Epub 2015 Mar 5.

Article de fin de post-Internat

Desmoid tumour in familial adenomatous polyposis patients: responses to treatments.

Desurmont T, Lefèvre JH, Shields C, Colas C, Tiret E, Parc Y.

Fam Cancer. 2015 Mar;14(1):31-9.

Article de Master 2 Recherche

Trophic factor and FR167653 supplementation during cold storage rescue chronic renal injury.

Desurmont T, Giraud S, Cau J, Goujon JM, Scepi M, Roumy J, Chatauret N, Thuillier R, Hauet T.

J Urol. 2011 Mar;185(3):1139-46. Epub 2011 Jan 21

Annexes

Principaux protocoles de chimiothérapies de 1ère ligne, utilisés en France, en traitement du cancer colorectal métastatique.

D'après, Phelip JM, Bouché O, Conroy T, Michel P, Penna C, Tournigand C, Louvet C, Bedenne L. «Cancer colorectal métastatique». Thésaurus National de Cancérologie Digestive, février 2014.

➤ **LV5FU2 simplifié** (recommandation : grade A)

+/- bévacizumab 5 mg/kg (Avastin®) avec schéma de 5FU modifié (recommandation : grade B)

➤ **Capecitabine (Xeloda®)** (recommandation : grade A).

+/- bévacizumab 7,5 mg/kg [147] (recommandation : grade B)

➤ **FOLFIRI** (irinotécan 180 mg/m² - LV5FU2 simplifié) (recommandation : grade A)

+/- bévacizumab 5 mg/kg - FOLFIRI (recommandation : grade B)

+/- cétuximab 400 mg/m² puis 250 mg/m² hebdomadaire si statut tumoral RAS non muté (recommandation : grade B). Possibilité d'administrer une double dose (500 mg/m²) toutes les deux semaines (recommandation : grade B).

➤ **FOLFOX 4 simplifié** (US =6 modifié) (oxaliplatine 85 mg/m²-LV5FU2 simplifié) (recommandation : grade A)

+/- bevacizumab 5 mg/kg (recommandation : grade B - cette association n'a pas été retenue par l'ensemble des membres du groupe de travail du fait de l'absence d'amélioration de la survie sans progression dans l'analyse de sous-groupe d'un essai de phase III)

+/- panitumumab 6 mg/kg si le statut tumoral RAS est non muté (recommandation : grade B)

+/- cétuximab 400 mg/m² puis 250 mg/m² hebdomadaire si statut tumoral RAS non muté. Possibilité d'administrer une double dose (500 mg/m²) toutes les deux semaines (recommandation : grade C).

➤ **FOLFOX 7** (oxaliplatine 130mg/m² -LV5FU2 simplifié sans 5FU bolus) 6 cures puis LV5FU2 simplifié puis réintroduction de l'oxaliplatine à la progression (stratégie OPTIMOX 1) (recommandation : grade B).

➤ **XELOX** (recommandation : grade A)

+/- bevacizumab 7,5 mg/kg [85,106](recommandation : grade B)

L'association du cétuximab ou du panitumumab à l'oxaliplatine est formellement contre-indiquée lorsque RAS est muté car délétère en terme de survie, et inefficace avec l'irinotecan.

L'association XELOX-cétuximab est déconseillée car toxique et sans bénéfice (retrait d'AMM) (étude COIN 175).

- Options si contre-indication aux fluoropyrimidines (5FU, capécitabine)

raltitrexed (Tomudex®) adaptation des doses à la clairance de la créatinine; antidote = acide folinique. (recommandation : grade C)

raltitrexed-oxaliplatine (TOMOX) (recommandation : grade C)

raltitrexed-irinotecan (TOMIRI) (recommandation : grade C)

irinotecan-oxaliplatine (IRINOX) (recommandation : grade C)

irinotecan (recommandation : grade C)

oxaliplatine 130mg/m² tous les 21 jours (recommandation : grade C)

- Options en l'absence de contre-indication au bevacizumab :

bévacizumab 5 mg/kg - LVfd5FU2 d'après Kabinavar et al. avec schéma de 5FU modifié (accord d'experts)

bévacizumab 7,5 mg/kg - XELIRI (recommandation : grade C)

- Options en l'absence de contre-indication aux fluoropyrimidines :

LVfd5FU2 schéma plus court que LV5FU2 (recommandation : grade B)

FOLFOX 6 (oxaliplatine 100mg/m²-LV5FU2 simplifié) schéma intensifié mais pas de comparaison disponible avec le FOLFOX4 simplifié (recommandation : grade C)

XELIRI alternative moins contraignante que FOLFIRI (recommandation : grade C)

NOTES

NOTES