

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Lille 1

Spécialité Biochimie et Biologie moléculaire

Soutenue publiquement le 11 janvier 2016 par

Adriana MIHALACHE

**Recherche de nouveaux marqueurs
diagnostiques et/ou pronostiques pour le cancer
du côlon**

Composition du jury :

Président	Dr Jean-Claude MICHALSKI, Université de Lille 1
Directeurs de thèse	Dr Catherine ROBBE-MASSELOT, Université de Lille 1 Dr Sophie GROUX-DEGROOTE, Université de Lille 1
Rapporteurs	Dr Anthony CORFIELD, Université de Bristol, UK Pr Jean-Christophe SABOURIN, CHU de Rouen
Examineur	Pr Abderrahman MAFTAH, Université de Limoges
Invité	Pr Pierre GOSSET, Hôpital Saint-Vincent de Lille

A Guillaume

Pour son amour, son soutien et sa patience

A ma famille et tous mes amis

Remerciements

Durant ma thèse j'ai été amenée à être partagée entre deux laboratoires, celui d'anatomie pathologique de l'hôpital Saint Vincent de Paul et celui du C9, l'unité de Glycobiologie structurale et fonctionnelle.

Je remercie le Professeur Pierre Gosset pour m'avoir offert la possibilité d'effectuer cette thèse en disposant pendant deux ans d'un mi-temps en dehors du travail de l'hôpital consacré à la thèse, et pour son soutien pendant tout le parcours.

Je remercie également le Docteur Jean-Claude Michalski pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, et tout particulièrement les Docteurs Catherine Robbe-Masselot et Sophie Groux-Degroote qui m'ont encadrée et guidée durant ces travaux, pour leur patience, leur gentillesse, leur disponibilité ainsi que d'avoir cru en moi, ce qui m'a permis d'être là où j'en suis.

Un grand merci aux différents membres de ces deux laboratoires qui m'ont aidée le long des différentes étapes de ma thèse.

Je remercie les collègues du C9 : le professeur Philippe Delannoy, le docteur Anne Harduin-Lepers, Cindy, Lucie, Dorothée, Florent, Marie, Lucie, Agata, Sylvain, Virginie, Sven, Eudoxie pour leurs conseils, leur aide, la bonne humeur et sympathie.

Je remercie aussi mes collègues de l'hôpital Saint Vincent de Paul : Laurence, Baptiste, Pierre, Sophie, Marie, Sabrina pour leur précieuse aide technique, et aussi les secrétaires Jennifer, Maryse et Delphine pour leur soutien. Je remercie également les docteurs Stephanos Papadopoulos et Jean François Quinchon.

Je remercie l'ingénieur statisticienne Laurène Norberciack pour son aide apportée pour l'analyse statistique des résultats.

Je transmets également ma plus sincère gratitude au Docteur Jean-Luc Desseyn d'avoir accepté de participer aux comités de suivi de thèse ainsi qu'aux membres du jury : le

professeur Abderrahman Maftah, le Dr Anthony Corfield et le professeur Jean-Christophe Sabourin pour avoir accepté d'être examinateur et rapporteurs de ma thèse. Merci également au docteur Jean-Claude Michalski pour avoir accepté la présidence du jury et au Professeur Gosset pour sa participation au jury.

Egalement un grand merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au sein du C9 et qui m'ont aidée et/ou écoutée à un moment ou un autre durant toutes ces années : Stéphanie, Marie Ange, Nadège, Gaëlle, Bélinda... et toutes les autres personnes que je n'ai pas citées.

Publications

- **Mihalache A**, Delplanque JF, Ringot-Destrez B, Wavelet C, Gosset P, Nunes B, Groux-Degroote S, Léonard R, Robbe-Masselot C. (2015). Structural characterization of mucin O-glycosylation may provide important information to help prevent colorectal tumor recurrence. *Front. Oncol.* 5, DOI: 10.3389/fonc.2015.00217
- Chaouche-Mazouni S, Scherpereel A, Zaamoum R, **Mihalache A**, Amir ZC, Lebaïli N, Delaire B, Gosset P. (2015). Claudin 3, 4, and 15 expression in solid tumors of lung adenocarcinoma versus malignant pleural mesothelioma. *Ann Diagn Pathol.* 19(4) :193-7. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2015.03.007
- Curt MJ, Lecointe K, **Mihalache A**, Rossez Y, Gosset P, Léonard R, Robbe-Masselot C. (2015). Alteration or adaptation, the two roads for human gastric mucin glycosylation infected by *Helicobacter pylori*. *Glycobiology.*25 :617-31.
- Raphaël M, Lehen'kyi V, Vandenberghe M, Beck B, Khalimonchuk S, Vanden Abeele F, Farsetti L, Germain E, Bokhobza A, **Mihalache A**, Gosset P, Romanin C, Clézardin P, Skryma R, Prevarskaya N. (2014) TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orai1-mediated mechanism and controls cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(37):E3870-9. doi: 10.1073/pnas.1413409111
- Groux-Degroote S, Wavelet C, Krzewinski-Recchi MA, Portier L, Mortuaire M, **Mihalache A**, Trinchera M, Delannoy P, Malagolini N, Chiricolo M, Dall'Olio F, Harduin-Lepers A (2014). B4GALNT2 gene expression controls the biosynthesis of Sda and sialyl Lewis X antigens in healthy and cancer human gastrointestinal tract. *Int J Biochem Cell Biol.* 53:442-9.

Posters

- 2014, 3-6 mai, Chicago, Digestive Disease Week (American society for gastroenterology): Mucin O-glycans as potential prognosis and recurrence markers of colorectal cancer. **Mihalache A**, Gosset P, Ringot B, Nunes B., Fleurisse L, Léonard R., Groux-Degroote S., Robbe-Masselot C.
- 2014, 17–21 novembre, Paris, Carrefour Pathologie: Modifications d'expression et de localisation de DMBT1 (deleted in malignant brain tumor 1 dans le cancer colorectal. **Mihalache A.**, Gosset P., Nunes B., Fleurisse L., Delaire B, Groux-Degroote S., Robbe-Masselot C.
- 2013, 18–22 novembre, Paris, Carrefour Pathologie : Tumeur à composante choriocarcinomeuse chez la femme ménopausée. Difficultés diagnostiques et implications thérapeutiques. A propos d'un cas et revue de la littérature. A Houzé de l'Aulnoit, **A Mihalache**, C Desauw, R Detchev, M Delemer, D Houzé de l'Aulnoit, P Gosset

Index des Figures

Figure 1. Anatomie du tractus gastro-intestinal.....	26
Figure 2. Histologie du côlon.	27
Figure 3. Les différentes étapes du développement du cancer colique.	32
Figure 4. Modèle simplifié d'une mucine sécrétée.	57
Figure 5. Caractéristiques structurales des mucines.	58
Figure 6. Localisation du gène MUC2 et organisation de la protéine MUC2.	60
Figure 7. La synthèse des différents noyaux, ou « cores » de chaînes O-glycanniques de mucines.	63
Figure 8. Exemples de déterminants glycaniques périphériques de type Lewis et Sda, présents sur des disaccharides terminaux de type 1 ou de type 2.	67
Figure 9. Déterminants glycaniques présents en périphérie des mucines résultant de la fucosylation par l'enzyme FucT-III et de la substitution d'un disaccharide de type 2 par les enzymes de groupes tissulaires A et B.....	68
Figure 10. Voies de biosynthèse de dérivés sulfatés, sialylés et/ou fucosylés de l'épitope Lewis x, et de l'épitope Sda.	69
Figure 11. Schématisation de la protéine DMBT1.	76
Figure 12. Voies de biosynthèse des O-glycannes sialyl Tn, sialyl T et disialyl T surexprimés dans de nombreux cancers.	87
Figure 13. Caractérisation structurale de la O-glycosylation des mucines.....	96
Figure 14. Gradients du niveau d'expression des O-glycannes de mucines coliques issues de contrôles sains (n=5), de marges de résection (n=10) et des tumeurs appariées (n=10).....	102
Figure 15. Comparaison de l'abondance relative des O-glycannes majoritaires purifiés à partir de tumeurs au stade II (n=4), au stade III (n= 3) et au stade IV (n=3).	104
Figure 16. Comparaison de l'abondance relative des O-glycannes majoritaires purifiés à partir de tumeurs mucineuses (n=1), bien différenciées (n= 1), moyennement différenciées (n=6) ou peu différenciées (n=2).....	106
Figure 17. Comparaison de l'abondance relative des O-glycannes majoritaires purifiés à partir de contrôles (n=5), tumeurs avec récurrence (n=3) et tumeurs sans récurrence (n=6)......	107

Figure 18. Comparaison des répertoires de glycosylation des mucines purifiées à partir de tumeurs avec ou sans récurrence.....	108
Figure 19 : Représentation schématique des déterminants glycaniques périphériques 3-sulfo Le ^x et Sialyl Le ^x , basés sur le core 3 sialylé en 6 sur la GalNAc-ol spécifique des mucines coliques.	113
Figure 20. Expression des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases (<i>GAL3ST2</i> , <i>GAL3ST3</i> , <i>GAL3ST4</i>), d'α2,3-sialyltransférases (<i>ST3GAL1</i> , <i>ST3GAL2</i> , <i>ST3GAL3</i> , <i>ST3GAL4</i> , <i>ST3GAL6</i>) et de la core 3 synthétase dans les tumeurs coliques, les marges de résection appariées (n = 20), et les contrôles sains (n = 11).	121
Figure 21. Expression des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases (<i>GAL3ST2</i> , <i>GAL3ST3</i> , <i>GAL3ST4</i>), d'α2,3-sialyltransférases (<i>ST3GAL1</i> , <i>ST3GAL2</i> , <i>ST3GAL3</i> , <i>ST3GAL4</i> , <i>ST3GAL6</i>) et de la core 3 synthétase dans les tumeurs coliques de différents stades TNM (n=2 pour le stade 2 ; n=4 pour le stade 3 ; n = 8 pour le stade 4).	126
Figure 22. Expression des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases (<i>GAL3ST2</i> , <i>GAL3ST3</i> , <i>GAL3ST4</i>), d'α2,3-sialyltransférases (<i>ST3GAL1</i> , <i>ST3GAL2</i> , <i>ST3GAL3</i> , <i>ST3GAL4</i> , <i>ST3GAL6</i>) et de la core 3 synthétase dans les tumeurs coliques et les marges de résection provenant de patients ayant récidivé avant 5 ans (n = 6) ou pas (n = 10).	131
Figure 23. Immunolocalisation de DMBT1 dans la muqueuse colique normale.....	141
Figure 24. Coloration HES de coupes de tumeurs coliques provenant des différents groupes histologiques.....	142
Figure 25. Expression hétérogène de DMBT1 au sein des tumeurs.....	143
Figure 26. Immunolocalisation hétérogène de DMBT1 au niveau des cellules tumorales des différentes tumeurs.	144
Figure 27. Niveau d'expression de DMBT1 au niveau tumoral.	145
Figure 28. Expression de DMBT1 au niveau de la muqueuse non tumorale à proximité.	145
Figure 29. Expression de DMBT1 au niveau de la muqueuse non tumorale à distance.	146
Figure 30. Expression de DMBT1 au niveau des adénomes.	147
Figure 31. Expression de DMBT1 au niveau des métastases ganglionnaires.....	147
Figure 32. Expression de DMBT1 au niveau des métastases hépatiques.....	148
Figure 33. Expression de DMBT1 au niveau des différentes localisations.	149

Figure 34. Expression de DMBT1 en fonction de l'état de différenciation et/ou la présence d'une composante mucineuse au sein de la tumeur.	150
Figure 35. Expression de DMBT1 dans les tumeurs coliques en fonction du stade TNM.	151
Figure 36. Expression de DMBT1 au niveau des différents polypes.....	152
Figure 37. Localisation de l'expression de DMBT1 au niveau des polypes hyperplasiques et les adénomes/polypes sessiles festonnés.	153
Figure 38. Expression de DMBT1 au niveau des adénomes avec dysplasie de bas grade par rapport à la muqueuse saine de voisinage et aux témoins sains.	154
Figure 39. Expression de DMBT1 au niveau des adénomes avec dysplasie de haut grade +/- foyer(s) d'adénocarcinome intramuqueux.....	155
Figure 40. Expression de DMBT1 au niveau des adénomes des patients ayant des tumeurs (avec la muqueuse saine de voisinage et à distance – premier groupe) versus les patients sans tumeurs (avec la muqueuse de voisinage et les témoins sains – 2 ^{ème} groupe).	156
Figure 41. Expression de DMBT1 dans les adénomes.	157
Figure 42. Expression de DMBT1 au niveau d'un polype mixte.	158
Figure 43. Histogramme du % de cellules marquées par DMBT1 au niveau tumoral.....	158
Figure 44. Courbe de survie globale obtenue par la méthode de Kaplan-Meier en fonction de l'expression de DMBT1 au niveau tumoral.....	159
Figure 45 : Les courbes de survie globale obtenues par la méthode de Kaplan-Meier en fonction de l'expression de DMBT1 au niveau tumoral pour les groupes de <5%, 5-25%, 25-50%, 50-75% et ≥75%.	160
Figure 46. Immunodétection de MSH2.....	163
Figure 47. Expression de DMBT1 dans les tumeurs microsatellitaires stables et instables, toutes tumeurs confondues.	164
Figure 48. Expression de DMBT1 dans les tumeurs microsatellitaires stables et instables pour les adénocarcinomes mucosécrétants et peu différenciés.	164
Figure 49. Expression de DMBT1 versus polyclonal.	165
Figure 50. Expression comparative de DMBT1 au niveau des ARNm (qPCR) et au niveau protéique (IHC).....	167
Figure 51. Expression de DMBT1 évaluée par RT-qPCR – augmentation de l'expression de DMBT1 au sein des tumeurs par rapport aux marges de résection pour 12 patients/20. ...	168

Index des Tableaux

Tableau 1 : Classification TNM selon l'OMS 7ème édition 2009 (World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2010).....	50
Tableau 2 : Caractéristiques des mucines sécrétées (formant ou non un gel) et des mucines membranaires.....	59
Tableau 3 : Structure des différents cores glycaniques de mucines.	65
Tableau 4 : Les Sialyltransférases humaines clonées et leur spécificité de substrat.	72
Tableau 5 : Les sulfotransférases impliquées dans la sulfatation des chaînes O-glycanniques de mucines.....	74
Tableau 6 : Expression et localisation de différentes mucines au niveau de la muqueuse colique normale.	81
Tableau 7 : Expression des différentes mucines dans les lésions polypoïdes bénignes et pré-malignes.	82
Tableau 8 : Expression de différentes mucines dans les différents types d'adénocarcinome colique.....	83
Table 9 : Caractéristiques cliniques des échantillons tumoraux (et de leur marge de résection appariée), polypes et témoins utilisés dans cette étude.....	95
Tableau 10 : Structures ou séquences proposées pour les oligosaccharides neutres et acides identifiés sur les mucines intestinales issues de muqueuses saines ainsi que des tumeurs et de leurs marges de résections appariées.	97
Tableau 11. Caractéristiques cliniques des échantillons témoins et tumoraux (et de leur marge de résection appariée) utilisés dans cette étude.	115
Tableau 12 : Caractéristiques cliniques des échantillons tumoraux (et de leur marge de résection appariée), polypes et témoins utilisés dans cette étude.....	134
Tableau 13 : Les groupes de patients établis en fonction du % d'expression de DMBT1 au niveau tumoral global afin de réaliser les courbes de survie.	159
Tableau 14 : Médianes de survie pour chacun des groupes d'expression de DMBT1 au niveau tumoral : <5%, 5-25%, 25-50%, 50-75%, ≥75%.....	161
Tableau 15 : Hazard Ratio des modèles de Cox univariés et multivariés expliquant le délai de survie post-prélèvement.....	162

Tableau 16 : Marqueurs d'instabilité microsatellitaire et expression de DMBT1.....	163
Table 17 : Séquence des amorces utilisées en PCR quantitative et température d'hybridation utilisée pour la réaction.	189
Table 18 : Anticorps primaires: provenance, clonalité, dilution, prétraitement et incubation.	193
Tableau 19 : Séquence des amorces DMBT1 et HPRT utilisées en PCR quantitative et température d'hybridation utilisée pour la réaction.....	194

Abréviations

ACE	Antigène carcino-embryonnaire
ADK	Adénocarcinome
AGAT	Antigènes glucidiques associés aux tumeurs
AJCC	American joint committee on cancer
Antigène T	Antigène Thomsen Friedenreich
APC	Adenomatous polyposis coli
ASP	Polype festonné avancé
β 3Gn-T6	β 1,3- <i>N</i> -acétylglucosaminyltransférase (C3GnT)
β 4GalT-I	β 1,4-galactosyltransférase I
β 6GlcNAc-T4	β 1,6- <i>N</i> -acétylglucosaminyltransférase 4
BMP	Bone morphogenetic protein
C1GALT1	β 1,3-galactosyltransférase
C1r/C1s	Fractions du complément
C2/C4GnT	β 1,6- <i>N</i> -acétylglucosaminyltransférase
C2 β 6GlcNAc-T	β 1,6- <i>N</i> -acétylglucosaminyltransférase
C3GnT	β 1,3- <i>N</i> -acétylglucosaminyltransférase (β 3Gn-T6)
C-rich	Domaine riche en cystéine
CA	Adénome conventionnel
CAZy	<u>C</u> arbohydrate- <u>A</u> ctive <u>E</u> nzymes
CCR	Cancer colorectal
CIMP	CpG island phénotype méthylateur
CIN	Instabilité chromosomique
CMP	Cytidine monophosphate
Core 1 β 3Gal-T1	Core 1 β 1,3 galactosyltransférase
Cosmc	Core 1 β 3Gal-T specific molecular chaperon
CT	Domaine de la queue cytoplasmique
CUB	C1r/C1s, Uegf, et Bmp1 (domaine DMBT1)
DCC	Deleted in Colorectal Cancer

DM	Domaine comportant une homologie avec le domaine de dimérisation du facteur von Willebrand
DMBT1	Deleted in malignant brain tumor 1
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteur de l'EGF
ESGAR	Société Européenne de Radiologie Gastrointestinale et Abdominale
ESGE	Société Européenne d'Endoscopie Gastrointestinale
ESI-MS	Electrospray ionisation mass spectrometry
FCA	Foyers de cryptes aberrantes
FDA	Food and Drug Administration
FOLFOX	<u>F</u> olinic acid, 5 <u>F</u> luorouracil, <u>O</u> Xaliplatin
FU	Fluoro-uracile
<i>FUT2</i>	Fucosyltransférase 2
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
Gal3ST2, 3 et 4	Gal-3-O-sulfotransférase
GalNAc	N-acétylgalactosamine
ppGalNAcTs	Polypeptides N-acétylgalactosaminyltransférases
GDP	Guanidine diphosphate
GL	Glycolipide
Glc	Glucose
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GP	Glycoprotéine
GTs	Glycosyltransférases
HES	Hématoxyline éosine safran
HNPCC	Cancer colorectal héréditaire sans polypose (syndrome de Lynch)
<i>HPRT</i>	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
HR	Hazard ratio
Ihh	Indian hedgehog

IHC	Immunohistochimie
INCa	Institut National de Cancer
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Le	Lewis
LPS	Lipopolysaccharide
LV5FU2	Acide folinique, 5 fluorouracil
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - time-of-flight mass spectrometry
MIN	Instabilité microsatellitaire
MINT1	Msx2 interacting nuclear target
MGMT	O-6-méthylguanine-ADN méthyltransférase
MLH1	MutL homolog 1
MMR	Mismatch repair
MP	Polype mixte
MSH2	MutS protein homolog 2
MSH6	MutS homolog 6
MSI	Instabilité microsatellitaire
MSI-H	Niveau élevé d'instabilité microsatellitaire
MSS	Microsatellitaire stable
MTS1	Multiple tumor suppressor
NDRG4	N-Myc Downstream-Regulated Gene 4 Protein
Neu5Ac	Acide sialique (acide N-acétyl neuraminique)
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain 2
NOS	No otherwise specified (sans autre précision)
O-GP	O-glycosylprotéine
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAF	Polypose adénomateuse familiale
PDGF	Platelet derived growth factor
PH	Polype hyperplasique

PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha
PMA	Acétate Myristate de Phorbol
ppGalNAcT	Polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférase
<i>PTEN</i>	Gène phosphatase and tensin homologue
PTS	Régions riches en proline, sérine et thréonine
RAD	Radiale
RCP	Réunion de concertation pluridisciplinaire
RE	Réticulum endoplasmique
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
SAG	Salivary agglutinin
SDHB	Sous-unité B du complexe déshydrogénase
SDHD	Sous-unité D du complexe déshydrogénase
SEA	Sea-urchin-sperm protein-enterokinase-agrin
Shh	Sonic hedgehog
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog
SNP arrays	Single nucleotide polymorphism arrays
SRCR	Scavenger receptor cystein rich
SRCR-SF	Scavenger receptor cystein rich – superfamille
SRCRP2	Motif de l'agglutinine salivaire
SSA/P	Polype/adénome festonné traditionnel
ST3Gal I, II, III, IV, VI	Alpha2,3-sialyltransférase I, II, III, IV, VI
ST6GalNAc	Alpha2,6-sialyltransférase
ST8Sia	Sialyltransférase 8
TA	Adénome tubuleux
TEP scan	Tomographie par émission des positrons
TF	Antigène Thomsen-Friedenreich
TFF	Peptide en trèfle
TFF3	Trefoil factor 3
TGF	Facteur de croissance transformant (<i>transforming growth factor</i>)
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 3

TLR4	Toll Like Receptor 4
TNCD	Thesaurus National de Cancérologie Digestive
TM	Domaine transmembranaire
TP53	Tumor protein p53
TR	Tandem repeat
TSA	Adénome festonné traditionnel
TVA	Adénome tubulovilleux
uEGF	Famille de facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor family) de l'oursin de mer (sea urchin)
UDP	Uridine diphosphate
UICC	Union for International Cancer Control
VA	Adénome villeux
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat
vWF	Facteur von Willebrand
XELOX	5 Fluorouracil, capecitabine, oxaliplatine
zp	Zona pellucida

Table des matières

RECHERCHE DE NOUVEAUX MARQUEURS DIAGNOSTIQUES ET/OU PRONOSTIQUES POUR LE CANCER DU COLON	1
REMERCIEMENTS	3
PUBLICATIONS	5
POSTERS	6
INDEX DES FIGURES	7
ABREVIATIONS	12
REVUE GENERALE.....	24
2. <u>LE CANCER COLORECTAL</u>.....	25
2.1. <i>Anatomie et histologie du côlon</i>	25
2.2. <i>Epidémiologie et étiologie/facteurs de risque</i>	29
2.3. <i>Histoire naturelle du cancer du côlon</i>	31
2.4. <i>Dépistage et diagnostic</i>	36
2.5. <i>Polypes</i>	39
2.6. <i>Classification du cancer colorectal</i>	48
2.7. <i>Evolution, pronostic et facteurs prédictifs</i>	51
2.8. <i>Traitement</i>	52
3. <u>LE MUCUS INTESTINAL</u>.....	56
3.1. <i>Structure des mucines</i>	56
3.2. <i>Fonction des mucines</i>	61
3.3. <i>Glycosylation des mucines</i>	62
3.4. <i>Glycosyltransférases</i>	70
3.5. <i>Sulfotransférases</i>	74
3.6. <i>La mucine-like DMBT1</i>	75
4. <u>ALTERATIONS D'EXPRESSION ET DE GLYCOSYLATION DES MUCINES DANS LE CANCER COLORECTAL</u>	81
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	90
RESULTATS	93
1^{ERE} PARTIE - LA CARACTERISATION STRUCTURALE DE LA O-GLYCOSYLATION DES MUCINES PEUT FOURNIR D'IMPORTANTES INFORMATIONS POUR AIDER A PREVENIR LA RECIDIVE DU CANCER COLORECTAL	94
1.1. <i>Démarche expérimentale</i>.....	94

1.2. <i>La glycosylation des mucines est altérée dans les tumeurs mais aussi dans les marges de résection</i>	95
1.3. <i>Comparaison des répertoires de glycosylation des mucines selon le stade TNM des tumeurs colorectales</i>	104
1.4. <i>Comparaison des répertoires de glycosylation des mucines selon l'état de différenciation des tumeurs</i>	105
1.5. <i>Les tumeurs avec récurrence peuvent être différenciées des tumeurs sans récurrence</i>	107
1.6. <i>Conclusion de cette étude</i>	109
2EME PARTIE – ETUDE DE L'EXPRESSION DES SIALYLTRANSFERASES ET SULFOTRANSFERASES IMPLIQUEES DANS LA GLYCOSYLATION DES MUCINES COLIQUES.	113
2.1 <i>Démarche expérimentale</i>	113
2.2. <i>Etude de l'expression des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases, d'α2,3-sialyltransférases et de la core 3 synthétase dans les tumeurs, les marges de résection, et les témoins</i>	115
2.3. <i>Comparaison de l'expression des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases, d'α2,3-sialyltransférases et de la core 3 synthétase selon le stade TNM des tumeurs colorectales</i>	121
2.4. <i>Comparaison de l'expression des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases, d'α2,3-sialyltransférases et de la core 3 synthétase selon la récurrence</i>	126
2.5. <i>Conclusion de cette étude</i>	131
3EME PARTIE – MODIFICATIONS D'EXPRESSION ET DE LOCALISATION DE DMBT1 (DELETED IN MALIGNANT BRAIN TUMOR 1) DANS LE CANCER COLORECTAL	133
3.1. <i>Démarche expérimentale</i>	133
3.2. <i>Expression et localisation de DMBT1</i>	140
3.3. <i>Corrélation entre l'expression de DMBT1 et la survie</i>	158
3.4. <i>Corrélation entre l'expression de DMBT1 et l'instabilité microsatellitaire</i>	162
3.5. <i>Comparaison entre l'expression de DMBT1 monoconale vs polyclonale en immunohistochimie</i>	165
3.6. <i>Comparaison entre l'expression de DMBT1 en immunohistochimie et l'expression du gène DMBT1 quantifiée par RT-qPCR</i>	165
3.7. <i>Conclusions de cette étude</i>	168
DISCUSSION-PERSPECTIVES	171
DISCUSSION GENERALE	172

CONCLUSIONS – PERSPECTIVES ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

MATERIELS ET METHODES	183
1. MATERIEL BIOLOGIQUE	184
2. EXTRACTION ET PURIFICATION DES MUCINES	185
2.1. <i>Extraction des mucines</i>	185
2.2. <i>Ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium</i>	185
2.3. <i>Détection des mucines</i>	185
3. ANALYSE STRUCTURALE DES CHAINES GLYCANIQUES DE MUCINES.....	186
3.1. <i>Hydrolyse chimique des oligosaccharides</i>	186
3.2. <i>Chromatographie échangeuse de cations</i>	186
3.3. <i>Perméthylation des oligosaccharides</i>	186
3.4. <i>Analyse des oligosaccharides par spectrométrie de masse</i>	187
3.5. <i>Analyse statistique</i>	187
4. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES SIALYL- ET SULFOTRANSFERASES	188
4.1. <i>Extraction d'ARN de tissus coliques et synthèse d'ADNc</i>	188
4.2. <i>Analyse par PCR quantitative</i>	188
4.3. <i>Analyse statistique</i>	190
5. ANALYSE DE L'EXPRESSION ET DE LA LOCALISATION DE DMBT1	191
5.1. <i>Etude histologique</i>	191
5.2. <i>Etude immunohistochimique</i>	192
5.3. <i>Analyse par PCR quantitative</i>	194
5.4. <i>Analyse statistique</i>	195
ANNEXES	217

Résumé (en français)

Le cancer colorectal (CRC) est la deuxième cause de décès par cancer dans le monde. Contrairement aux autres types de cancer, le CRC est une pathologie qu'il est possible à la fois de prévenir et de guérir si la tumeur est réséquée à un stade précoce. Cependant la plupart des CRC ne sont pas détectés avant d'avoir envahi d'autres organes ou des ganglions lymphatiques car les tests de dépistages actuels ne sont pas suffisamment spécifiques et sensibles. Dans ce contexte, il est urgent d'identifier des biomarqueurs permettant de détecter les CRC à des stades précoces, de suivre le développement des tumeurs pendant la durée du traitement et de prédire les récurrences. Les mucines, O-glycosylprotéines majeures du mucus qui protège l'épithélium intestinal, sont fréquemment altérées dans les cancers colorectaux et jouent un rôle important dans la pathogénèse de la maladie. L'objectif principal de ce travail de thèse était d'explorer les altérations d'expression et de glycosylation des mucines intestinales durant les différentes étapes de la transformation maligne, et d'identifier, parmi les molécules modifiées, de potentiels biomarqueurs utilisables pour évaluer le pronostic et le risque de récurrence après traitement.

Les mucines ont été purifiées à partir de pièces opératoires d'individus sains et de patients atteints de CCR et leur profil de glycosylation a été déterminé par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus démontrent une très forte diminution du niveau d'expression des O-glycanes sialylés basés sur un core 3 dans la tumeur, corrélée à une forte augmentation des O-glycanes sialylés basés sur un core 1. Aucune corrélation n'a pu être faite entre les stades des tumeurs et les répertoires de glycosylation des mucines. Cependant, à l'exception des antigènes sialyl-Tn, les tumeurs de patients ayant récidivé présentaient moins d'altérations dans leur profil de glycosylation de mucines, comparées aux tumeurs sans récurrence. Ces résultats suggèrent que les O-glycanes de mucines provenant de tumeurs avec récurrence masqueraient la situation pathologique en mimant une situation physiologique saine afin d'échapper au système de défense immunitaire. Nous avons également confirmé une augmentation de l'expression d'un antigène sialyl-Le^x basé sur un core 3 dans la tumeur de patients sans récurrence, qui semble entrer en compétition avec son homologue sulfo-Le^x dans le côlon sain. Nous avons démontré une diminution significative de l'expression des Gal-3-O-sulfotransférases ainsi que de faibles variations de l'expression des α 2,3-sialyltransférases,

qui pourraient expliquer l'inversion des ratios d'expression de ces 2 antigènes. L'expression de DMBT1, une mucine-like, est fortement augmentée dans les stades précoces du CCR et une très forte expression de DMBT1 dans la muqueuse de résection des patients semble corrélée à un mauvais pronostic.

En conclusion, notre travail a permis de démontrer pour la première fois une possible corrélation entre le profil de glycosylation des mucines dans la tumeur réséquée et le risque de récurrence. Ces travaux démontrent également des altérations spécifiques de la glycosylation des mucines durant la transformation maligne et la progression vers le CCR. Ces résultats devraient permettre d'identifier de nouveaux marqueurs utilisables pour le pronostic et pour guider les oncologues dans le choix des traitements post-opératoires.

Résumé (en anglais)

Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer-related death in the Western world. Unlike many other malignancies, CRC is a preventable and curable disease if early stage tumors are removed. However, many CRC remain undetected until they have spread to the surrounding organs or lymph, correlating with poor prognosis because of the low sensitivity and specificity of fecal occult blood tests used for screening of risk populations. In this context, there is an urgent need to identify biomarkers for early detection of CRC, to follow tumor development during therapy and to predict recurrence. Mucins, major glycoproteins found in the mucus film covering and protecting the colon mucosa, are frequently altered in colon cancer and implicated in the pathogenesis of cancer. The main goal of this PhD project was to explore alteration of expression and glycosylation of colonic mucins during progression of adenomas to a colorectal cancer and to identify, among all these modified molecules, new potential biomarkers for prognosis and recurrence after treatment.

Mucins were purified from healthy individuals and patients with colon cancer and their O-glycosylation patterns were determined by mass spectrometry. The obtained data showed an important decrease in the level of expression of sialylated core 3 based O-glycans in tumors correlated with an increase in sialylated core 1 structures. No correlation was established between stages of the tumor samples and mucin O-glycosylation. However, with the notable exception of sialyl Tn antigens, tumors with recurrence presented a milder alteration of glycosylation profile than tumors without recurrence. These results suggest that mucin O-glycans from tumors with recurrence might mimic a healthier physiological situation, hence deceiving the immune defense system. We confirmed an increased expression of a core 3 sialyl-Le^x hexasaccharide in tumors of patients without any recurrence during the first 3 years after resection of the tumor, which appeared to compete with its sulfo-Le^x counterpart in normal tissue. We demonstrated a significant decrease of expression of Gal-3-O-sulfotransferases together with small variations of α 2,3-sialyltransferases expression levels that could explain the inversion of ratio for these two sugar motifs. Expression of DMBT1, a mucin-like, was highly increased in initial stages of

colon carcinoma and a high expression in normal mucosa of patients seemed to be correlated with a poor prognosis.

In conclusion, our work demonstrated for the first time a possible correlation between mucin O-glycosylation patterns in the resected tumor of patients and the risk of recurrence. This study highlights specific pattern of mucin alterations during malignant transformation and progression of colon cancer. These findings might prove valuable as prognostic tools orienting the cure to be given to patients after resection.

REVUE GENERALE

1. Introduction

Au niveau mondial, le cancer représente la troisième cause de mortalité, avec un risque très élevé pour le cancer du côlon. Celui-ci se situe, par sa fréquence, au troisième rang chez l'homme et au deuxième rang chez la femme. Il constitue la deuxième cause de décès par cancer en France, avec une survie à 5 ans d'environ 56% et à 10 ans de 50%, malgré des progrès thérapeutiques récents et cela est souvent dû à une détection trop tardive.

La caractérisation d'un cancer primaire ou de sa récurrence, la détection de métastases et le suivi de traitement thérapeutique sont des éléments clés de la prise en charge du patient et de la réduction de l'incidence. Excepté le taux d'ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) sérique qui est utilisé comme facteur pronostic dans le cadre du bilan préopératoire et de risque de récurrence, aucun marqueur sanguin n'est utilisé en routine clinique pour la détection d'adénome ou d'adénocarcinome.

2. Le cancer colorectal

2.1. Anatomie et histologie du côlon

Anatomie

Le côlon (colo-rectum) est le segment terminal du tractus gastro-intestinal avec une longueur d'environ 1–1,5m, suivie par l'anus. La délimitation en côlon droit et gauche tient compte de la vascularisation, du drainage veineux et de l'innervation, en corrélation avec le développement embryologique antéro-postérieur (intestin moyen et postérieur)(Mills, 2007). Le côlon proprement dit se trouve en amont de la jonction recto-sigmoïdienne, située à plus de 15 cm de la marge anale en rectoscopie et au-dessus du corps de la 3ème vertèbre sacrée (de profil au-dessus du promontoire). Le côlon droit est desservi par l'artère mésentérique supérieure, le nerf vague et le ganglion sympathique mésentérique supérieur alors que le côlon gauche est desservi par l'artère mésentérique inférieure, les nerfs spino-sacrés S2, S3 et S4 et le ganglion sympathique mésentérique inférieur. Le rectum reçoit les artères rectales moyennes et inférieures, les nerfs érigents et les segments lombaires spinaux L1, L2 et L3 du plexus hypogastrique (Mills, 2007).

Le côlon droit est divisé en caecum avec l'appendice, côlon ascendant jusqu'à la flexure hépatique (les deux d'un total de 15cm) et côlon transverse (premiers deux tiers), alors que le côlon gauche est divisé en côlon transverse (dernier tiers, au total environ 50 cm), côlon descendant à partir de la flexure splénique (25 cm), sigmoïde (35 à 50 cm) et rectum (8 à 15 cm) (Yantiss, 2013) (Figure 1).

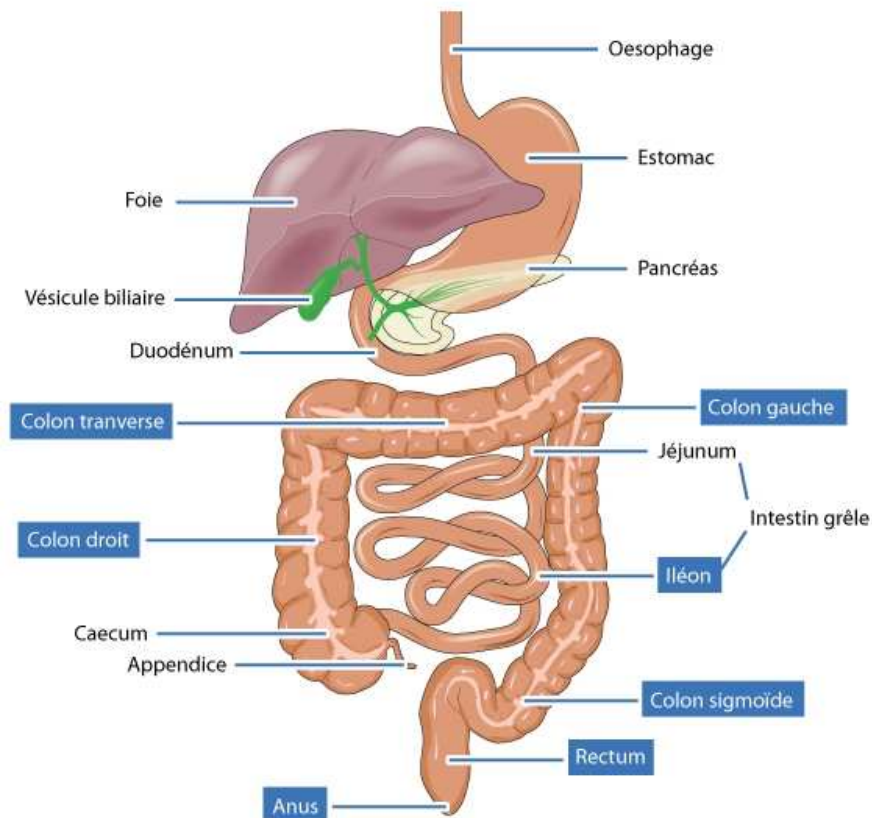


Figure 1. Anatomie du tractus gastro-intestinal.

Pour des raisons chirurgicales (conservation sphinctérienne), le rectum a été divisé en bas rectum (de 0 à 5 cm de la marge anale ou à 2 cm ou moins du bord supérieur du sphincter), moyen rectum (> 5 à 10 cm de la marge anale ou de 2 à 7 cm du bord supérieur du sphincter), haut rectum (> 10 à 15 cm de la marge anale ou à plus de 7 cm du bord supérieur du sphincter) et la jonction rectum-sigmoïde (> 15 cm ou au-dessus du corps de la 3^{ème} vertèbre sacrée)(Gérard et al., 2013).

Histologie

La structure de la paroi colique est similaire le long des différentes régions. Elle comporte quatre couches distinctes : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse, la sous-séreuse avec la séreuse.

La muqueuse est recouverte par le glycocalyx comportant des glycanes, enzymes, lectines et mucines (notamment les mucines membranaires MUC3 et MUC12 (Pelaseyed et al., 2014)). Elle est constituée d'un épithélium cylindrique polarisé, s'invaginant sous la forme de cryptes de Lieberkühn régulièrement espacées les unes des autres et parallèles entre elles, reposant sur la musculaire muqueuse (Mills, 2007). Cet épithélium comporte des cellules caliciformes (en gobelet), chargées en mucus, des entérocytes coliques, jouant un rôle d'absorption, des cellules de Paneth, des entérocytes, des cellules M et des cellules souches (Yantiss, 2013).

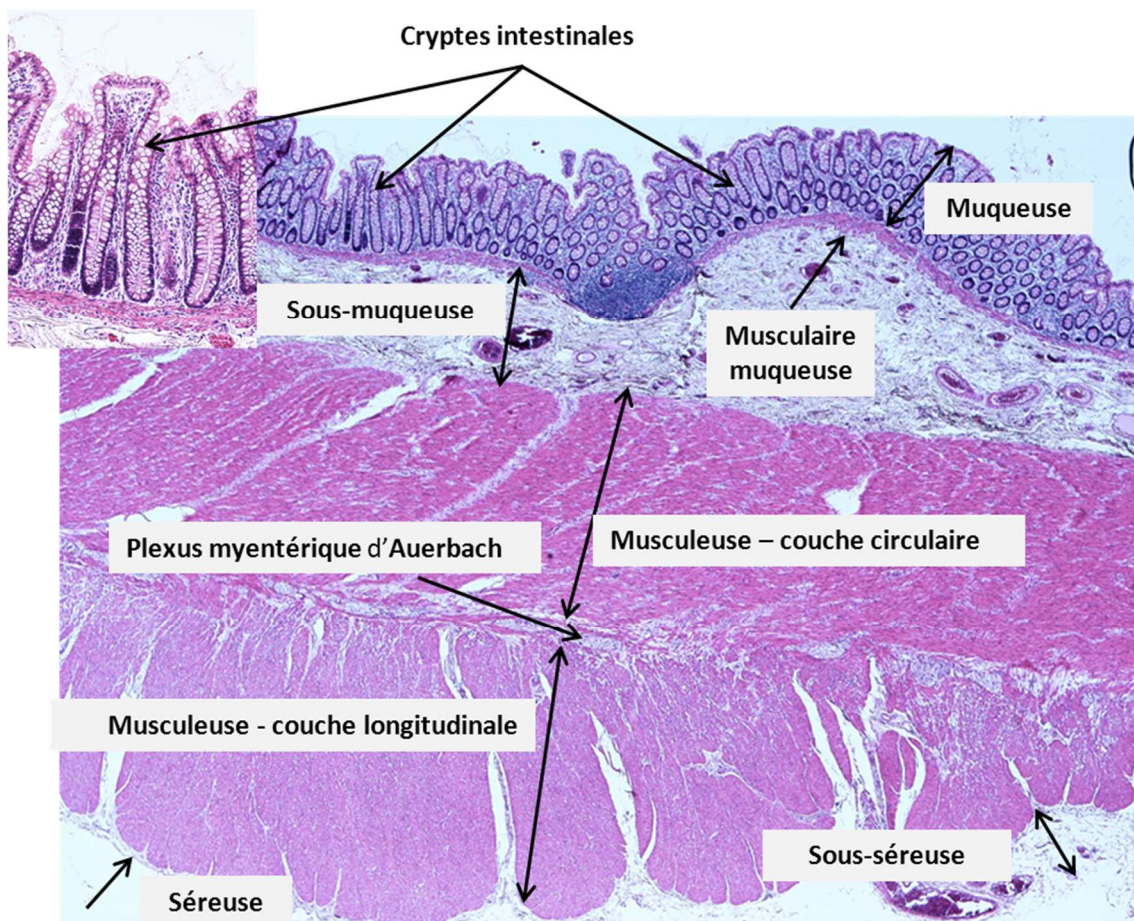


Figure 2. Histologie du côlon.

Il existe de discrètes différences droite et gauche dans la répartition de cellules entérocytaires et caliciformes au sein de la muqueuse colique, ainsi que dans l'épaisseur de la couche de mucus, la présence ou non des cellules de Paneth, la longueur des cryptes, la densité de l'infiltrat inflammatoire monocytaire dans le chorion muqueux, en relation avec la fonction dominante dans l'absorption du côlon proximal, et celle de consolidation et transit des matières fécales dans le côlon distal. On observe ainsi un nombre plus élevé de cellules entérocytaires absorbatives à droite par rapport aux cellules caliciformes (rapport entérocytes/cellules en gobelet de 4-5 :1 à droite et 3-4 :1 à gauche, en arrivant à 1 :1 au niveau rectal). Les entérocytes coliques forment la plupart de la surface épithéliale et une partie de celle des cryptes. Ils ont un cytoplasme éosinophile (avec la coloration standard hématoxyline – éosine), avec des petites vésicules apicales contenant des mucines, de composition différente par rapport aux cellules caliciformes. Leur membrane apicale comporte des microvillosités au sommet desquelles il existe des glycoprotéines mucine-like membranaires formant le glycocalyx filamenteux, continu, en bordure en brosse. Ces pôles apicaux des entérocytes s'étendent sur les cellules en gobelet avoisinantes en laissant libre juste une petite partie de leur apex en contact avec la lumière colique. Leurs noyaux sont ovales, réguliers, de disposition basale, parallèles au long axe des cellules.

Les cellules caliciformes ont des cytoplasmes caractéristiques en coupe de verre de vin, grâce à l'accumulation des mucines au niveau de leur pôle apical. Ces mucines sont soit sécrétées soit membranaires et leur composition varie le long de la muqueuse colique. Avec la coloration standard hématoxyline – éosine, le cytoplasme apparaît relativement clair. Les granules de mucines sont mises en évidence avec les colorations par le mucicarmin, bleu Alcian à pH 2,5 et PAS (periodic acid-Schiff)(Mills, 2007). Ce sont des mucines majoritairement acides appartenant à deux groupes : sialomucines et sulfomucines. Ces dernières sont également positives au bleu Alcian à pH 0,5. Les noyaux des cellules caliciformes sont hyperchromes, avec une chromatine plus dense par rapport aux entérocytes. Les mucines retrouvées au niveau des cellules épithéliales coliques sont MUC2 et MUC4 (retrouvées dans les cellules caliciformes) ainsi que MUC1, MUC3, MUC4 et MUC12 (dans les entérocytes) (Van Klinken et al., 1995) . On note également MUC5B et MUC11 (Yantiss, 2013). La plupart de ces mucines sont présentes au niveau des cellules de

surface et des cryptes à l'exception de MUC3 (uniquement en surface) et MUC5B (uniquement au niveau des cryptes).

2.2. Epidémiologie et étiologie/facteurs de risque

Au niveau mondial, le cancer représente la troisième cause de mortalité, avec un risque très élevé pour le cancer du côlon. L'incidence du cancer du côlon dans le monde est extrêmement variable selon les pays, avec 55% des cas dans les régions développées, selon l'International Agency for Research on Cancer (Ferlay et al., 2013). Les régions les plus touchées concernent l'Australie, Nouvelle Zélande, l'Europe et l'Amérique du Nord, et les moins touchées se trouvent en Afrique de l'Ouest et le Sud-Centre de l'Asie (Torre et al., 2015). La mortalité est plus élevée dans l'Europe Centrale et l'Est, et la plus basse dans l'Afrique de l'Ouest.

En France métropolitaine, les statistiques de l'Institut National du Cancer indiquaient 42 152 nouvelles personnes atteintes de cancer colorectal (CCR) en 2012 (Vongmany and Bousquet, 2014). Chez l'homme, le cancer du côlon-rectum représente 11,6 % de l'ensemble des cancers incidents, et se situe, par sa fréquence, au troisième rang (environ 23 226 nouveaux cas estimés en 2012) derrière les cancers de la prostate (56 841 cas) et du poumon (28 211 cas). Chez la femme, il représente 12,2 % de l'ensemble des cancers incidents, et se situe, par sa fréquence, au deuxième rang (18 926 cas) derrière le cancer du sein (48 763 cas). Il survient en majeure partie (95%) chez les personnes âgées de 50 ans et plus (Binder-Foucard et al., 2013), avec un âge médian au diagnostic en 2012 de 71 ans chez l'homme et 75 ans chez la femme. Il constitue la deuxième cause de décès par cancer en France, avec 17 722 décès en 2012. La survie à 5 ans est d'environ 56% et à 10 ans de 50%.

Le facteur de risque plus élevé est donc l'âge qui augmente la prévalence d'une façon exponentielle (Plumb and Halligan, 2015). L'incidence est plus élevée chez les hommes (Jemal et al., 2011) et il semble exister une différence d'âge entre les femmes et les hommes, avec un âge plus élevé chez les femmes au moment du diagnostic, de 4 à 8 ans (Brenner et al., 2007). Cela peut-être expliqué d'une part par l'effet anti-tumorogénique des

œstrogènes (Caiazza et al., 2015) et d'autre part par l'effet promoteur tumoral de la testostérone (Amos-Landgraf et al., 2014).

D'autres facteurs de risques sont le sédentarisme et l'inactivité physique associés à un surpoids/obésité (Riondino, 2014; Warburton et al., 2010; World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research, 2007) ainsi que le syndrome métabolique (Chiu et al., 2014; Fiori et al., 2015; Kim et al., 2007) ou le diabète comme facteur indépendant (Lai et al., 2013; Rampal et al., 2014; Yuhara et al., 2011). Le régime alimentaire riche en fibres ne semble pas avoir un réel effet protecteur contre le cancer colorectal (Park et al., 2005; Sandler, 2010) alors que le régime végétarien est associé à un risque diminué (Lee et al., 2014; Orlich et al., 2015) et celui riche en viande rouge à un risque élevé (Parkin, 2011). Un niveau élevé de vitamine D semble corrélé à un risque diminué de cancer (Jenab et al., 2010). Un autre facteur de risque est la cigarette (Gong et al., 2012; Hannan et al., 2009) alors que le rôle de l'alcool est controversé (Park et al., 2010), avec pour certains un rôle possible protecteur si consommé avec modération (notamment le vin rouge) et délétère en cas d'excès (Kontou et al., 2012). Le risque de cancer colorectal semble réduit par un mode de vie avec une exposition aux antioxydants (alimentaires ou non) plutôt qu'aux pro oxydants (Dash et al., 2015). Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens semblent des bons candidats pour la chémoprévention (Rigas and Tsioulis, 2015). Il n'est pas observé d'association avec la diverticulose ou la diverticulite colique (Alexandersson et al., 2014).

La plupart des cancers colorectaux sont sporadiques, avec un moindre nombre de cancers à prédisposition génétique, dont les plus fréquents sont le syndrome de Lynch et la polypose adénomateuse familiale, et aussi les maladies inflammatoires idiopathiques prédisposant au cancer colorectal: la rectocolite hémorragique (Dyson and Rutter, 2012; Fearnhead et al., 2002; Lutgens et al., 2015) mais aussi la maladie de Crohn (Lukas, 2010). On note également une incidence plus élevée chez les juifs Ashkenazi (Goldberg et al., 2014b, 2014a; Lynch et al., 2004). Un autre groupe ethnique atteint à un niveau plus élevé par le cancer colorectal est celui des Américano-Africains (Tsai and Giovannucci, 2012).

2.3. Histoire naturelle du cancer du côlon

La carcinogenèse colique est un processus d'initiation et de transformation des cellules normales suite à des modifications génétiques et épigénétiques de l'ADN (Jones and Baylin, 2002; Kinzler and Vogelstein, 1996). L'instabilité génétique est une caractéristique des cellules cancéreuses. Les déterminants de l'instabilité génétique sont liés majoritairement à des mécanismes cellulaires fondamentaux comme le cycle cellulaire, la réplication ou la réparation de l'ADN. On note ainsi le rôle des proto-oncogènes, des gènes suppresseurs des tumeurs et des micro-ARN. Les proto-oncogènes régulent l'embryogenèse et le développement, la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose. L'anomalie d'un seul proto-oncogène suffit pour avoir des anomalies au niveau de l'expression protéique ou sa dégradation. Quant aux gènes suppresseurs de tumeurs, ils inhibent la transcription des proto-oncogènes. Les deux allèles doivent être dysfonctionnels pour conduire à une prolifération cellulaire. Pour la plupart des cancers hérités il s'agit d'une mutation de la lignée germinale avec la perte/mutation ultérieure du deuxième allèle (Yantiss, 2013). Les micro-ARN interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression protéique. Ils se lient à l'ARNm empêchant sa traduction en protéines.

Les tumeurs colorectales sont subdivisées en deux grandes catégories en fonction de leurs altérations génétiques, témoignant de deux voies de carcinogenèse distinctes : les tumeurs se caractérisant par une instabilité chromosomique (CIN : chromosomal instability) avec des pertes fréquentes d'hétérozygotie, et les tumeurs se caractérisant par une instabilité des microsatellites (MSI ou MIN : microsatellite instability).

Instabilité chromosomique

C'est l'instabilité génomique la plus commune : elle est retrouvée dans 75% des cancers colorectaux sporadiques et dans la plupart des adénocarcinomes syndromiques hors syndrome de Lynch (Grady and Carethers, 2008). Elle se caractérise par une aneuploïdie associée à une perte de fragments chromosomiques à l'origine d'une perte d'hétérozygotie ou LOH (Loss of Heterozygosity) ou perte d'allèles. On note la fréquence des mutations du gène *APC* (>90% des cas), *KRAS* (50%) ou *BRAF*, *TP53* (70%), et la perte allélique de 18q (Seth et al., 2009).

Cette voie classique commence ainsi par des mutations bialléliques inactivatrices du gène APC (chromosome 5q) avec une activation de la voie APC/ β -caténine/Wnt et accumulation de β -caténine dans le cytoplasme à la place d'être dégradée. Elle est transloquée dans le noyau en facilitant ainsi la transcription des proto-oncogènes impliqués dans la prolifération cellulaire et l'apparition de l'adénome. APC agit également sur les microtubules et l'actine F pour empêcher le passage de phase G0/G1 en phase S. Elle régule la phase de mitose en interagissant avec la dynamique des microtubules (Yantiss, 2013). Sur le plan histologique, on observe l'apparition d'une hyper-prolifération de l'épithélium colique, plus connue sous le nom de foyer de cryptes aberrantes ou FCA (Pretlow et al., 1991). Ces FCA existent sous la forme d'une hyperplasie, c'est-à-dire une augmentation de la prolifération anormale des cellules normales d'un tissu, la forme la plus commune, ou d'une dysplasie, caractérisée par des anomalies cellulaires, nucléaires et cytoplasmiques associées à des anomalies architecturales des glandes, une forme rare, à l'exception du syndrome de polypose adénomateuse familiale (PAF). La prolifération cellulaire anormale conduit à l'accumulation des cellules dans la muqueuse et aboutit à la formation d'un polype ou adénome (Figure 3)(DeVita et al., 2011).

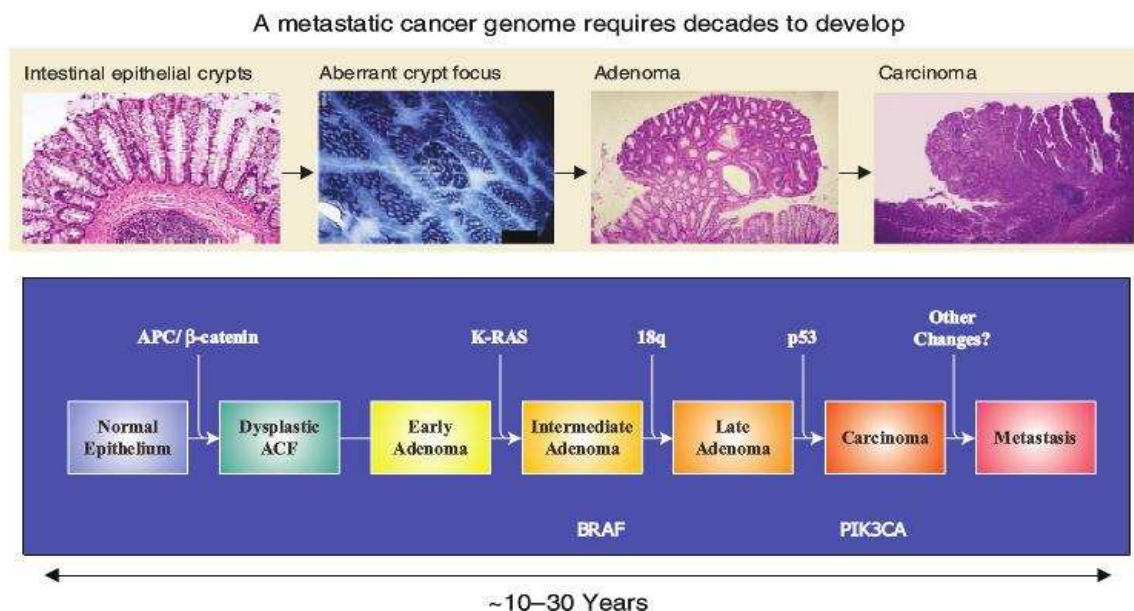


Figure 3. Les différentes étapes du développement du cancer colique.
(DeVita et al., 2011)

L'adénome est une véritable lésion précancéreuse qui correspond déjà à l'expansion clonale de cellules mutées. Initialement la dysplasie est de bas grade. Plus tardivement apparaissent des mutations de KRAS (12p12) avec augmentation en taille de l'adénome et l'apparition de la dysplasie de haut grade. On note ensuite des pertes de matériel génétique du chromosome 18q (avec perturbation des régions contenant SMAD2 et SMAD4 impliqués dans la voie TGF- β , importante pour la régulation de la croissance et la mort programmée des cellules, et DCC – récepteur transmembranaire qui induit l'apoptose) ainsi que l'inactivation de TP53 (facteur de transcription localisé au niveau 17q13), avec la transition vers le carcinome (Yantiss, 2013). Lorsque les anomalies cellulaires et architecturales sont majeures mais que la membrane basale n'est pas franchie par les cellules tumorales, on parle de cancer *in situ* ou intra-muqueux. Le terme de carcinome invasif s'applique aux lésions entraînant une rupture de la lame basale et dépassant la musculaire muqueuse (Compton, 2006). Le carcinome s'étend ensuite progressivement au niveau de la sous-muqueuse, de la musculaire, puis de la sous-séreuse et la séreuse.

L'instabilité microsatellitaire

Ce mécanisme est observé dans 15% des cancers sporadiques et dans les cancers héréditaires non polyposiques (HNPCC ou syndrome de Lynch). L'instabilité des microsatellites (séquences courtes de 1 à 5 paires de bases répétées en tandem) se caractérise par la modification d'un grand nombre de séquences répétées dans le génome des cellules tumorales par rapport aux cellules normales d'un même individu (Lamoril et al., 2006).

Cette instabilité est liée à un défaut de réparation des mésappariements de l'ADN. Au cours de la mitose, lors de la réplication de l'ADN, des mésappariements se créent physiologiquement lors de la réplication des deux brins d'ADN, conséquence d'erreurs de recopiage par l'ADN polymérase. Dans une cellule normale, ces mésappariements sont réparés par un complexe protéique codé par les gènes de réparation des mésappariements de l'ADN ou gènes MMR (mismatch repair genes). Les protéines du système MMR sont principalement MLH1, MSH2, MLH6 et PMS2. Le système MMR corrige les erreurs survenant lors de la réplication, notamment les délétions et insertions (Figure 4). En cas de défaut du système MMR, les erreurs s'accumulent avec l'apparition d'allèles de différentes tailles,

appelés MSI-H (ou RER - erreurs de réplication de l'ADN). Le nombre anormal de répétitions est transmis aux cellules filles. Il y a instabilité des microsatellites.

Dans les tumeurs sporadiques l'altération de MMR correspond à une inactivation somatique de MLH1 par hyperméthylation biallélique de son promoteur avec la perte de l'expression de la protéine MLH1 et son partenaire de liaison PMS2. Elle est observée chez le sujet âgé, en lien avec la sénescence de l'épithélium colique, et est souvent associée à une mutation somatique du gène BRAF (70% des cas). Cette altération est retrouvée dans 80% des cas de carcinomes colorectaux MSI (Le Pessot and Buisine, 2010). Dans les autres 20% des cas l'altération correspond à une inactivation constitutionnelle (un allèle) et ensuite somatique (deuxième allèle) d'un gène MMR par mutation. Elle est responsable du syndrome de Lynch et touche préférentiellement les gènes MLH1 et MSH2, mais peut également toucher les gènes MSH6 et PMS2. Habituellement, dans le cas des gènes MSH2 et MLH1 il existe une perte d'expression des protéines correspondantes mais aussi de leurs partenaires de liaison MSH6 et PMS2 respectivement. Quant à MSH6, il peut aussi être perdu suite à un défaut de réparation des mésappariements (car le gène MSH6 contient en lui-même une zone microsatellitaire), ou suite à une mutation au niveau germinale (World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2010).

Techniques d'identification des instabilités microsatellitaires

Les principes de caractérisation du statut MSI reposent sur des critères internationalement reconnus (Boland et al., 1998). La caractérisation des mutations est réalisée dans un premier temps sur les gènes principalement impliqués *MLH1* et *MSH2*, ces deux gènes représentant environ 90% des mutations causales.

La caractérisation MSI repose sur l'analyse comparative des produits d'amplification par PCR, obtenus à partir de l'ADN tumoral et de l'ADN normal du même patient, de plusieurs régions contenant des microsatellites. Il est suggéré d'utiliser 5 marqueurs mononucléotidiques : BAT25, BAT26, NR21, NR24 et NR (Umar et al., 2004). Une tumeur est considérée MSI si elle montre une instabilité sur au moins 3 de ces 5 microsatellites. Une alternative à l'allélotypage de microsatellites est l'immunohistochimie. En effet, le phénotype MSI est dû, dans la plupart des cas, à l'absence d'expression d'un des gènes

majeurs du système MMR. L'immunohistochimie permet donc la détermination indirecte du statut MSI des échantillons étudiés par la mise en évidence de cette absence d'expression dans la cellule tumorale, les cellules normales contaminantes ou infiltrantes servant de contrôle d'expression (Jourdan et al., 2003). Cette analyse nécessite l'emploi de 4 anticorps dirigés contre MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2. Cette méthodologie est moins lourde et moins coûteuse que l'allélotypage des microsatellites mais elle est difficile à standardiser.

Intérêt clinique de la détermination du statut MSI

Les tumeurs MSI présentent des caractéristiques anatomopathologiques particulières : elles ont surtout une localisation proximale, elles sont peu différenciées, mucineuses ou en bague à chatons, avec un infiltrat lymphocytaire important. De nombreuses études ont analysé la relation existant entre le statut MSI et la survie des patients, avec des résultats généralement concordants. Une compilation de 32 études comportant plus de 7000 cas de cancers colorectaux (dont environ 1300 MSI), publiée par Popat et al (Popat et al., 2005), a confirmé de manière significative que les tumeurs MSI étaient globalement associées à un meilleur pronostic que les tumeurs MSS. L'influence du statut MSI positif sur la réponse aux différents traitements de chimiothérapie a également fait l'objet de plusieurs études *in vitro* et *in vivo*. Les études réalisées *in vitro* concluent à une résistance des cellules MSI aux effets cytotoxiques du 5FU (5 fluoro-uracile). Concernant l'impact du phénotype MSI sur la réponse des patients atteints de cancers coliques et traités par 5FU, les premières études ont abouti à des résultats contradictoires. Il semble que ce traitement ne bénéficie pas aux patients ayant une tumeur MSI avec envahissement locorégional et pourrait même être délétère pour ces patients. L'étude des tumeurs MSI présente donc un grand intérêt clinique puisque la présence de MSI est associée à une meilleure survie et permettrait d'adapter les traitements adjuvants.

La voie CIMP

Une troisième voie de cancérogénèse a été décrite. C'est la voie festonnée à partir des polypes festonnés qui ne comportent pas des anomalies de la voie APC/Wnt/ β -caténine mais des mutations de BRAF suite à des hyperméthylations des îlots riches en CpG (CIMP) au niveau des promoteurs des gènes, avec comme conséquence une méthylation progressive

de l'ADN et une extinction des gènes de réparation des mésappariements comme MGMT (méthylguanine-méthyltransférase) et MLH1 (avec MSI – dans 70% des cas), ce qui coïncide avec l'apparition de la dysplasie dans les polypes festonnés. D'autres méthylations ont été décrites au niveau des gènes *MINT1*, *RIZ1* et *TIMP3*. La mutation de KRAS est associée avec la méthylation de plusieurs marqueurs MINT (Yantiss, 2013).

2.4. Dépistage et diagnostic

Le cancer colorectal est asymptomatique ou comporte des symptômes souvent non-spécifiques : changement du transit intestinal avec constipation ou diarrhée persistantes, douleurs abdominales, hémorragie, anémie, altération de l'état général avec fatigue, amaigrissement, perte d'appétit ; ce qui fait que la maladie est découverte tardivement, dans un stade avancé, avec parfois une occlusion tumorale et une perforation.

Dépistage

Etant donné l'incidence et la mortalité élevée de cette maladie en France, un programme de dépistage du cancer colorectal est proposé depuis 2009 (Vongmany and Bousquet, 2014). Il s'adresse aux personnes âgées de 50 à 74 ans, à risque moyen de cancer colorectal. Le dépistage se réalise avec un test Hemoccult II (au gaïac), à la recherche de sang occulte dans les selles, avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 98% (e-cancer.fr, 2015). En cas de test négatif (97 % des cas), la personne est invitée à renouveler le test deux ans plus tard. Si le test est positif, le médecin traitant prescrit une coloscopie pour rechercher la présence de lésions dans le côlon ou le rectum. Le Plan cancer 2014-2019 prévoit de remplacer le test au gaïac par un test immunologique, basé sur la détection de l'hémoglobine humaine dans les selles à l'aide d'anticorps (Vongmany and Bousquet, 2014). Ce test est plus sensible que celui au gaïac (Faivre et al., 2012; Oort et al., 2010; van Rossum et al., 2008, 2011; Wong et al., 2012), en vue de détecter notamment les lésions précancéreuses et les cancers débutants. La spécificité du test semble plus faible par rapport à celui au gaïac selon certaines études (Oort et al., 2010; Wong et al., 2012). Aux Etats Unis, la FDA (Food and drug administration) a donné l'accord pour l'utilisation du test Cologuard (Exact Sciences), un test ADN des matières fécales (2014). Il inclut une analyse moléculaire des biomarqueurs liés aux mutations et méthylations de l'ADN associés au cancer colorectal (mutations de KRAS et

méthylations de NDRG4 et BMP3) ainsi qu'une analyse immuno-chimique de l'hémoglobine. Un gène de référence, celui de la β -actine, est utilisé pour l'estimation de l'ADN humain total présent. La sensibilité du test est appréciée à 92,3% (contre 73,8% pour le test immunologique seul) pour les lésions invasives et à 42,4% pour les lésions précancéreuses avancées. La spécificité du test est moins bonne par rapport au test immunologique, donnant un nombre important de faux positifs.

Il existe d'autres modalités de screening, comme la sigmoïdoscopie flexible, le transit baryté double contraste, la colonoscopie, la colonoscopie virtuelle (le coloscanner, mais pas encore l'IRM du côlon ni le PET). La colonoscopie reste la méthode gold standard de screening (Beck, 2015), et le moyen le plus sensible pour la détection des lésions festonnées du côlon droit, notamment si elle est associée à la chromoendoscopie, et le test ADN des selles est assez sensible pour le screening de ces lésions (East et al., 2015). Le coloscanner comporte un potentiel de screening considérable en étant une méthode non-invasive, mieux acceptée par la population, avec un rendement diagnostique équivalent ou même supérieur à une colonoscopie, et au coût moindre (Jenkinson and Steele, 2010; Plumb and Halligan, 2015). Les recommandations de la Société Européenne d'Endoscopie Gastrointestinale (ESGE) et la Société Européenne de Radiologie Gastrointestinale et Abdominale (ESGAR) portent sur l'utilisation du coloscanner en cas de colonoscopie incomplète, contre-indiquée ou impossible. Elles ne la recommandent pas comme méthode de screening de la population, mais uniquement individuelle, au cas par cas, avec la recommandation de polypectomie endoscopique pour tout polype de diamètre ≥ 6 mm, en réservant la surveillance seulement si la polypectomie n'est pas possible (Laghi et al., 2015).

Les méthodes de screening peuvent prévenir l'apparition du cancer colorectal suite aux résections des polypes précancéreux et la détection du cancer dans les stades débutants. Aux Etats Unis, il a été noté une diminution de l'incidence du cancer colorectal et de la mortalité grâce aux méthodes de screening, à la réduction des facteurs de risque (comme par exemple la diminution du tabac) et de l'amélioration des traitements (Fedewa et al., 2015). Néanmoins, seulement 40% des cas sont diagnostiqués en stade précoce (maladie localisée), pour lesquels la survie est de 90% à 5 ans (Howlader et al., 2014).

Grâce à la détection d'un nombre de plus en plus grand de polypes, envoyés ensuite aux laboratoires d'anatomie pathologique pour analyses, les coûts associés aux procédures de screening ont fortement augmenté ces dernières années, justifiant pleinement le besoin de découvrir des moyens de diagnostic *in vivo* des polypes de petite taille, en vue d'être reséqués et jetés sans analyse anatomopathologique (Wilson and Saunders, 2015).

Pour les personnes à risque élevé de cancer colorectal, le suivi consiste en la réalisation régulière d'une coloscopie. Il s'agit des personnes ayant déjà eu un cancer colorectal ou un adénome de plus d'un centimètre, les personnes dont un parent du premier degré (père, mère, frère, sœur, enfant) a été atteint d'un cancer colorectal ou d'un adénome de plus d'un centimètre avant 65 ans, et celles dont deux parents ont été atteints quel que soit l'âge au moment du diagnostic, les personnes atteintes de maladie inflammatoire chronique de l'intestin étendue au moment du diagnostic et évoluant depuis plus de 10 ans (2009).

Enfin, pour les personnes à risque très élevé de cancer colorectal, le suivi repose sur des consultations d'oncogénétique et la réalisation régulière de chromocoloscopies. Il s'agit des personnes atteintes de polypose adénomateuse familiale (PAF) ou du syndrome de Lynch (ou HNPCC)(2009). Le dépistage inclut également la recherche de cancers épidémiologiquement liés (endomètre, ovaire, grêle, uretère ou cavités excrétrices rénales) ainsi que d'antécédents familiaux de cancers.

Diagnostic

Il a plusieurs objectifs : de confirmer la présence d'un cancer, sa localisation et le type (le bilan initial) ainsi que l'étendue (son stade – le bilan d'extension) pour pouvoir ensuite élaborer un plan de traitement adapté.

Il consiste en un examen clinique, un examen colorectal par rectoscopie, sigmoïdoscopie ou coloscopie (si incomplète en préopératoire, il faut la prévoir dans les 6 mois post-opératoires) avec biopsie suivie d'un examen anatomopathologique, d'une échographie abdomino-pelvienne et une radiographie de thorax (référence) ou scanner thoraco-abdomino-pelvien avec contraste (accord d'expert). L'opacification radiologique peut être envisagée seulement en cas d'occlusion aiguë, coloscopie incomplète ou problème de repérage (lavement aux hydrosolubles, lavement baryté ou coloscanner selon les cas et la

disponibilité). Parfois une IRM du foie est proposée, et dans le cas du cancer rectal, une échographie endorectale et/ou une IRM rectale. Des analyses de sang sont également réalisées, notamment pour évaluer l'état de santé général du patient (pour diagnostiquer une anémie par exemple) et pour le dosage de l'ACE (accord d'experts, non recommandé par la conférence de consensus de 1998). Plus rarement, après discussion en RCP (réunion de concertation pluridisciplinaire), un TEP Scan peut compléter le bilan. Lors de l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire, le bilan est complété avec l'évaluation des ganglions à la recherche des métastases locorégionales, l'évaluation de l'envahissement tumoral au sein de la paroi colorectale, la présence ou non d'engainements tumoraux péri-nerveux. Un prélèvement pour congélation est souhaitable afin de réaliser des études de biologie moléculaire en cas de besoin (Lecomte et al., 2011; Vongmany and Bousquet, 2014).

2.5. Polypes

La classification OMS 7^{ème} édition 2009 classe les polypes coliques en trois catégories: la première catégorie correspond à des lésions pré-malignes regroupant les adénomes tubuleux, vilieux et tubulovilleux avec dysplasie (néoplasie intraépithéliale) de bas- et -haut grade ; la deuxième catégorie comprend des lésions festonnées regroupant les polypes hyperplasiques, les polypes/adénomes festonnés sessiles et les adénomes festonnés traditionnels ; et la troisième catégorie est celle des hamartomes regroupant les polypes associés à Cowden, les polypes juvéniles et les polypes Peutz-Jeghers.

Les polypes les plus fréquents sont les adénomes et les polypes hyperplasiques.

Les adénomes conventionnels tubuleux/villeux sont pédiculés, sessiles ou plans, classifiés comme tubuleux si la composante tubuleuse représente plus de 80%, vilieux si la composante vilieuse représente plus de 80% et tubulovilleux si la composante vilieuse est de 20 à 79%. Ils peuvent être :

- en dysplasie de bas grade quand les cellules épithéliales sont cylindriques comportant des noyaux ovalaires, stratifiés, ne dépassant pas les $\frac{1}{2}$ - $\frac{3}{4}$ de la hauteur de l'épithélium, avec pléomorphisme nucléaire peu marqué et une persistance d'une mucosécrétion ;

- en dysplasie de haut grade avec une perte de la mucosécrétion, une stratification nucléaire à la partie haute de l'épithélium, un pléomorphisme nucléaire marqué avec risque de transformation maligne (la séquence adénome-carcinome). Certains adénomes avec dysplasie de haut grade contiennent des foyers d'adénocarcinome intra-muqueux limités au chorion muqueux ou à la musculaire muqueuse. Ils n'ont pas de potentiel métastatique à cause de la paucité des canaux lymphatiques au sein du chorion muqueux. Ils sont donc pris en charge comme une dysplasie de haut grade.

Selon la classification de Vienne modifiée (Stolte, 2003) on distingue 5 catégories : 1 – pas de néoplasie, 2 – indéfini pour néoplasie, 3 – néoplasie de bas grade, 4 – néoplasie de haut grade avec 4.1 – dysplasie de haut grade, 4.2 – carcinome *in situ* (non invasif), 4.3 – carcinome suspect d'être invasif, 4.4 – carcinome intra-muqueux, et 5 – carcinome infiltrant la sous-muqueuse.

Certains adénomes sont classifiés par les cliniciens comme « adénomes avancés » à cause du risque élevé de progression vers l'adénocarcinome. Il s'agit des adénomes > 1 cm, avec une composante villose d'au moins 25% du polype, ou comportant une dysplasie de haut grade (Atkin et al., 1992; van Putten et al., 2011). La taille du polype doit être mesurée préférentiellement sur lame (Levene et al., 2015).

L'immunomarquage est positif pour MUC2 et MUC5AC, et négatif pour MUC6 (Mochizuka et al., 2007). Au niveau moléculaire on retrouve les mutations inactivatrices de *APC* dans 80% des cas, mutation de *KRAS* dans 20% des cas, une perte d'hétérozygotie concernant *MTS1* (p16) et au niveau du chromosome 3p dans 20% des cas (Yantiss, 2013).

Il existe également les adénomes plans, souvent inférieurs à 1cm avec dépression centrale, constitués d'une prolifération tubulovilleuse d'épaisseur inférieure de 2 fois la hauteur de la muqueuse normale. Ils ont un risque élevé de transformation maligne malgré la fréquence plus basse des mutations de *KRAS* par rapport aux adénomes polypoïdes (Morita et al., 2002).

Le polype hyperplasique, la forme la plus fréquente des polypes festonnés (> 75%) est rencontré fréquemment dans le rectum et le sigmoïde. Il est souvent de taille inférieure à

0,5 - 1cm. Il existe trois sous-types morphologiques : micro-vésiculaire (la forme la plus fréquente), le type riche en cellules caliciformes et le type pauvre en mucine. Les trois formes sont constituées de cryptes coliques allongées, à lumière festonnée notamment vers la lumière, avec une dilatation de la glande à ce niveau. La partie profonde de la glande reste étroite, avec la présence d'une prolifération cellulaire à ce niveau. Pour la forme microvésiculaire, le revêtement épithélial est fait de cellules contenant des microvésicules de mucus, avec ou sans la présence de cellules en gobelet, avec un feston plus prononcé de la lumière glandulaire par rapport à la forme riche en cellules caliciformes. Pour les deux formes, les noyaux sont réguliers. La troisième forme, pauvre en mucines, est rare. Elle peut comporter un feston important au niveau des lumières glandulaires, avec des atypies de type régénératif des noyaux (World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2010).

Au niveau moléculaire, le phénotype microvésiculaire comporte fréquemment la mutation de BRAF (V600E) et des méthylations aberrantes. Le phénotype riche en cellules caliciformes comporte des mutations de KRAS (Qazi et al., 2014). Cette mutation est fréquente au niveau des polypes de localisation distale.

En immunohistochimie il existe une positivité pour MUC2 (apomucine côlon-spécifique) et MUC5AC (mucine gastrique), et rarement pour MUC6 (en position abdominale)(Yantiss, 2013).

Les adénomes/polypes sessiles festonnés constituent environ 15-25% des polypes festonnés (World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2010). Ils sont localisés au niveau du côlon droit, plus fréquemment chez les femmes et associés à la consommation de tabac. Ils comportent des cryptes allongées, festonnées avec une architecture déformée à cause des altérations notamment dans la partie proliférative des cryptes, localisée non pas à la base des cryptes mais vers l'un ou les deux côtés de la lumière, de façon asymétrique. Les cryptes sont ainsi dilatées dans leur partie profonde, en prenant des formes anormales en lettres L ou T inversées, avec des aspects festonnés à ce niveau, parfois assez prononcés. Les noyaux peuvent être vésiculeux, avec des nucléoles proéminents (World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2010). Parfois le diagnostic différentiel avec un polype hyperplasique microvésiculaire peut

être très difficile. Certains auteurs considèrent que la présence d'une seule crypte typique d'adénome sessile festonné serait suffisante pour faire le diagnostic (Bettington et al., 2014).

Il peut exister une progression vers la dysplasie, suite à des méthylations du gène *MLH1*. Ces polypes sont donc des précurseurs pour certains adénocarcinomes sporadiques caractérisés par un niveau élevé d'instabilité microsatellitaire (MSI-H). Quand la dysplasie est présente, le polype était classifié comme *polype mixte* hyperplasique et adénomateux selon l'OMS en 2009 (World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2010). Selon certains auteurs il faudrait les considérer plutôt comme des polypes sessiles festonnés avec dysplasie, étant un stade intermédiaire de progression des polypes sessiles festonnés vers le carcinome invasif (Yantiss, 2013). La dysplasie peut être similaire à celle retrouvée dans les adénomes conventionnels, ou elle peut comporter des cellules plutôt cubiques, au cytoplasme éosinophile et aux noyaux vésiculeux, nucléolés, appelée « dysplasie festonnée ». Les polypes comportant ce type de dysplasie sont désignés polypes adénomateux sessiles avec dysplasie cytologique. Ils peuvent être plus agressifs que les adénomes conventionnels (World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2010)

Sur le plan moléculaire, au niveau des zones dysplasique on observe une perte de *MLH1* en immunohistochimie (IHC) avec phénotype MSI, mutation de *BRAF* dans 40-89% et de *KRAS* dans > 10% des cas. Selon certains auteurs, ces polypes comportent fréquemment le CIMP (CpG island phénotype méthylateur)(Batts, 2015).

En immunohistochimie ils sont positifs pour *MUC2*, *MUC5AC* et *MUC6* (Yantiss, 2013).

Les adénomes festonnés traditionnels sont retrouvés partout dans le côlon mais notamment au niveau du sigmoïde et rectum. Ils sont rares (1-2%). La plupart sont sporadiques mais peuvent être rencontrés dans les polyposes festonnées/hyperplasiques.

Sur le plan histologique ils comportent des similitudes avec le polype hyperplasique mais avec présence simultanée dans les mêmes glandes d'aspects adénomateux avec dysplasie de bas grade (plus fréquemment)/haut grade (plus rarement). Il existe des similitudes avec les polypes sessiles avec dysplasie et avec certains adénomes traditionnels avec architecture festonnée. Pour les adénomes festonnés traditionnels, l'architecture est souvent vilieuse.

Les villosités sont bordées par des cellules cylindriques hautes, au cytoplasme éosinophile et aux noyaux allongés, appelées cellules « dysplasiques », assez caractéristiques. Mais les mitoses sont rares. Ces cellules semblent être plutôt sénescents que dysplasiques (World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2010). Cependant, il peut y avoir une vraie dysplasie de type adénomateux ou festonnée, témoignant d'une progression vers le cancer. Le critère permettant de différencier ce type d'adénome d'un polype hyperplasique ou d'un polype/adénome sessile festonné, est plutôt la présence des foyers de cryptes aberrantes. Ce critère n'est pas suffisant pour le différencier d'un adénome traditionnel villositéux/tubulovillositéux qui peut présenter des FCA et plus rarement des cellules au cytoplasme éosinophile (Hafezi-Bakhtiari et al., 2015). Les FCA au sein d'un adénome peuvent donner des aspects d'invaginations plutôt ondulées, différentes des aspects festonnés observés dans les adénomes festonnés traditionnels, qui comportent des fentes profondes conduisant à des frondes larges vers la lumière des glandes et aux festons aux sommets plutôt plats, avec des aspects en puzzle, associant une bordure en brosse en surface, similaire à la muqueuse intestinale grêle.

En immunohistochimie ils sont positifs pour MUC2 et MUC5AC, et négatif pour MUC6 (Yantiss, 2013). Sur le plan moléculaire on retrouve la mutation d'APC dans 13-20% des cas, de KRAS dans 70% des cas, de CIMP dans 43-90% des cas, et plus rarement la méthylation du promoteur de MGMT et des mutations de BRAF.

Polypes hamartomateux

Les polypes juvéniles peuvent être sporadiques, diagnostiqués chez l'enfant. Ils sont constitués de glandes dilatées d'aspect kystique contenant du mucus, et bordées par un épithélium d'aspect réactionnel, avec très rarement des foyers de dysplasie associée. Les glandes se disposent dans un stroma abondant, œdémateux, infiltré par des éléments inflammatoires avec présence d'un tissu de granulation.

Les polypes de Peutz-Jeghers sont localisés plus fréquemment au niveau de l'intestin grêle. Ils sont rencontrés dans le syndrome de Peutz-Jeghers.

Les polypes/pseudo-polypes inflammatoires sont des lésions réactionnelles comportant des glandes déformées, au revêtement épithélial régénératif, dans un chorion inflammatoire avec présence de tissu de granulation et de remaniements fibreux et parfois la présence de fibres musculaires lisses provenant de la musculaire muqueuse. Ils sont retrouvés dans diverses maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, les diverticulites, la schistosomiase.

Les syndromes polyposiques

Une polypose est suspectée si plus de 15 polypes adénomateux colorectaux synchrones ou métachrones sont mis en évidence. L'identification de polypes adénomateux du tractus digestif supérieur est un argument supplémentaire en faveur de l'analyse génétique. Sur le plan génétique, les altérations de deux gènes ont été reconnues comme responsables du phénotype dans le cas de polypes dysplasiques : le gène APC, qui est responsable d'une transmission autosomique dominante de la maladie et le gène MYH, qui est responsable d'une transmission autosomique récessive de la maladie. Il peut exister dans les deux cas des formes atténuées de polypose de diagnostic plus difficile. Dans les deux cas, des manifestations extra-coliques bénignes et malignes peuvent être responsables d'une morbidité importante (tumeur desmoïde et tumeur duodénale)(Lecomte et al., 2011).

L'indication d'une analyse génétique (accord d'experts) concerne les patients ayant (1) plus de 15 polypes adénomateux colorectaux synchrones ou métachrones, ou (2) une polypose floride (avec plus de 100 polypes). Dans ce deuxième cas, s'il existe une atteinte d'individus de génération successive ou de tumeur desmoïde, l'analyse débutera par la recherche d'une mutation APC, sinon l'analyse débutera par la recherche d'une mutation MYH (Lecomte et al., 2011).

La polypose adénomateuse familiale

C'est une maladie à transmission autosomique dominante, avec présence de centaines/milliers de polypes adénomateux et évolution vers un adénocarcinome dans 100% des cas. Au niveau des polypes on retrouve la mutation du gène APC. La maladie associe souvent des polypes glandulo-kystiques gastriques, des adénomes du duodénum et de l'intestin grêle.

Une variante de la maladie est le *syndrome de Gardner* qui associe des kystes épidermiques, des ostéomes, des anomalies dentaires et/ou des tumeurs desmoïdes.

Une autre variante est le *syndrome de Turcot* avec association de tumeurs cérébrales (médulloblastomes).

Il existe une *forme atténuée* avec environ 30 polypes.

Cette polypose est le précurseur de moins d'1% des cancers colorectaux, avec apparition des adénomes dans les décades 2-3 (à l'âge de 15 ans environ) et de cancers à l'âge de 40 ans (mais 1-6% à 21 ans).

La prise en charge inclut un test génétique, le screening dès l'âge de 10-15 ans. Si des adénomes sont observés, il y a un suivi par coloscopie tous les ans/2 ans avec colectomie en cas de transformation maligne et surveillance post chirurgicale. En absence de test génétique le screening s'effectue tous les ans/2 ans jusqu'à l'âge de 40 ans. Au niveau moléculaire il existe des anomalies de KRAS et TP53.

La polypose associée à MUTYH

C'est une maladie de transmission autosomique récessive (AR) comportant 10-100 polypes coliques, avec évolution vers un cancer. Il peut associer des polypes au niveau gastrique et intestin grêle, ainsi que des manifestations extra-intestinales (avec une certaine superposition avec le syndrome de Lynch notamment pour les tumeurs des glandes sébacées). La maladie est suspectée devant une polypose négative pour la mutation germinale du gène APC et un pattern de transmission AR.

Histologiquement, les polypes sont notamment des adénomes, mais il peut y avoir aussi des polypes hyperplasiques ou des polypes/adénomes sessiles festonnés.

Les polyposes festonnées (hyperplasiques) sont définies par plusieurs critères: (1) au moins 5 polypes festonnés de localisation proximale par rapport au sigmoïde, dont au moins deux de taille > 1 cm ou (2) 20 (ou plus) de polypes festonnés de toute taille mais disséminés au niveau du côlon ou (3) un nombre non défini de polypes festonnés de localisation

proximale par rapport au sigmoïde si un parent de premier degré est atteint de polypose festonnée (hyperplasique).

Histologiquement, la plupart des polypes sont des polypes/adénomes sessiles festonnés, et plus rarement des polypes hyperplasiques de type microvésiculaire, souvent de taille plus grande que les polypes hyperplasiques sporadiques. Avec le temps il y a une évolution vers la dysplasie et le cancer. Parfois, la dysplasie peut intéresser toute la surface du polype, sans être de vrais adénomes traditionnels.

Syndrome de Lynch (cancer colique héréditaire non polyposique)

Il s'agit d'un syndrome de prédisposition au cancer à transmission autosomique dominante. Il est à l'origine de 3-5% des cancers colorectaux, avec un âge moyen au diagnostic de 45-50 ans, et la présence des cancers synchrones ou métachrones chez 18% des patients.

Les critères diagnostiques reposent sur les critères d'Amsterdam II: soit au moins 3 sujets atteints de cancers du spectre HNPCC (côlon-rectum, endomètre, ovaire, grêle, uretère ou cavités excrétrices rénales) dont 1 uni aux 2 autres au premier degré, soit au moins 2 générations successives concernées soit au moins 1 cancer diagnostiqué avant l'âge de 50 ans avec les tumeurs vérifiées par examen anatomopathologique (Lecomte et al., 2011).

Les formes incomplètes sont fréquentes. La conférence d'expertise collective française a retenu des critères cliniques élargis nécessitant la prescription d'une consultation d'oncogénétique d'emblée pour les personnes ayant deux parents atteints par un cancer du spectre dont un avant l'âge de 50 ans, pour les malades ayant un antécédent personnel de cancer du spectre HNPCC, pour les patients de moins de 40 ans, ou en cas de présence d'une instabilité microsatellitaire chez un patient de moins de 60 ans ou quel que soit l'âge en cas d'antécédent au 1er degré d'un cancer du spectre HNPCC. En cas d'extinction de MLH1, la recherche de la mutation de BRAF V600E est recommandée. Si celle-ci est présente, il n'est pas nécessaire de réaliser un séquençage des gènes MMR. En l'absence de la mutation BRAF V600E ou d'emblée en cas d'extinction de MSH2 ou MSH6 un séquençage des gènes MMR peut être proposé. Cette altération sera recherchée par une prise de sang (Lecomte et al., 2011).

Une variante de la maladie est le *syndrome de Turcot* qui associe des cancers au niveau endométrial, uretère/bassin, gastrique, intestin grêle, ovarien, cérébral (glioblastomes).

Une autre variante est le *syndrome de Muir-Torre* avec des tumeurs des voies hépatobiliaires et des tumeurs sébacées.

Le syndrome de Peutz-Jeghers est un syndrome de cancer héréditaire caractérisé selon l'OMS par une pigmentation cutanée et des muqueuses ainsi qu'une polypose hamartomateuse gastro-intestinale prédominante au niveau de l'intestin grêle. Il existe également un risque élevé pour les cancers ovariens, du col utérin, testiculaires, pancréatiques et mammaires.

Sur le plan histologique, le polype de Peutz-Jeghers est constitué d'un axe central arborescent de tissu musculaire lisse, recouvert par la muqueuse souvent repliée donnant un aspect villositaire. Les lésions adénomateuses au sein d'un polype de Peutz-Jeghers sont très rares.

La polypose juvénile comporte des polypes faits de moins de stroma et des glandes de taille plus petites qu'au niveau des polypes sporadiques. Il existe un risque élevé de développer un cancer.

Le syndrome de Cowden (Syndrome des tumeurs hamartomateuses PTEN) est un syndrome de transmission autosomique dominante caractérisé par de multiples hamartomes développés à partir de toutes les trois couches germinales, dont le plus caractéristique est le trichilemmome. Il existe un risque élevé pour des carcinomes mammaires et thyroïdiens. Le syndrome apparaît suite à une mutation de la lignée germinale du gène *PTEN* (phosphatase and tensin homologue) ou des sous-unités B ou D du complexe déshydrogénase (*SDHB* ou *SDHD*). Au niveau du tube digestif on retrouve des polypes au niveau gastrique, duodéal, intestin grêle et côlon, mesurant de 3 – 10 mm jusqu'à 2 cm.

Sur le plan histologique, les polypes hamartomateux ressemblent aux polypes juvéniles, comportant des glandes normales ou allongées, bordées d'un épithélium régulier, et associé parfois à des lésions lipomateuses, des ganglioneuromes et une hyperplasie lymphocytaire.

2.6. Classification du cancer colorectal

En macroscopie, il peut avoir soit l'aspect de polype sessile, pédiculé ou plan, soit de carcinome infiltrant exophytique, bourgeonnant ou endophytique, infiltrant. En cas d'aspect polypoïde, il peut être parfois de taille infracentimétrique, ce qui rend le diagnostic de malignité difficile en endoscopie (Bugajski et al., 2015).

En microscopie on observe soit un polype dégénéré soit une lésion entièrement tumorale. Plus de 90% des carcinomes colorectaux sont des adénocarcinomes (International Agency for Research on Cancer and World Health Organization, 2008). Ils sont constitués d'une prolifération de cellules tumorales s'organisant sous forme de glandes de tailles variées, souvent fusionnées, et bordées de cellules tumorales stratifiées comportant des atypies et des mitoses. Les glandes se trouvent au sein d'un stroma fibreux, inflammatoire. Les cellules peuvent s'organiser aussi sous forme de plages, de travées ou de cellules indépendantes. Traditionnellement, selon la classification des tumeurs du système digestif faite par l'OMS, les adénocarcinomes coliques ont été gradés en bien-, moyennement, peu- et indifférencié selon le pourcentage de la composante glandulaire : bien différencié avec $\geq 95\%$ structures glanduliformes, modérément différencié avec 50 à 95% de structures glanduliformes et peu différencié avec $< 50\%$ de structures glanduliformes. Un nouveau schéma classe les adénocarcinomes coliques en bas-grade qui regroupe les formes bien- et moyennement différenciées, et haut grade qui correspondent aux formes peu différenciées. Le grade s'applique uniquement aux formes "Adénocarcinomes NOS (no otherwise specified)". En dehors de cette forme "classique", il existe plusieurs variantes histopathologiques d'adénocarcinome colique (World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2010).

L'adénocarcinome mucineux est défini par la présence d'une composante mucineuse majoritaire de plus de 50% faite de plages de mucus extracellulaire qui englobe des glandes ou des plages de cellules tumorales, ou des cellules tumorales isolées y compris les cellules en bague à chaton.

L'adénocarcinome à cellules en bague à chaton est défini par la présence d'une composante mucineuse majoritaire de plus de 50% faite de plages de cellules comportant du mucus intracellulaire abondant qui refoule le noyau en périphérie de la cellule. Elles peuvent être

englobées au sein des plages de mucus où elles peuvent être infiltrantes, de façon diffuse, avec peu de mucines extracellulaires.

Le carcinome médullaire est constitué de plages de cellules tumorales comportant des noyaux vésiculeux, avec des nucléoles proéminents et un cytoplasme éosinophile abondant. Les plages tumorales sont infiltrées par de nombreux lymphocytes.

L'adénocarcinome festonné (serrated) est une variante rare, constitué de glandes à lumière festonnée avec des zones mucineuses, cribriiformes, ou trabéculaires associées, et un rapport nucléo-cytoplasmique élevé.

Stadification des tumeurs

La tumeur, développée initialement au niveau de la muqueuse, envahit les différentes couches de la paroi colique avec une extension directe au niveau du péritoine et une dissémination dans la cavité péritonéale (carcinose péritonéale) ou avec une extension directe au niveau des tissus péri-rectaux tels que le vagin ou la vessie urinaire. La dissémination au niveau d'autres organes peut se faire soit par contiguïté à travers le péritoine suite à des adhérences tumorales avec les organes voisins, soit par voies sanguine ou lymphatique, assez tôt au cours du développement du cancer, conduisant à des métastases ganglionnaires et à une maladie systémique. La dissémination par voie lymphatique nécessite le dépassement de la musculaire muqueuse et l'envahissement de la sous-muqueuse. Ainsi la classification de la tumeur prend en compte l'envahissement tumoral au niveau de la paroi colique et des organes voisins par contiguïté (T), l'envahissement ganglionnaire (N) et les métastases à distance (M). Le Tableau 1 reprend la classification TNM selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) 4ème édition (World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2010).

Tableau 1: Classification TNM selon l'OMS 7ème édition 2009 (WORLD HEALTH ORGANIZATION AND INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2010)

<p>T - Tumeur primitive</p> <p>Tx Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive</p> <p>T0 Pas de signe de tumeur primitive</p> <p>Tis Carcinome in situ : intra-épithélial ou envahissant le chorion muqueux</p> <p>T1 Tumeur envahissant la sous-muqueuse</p> <p>T2 Tumeur envahissant la musculuse</p> <p>T3 Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péri-coliques ou péri-rectaux non péritonisé</p> <p>T4 Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures et/ou perforant le péritoine viscéral</p> <p style="padding-left: 20px;">T4a Tumeur perforant le péritoine viscéral</p> <p style="padding-left: 20px;">T4b Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures</p> <p>N – Adénopathies régionales</p> <p>Nx Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales</p> <p>N0 Pas de métastase ganglionnaire régionale</p> <p>N1 Métastase dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux</p> <p style="padding-left: 20px;">N1a Métastase dans 1 ganglion lymphatique régional</p> <p style="padding-left: 20px;">N1b Métastase dans 2 à 3 ganglions lymphatiques régionaux</p> <p style="padding-left: 20px;">N1c Dépôts tumoraux satellites dans la sous-séreuse ou dans le tissu péri-colique ou péri-rectal non péritonisé sans métastase ganglionnaire régionale</p> <p>N2 Métastase dans 4 ou plusieurs ganglions lymphatiques régionaux</p> <p style="padding-left: 20px;">N2a Métastase dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux</p> <p style="padding-left: 20px;">N2b Métastase dans 7 ou plusieurs ganglions lymphatiques régionaux</p>	<p>M – Métastases à distance</p> <p>M0 Pas de métastase à distance</p> <p>M1 Présence de métastase(s) à distance</p> <p style="padding-left: 20px;">M1a Métastase localisée à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s) autre que régional)</p> <p style="padding-left: 20px;">M1b Métastase dans plusieurs organes ou métastases péritonéales</p>																																																																												
	<p>Classification</p> <table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Stade</th> <th style="text-align: left;">T</th> <th style="text-align: left;">N</th> <th style="text-align: left;">M</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Stade 0</td> <td>Tis</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade I</td> <td>T1, T2</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade II</td> <td>T3, T4</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Stade IIA</td> <td>T3</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Stade IIB</td> <td>T4a</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Stade IIC</td> <td>T4b</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade III</td> <td>tous T</td> <td>N1, N2</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Stade IIIA</td> <td>T1, T2</td> <td>N1</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;"></td> <td>T1</td> <td>N2a</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Stade IIIB</td> <td>T3, T4a</td> <td>N1</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;"></td> <td>T2, T3</td> <td>N2a</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;"></td> <td>T1, T2</td> <td>N2b</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Stade IIIC</td> <td>T4a</td> <td>N2a</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;"></td> <td>T3, T4a</td> <td>N2b</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;"></td> <td>T4b</td> <td>N1, N2</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade IV</td> <td>Tous T</td> <td>Tous N</td> <td>M1</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Stade IVA</td> <td>tous T</td> <td>tous N</td> <td>M1a</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Stade IVB</td> <td>tous T</td> <td>tous N</td> <td>M1b</td> </tr> </tbody> </table>	Stade	T	N	M	Stade 0	Tis	N0	M0	Stade I	T1, T2	N0	M0	Stade II	T3, T4	N0	M0	Stade IIA	T3	N0	M0	Stade IIB	T4a	N0	M0	Stade IIC	T4b	N0	M0	Stade III	tous T	N1, N2	M0	Stade IIIA	T1, T2	N1	M0		T1	N2a	M0	Stade IIIB	T3, T4a	N1	M0		T2, T3	N2a	M0		T1, T2	N2b	M0	Stade IIIC	T4a	N2a	M0		T3, T4a	N2b	M0		T4b	N1, N2	M0	Stade IV	Tous T	Tous N	M1	Stade IVA	tous T	tous N	M1a	Stade IVB	tous T	tous N	M1b
Stade	T	N	M																																																																										
Stade 0	Tis	N0	M0																																																																										
Stade I	T1, T2	N0	M0																																																																										
Stade II	T3, T4	N0	M0																																																																										
Stade IIA	T3	N0	M0																																																																										
Stade IIB	T4a	N0	M0																																																																										
Stade IIC	T4b	N0	M0																																																																										
Stade III	tous T	N1, N2	M0																																																																										
Stade IIIA	T1, T2	N1	M0																																																																										
	T1	N2a	M0																																																																										
Stade IIIB	T3, T4a	N1	M0																																																																										
	T2, T3	N2a	M0																																																																										
	T1, T2	N2b	M0																																																																										
Stade IIIC	T4a	N2a	M0																																																																										
	T3, T4a	N2b	M0																																																																										
	T4b	N1, N2	M0																																																																										
Stade IV	Tous T	Tous N	M1																																																																										
Stade IVA	tous T	tous N	M1a																																																																										
Stade IVB	tous T	tous N	M1b																																																																										

Précisions sur la classification TNM:

L'envahissement de la sous-muqueuse est divisé par certains auteurs en T1sm1, sm2 ou sm3, selon que la tumeur envahit jusqu'au niveau du tiers supérieur, moyen ou inférieur de

la sous-muqueuse (Kikuchi et al., 1995; Kudo, 1993). Cette évaluation est difficile en dehors des pièces opératoires en raison de l'absence de la musculuse, de la fragmentation du prélèvement ou sa forme polyploïde. D'autres auteurs proposent dans ces cas la limite de 1000 µm à partir de la musculaire muqueuse pour stratifier les cas nécessitant une simple surveillance ou un traitement chirurgical complémentaire (Watanabe et al., 2012).

L'examen d'au moins 12 ganglions régionaux est recommandé par l'UICC et l'AJCC. Quel que soit le stade le pronostic est d'autant meilleur que le nombre de ganglions prélevés et analysés est grand car en lui-même c'est un facteur de pronostic.

Concernant le stade pN1c il existe des réticences liées 1) à l'absence de données montrant un bénéfice du traitement adjuvant lorsque ces dépôts tumoraux sont identifiés, 2) à l'absence d'étude de reproductibilité pour les identifier, 3) à l'hétérogénéité de ces lésions intégrant potentiellement une extension discontinue de la tumeur, une extension extravasculaire d'une invasion veineuse ou lymphatique, un ganglion lymphatique totalement remanié et non identifiable, ou une infiltration périneurale, tous associés cependant à un risque élevé de récurrence (HR : 1,96)(Lecomte et al., 2011).

2.7. Evolution, pronostic et facteurs prédictifs

Sans traitement, le cancer colorectal évolue vers le décès du patient. Pour l'ensemble des cancers colorectaux, tous stades confondus, le taux de survie à 5 est d'environ 56% et à 10 ans de 50%. De nombreux facteurs influencent le pronostic du cancer colorectal. Le plus important est le stade du cancer au moment du diagnostic avec les meilleures chances de guérison pour ceux découverts à un stade précoce. D'autres facteurs qui influencent le pronostic sont liés à la morphologie de la tumeur, l'âge du patient, son état de santé général, la réponse aux traitements. Certains types de tumeurs ont un pronostic meilleur que d'autres. C'est le cas des carcinomes MSI-H qui ont un meilleur pronostic et souvent une microscopie suggestive (stroma riche en lymphocytes, présence d'un type mucineux ou à cellules indépendantes, aspect médullaire, haut grade, nécrose tumorale basophile), avec une localisation au niveau du côlon droit. Néanmoins, on note un pronostic péjoratif pour les patients de phénotype MSI qui associent une obstruction intestinale ou des embolies vasculaires (Tougeron et al., 2015).

Les formes tumorales avec un pronostic plus péjoratif sont aussi les carcinomes à cellules indépendantes ou les tumeurs comportant un pattern infiltratif du front d'expansion avec la présence de bourgeons tumoraux, une architecture micro-acinaire, les formes peu différenciées et les formes mucineuses en absence de MSI-H (World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2010), la présence d'engainements tumoraux péri-nerveux, la présence de cellules tumorales circulantes dans le cas du cancer métastatique mais aussi non-métastatique (Bork et al., 2015), cellules qui peuvent constituer un marqueur utile pour suivre la maladie résiduelle post-traitement (Bork, 2014). Au niveau moléculaire, un pronostic péjoratif est lié aux mutations KRAS, BRAF, 18q, PIK3CA (avec perte d'expression PTEN) ou surexpression de CD133 (marqueur de cellule souche), ostéoponine, CXCL. Au contraire, une surexpression d'EGFR ainsi qu'une expression des ligands épi- et amphiréguline sont des facteurs prédictifs positifs.

Un problème qui se pose est lié à l'hétérogénéité intra-tumorale avec présence fréquente de signatures moléculaires différentes entre le centre et la périphérie de la tumeur (Kosmidou et al., 2014). Cette hétérogénéité tumorale est responsable des discordances observées entre l'expression des biomarqueurs au sein de la tumeur et au niveau des cellules tumorales circulantes (Raimondi et al., 2014), et peut également expliquer la résistance contre les thérapies ciblées. Il apparaît de plus en plus évident que chaque tumeur est unique en termes de composition moléculaire, microenvironnement tumoral et interactions entre les cellules tumorales et les cellules de l'hôte (Ogino et al., 2012) influençant leur pronostic et l'approche thérapeutique par une médecine personnalisée.

2.8. Traitement

Le traitement du cancer colorectal peut avoir comme objectif soit la guérison en supprimant toutes les cellules tumorales et en réduisant le risque de récurrence, soit une stabilisation de la maladie en empêchant le cancer de se développer et de disséminer, soit juste un objectif palliatif pour améliorer le confort et la qualité de vie du patient en traitant les complications et les symptômes (notamment la douleur).

Les moyens de traitement disponibles sont la chirurgie, la radiothérapie (pour les cancers du rectum), la chimiothérapie et les thérapies ciblées. Ils peuvent être utilisés seuls ou en association, avec un traitement principal et un traitement adjuvant.

Le traitement principal du cancer du côlon est la **chirurgie**, qui a pour but d'enlever la tumeur et les ganglions locorégionaux correspondants. Il faut avoir en principe une marge saine distale et proximale d'au minimum 5 cm sur pièce fraîche, et effectuer une exérèse en bloc du mésocolon avec repérage du pédicule vasculaire (pour les tumeurs de la charnière recto-sigmoïdienne il faut enlever 5 cm de mésorectum sous le pôle inférieur de la tumeur)(Lecomte et al., 2011).

La **chimiothérapie** détruit ou empêche la multiplication de cellules tumorales par voie médicamenteuse systémique, en ayant des effets indésirables sur les tissus sains de l'organisme.

Les **thérapies ciblées** en revanche utilisent des anticorps monoclonaux agissant notamment sur les cellules cancéreuses, en limitant les dommages causés aux cellules normales du corps, et réduisent ainsi les effets secondaires.

Depuis 1995 et jusqu'à 2005, le nombre de molécules efficaces a augmenté d'un (5 fluorouracil) à sept (5-FU, capecitabine, oxaliplatine, irinotecan – chimiothérapie, et bevacizumab, cetuximab, panitumumab – thérapie ciblée).

Le **suivi** après traitement a pour objectifs de détecter les signes de récurrence pour les traiter rapidement, de détecter l'apparition de nouveaux polypes ou d'un nouveau cancer, de prévenir et traiter les effets indésirables liés aux traitements et d'assurer au patient la meilleure qualité de vie possible après les traitements.

En pratique

Les référentiels pour la région Nord-Pas-de-Calais datent de décembre 2007 pour le cancer du côlon non métastatique et de mars 2008 pour le cancer du côlon métastatique (Onco Nord Pas-de-Calais) alors que les référentiels du Thesaurus National de Cancérologie Digestive (TNCD) © ont été réactualisés en 2011 pour le cancer du côlon non métastatique

(Lecomte et al., 2011), en 2014 pour le cancer colorectal métastatique (Phelip et al., 2014) et en 2013 pour le cancer rectal (Gérard et al., 2013). Les référentiels utilisés dans ce chapitre sont ceux du TNCD.

Les tumeurs de **stade I** sont traitées par chirurgie seule. Pour les lésions avec foyers de carcinomes sous muqueux, la résection endoscopique est considérée comme suffisante uniquement en cas d'envahissement sous muqueux superficiel (<1000 µm si sessile et 1/3 supérieur du pied si pédiculé) et si la pièce de polypectomie présente l'ensemble des critères de sécurité : limite de résection saine, absence de foyer de carcinome indifférencié, absence d'embolie vasculaire ou lymphatique et marge de sécurité > 1mm (accord d'experts).

Les tumeurs de **stade II** sont traitées par chirurgie avec ou sans chimiothérapie adjuvante (discutée cas par cas) avec une association **5FU** (5 FluoroUracil)-Acide folinique. La détermination du statut microsatellitaire stable (MSS) ou instable (MSI) de la tumeur est devenue indispensable pour poser l'indication d'une chimiothérapie adjuvante pour un patient opéré d'un cancer de stade II avec facteurs de mauvais pronostic car d'une part les tumeurs MSI de stade II sont un excellent pronostic et d'autre part la chimiothérapie adjuvante à base de 5FU semble même avoir un effet délétère sur la survie en cas de tumeur MSI de stade II. Pour les tumeurs MSS de stade II de mauvais pronostic il n'y a pas de référence à ce jour.

Les tumeurs de **stade III** nécessitent une chimiothérapie adjuvante post-opératoire par FOLFOX 4 ou XELOX (avec l'arrêt de l'oxaliplatine en cas de certains effets indésirables toxiques) ou par fluoropyrimidine seule en cas de sujets de plus de 70 ans.

Quant à la thérapie ciblée, plusieurs études de phase III évaluant les thérapies ciblées (bevacizumab et cétuximab) en association à la chimiothérapie (fluoropyrimidine + oxaliplatine) sont négatives.

Les tumeurs de **stade IV** : en cas des tumeurs hépatiques résécables, la chimiothérapie adjuvante se fait selon le protocole FOLFOX 4 pré- et post-opératoire, et les tumeurs

hépatiques sont en général opérées 3 mois après la chirurgie du côlon. En cas de métastases pulmonaires, elles seront résectionnées 2-3 mois après les tumeurs hépatiques.

La chimiothérapie palliative peut se faire soit par une polychimiothérapie (bithérapie +/- biothérapie) ou par une monothérapie (LV5FU2 ou xeloda +/- biothérapie) avec intensification en cas de progression.

Les tumeurs MSI-H ont une réponse faible au traitement avec le 5-FU et l'oxaliplatine, en étant en revanche sensibles à l'irinotecan.

Les thérapies ciblées sont utilisées en association avec de la chimiothérapie. Trois médicaments sont principalement utilisés : le bevacizumab (Avastin®), le cetuximab (Erbitux®) et le panitumumab (Vectibix®). Le premier a un effet anti-angiogénique alors que les deux derniers agissent contre le récepteur EGF. La détermination du statut mutationnel des gènes RAS de type sauvage (exons 2, 3 et 4 des gènes KRAS et NRAS) est nécessaire avant d'instaurer ce type de traitement dans les cancers colorectaux métastatiques. Les mutations KRAS et BRAF sont en général mutuellement exclusives. Les inhibiteurs de BRAF (Vemurafenib) utilisés dans le mélanome malin métastatique ne sont pas encore utilisés dans le carcinome colorectal.

Pour les tumeurs rectales, une chimioradiothérapie préopératoire est recommandée pour les cancers T3-T4 du moyen et bas rectum, et aussi en cas de tumeur non résectable du haut rectum. Elle peut rendre résectables des tumeurs initialement non résectables. Les indications pour une chimiothérapie adjuvante des tumeurs du haut rectum sont les mêmes que pour les tumeurs coliques. Pour les cancers du bas et moyen rectum de stade II ou III il peut y avoir soit une surveillance soit une chimiothérapie. En cas de stade IV avec métastases résectables ou non, il n'existe pas de standard reconnu de façon unanime.

3. Le mucus intestinal

Le mucus intestinal est un gel viscoélastique qui couvre la surface de la muqueuse colique, et qui va jouer plusieurs rôles dont la protection mécanique de l'épithélium, la lubrification, un rôle de barrière chimique contre les molécules potentiellement nocives, un rôle dans l'interaction entre l'hôte et le microbiote, ou encore une régulation du mouvement des molécules vers les cellules absorbantes (Yildiz et al., 2015) Hasan M. Yildiz et al., "Mucus Barriers to Microparticles and Microbes Are Altered in Hirschsprung's Disease," *Macromolecular Bioscience*, February 2, 2015, doi:10.1002/mabi.201400473.. Il est constitué des mucines sécrétées par les cellules caliciformes (environ 5% de sa composition), de l'eau et des électrolytes (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , autres), des protéines (en particulier des immunoglobulines IgA, IgM et IgG), ainsi que des débris cellulaires provenant des cellules épithéliales desquamées. Il est organisé en 2 couches de mucus : une partie insoluble dans l'eau, plus dense, adhérent à la surface épithéliale au-dessus du glycocalyx, et une couche plus lâche, visqueuse, hydrosoluble, plus hydratée, constamment renouvelée, située vers la lumière colique, au contact direct avec son contenu. Les deux couches sont constituées principalement de MUC2, la mucine majoritairement sécrétée dans l'intestin. Elle subit un clivage protéolytique dans la couche superficielle, en lui conférant plus de volume grâce à une hydratation importante. Cette couche est colonisée par les micro-organismes commensaux ou pathogènes.

3.1. Structure des mucines

Les mucines coliques synthétisées par les cellules caliciformes entrent dans la composition du mucus. Elles sont responsables de ses propriétés rhéologiques et d'une partie de ses propriétés biochimiques. Elles sont très hétérogènes, avec de très hautes masses moléculaires, pouvant atteindre plusieurs millions de daltons (Dekker et al., 2002; Lindén et al., 2008; Porchet and Aubert, 2004). Le terme de « mucine » a été initialement associé aux glycoprotéines sécrétées, formant un gel de mucus. Ultérieurement, il a été utilisé pour désigner aussi d'autres glycoprotéines membranaires et sécrétées qui ne forment pas de gel. Les mucines sont des glycoprotéines de grande taille, constituées d'un axe peptidique appelé apomucine et codé par la famille des gènes *MUC* (Porchet and Aubert, 2004), auquel

se lie de multiples chaînes glycaniques différentes. L'axe peptidique est composé (jusqu'à 50%) de séquences répétées en tandem appelées « tandem repeat » (TR) ou régions PTS (régions riches en proline, sérine et thréonine), localisées dans la partie centrale de l'apomucine (Hollingsworth and Swanson, 2004). Ces régions comportent des sites potentiels de O-glycosylation au niveau des résidus de sérine et thréonine, auxquels s'attachent les chaînes glycaniques. Les résidus de proline facilitent la O-glycosylation de type O-GalNAc (N-acétylgalactosamine), la GalNAc étant le premier résidu de monosaccharide greffé sur un acide aminé hydroxylé de l'axe peptidique. Les mucines peuvent comporter des centaines de O-glycanes attachés aux régions VNTR (Variable Number of Tandem Repeat), conférant au peptide une conformation en « écouvillon » (Fig 4).

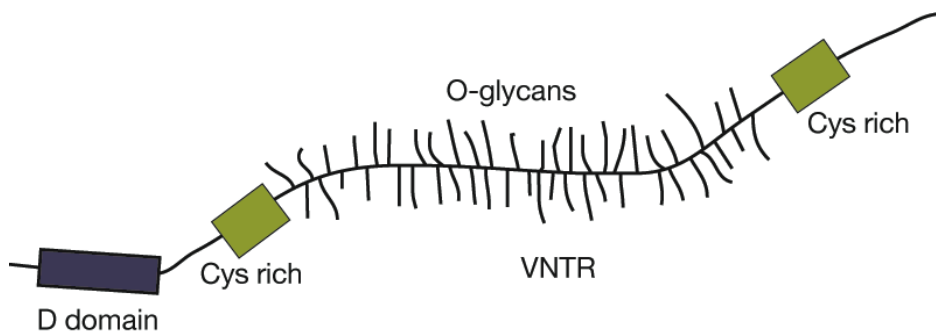


Figure 4. Modèle simplifié d'une mucine sécrétée.

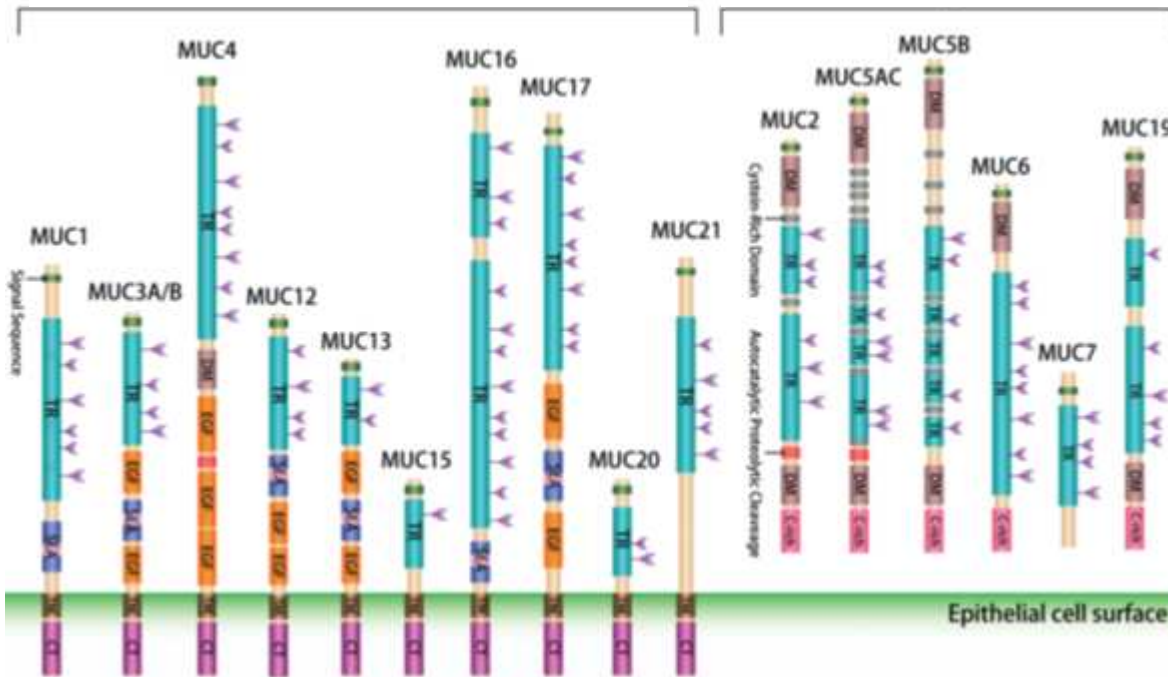
La région centrale riche en sérine, thréonine et proline est largement O-glycosylée. Des centaines de O-glycanes peuvent être attachés aux résidus de sérine ou thréonine des domaines VNTR. Les régions riches en cystéine (Cys rich) sont impliquées dans la formation de ponts disulfures intra et interchaînes, formant des polymères de plusieurs millions de daltons (VARKI, 2009)

Les différentes mucines se différencient les unes des autres par la taille, le nombre et la séquence des unités de répétition. Lorsque leur taille dépasse quelques kilobases, il apparaît un polymorphisme génétique interindividuel de type VNTR (Variable Number of Tandem Repeat), avec un nombre variable de répétitions d'un sujet à l'autre, dû à une instabilité des répétitions au cours des générations.

Les mucines sont groupées en 3 classes : (1) sécrétées formant un gel (MUC2, MUC5B, MUC5AC, MUC6, MUC19), (2) sécrétées ne formant pas de gel (MUC7) et (3) membranaires (MUC1, MUC3A/B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20, MUC21) (Figure 5, Tableau 2). Au niveau du côlon, on retrouve essentiellement MUC2, et en moindre

Mucines membranaires

Mucines sécrétées



mesure MUC5AC, MUC6, MUC5B (parmi les mucines sécrétées) et MUC1, MUC3A/B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 (parmi les mucines membranaires).

Figure 5. Caractéristiques structurales des mucines.

Les mucines membranaires jouent un rôle important dans les interactions cellules/cellules et cellules/ matrice extracellulaire ainsi que dans la transduction des signaux. Elles sont constituées d'un long domaine extra-cellulaire, d'un domaine hydrophobe intra-membranaire et d'une queue cytoplasmique courte. Les mucines sécrétées participent à la formation du gel de mucus et constituent une barrière physiologique protectrice pour l'épithélium sous-jacent contre les agressions mécaniques (Yonezawa et al., 2011).

C-rich - domaine riche en cystéine ; CT - domaine de la queue cytoplasmique ; DM – domaine comportant une homologie avec le domaine de dimérisation du facteur von Willebrand ; EGF – domain facteur de croissance épidermique like ; SEA – sea-urchin-sperm protein-enterokinase-agrin ; TM – domaine transmembranaire ; TR – région de répétitions en tandem

Tableau 2 : Caractéristiques des mucines sécrétées (formant ou non un gel) et des mucines membranaires

Mucines	Sous-famille	Locus	ARN	Taille du TR (aa)	Masse moléculaire de l'apomucine
MUC1	Membranaire	1q21	4.4 kb	20	122 kDa
MUC2	Gel	11p15.5	15.7 kb	23	540 kDa
MUC3	Membranaire	7q22	nd	17	nd
MUC4	Membranaire	3q29	26.5kb	16	930 kDa
MUC5AC	Gel	11p15.5	17.5 kb	8	641 kDa
MUC5B	Gel	11p15.5	17 kb	29	620 kDa
MUC6	Gel	11p15.5	nd	169	nd
MUC7	Pas de gel	4q13-q21	2.3 kb	23	41,5 kDa
MUC9	Pas de gel	1p13 2	2.3 kb	15	83 kDa
MUC12	Membranaire	7q22	nd	28	nd
MUC13	Membranaire	3q13.3	2.8 kb	27	54.7 kDa
MUC15	Membranaire	11p14.3	3.4 kb	-	33.3 kDa
MUC16	Membranaire	19q13.3	35 kb	156	>1000 kDa
MUC17	Membranaire	7q22	nd	59	nd
MUC19	Gel	12q12	nd	nd	nd
MUC20	Membranaire	3q29	2.4 kb	18	55-79 kDa

MUC2 est la mucine majoritaire du côlon. Son gène est localisé sur le chromosome 11, dans sa partie télomérique 11p15.5, entre les gènes codant pour les mucines MUC5AC/B et MUC6 (Figure 6). Les trois loci MUC2, MUC5AC et MUCB ont pu évoluer à partir d'un gène commun ancestral suite à deux duplications successives (Desseyn et al., 1998; Griffiths et al., 1990; Rousseau et al., 2004).

MUC2 est une mucine sécrétée de plus de 540 kDa. L'axe peptidique est constitué de 3 régions : centrale, N-terminale et C-terminale (Figure 6). La région centrale est constituée de deux tandem repeat: le premier est constitué de 21 répétitions d'un motif irrégulier d'acides aminés, en étant délimité par deux domaines CYS, riches en résidus de cystéine, avec très peu de résidus de sérine et thréonine ; le deuxième tandem repeat comporte des polymorphismes de type VNTR, avec 23 acides aminés (PTTTPITTTTTVTPTPTGTQT) répétés de manière variable d'un allèle à l'autre et d'un individu à l'autre, pouvant arriver jusqu'à une centaine de répétitions. Cette région est très riche en thréonine, comportant donc de nombreux sites potentiels de O-glycosylation. La région N-terminale renferme 4 domaines D (D1, D2, D' et D3), communs aux mucines sécrétées tandis que le côté C terminal comporte un domaine D4, un domaine C, un domaine B et un domaine CK riche en cystéine (Gum et al., 1992; Rousseau et al., 2004). Les domaines D1, D2, D', D3, D4, B et C présentent de très fortes homologies avec les domaines du facteur von Willebrand (vWF) like. Le facteur von Willebrand est une glycoprotéine multimérique sécrétée dans le sang et impliquée dans la

coagulation. La région C-terminale de MUC2 est impliquée dans la dimérisation des monomères des mucines alors que la région N-terminale sert à la formation de multimères avant leur sécrétion dans la lumière sous la forme de longs filaments linéaires.

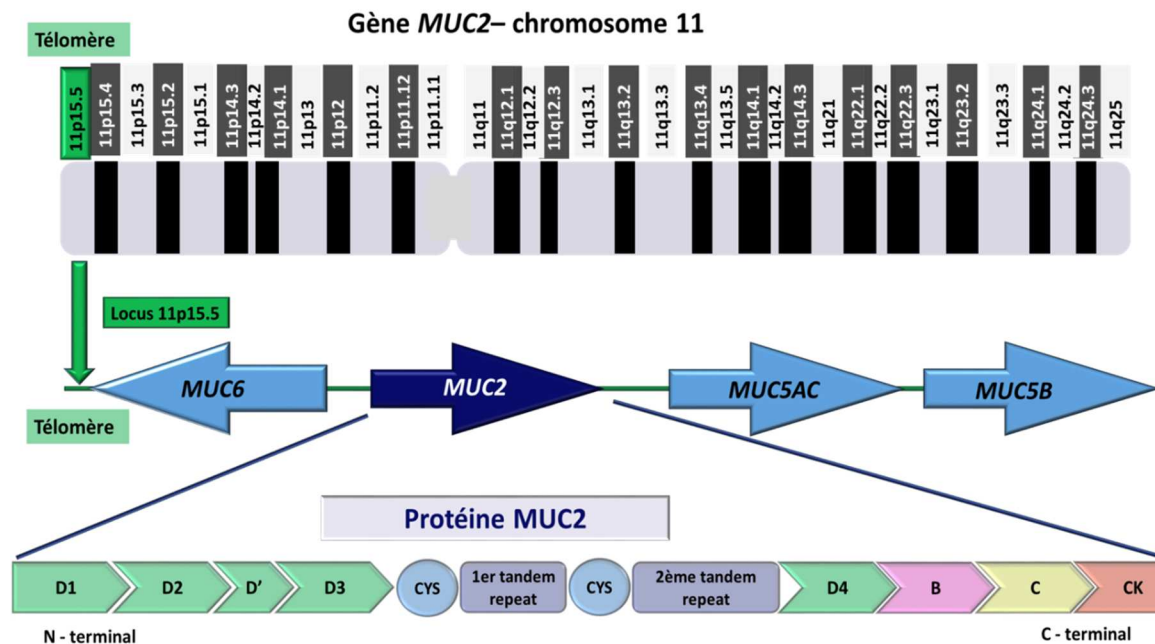


Figure 6. Localisation du gène MUC2 et organisation de la protéine MUC2.

MUC2 est localisé sur chromosome 11 (11p15.5) entre les gènes codant pour MUC5AC/B et MUC6. La structure de l'axe peptidique de MUC2 est formée d'une région N-terminale avec les 4 domaines communs aux mucines sécrétées (D1, D2, D' et D3), la région centrale avec les deux tandem repeat dont le deuxième comporte un nombre variable d'un allèle à l'autre de répétitions en tandem de 23 aminoacides riches en thréonine (51 à 115 TR), et la région C-terminale avec des domaines communs au vWF dont le dernier, CK, riche en cystéine.

La O-glycosylation de type mucin-like n'est pas réservée uniquement aux mucines. Il existe ainsi des protéines contenant un nombre réduit de domaines O-glycosylés appelées « mucines-like ». (Marcaurelle and Bertozzi, 2002). Ces glycoprotéines mucines-like, comme GlyCAM-1, CD34 et PSGL-1, peuvent porter des antigènes Lewis et d'autres antigènes de groupe sanguin, et peuvent avoir une fonction de ligand pour des sélectines L et P lors de la réponse inflammatoire ou être impliquées dans l'adhésion inter-cellulaire (McEver and Cummings, 1997).

MUC10, MUC14 et MUC18, bien que considérées initialement comme appartenant à la famille des mucines, méritent une meilleure caractérisation biochimique afin de confirmer la légitimité de cette classification. D'autant qu'un prérequis pour l'appartenance à la famille des mucines est leur sécrétion par des cellules épithéliales et non des cellules endothéliales ou de mélanome (Johnson et al., 1996; Kinoshita et al., 2001; Melnick et al., 2001).

DMBT1 (*deleted in malignant brain tumor 1*) est une autre glycoprotéine de type mucine-like, comportant de nombreux sites potentiels de O-glycosylation, traitée plus en détail dans un autre chapitre de ce manuscrit (chapitre 3.6. La mucine-like DMBT1).

3.2. Fonction des mucines

Des mucines différentes sont exprimées dans les différentes régions du tractus gastro-intestinal, en remplissant des fonctions nombreuses et spécifiques. Leur rôle principal, au niveau du côlon, est la protection des cellules épithéliales sous-jacentes. Par leur configuration oligomérique et leur charge globale négative, elles confèrent au mucus ses propriétés de viscosité et élasticité, en assurant une protection mécanique, chimique et bactériologique. La protection mécanique intervient lors de la progression du bol alimentaire, facilitée par l'hydratation et la lubrification de la muqueuse colique. Par son épaisseur, la couche de mucus tient à distance les substances toxiques de l'épithélium colique. Concernant la protection bactériologique, les mucines jouent un double rôle : elles protègent la muqueuse des bactéries pathogènes en inhibant leur adhésion et en favorisant leur élimination, notamment MUC2 (Bergstrom et al., 2010) ; et en même temps, elles permettent l'adhésion et la protection des bactéries commensales, en servant de substrat pour leur croissance (Van Klinken et al., 1995). L'adhésion des bactéries commensales est rendue possible par la présence des sites d'adhésion préférentiels au niveau des chaînes de O-glycanes des mucines. Cette adhésion est un prérequis nécessaire à la colonisation de la muqueuse et la prolifération de la flore commensale. Les bactéries pathogènes peuvent, dans certaines conditions, adhérer elles aussi au mucus, comme il a été montré pour les souris KO pour MUC2 et infectées avec des pathogènes tels que *Escherichia coli* (Bergstrom et al., 2010). Les microorganismes utilisent des adhésines qui reconnaissent les ligands

glycaniques portés par les mucines. Leur capacité d'adhésion est exploitée par le secteur agro-alimentaire à la recherche des bactéries probiotiques capables d'adhérer aux mucines avec comme conséquence, des effets bénéfiques tels que le renforcement de la barrière de mucus avec l'élimination des bactéries pathogènes et le traitement de certaines pathologies inflammatoires. Il a été montré que *Lactobacillus plantarum* augmente le niveau d'expression de MUC2 et MUC3, inhibant ainsi l'adhésion d'une souche entéropathogène de *E. Coli* (Mack et al., 1999, 2003). Dans la lutte anti-bactérienne interviennent également les mucines membranaires. Suite à l'adhérence des pathogènes à ce niveau, via des interactions lectiniques, les cellules caliciformes s'hyperplasient et secrètent du mucus qui englobe des substances anti-microbiennes. Les mucines secrétées en quantité élevée et dont la glycosylation est modifiée, sont hydratées en piégeant ensuite les pathogènes libérés probablement de la surface épithéliale suite au clivage du domaine extracellulaire des mucines membranaires. La protection que le mucus offre à la muqueuse colique est fortement conditionnée par le microbiote intestinal (Rodríguez-Piñeiro and Johansson, 2015). Le microbiote peut influencer la perméabilité du mucus pour les bactéries (Jakobsson et al., 2015).

Les mucines jouent aussi un rôle dans l'interaction avec les toxines bactériennes en empêchant notamment l'activité de dégradation par des protéases. Certaines bactéries possèdent des glycosidases capables de dégrader les chaînes oligosaccharidiques. Les groupements sulfates ainsi que les résidus d'acides sialiques acétylés confèrent une résistance envers ces glycosidases.

Les chaînes O-glycaniques des mucines influencent également la conformation de l'axe protéique en ayant un rôle dans sa structure tertiaire et quaternaire

3.3. Glycosylation des mucines

La glycosylation des mucines peut se faire de trois façons : O-, N- et C-glycosylation. La O-glycosylation est la plus représentée, pouvant atteindre jusqu'à 80% de la masse totale de la glycoprotéine. Cette O-glycosylation implique une liaison O-glycosidique entre l'axe peptidique, par l'intermédiaire de résidus d'acides aminés hydroxylés : sérine ou thréonine situés au niveau des régions tandem repeat, et les chaînes glycaniques, via les résidus de N-acétylgalactosamine (GalNAc). Ces chaînes oligosaccharidiques sont composées de N-

acétylglucosamine (GlcNAc), de galactose (Gal), GalNAc, d'acide sialique (chez l'homme essentiellement de l'acide N-acétylneuraminique ou Neu5Ac) et de résidus de sulfate (Gendler and Spicer, 1995; Moniaux et al., 2001). Elles comportent trois régions : le noyau correspondant à l'initiation de la O-glycosylation, le squelette construit par l'élongation, et la périphérie correspondant à la fin de synthèse de glycanes. Le noyau comprend le résidu de GalNAc lié à l'axe peptidique. Il est substitué par un ou deux monosaccharides, résultant en 8 structures différentes appelées « core » : core 1, core 2 et ainsi de suite jusqu'au core 8. Cinq d'entre elles (cores 1, 2, 3, 4 et 5) peuvent se trouver dans les mucines intestinales humaines.

La synthèse des différents « cores » se fait de façon séquentielle. Après transfert de la GalNAc (disponible sous la forme de UDP-N-acétylgalactosamine (UDP-GalNAc), la forme activée de la GalNAc) par les polypeptides N-acétylgalactosaminyltransférases (ppGalNAcTs), il y a soit transfert de galactose par la β 1-3 galactosyltransférase de core 1, soit de GlcNAc par la β 1-3 glucosaminyltransférase de core 3. Secondairement, la fixation de GlcNAc sur la GalNAc du point d'attache conduit au core 2 à partir du core 1, et au core 4 à partir du core 3 (Figure 7).

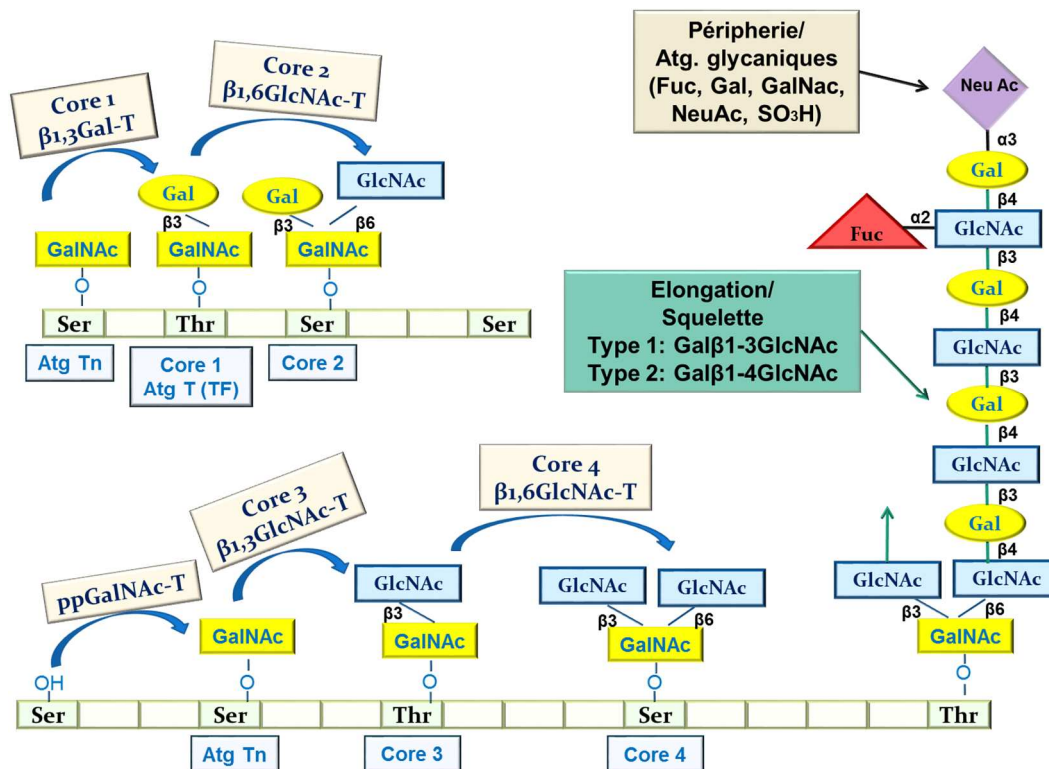


Figure 7. La synthèse des différents noyaux, ou « cores » de chaînes O-glycanniques de mucines.

La synthèse des cores sur la chaîne peptidique représente l'étape d'initiation. La molécule de GalNAc reliée à la chaîne peptidique, grâce à l'action d'une ppGalNAcT, représente l'antigène Tn, le O-glycane le plus simple. Il existe 20 gènes de ppGalNAcTs chez l'homme (Bennett et al., 2012).

Ces enzymes comportent une séquence répétitive de type lectine-like au niveau du domaine C-terminal, QXW, constituée de trois tandem repeat (alpha, beta et gamma). Ce domaine est impliqué dans l'activité enzymatique, sa délétion entraînant la perte complète de l'activité enzymatique. Il a un double rôle, sensitif entraînant la O-glycosylation de l'apomucine qui comporte de multiples sites de glycosylation et résistant vers les peptides comportant un seul site de glycosylation (Tenno et al., 2002).

Le core 1, constitué après l'addition d'un résidu de galactose sur le carbone 3 du résidu de GalNAc, représente l'antigène T ou Thomsen Friedereinch (Carlson, 1968). L'enzyme impliquée est appelée « core 1 β 1,3 galactosyltransférase » (Core 1 β 3Gal-T1 ou T-synthétase). Elle est protégée de l'adressage au protéasome par une chaperonne appelée Cosmc (Core 1 β 3Gal-T specific molecular chaperon), une protéine transmembranaire de type II. La Core 1 β 3Gal-T1 est diffusément exprimée avec une prépondérance au niveau des reins, du cœur, du placenta et du foie (Ju et al., 2002). Le glycane Gal β 1-3GalNAc- est le glycane O-GalNAc le plus fréquent, rencontré dans de nombreuses glycoprotéines et mucines. Les deux antigènes T et Tn peuvent être modifiés par l'addition d'un acide sialique donnant naissance aux antigènes T et Tn sialylés. L'absence de Core 1 peut être liée soit à un défaut de la T-synthétase, soit à l'absence d'une chaperonne Cosmc fonctionnelle, comme il a été retrouvé dans le syndrome Tn, une maladie autoimmune rare caractérisée par une glycosylation incomplète des glycoprotéines membranaires au niveau des cellules sanguines (Ju and Cummings, 2005). Le résultat est une expression élevée d'antigènes Tn et Tn sialylés (Varki, 2009). Le core 2 est constitué à partir du core 1 par l'action des enzymes β 1,6-N-acétylgucosaminyltransférases (C2 β 6GlcNAc-T). Le core 2 est donc un core 1 ramifié, retrouvé dans des glycoprotéines et mucines de différentes cellules et tissus, y compris au niveau de la muqueuse intestinale. Par sa nature ramifiée, il bloque l'exposition des épitopes peptidiques de la mucine. Le core 3 est synthétisé d'une manière similaire au core 1, par un transfert d'un résidu de GlcNAc sur le carbone 3 du résidu de GalNAc, sous l'action

de l'enzyme β 1,3-*N*-acétylglucosaminyltransférase (β 3Gn-T6 ou C3GnT). Son expression est restreinte en majeure partie aux épithéliums du tractus gastro-intestinal (estomac, côlon et intestin grêle) et respiratoire et aux glandes salivaires (Iwai et al., 2002; Lamblin et al., 2001), (Klein et al., 1992). Elle semble très efficace dans les cellules caliciformes intestinales qui sécrètent des mucines comportant surtout des O-glycanes de core 3 et peu de core 1, core 2 ou core 4. La synthèse du core 4 à partir du core 3 nécessite la même enzyme que pour la synthèse du core 2, une β 6GlcNAc-T4, appelée aussi C2/C4GnT. Les cores 3 et 4 sont retrouvés seulement au niveau des mucines sécrétées de certains tissus comme les bronches, le côlon et les glandes salivaires (Varki, 2009). Les cores 5-8 sont plus rarement rencontrés, comme par exemple le core 5 dans le méconium ainsi que la muqueuse et l'adénocarcinome intestinal, le core 6 dans les mucines de kystes ovariens mucineux, ou le core 8 dans les mucines du tractus respiratoire (Tableau 3).

Tableau 3 : Structure des différents cores glycaniques de mucines.

Cores O-Glycanes	Structure
Antigène Tn	GalNAc α Ser/Thr
Antigène Sialyl Tn	NeuAc α 2-6 GalNAc α Ser/Thr
Core 1 ou antigène T	Gal β 1-3 GalNAc α Ser/Thr
Core 2	GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc α Ser/Thr
Core 3	GlcNAc β 1-3GalNAc α Ser/Thr
Core 4	GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α Ser/Thr
Core 5	GalNAc α 1-3GalNAc α Ser/Thr
Core 6	GlcNAc β 1-6GalNAc α Ser/Thr
Core 7	GalNAc α 1-6GalNAc α Ser/Thr
Core 8	Gal α 1-3GalNAc α Ser/Thr

Les cores sont ensuite soit allongés, soit sialylés. Le principal acide sialique retrouvé chez l'homme est l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac). D'autres acides sialiques ont également été décrits, dont certains sont tissu-spécifiques, comme le Neu5,8Ac₂ (acide 5-*N*-acétyl-8-*O*-acétylneuraminique), retrouvé majoritairement dans le sigmoïde. Au niveau des chaînes glycaniques de mucines, les acides sialiques sont liés soit en position α 2-6 sur la GalNAc du point d'attache des cores 1, 3 et 5, soit en position α 2-3 sur un résidu de Gal terminal.

L'élongation des chaînes glycaniques se fait à partir des différents cores par l'addition séquentielle de résidus de Gal et de GlcNAc, formant des structures de type 1 (Gal β 1-

3GlcNAc) ou de type 2 (Gal β 1-4GlcNAc appelée N-acétyllactosamine (LacNAc)). Ces structures peuvent être répétées au sein d'une chaîne glycanique formant un squelette poly N-acétyllactosaminique. Ce squelette peut être linéaire, donnant l'antigène linéaire i, ou ramifié avec des liaisons supplémentaires en position C6 du Galactose, donnant l'antigène I ramifié (Hounsell et al., 1996). Il permet l'attachement de nouveaux sucres ou groupes fonctionnels.

La périphérie des oligosaccharides des mucines est représentée par les monosaccharides qui s'ajoutent sur le squelette, en position terminale ou interne, suite à l'action de différentes glycosyltransférases (GTs). Il s'agit de résidus de fucose (Fuc), liés en α 1,2- sur un Gal terminal et/ou en α 1,3- ou en α 1,4- sur une GlcNAc interne, de Gal lié en α 1,3- sur un résidu de Gal terminal, de GalNAc lié en β 1,4- ou en α 1,3- sur un résidu de Gal ou d'acide sialique lié en α 2,3 sur un résidu de Gal terminal. Les chaînes glycaniques peuvent également être sulfatées en périphérie, en position 3 sur un résidu de Gal terminal, ou en position 6 sur un résidu de GlcNAc interne (Lo-Guidice et al., 1994; Robbe et al., 2004).

Lorsqu'un résidu d'acide sialique ou de sulfate est en position terminale, l'élongation de l'oligosaccharide est arrêtée. Les différents domaines périphériques sont porteurs des activités antigéniques, comme par exemple les antigènes de groupes sanguins ABO, Lewis (Figure 8). Ils peuvent également constituer des sites de reconnaissance pour les lectines. Les sélectines sont un groupe de lectines qui reconnaissent des structures glycaniques sialylées, présentes au niveau des cellules endothéliales (les sélectines E), au niveau des plaquettes (sélectines P) et des leucocytes (sélectines L). Les ligands pour ces sélectines sont représentés par les oligosaccharides comportant des chaînes lactosaminiques sulfatées, sialylées ou fucosylées, comme par exemple les antigènes Lewis : Le^y, sialyl- et sulfo-Le^x ou sialyl-Le^a (Delannoy Philippe and Robbe-Masselot; McEver, 1994), (Mannori et al., 1995). Elles favorisent la liaison des cellules tumorales aux cellules endothéliales, aux plaquettes et neutrophiles.

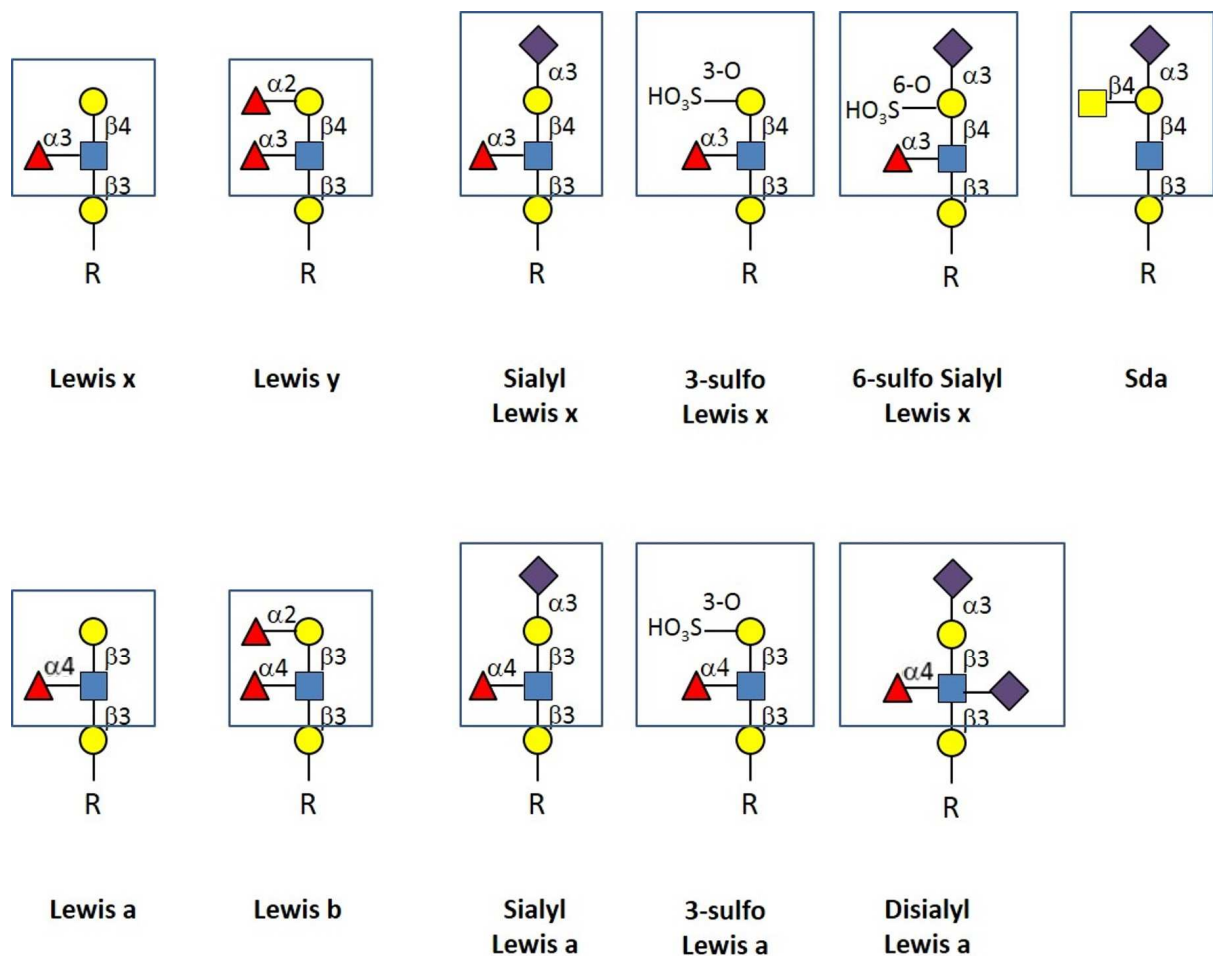


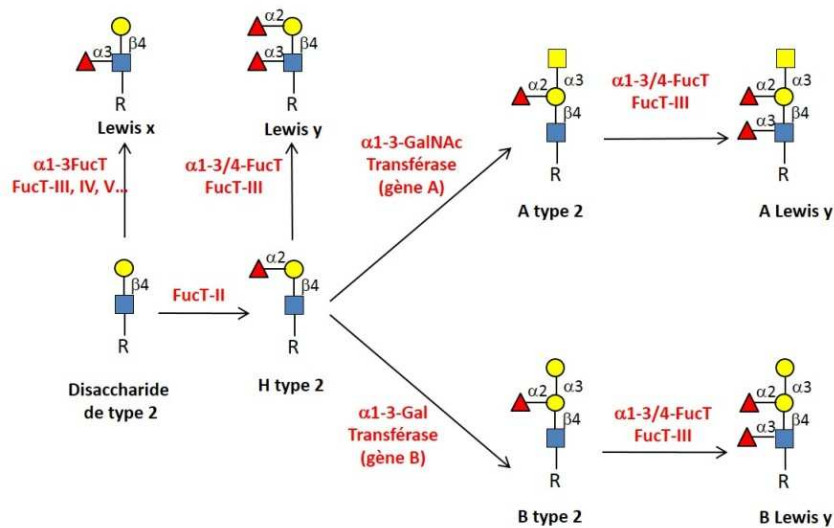
Figure 8. Exemples de déterminants glycaniques périphériques de type Lewis et Sda, présents sur des disaccharides terminaux de type 1 ou de type 2.

Les symboles représentant les différents monosaccharides sont : ● : Gal ; ■ : GalNAc ; ■ : GlcNAc ; ▲ : Fuc ; ◆ : NeuAc ; HO₃S : sulfate.

Les monosaccharides sont transférés par des GTs à partir de leur forme activée, un glycosyl-nucléotide synthétisé dans le compartiment cytoplasmique à partir de précurseurs d'origine endogène. Les GTs sont spécifiques du monosaccharide à transférer, du substrat accepteur et du type de liaison formée. Les Gal, GalNAc et GlcNAc sont activés par l'UDP (Uridine diphosphate), le Fuc par le GDP (Guanidine diphosphate) et le Neu5Ac par le CMP (Cytidine monophosphate).

Concernant les antigènes de groupes sanguins du système ABO, quel que soit le groupe, il existe toujours des résidus de fucose terminaux liés en α 1-2 sur un Gal au niveau des chaînes de type 1 ou 2. On parle ainsi de groupe O (ou H en anglais). Lorsque ce même résidu de Gal est substitué par un autre résidu de Gal lié en α 1,3, ceci forme le groupe B et

par une GalNAc liée en $\alpha 1,3$ le groupe A. Le transfert du résidu de Fuc est réalisé à l'aide d'une fucosyltransférase spécifique codée par le gène *FUT2* (Kelly et al., 1995). Cette enzyme n'est pas exprimée chez certains individus (environ 20% de la population), qui sont qualifiés de « non sécréteurs ». Il existe d'autres fucosyltransférases dont les FucT-I et FucT-III qui ont une action sur les mucines. FucT-I transfère le Fuc sur des résidus de Gal au niveau des chaînes de type 2 pour former le groupe H tandis que FucT-III transfère du Fuc en $\alpha 1-3$ ou 4 sur une GlcNAc au niveau des chaînes de type 1 et 2 pour former les antigènes de type Lewis. Il existe deux groupes d'antigènes Lewis, le couple Lewis^a / Lewis^b constitué d'un enchaînement de Gal $\beta 1-3$ GlcNAc avec un Fuc en $\alpha 1-4$ sur la GlcNAc pour l'antigène Le^a, et un Fuc supplémentaire en $\alpha 1-2$ sur le Gal pour l'antigène Le^b, et le couple Lewis^x / Lewis^y



constitué d'un enchaînement de Gal $\beta 1-4$ GlcNAc, avec un Fuc en $\alpha 1-3$ sur le GlcNAc pour l'Ag Le^x, et un Fuc supplémentaire en $\alpha 1-2$ sur le Gal pour l'Ag Le^y. Les voies de biosynthèse des antigènes Le^x et Le^y sont à titre d'exemple décrites dans la figure 9.

Figure 9. Déterminants glycaniques présents en périphérie des mucines résultant de la fucosylation par l'enzyme FucT-III et de la substitution d'un disaccharide de type 2 par les enzymes de groupes tissulaires A et B.

Les enzymes impliquées sont indiquées en rouge.

Les antigènes Lewis peuvent subir des sialylations avec l'apparitions des antigènes sialyl Lewis^a (CA19-9, Figure 10) et sialyl Lewis^b (NCC-ST-439), utilisés comme marqueurs tumoraux (Nakagoe et al., 2002), ou l'antigène disialyl-Lewis^x retrouvé dans le cancer colorectal (Robbe-Masselot *et al.*, 2009). Ils peuvent être également sulfatés par les sulfotransférases avec l'apparition de l'antigène sulfo-Lewis^x retrouvé en abondance dans

les mucines coliques normales. D'autres antigènes ont été identifiés dans les mucines coliques comme l'antigène Sda/Cad (Capon et al., 2001; Morton et al., 1988), synthétisé suite à l'action séquentielle de la β 1,4-galactosyltransférase I (β 4GalT-I), d'une α 2,3-sialyltransférase et la β -1,4-N-acétylgalactosaminyltransférase-II (β 4GalNAcT-II) (Figure10).

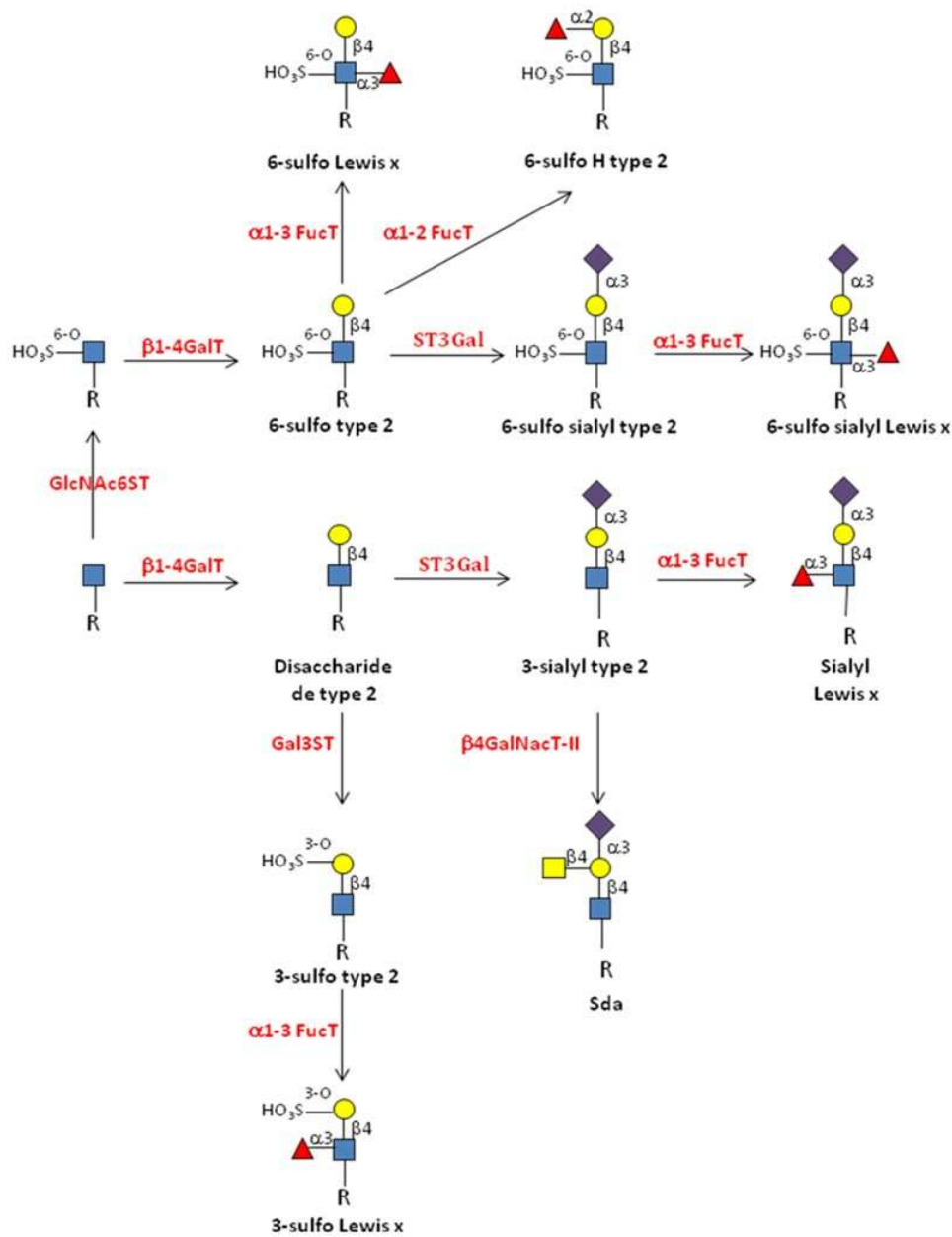


Figure 10. Voies de biosynthèse de dérivés sulfatés, sialylés et/ou fucosylés de l'épitope Lewis x, et de l'épitope Sda.

Les activités enzymatiques indiquées sont indiquées en rouge : α 1-3 FucT : activité α 1-3-fucosyltransférase, peut correspondre à FucT III, FucT IV, FucT V, FucT VI, FucT VII ; α 1-2 FucT : activité α 1-2-fucosyltransférase, correspond à l'activité de FucT II ; ST3Gal : activité α 2-3-sialyltransférase, peut correspondre à ST3Gal III, ST3Gal IV, ST3Gal VI ; β 1-4 GalT : activité β 1,4-galactosyltransférase ; β 4 GalNAcT-II : activité Sda synthétase ; Gal3ST : activité Gal-3-O-

sulfotransférase : peut correspondre à Gal3ST2, Gal3ST3 ou Gal3ST4 ; **GlcNAc6ST** : activité GlcNAc-6-O-sulfotransférase : peut correspondre à GlcNAc6ST1, GlcNAc6ST2, GlcNAc6ST3, GlcNAc6ST4, GlcNAc6ST5.

3.4. Glycosyltransférases

Au cours de la migration des cellules caliciformes vers la surface des cryptes, les mucines sont progressivement sialylées, et donc acidifiées, la charge des mucines contribuant à leur rôle de protection de la muqueuse intestinale. La sialylation serait également requise pour la sécrétion des mucines ainsi que l'adressage correct des glycoprotéines membranaires, notamment de MUC1 (Gouyer et al., 2001).

La biosynthèse des structures glucidiques nécessite donc un équipement enzymatique considérable avec un grand nombre de GTs et de glycosidases, mais aussi d'autres enzymes modifiant les chaînes glycaniques comme les sulfotransférases et les acétylases. De 1 à 2 % des gènes humains sont dévolus aux différentes étapes de la glycosylation mais la structure des glycanes n'est pas encodée directement dans le génome, contrairement aux séquences peptidiques. Les chaînes glycaniques peuvent comporter de multiples combinaisons de structures, suite à l'action séquentielle et parfois compétitive de nombreuses glycosyltransférases et glycosidases (Varki, 2009). La famille des polypeptide-GalNAc-transférases (ppGalNAc-Ts) comprend 20 membres, dont 16 ont été caractérisés du point de vue enzymatique et dont les ADNc ont été clonés (Benard et al., 2015; Tian and Ten Hagen, 2009). On estime à plusieurs centaines le nombre de GTs nécessaires à l'élaboration de l'ensemble des structures glucidiques d'un organisme. Ces enzymes sont pour la plupart localisées dans le réticulum endoplasmique et surtout dans l'appareil de Golgi.

Les GlcNAc-transférases agissent dans les compartiments cis-Golgi et médian-Golgi, les Fuc-, Gal- et GalNAc-transférases sont localisées dans les citernes du médian-Golgi et trans-Golgi, et les sialyltransférases sont actives au niveau du trans-Golgi et du réseau trans-golgien. Chacune de ces GTs possède une affinité particulière pour une structure acceptrice donnée et une spécificité pour le type de liaison glycosidique formée. L'expression de ces GTs au niveau de l'appareil de Golgi est par ailleurs dépendante d'un type cellulaire et/ou de la situation physiologique, contribuant ainsi à la diversité des structures glycaniques observées dans différentes conditions physiopathologiques (comme le développement, la différenciation, les changements métaboliques, les cancers, l'inflammation ou les

infections...), mais aussi à la diversité observée d'un organisme à un autre. Il existe ainsi une microhétérogénéité liée aux variations des chaînes glycaniques au niveau d'un point d'attache donné d'une protéine donnée (codée par un seul gène), avec l'apparition des glycoformes. Des modifications mineures dans le milieu environnemental peuvent conduire à des changements importants dans la structure des glycanes produits par une cellule donnée (Varki, 2009).

A l'heure actuelle, les mécanismes de régulation qui permettent à cette machinerie enzymatique de s'adapter aux besoins physiologiques de l'organisme sont mal connus, tout comme les causes de ses dérives pathologiques.

Les sialyltransférases forment une super famille de GTs appartenant à la classe 29 de la classification CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes), regroupant l'ensemble des sialyltransférases eucaryotes identifiées à ce jour (Coutinho et al., 2003; <http://www.cazy.org/fam/GT29.html>, 2015). Ce sont les enzymes catalysant le transfert d'acides sialiques sous leur forme activée (CMP- β -Sia) sur les glycoconjugués, selon le schéma général suivant : CMP- β -Sia + HO-accepteur \rightarrow CMP + Sia- α -O-accepteur. Elles sont localisées dans le *trans*-Golgi et le réseau trans-Golgien.

Les sialyltransférases sont au nombre de vingt chez les mammifères. Elles sont classées en quatre familles : ST3Gal, ST8Sia, ST6GalNAc et des ST6Gal. Elles se distinguent en fonction du substrat accepteur préférentiel et du type de liaison formée avec le monosaccharide accepteur (Tsuji, 1996) (Tableau 4). Ainsi les enzymes de la famille des ST3Gal transfèrent un acide sialique en α 2,3 sur un résidu de galactose, les ST8Sia en α 2,8 sur un autre résidu d'acide sialique, les ST6GalNAc en α 2,6 sur un résidu de *N*-acétylgalactosamine et les ST6Gal en α 2,6 sur un résidu de galactose. La spécificité d'action d'une sialyltransférase ne se limite pas au seul monosaccharide accepteur : le disaccharide et même la partie aglycone du substrat accepteur conditionnent son affinité et sa spécificité (Tableau 4). Il n'existe donc qu'une redondance partielle au sein d'une même famille de sialyltransférases.

Tableau 4 : Les Sialyltransférases humaines clonées et leur spécificité de substrat.

(Harduin-Lepers, 2010; Tsuji, 1996). GP : glycoprotéine ; GL : glycolipide ; O-GP : O-glycosylprotéine. Les sialyltransférases potentiellement impliquées dans la biosynthèse des motifs glycaniques périphériques des mucines sont soulignées.

Gène N° accès Genbank	Enzyme	Acc.	Structures formées	Chromosome	Référence
Famille des ST6Gal					
<i>ST6GAL1</i> X17247	<u>ST6Gal I</u>	GP GL	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAc-R	3(q27-q28)	(Grundmann et al., 1990)
<i>ST6GAL2</i> AB059555	<u>ST6Gal II</u>	GP	Neu5Acα2-6Gal(NAc)β1-4GlcNAc-R	2q11.2-q12.1	(Krzewinski-Recchi et al., 2003)
Famille des ST6GalNAc					
<i>ST6GALNAC1</i> Y11339	<u>ST6GalNAc I</u>	O-GP	Neu5Acα2-3Galβ1-3(Neu5Acα2-6)-GalNAc-Ser	17q25.1	(Ikehara et al., 1999a)
<i>ST6GALNAC2</i> AJ251053	<u>ST6GalNAc II</u>	O-GP	(Neu5Acα2-3) ₀₋₁ Galβ1-3[Neu5Acα2-6]GalNAc-Ser	17q25.1	Samyn-Petit <i>et al.</i> , 2000
<i>ST6GALNAC3</i> AJ507291	ST6GalNAc III	O-GP GL	Neu5Acα2-3Galβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAc-Ser et G _{D1α}	1p31.1	Tsuchida <i>et al.</i> , 2005
<i>ST6GALNAC4</i> AJ271734	<u>ST6GalNAc IV</u>	O-GP GL	Neu5Acα2-3Galβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAc-Ser et G _{D1α}	9q34	Harduin-Lepers <i>et al.</i> , 2000
<i>ST6GALNAC5</i> AJ507292	ST6GalNAc V	GP GL	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Neu5Acα2-6)GalNAc-Ser et G _{D1α}	1p31.1	(Ikehara et al., 1999b)
<i>ST6GALNAC6</i> AJ507293	ST6GalNAc VI	GL	gangliosides série α (G _{D1α} , G _{T1αα} , G _{Q1bα}) et di-sialyl Lewis ^x	9q34.11	(Tsuchida et al., 2003)
Famille des ST3Gal					
<i>ST3GAL1</i> L29555	<u>ST3Gal I</u>	O-GP GL	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAc- G _{D1a} G _{M1b} G _{T1b}	8	(Kitagawa and Paulson, 1993)
<i>ST3GAL2</i> X96667	<u>ST3Gal II</u>	O-GP GL	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAc- G _{D1a} G _{M1b} G _{T1b}	16q22.1	(Kim et al., 1996)
<i>ST3GAL3</i> L23768	<u>ST3Gal III</u>	GP	Neu5Acα2-3Galβ1-3/4GlcNAc-	1(p34-p33)	Sasaki <i>et al.</i> , 1993
<i>ST3GAL4</i> L23768	<u>ST3Gal IV</u>	GP GL	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAc- Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAc-	11(q23-q24)	(Kitagawa and Paulson, 1994)
<i>ST3GAL5</i> AB018356	ST3Gal V	GL	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-Cer G _{M3} (et G _{M4} ?) synthétase	2p11.2	Ishii <i>et al.</i> , 1998

<i>ST3GAL6</i> AF119391	<u>ST3Gal VI</u>	GP GL	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-	3q12.1	Okajima <i>et al.</i> , 1999
Famille des ST8Sia					
<i>ST8SIA1</i> D26360	ST8Sia I	GL	(Neu5Acα2-8) ₁₋₂ Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc-Cer	12p12.1- p11.2	Nara <i>et al.</i> , 1994 Sasaki <i>et al.</i> , 1994
<i>ST8SIA2</i> U33551	ST8Sia II	GP	G _{D3} and G _{T3} (Neu5Acα2-8) _n Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-	15q26	(Scheidegger <i>et al.</i> , 1995)
<i>ST8SIA3</i> AF004668	ST8Sia III	GL/GP	Neu5Acα2-8 Neu5Ac α 2-3Gal β 1- Neu5Acα2-8 Neu5Ac α 2-6GalNAc-	18q21.31	(Lee <i>et al.</i> , 1998)
<i>ST8SIA4</i> L41680	ST8Sia IV	GP	(Neu5Acα2-8) _n - Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-	5q21	(Nakayama <i>et al.</i> , 1995)
<i>ST8SIA5</i> U91641	ST8Sia V	GL	G _{D1c} , G _{T1a} , G _{Q1b} , G _{T3}	18q21.1	(Kim <i>et al.</i> , 1997)
<i>ST8SIA6</i> AJ621583	<u>ST8Sia VI</u>	O-GP	Neu5Acα2-8 Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc-	10p12.33	(Teinturier-Lelièvre <i>et al.</i> , 2005)

Je me suis particulièrement intéressée au cours de mes recherches aux sialyltransférases potentiellement impliquées dans la sialylation des chaînes glycaniques de mucines. Ces enzymes appartiennent essentiellement à la famille des ST3Gal : ST3Gal I, ST3Gal II, ST3Gal III, ST3Gal IV et ST3Gal VI. Elles catalysent le transfert d'un acide sialique en α 2,3 sur un résidu de galactose terminal de glycoprotéines ou de glycolipides.

ST3Gal I et II transfèrent un acide sialique sur le motif de type 3 : Gal β 1-3GalNAc porté par des O-glycosylprotéines ou des glycolipides (Kim *et al.*, 1996). ST3Gal III agit préférentiellement sur le disaccharide terminal de type 1, Gal β 1-3GlcNAc, mais transfère également avec une moindre efficacité sur les motifs de type 2 : Gal β 1-4GlcNAc, présents sur des glycoprotéines ou des glycolipides (Sasaki *et al.*, 1993) ; (Kitagawa and Paulson, 1993). Les sialyltransférases appartenant aux sous familles ST3Gal IV et VI ont une préférence pour des substrats accepteurs de type 2, Gal β 1-4GlcNAc, portés par des glycoprotéines (Kitagawa and Paulson, 1994; Okajima *et al.*, 1999). ST3Gal IV agit également sur le motif de type 3, Gal β 1-3GalNAc porté par des O-glycannes appelé antigène T, pour former l'antigène sialyl-T et ST3Gal VI intervient au niveau des glycolipides pour former le Sialyl-3paragloboside (NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-4Gal β 1-4Glc1-1'Cer).

3.5. Sulfotransférases

Les SulfoTs sont des enzymes présentant une topologie de type 2, localisées essentiellement dans l'appareil de Golgi, avec pour certaines SulfoTs comme GlcNAc6ST3 une localisation plus étendue, notamment dans le RE. Les SulfoTs transfèrent un groupement sulfate à partir du donneur activé, le PAPS (3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate) sur des divers accepteurs. Les réactions de sulfatation des mucines sont catalysées par des sulfotransférases appartenant à deux familles distinctes : les Gal-3-O-sulfotransférases et les GlcNAc-6-O-sulfotransférases (Tableau 5).

Tableau 5 : Les sulfotransférases impliquées dans la sulfatation des chaînes O-glycanniques de mucines.

Ne sont pas décrits dans ce tableau les gènes de sulfotransférases spécifiques des glycolipides (comme la Gal-3-O-sulfotransférase codée par *GAL3ST1*, qui sulfate uniquement le galactosylcéramide), et les gènes de sulfotransférases spécifiques des protéoglycannes (par exemple *CHST1*, *CHST3*, *CHST7*)

Gène N° accès Genbank	Enzyme	Type d'accepteur préférentiel	Chromosome	Référence
<i>Gal-3-O-sulfotransférases</i>				
<i>GAL3ST2</i> AB040610	Gal3ST-2	GP/GL, DS type 1 et 2, Sulfo type 1, Core 1, Globoside	2q37.3	(Honke et al., 2001)
<i>GAL3ST3</i> NM033036	Gal3ST-3	O-GP/N-GP, DS type 2 (biosynthèse 3-sulfo Le ^x)	11q13.1	(El-Fasakhany et al., 2001)
<i>GAL3ST4</i> NM024637	Gal3ST-4	GP/GL, DS type 1 et 2, Noyaux de type 1 et 2, Globoside	7q22.1	(Suzuki et al., 2001)
<i>GlcNAc-6-O-sulfotransférases</i>				
<i>CHST2</i> NM 004267	GlcNAc6ST-1	DS type 2 → 6-sulfo sLe ^x	3q24	(Uchimura et al., 1998)
<i>CHST4</i> NM 005769	GlcNAc6ST-2 HEC- GlcNAc6ST	DS type 2 → 6-sulfo sLe ^x	16q22.2	(Bistrup et al., 1999)
<i>CHST5</i> AF176838	GlcNAc6ST-3 I-GlcNAc6ST	GlcNAc-R	16q22.3	(Lee et al., 1999)
<i>CHST6</i> NM021615	GlcNAc6ST-5	GlcNAc-Man-R ? Chondroïtine sulfate ?	16q22	(Uchimura et al., 2000)

Je me suis particulièrement intéressée au cours de mes recherches aux sulfotransférases appartenant à la famille des Gal-3-O-sulfotransférases : Gal3ST2, Gal3ST3 et Gal3ST4, pouvant agir au niveau des chaînes glycaniques de mucines coliques.

3.6. La mucine-like DMBT1

3.6.1 Généralités

DMBT1 est une glycoprotéine sécrétée appartenant à la superfamille des récepteurs de type SRCR (Scavenger Receptor Cystein-Rich) de type B. Elle est exprimée principalement dans les épithéliums du tractus respiratoire et digestif, dans le cerveau et dans le système reproducteur. Elle est codée par le gène *DMBT1* qui a été cloné pour la première fois en 1997 (Mollenhauer et al., 1997). Elle a été initialement proposée comme gène suppresseur de tumeur du fait de la fréquence élevée de sa délétion homozygote et l'absence d'expression dans les carcinomes gastriques et pulmonaires (Mollenhauer et al., 2001a; Wu et al., 1999). Cependant, le rôle exact joué par DMBT1 dans le développement et la progression tumorale n'est pas encore élucidé, d'autant que l'expression de DMBT1 augmente dans les cancers des glandes salivaires et du du sein (Bikker et al., 2004; Blackburn et al., 2007). Des isoformes et protéines homologues à DMBT1 ont été décrites chez l'homme (gp-340 et « salivary agglutinin », (Holmskov et al., 1999), chez la souris (CRP-ductine et mucline) (Cheng et al., 1996; De Lisle et al., 1998), le lapin (hensine) (Takito et al., 1999) et le rat (ebnerine) (Li and Snyder, 1995). Les études fonctionnelles portant sur ces protéines homologues démontrent qu'elles participent à de nombreux processus biologiques fondamentaux, notamment la protection des muqueuses, l'immunité innée et la différenciation épithéliale.

3.6.2 Structure de DMBT1

Comme le montre la Figure 11, la protéine prototype est composée de 14 domaines SRCR, chacun d'eux étant séparé par un peptide de 20 acides aminés appelé SIDs (SRCR-Interspersed Domains) qui porte une forte densité de sites potentiels de O-glycosylation. Le domaine SRCR est un fragment protéique d'environ 100 – 110 aminoacides, bien conservé, qui définit une superfamille (SRCR-SF) des récepteurs solubles ou membranaires exprimés

par des cellules hématopoïétiques ou autres, au cours de l'embryogénèse ou à l'âge adulte (Sarrias et al., 2004). La protéine DMBT1 possède aussi deux domaines CUB (C1r/C1s, uEGF, et Bmp1) et un domaine ZP (Zona Pellucida) qui présentent, quant à eux, 14 sites potentiels de N-glycosylation. La partie glycosylée compte environ pour 30% de sa masse totale (Robbe et al., 2005). La présence de ces différents motifs suggère que DMBT1 est impliquée dans des processus cellulaires fondamentaux car ils ont tous été très conservés durant l'évolution.

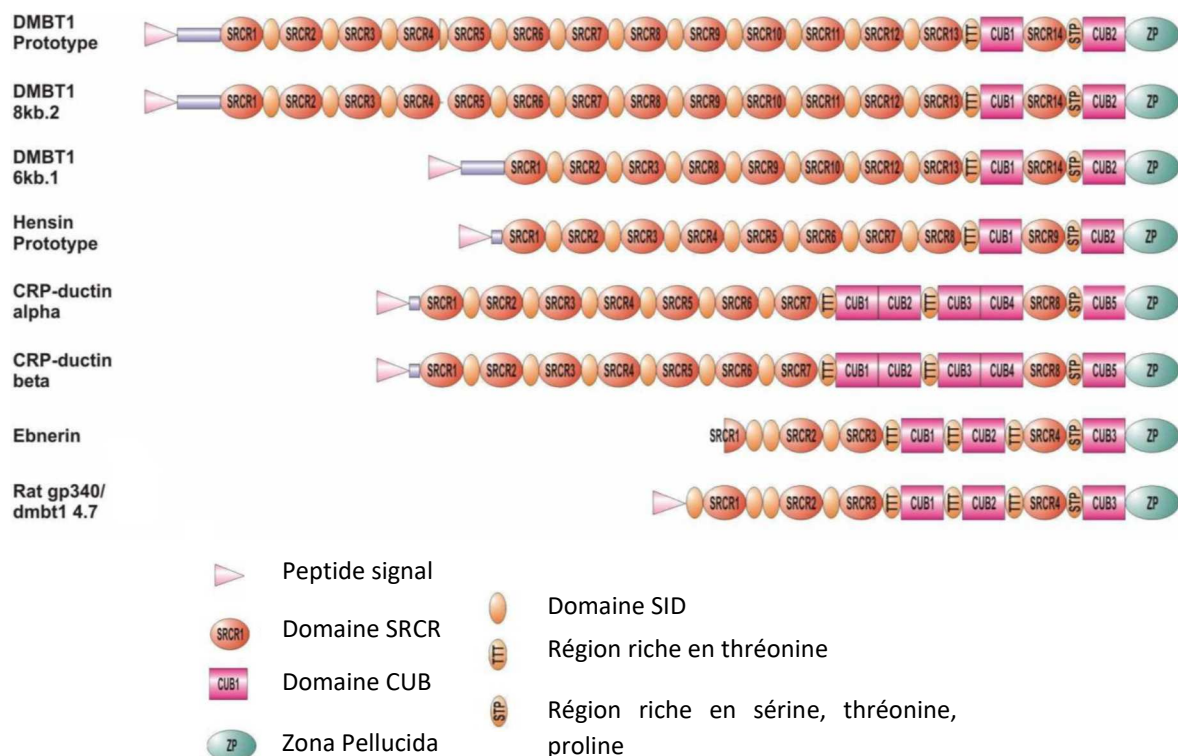


Figure 11. Schématisation de la protéine DMBT1.
 ((Ligtenberg et al., 2010)

Les domaines SRCR, CUB et ZP sont tous impliqués dans la médiation d'interactions protéines-protéines. Le motif qui permet la liaison de différentes molécules au domaine SRCR comporte un peptide de 11 acides aminés (GRVEVLYRGSW) dont certains sont essentiels pour la liaison (Ligtenberg et al., 2010). La répétition des domaines SRCR ainsi que le pourcentage élevé de O-glycanes font que DMBT1 est considérée comme une mucine-like.

3.6.3 Fonctions associées à DMBT1

DMBT1 est une protéine multifonctionnelle qui joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie mucoale (Kang and Reid, 2003).

Rôles dans la protection des muqueuses et la régénération des épithéliums

Pour illustrer les rôles contradictoires de DMBT1 dans la protection des muqueuses et la régénération des épithéliums, deux lignées de cellules épithéliales, pulmonaires et gastriques ont été comparées pour leur réponse suite à un traitement par le PMA (Acétate Myristate de Phorbol). Cette étude *in vitro* a permis de démontrer une augmentation de l'expression de gp-340 lors de l'inflammation de l'épithélium pulmonaire et au contraire une diminution de son expression dans la muqueuse gastrique différenciée (Kang et al., 2005). Des études immunohistochimiques ont confirmé ces résultats en montrant une expression accrue de gp-340 dans les tissus pulmonaires inflammatoires (Mollenhauer et al., 2002a) et une distribution prédominante de DMBT1 dans les cellules souches et les cellules progénitrices plutôt que dans les cellules différenciées du tractus gastro-intestinal (Mollenhauer et al., 2000), Kang *et al.*, 2002). Il apparaît donc que les deux fonctions de cette protéine sont liées à sa localisation tissulaire ainsi qu'au stade de différenciation de l'épithélium. Dans le tractus gastro-intestinal, il a été démontré que DMBT1 est sécrétée à la surface de la muqueuse où elle peut interagir avec des pathogènes. Les homologues de DMBT1 ont également été identifiés comme récepteurs putatifs des peptides en trèfles (Podolsky, 2000), qui jouent un rôle majeur dans la réparation des épithéliums. L'expression des gènes DMBT1 et TFF3 est diminuée chez les souris en sénescence accélérée (Kawashima et al., 2010).

Ainsi, la forme sécrétée de DMBT1 serait capable d'intégrer les signaux environnementaux locaux. Les informations seraient alors transmises aux cellules souches/progénitrices par l'intermédiaire d'interactions que DMBT1 aurait avec ces cellules. Cela favoriserait la régénération de l'épithélium en modulant la prolifération des cellules progénitrices et leur différenciation.

Rôles dans la différenciation terminale des cellules épithéliales

Des études fonctionnelles portant sur les protéines homologues de DMBT1 (l'hensine et la CRP-ductine) ont permis de démontrer leur implication dans la différenciation des cellules

épithéliales du tractus gastro-intestinal. Il a été suggéré que l'hensine pourrait constituer une nouvelle voie de signalisation dans la différenciation épithéliale ou pourrait être un des intermédiaires d'une des voies déjà décrites (Vijayakumar et al., 2006). En effet, Hikita et al. (Hikita et al., 2000) ont démontré que la différenciation terminale des cellules épithéliales était induite lorsque l'hensine était polymérisée dans la matrice extracellulaire par l'intermédiaire d'une lectine : la galectine-3 qui reconnaît les chaînes latérales oligosaccharidiques de DMBT1 (Rossez et al., 2011). D'autre part, comme le gène codant l'hensine est souvent délétée dans les tumeurs épithéliales, elle pourrait avoir un rôle prépondérant pour maintenir l'épithélium dans un état différencié.

Rôles dans l'immunité innée

De nombreuses études soulignent l'implication de DMBT1 et de ses isoformes (gp-340 et SAG) dans la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Ces glycoprotéines fixent les bactéries, permettant leur agglutination puis leur élimination. Deux types d'interaction entre DMBT1 et les bactéries ont été décrits : peptidique et glycanique. Certaines bactéries vont reconnaître un motif peptidique présent sur les domaines SRCR : par exemple, de nombreuses bactéries ont été testées à l'aide d'un peptide synthétique de 16-mer issu d'une séquence consensus présente sur les 13 premiers domaines SRCR : *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, *Prevotella intermedia* et *Helicobacter pylori* (Leito et al., 2008), ainsi que *Streptococcus mutans* qui adhère au niveau du motif SRCRP2 de l'agglutinine salivaire (Blackburn et al., 2007).

D'autres travaux ont démontré que la fixation des pathogènes (*Helicobacter pylori*, *Streptococcus suis* et *Streptococcus mutans*) serait dépendante de la composition en structures glycaniques portées par la protéine (Eriksson et al., 2007).

Il a également été démontré que DMBT1 jouait un rôle direct dans la réponse inflammatoire au niveau intestinal lors d'infections par *Salmonella enterica* (Rosenstiel et al., 2007). Ces auteurs ont montré que l'activation de la voie NOD2/NF- κ B lors d'interaction du récepteur cellulaire TLR4 avec le LPS ou d'autres constituants de la paroi de *S. enterica* avait pour conséquence directe l'activation du gène *DMBT1*. La synthèse de DMBT1 provoquerait alors une agglutination de *S. enterica* ce qui conduirait à la fois à une diminution de la réponse

inflammatoire des tissus sous-jacents par limitation de l'interaction LPS/TLR4 et inhibition de l'invasion de ces tissus par la bactérie. DMBT1 joue un rôle dans l'inflammation également par l'activation du complément, activité dépendante du statut de sécréteur (ceux qui expriment les antigènes Lewis^b, Lewis^y et du groupe ABO) (Gunput et al., 2015)

Il a été démontré que la synthèse de DMBT1 était induite au niveau pulmonaire chez le nouveau-né consécutivement à des infections bactériennes notamment par *Pseudomonas aeruginosa* ce qui tendrait à impliquer DMBT1 dans un processus de réponse inflammatoire innée de l'hôte à une infection par *P. aeruginosa* (Müller et al., 2008). Une étude récente a montré également le rôle de DMBT1 dans la transition de l'inflammation vers régénération au niveau alvéolaire par l'induction de l'expression de VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) et par la suppression de l'IL-6 au niveau des cellules épithéliales alvéolaires de type II (Müller et al., 2015). Une étude antérieure avait mis en évidence le rôle de DMBT1 dans l'angiogenèse, en tant que protéine importante de la matrice extracellulaire capable d'interagir avec les facteurs angiogénétiques et d'initier l'adhésion, la migration, la prolifération et l'angiogenèse ainsi que la réparation vasculaire, en interagissant avec la galectine 3 et en modulant la voie de signalisation Notch (Müller et al., 2012).

Rôles dans les cancers

De nombreux travaux ont démontré des modifications d'expression et de localisation de DMBT1 dans les cancers, avec notamment une diminution d'expression de DMBT1 dans les carcinomes épidermoïdes (Imai et al., 2005) et les carcinomes ayant pour origine des épithéliums unistratifiés, associés à une relocalisation de la protéine : au lieu d'être sécrétée au pôle luminal des cellules épithéliales, elle se retrouve sécrétée au niveau basal et latéro-basal, vers la matrice extracellulaire.

Le fait que DMBT1 soit une protéine aux multiples facettes, capable de jouer des rôles aussi bien dans la protection des épithéliums que dans leur différenciation, au même titre que les mucines, permet d'expliquer les changements d'expression et de localisation de la protéine dans les tumeurs primaires. Les tissus possédant une sécrétion constitutive de DMBT1 dans la lumière des glandes vont maintenir voire augmenter le niveau d'expression de DMBT1 lors des premières étapes de la tumorigenèse alors que ceux qui n'ont pas d'expression

basale de DMBT1 vont montrer une induction de la protéine et sa sécrétion au niveau du pôle basal des cellules épithéliales. Ces affirmations sont étayées par les études démontrant la surexpression de DMBT1 dans les tumeurs pulmonaires et les tissus inflammés bordant les tumeurs (Mollenhauer et al., 2002a). Ainsi DMBT1 participerait à un rôle de protection constitutive et/ou inductible.

Cependant, du fait d'une perte de polarité et/ou de changements dans l'architecture des tissus, DMBT1 va rapidement être sécrétée vers la matrice extracellulaire. Selon la présence ou non des partenaires d'interaction appropriés, sa fonction principale va devenir la différenciation des cellules épithéliales. La différenciation crée un désavantage à la cellule tumorale puisque les cellules ne peuvent dans ce cas plus se diviser, ce qui implique qu'une inactivation de DMBT1 offrirait maintenant un avantage aux cellules tumorales. L'hypothèse avancée est donc que l'inactivation de DMBT1 prend place après sa translocation vers la matrice extracellulaire. Cependant ces hypothèses sont encore controversées dans la mesure où l'expression de DMBT1 est augmentée dans certaines tumeurs (Mollenhauer et al., 2001, Conde et al., 2007, Ligtenberg et al., 2007).

Concernant le cancer colorectal, peu d'études ont été effectuées à ce jour. Une des premières a montré une réduction des ARNm dans 16.7% des cas de cancer colorectal par rapport aux tissus sains correspondant (Mori et al., 1999). Une étude récente utilisant des SNP arrays a mis en évidence des régions du génome comportant une perte d'hétérozygotie avec des disomies et polysomie uniparentales sur différents chromosomes impliquant des gènes candidats pour la cancérogénèse colique parmi lesquels on retrouve aussi *DMBT1* (Torabi et al., 2015).

4. Altérations d'expression et de glycosylation des mucines dans le cancer colorectal

MUC2 est la mucine majoritairement sécrétée au niveau de la muqueuse colique normale. Cependant de nombreuses autres mucines sont également retrouvées dans le côlon (Tableau 6). MUC2 et MUC4 sont exprimées dans les cellules à gobelet au niveau des cryptes alors que les mucines membranaires MUC1, MUC3, MUC4 et MUC12 sont détectées dans les entérocytes (Tytgat et al., 1994). MUC13 est fortement exprimée à la surface apicale des membranes des cellules caliciformes et des cellules entérocytaires (Williams et al., 2001).

Tableau 6 : Expression et localisation de différentes mucines au niveau de la muqueuse colique normale.

Expression de différentes mucines au niveau de la muqueuse colique normale	
MUC1	Cellules caliciformes et absorptives, base des cryptes (1/3 inférieur), membrane apicale, vésicules de sécrétion, microvilli (Winterford et al. 1999, Biemer-Hüttmann et al. 1999)
MUC2	Cellules caliciformes uniquement, notamment dans le RE (Chang et al. 1994, Weiss et al. 1996, Winterford et al. 1999), d'aspect péri-nucléaire (Biemer-Hüttmann et al., 1999) Expression 21% (fort) + 65% (faible à modéré) (Blank et al., 1994), 100% (Mochizuka et al. 2007, Bu et al. 2010)
MUC3	Cellules caliciformes et absorptives (Chang et al. 1994, Weiss et al. 1996, Williams et al. 1999), dans le cytoplasme péri- et supranucléaire ; plus abondant dans l'épithélium de surface
MUC4	Cellules caliciformes et absorptives, RER (Winterford et al., 1999), notamment au niveau des 2/3 inférieurs des cryptes (Biemer-Hüttmann et al., 1999)
MUC5AC (mucine d'épithélium foveolaire gastrique)	Focal, cellules caliciformes sous la forme de gouttes de mucus intracytoplasmique (Biemer-Hüttmann et al., 1999) Expression 0% (Bartman et al. 1999, Bu et al. 2010), 40% (Mochizuka et al., 2007), 20% (Biemer-Hüttmann et al., 1999)
MUC6 (mucine de glande pylorique)	Expression 0% (Bartman et al. 1999, Mochizuka et al. 2007)
MUC12	Présente dans le côlon normal (Williams et al. 1999, Packer et al. 2004)

Des altérations d'expression de ces mucines sont observées au niveau de lésions tumorales néoplasiques et pré-néoplasiques ainsi qu'au sein d'autres lésions polypoïdes comme par exemple les polypes hyperplasiques (Tableaux 7 et 8).

Tableau 7 : Expression des différentes mucines dans les lésions polypoïdes bénignes et pré-malignes.

Expression de différentes mucines dans les lésions polypoïdes bénignes et pré-néoplasiques	
<i>Polype hyperplasique (PH)</i>	
MUC2	Expression ↗ à 100% (Mochizuka et al. 2007, Kim et al. 2005, Fujita et al. 2010, Bu et al. 2010) SSA/P = HP = TSA > CA (Higuchi et al., 2005)
MUC4	Expression ↘ dans 50% des cas, aspect normal pour le reste (Biemer-Hüttmann et al., 1999)
MUC5AC	Expression ↗100% (Mochizuka et al. 2007, Kim et al. 2005), 11% (Bartman et al., 1999), 75,4% (Fujita et al. 2010), 41,67% + 58,33% (Bu et al., 2010) HP, TSA < SSA/P (Higuchi et al., 2005) L'expression d'HGM (human gastric mucin) codée dans la protéine MUC5AC est présente sur toute la hauteur des cryptes, avec une diminution vers la partie basale (Hirono et al., 2004)
MUC6	Expression 0% (Bartman et al., 1999), (Owens et al., 2008), 17% (Bartley et al., 2010), ↗ à 26,7% (Mochizuka et al., 2007), 60% (Gibson et al., 2011), 16,9% (Fujita et al. 2010) ↗ à 68,2 avec expression notamment à la base des cryptes (Hirono et al., 2004)
<i>Polype/adénome sessile festonné (SSA/P)</i>	
MUC2	Expression 100% (Mochizuka et al., 2007), Fujita et al. 2010) SSA/P = HP = TSA > CA (Higuchi et al., 2005)
MUC5AC	↗100% (Mochizuka et al., 2007), 80,4% (Fujita et al. 2010) SSA/P > HP, TSA (Higuchi et al., 2005)
MUC6	Expression ↗75,9% (Mochizuka et al., 2007), 53% (Bartley et al., 2010), 100% (Owens et al., 2008), 91% pour SSA/P et 84% pour SSA/P avec dysplasie (notamment à droite pour ce dernier) (Gibson et al., 2011) ; 39,2% (Fujita et al. 2010)
<i>Adénome festonné traditionnel (TSA)</i>	
MUC2	Expression ↗ à 100% (Mochizuka et al. 2007, Fujita et al. 2010), 85% (Kim et al., 2005)
MUC4	Expression ↘ (Biemer-Hüttmann et al., 1999)
MUC5AC	Expression ↗ à 100% (Mochizuka et al., 2007), 85% (Kim et al., 2005), 43,1% (Fujita et al. 2010) L'expression d'HGM (human gastric mucin) codée dans la protéine MUC5AC est présente sur toute la hauteur des cryptes, avec une diminution vers la partie basale (Hirono et al., 2004)

MUC6	Expression 18% (Bartley et al., 2010); 0% (Owens, Chiosea, and Kuan 2008, Mochizuka et al. 2007); 4,2% (Fujita et al. 2010) ↗ à 71% (tout adénome festonné confondu), avec expression notamment à la base des cryptes (Hirono et al., 2004)
Adénome conventionnel (CA)	
MUC1	Expression ↗ dans 63% des cas ; sans modification pour le reste (Biemer-Hüttmann et al., 1999), Expression de 32% (Gibson et al., 2011)
MUC2	Expression 100% (Mochizuka et al., 2007)(Gibson et al., 2011) 40% VA et 48% TA (Blank et al., 1994) ; 100% VA, 36% TA et 85% TVA (Kim et al., 2005) CA < HP, ASP (polype festonné avancé) (Higuchi et al., 2005) Expression diminuée par rapport à la muqueuse normale (Drew et al., 2014) Expression de 40% + 60% pour les bas grade et 35,71% + 64,29% pour les haut grade (Bu et al., 2010)
MUC5AC	Expression 68,8% (Mochizuka et al., 2007), 60% (Biemer-Hüttmann et al., 1999), 100% (Gibson et al., 2011) CA < HP, SSA/P, MP (Higuchi et al., 2005) 32% TA, 85%TVA, 100%VA (Kim et al., 2005) VA de localisation rectale : MUC5AC plus exprimé dans les cas de dysplasie de bas grade par rapport à celle de haut grade (Buisine et al., 1996) Expression 20% + 80% pour les bas grade et 42,86% + 57,14% pour les haut grade (Bu et al., 2010)
MUC6	Expression 6,3% (Mochizuka et al., 2007), 9,5% (Hirono et al., 2004), 43% notamment à droite (Gibson et al., 2011) MUC6 < MUC5AC (Bartman et al., 1999)

PH – polype hyperplasique ; TSA – adénome festonné traditionnel ; SSA/P – polype/adénome festonné traditionnel ; CA – adénome conventionnel ; VA – adénome villositéux ; TVA – adénome tubulovillositéux ; TA – adénome tubuleux ; MP – polype mixte ; ASP – polype festonné avancé (de plus d'1 cm)

Tableau 8 : Expression de différentes mucines dans les différents types d'adénocarcinome colique

Expression de différentes mucines dans les différents types histologiques d'adénocarcinome colique	
Adénocarcinome classique	
MUC1	Expression ↗ (Lugli et al., 2007), (Packer et al., 2004), (Forgue-Lafitte et al., 2007), ↗ dans 53% de cas (Biemer-Hüttmann et al., 2000), 45% (Jang et al., 2002) Absence de modification dans le cancer rectal (Packer et al., 2004)
MUC2	Négatifs dans 41%, plus exprimé dans les cancers de la voie de pathogénèse adénome-carcinome que dans les cancers <i>de novo</i> (Blank et al., 1994) Expression ↘ (Weiss et al., 1996); 38% (Kim et al., 2005) ; 47% (Biemer-Hüttmann et al., 2000) Expression de 49,2% pour les adénocarcinomes bien à moyennement différenciés et 9,5% pour les peu différenciés (Imai et al. 2013) Expression 11,54% + 34,62% + 53,85% (Bu et al., 2010); 40% (Jang et al., 2002)

MUC3	Expression \searrow (Weiss et al., 1996) Absence de modification dans le cancer rectal (Packer et al., 2004)
MUC4	Expression \nearrow dans 34% (Biemer-Hüttmann et al., 2000) Expression \searrow (Williams et al., 1999), (Packer et al., 2004) Absence de modification dans le cancer rectal (Packer et al., 2004)
MUC5AC	Expression \nearrow (Forgue-Lafitte et al., 2007) ; 31% (Kim et al., 2005) ; 38% (Biemer-Hüttmann et al., 2000) Expression de 30,2% pour les adénocarcinomes bien à moyennement différenciés et 51,6% pour les peu différenciés (Imai et al. 2013) Expression 11,54% + 19,23% + 69,23% (Bu et al., 2010)
MUC11	Expression \searrow (Williams et al., 1999) Absence de modification dans le cancer rectal (Packer et al., 2004)
MUC12	Expression \searrow (Williams et al., 1999), (Packer et al., 2004) Absence de modification dans le cancer rectal (Packer et al., 2004)
MUC13	Expression \searrow (Williams et al., 1999), (Packer et al., 2004) Absence de modification dans le cancer rectal (Packer et al., 2004)
Adénocarcinomes mucineux	
MUC1	Expression \nearrow dans 63% des cas (Biemer-Hüttmann et al., 2000) Exprimée plus souvent dans les adénocarcinomes mucineux de bas grade (nés des adénocarcinomes bien à modérément différenciés, et papillaires) (Onodera et al., 2009)
MUC2	Expression conservée (Weiss et al., 1996), voire \nearrow à 72% (Blank et al., 1994), à 100% (Kim et al. 2005, Onodera et al. 2009). Elle augmente plus qu'au niveau des adénomes dans les lignées cellulaires (Aksoy et al., 2000) Souvent phénotype microsatellitaire instable MSI (86% MSI-H, 42% MSI-L et 32% MSS) (Biemer-Hüttmann et al., 2000) Expression de 95,1% (Imai et al. 2013), 60% + 40% (Bu et al., 2010)
MUC3	Expression conservée (Weiss et al., 1996)
MUC4	Expression \nearrow dans 47% des cas (Biemer-Hüttmann et al., 2000)
MUC5AC	\nearrow à 68% (Kim et al., 2005) Souvent phénotype microsatellitaire instable MSI (77% MSI-H, 33% MSI-L et 28% MSS) (Biemer-Hüttmann et al., 2000) Expression 46,67% + 53,33% (Bu et al., 2010) Exprimée plus souvent dans les carcinomes mucineux de haut grade, nés des carcinomes peu différenciés et à cellules en bague à chaton. (Onodera et al., 2009)
MUC6	Absence d'expression (Onodera et al., 2009)
Carcinome à cellules en bague à chaton	
MUC2	71,5% (Imai et al. 2013), 50% + 37,50% + 12,50% (Bu et al., 2010)
MUC5AC	25% + 75% (Bu et al., 2010)

MUC2, la mucine majoritairement sécrétée dans le côlon a un rôle protecteur dans la cancérogénèse colique. Une étude effectuée sur des souris déficientes en Muc2 (Muc2^{-/-}) a

montré l'apparition de cryptes aberrantes avec une altération de la maturation et de la migration cellulaire, ainsi que l'apparition fréquente d'adénomes dans l'intestin grêle évoluant vers des adénocarcinomes invasifs et des tumeurs rectales chez les souris déficientes (Velcich et al., 2002).

Comme on peut l'observer dans le tableau 7, les altérations des mucines apparaissent dès les lésions pré-néoplasiques et polypoïdes bénignes comme le polype hyperplasique. On constate ainsi une augmentation de la sécrétion de MUC2 dans les polypes hyperplasiques et les polypes festonnés et dans une moindre mesure dans les adénomes conventionnels. Selon certaines études on peut observer une diminution de l'expression de MUC2 de l'adénome vers le carcinome, ce qui est en accord avec l'observation faite sur les souris déficientes en Muc2, à savoir la perte d'expression de MUC2 favorise la progression vers le cancer colique par la séquence adénome-carcinome ou *de novo* (Mizoshita et al., 2007). Cependant de nombreuses études ont montré une expression conservée voire augmentée jusqu'à 100% des cas selon les études (Tableau 8) dans la variante d'adénocarcinome mucineux, augmentation qui est souvent corrélée à un profil d'instabilité microsatellitaire. Les modifications de MUC2 entraînent également un risque plus élevé de métastases ganglionnaires en engageant le pronostic de la maladie. En parallèle, on constate également des modifications d'expression au niveau des autres mucines aussi, avec augmentation ou apparition *de novo* des mucines normalement peu exprimées voire absentes au niveau colique comme MUC5AC (mucine de l'épithélium foveolaire gastrique) et MUC6 (mucine de la glande pylorique). On constate ainsi l'apparition/augmentation de l'expression de MUC5AC, dans les lésions polypoïdes non-tumorales et adénomateuses, ainsi que tumorales. Son expression augmente avec la taille de l'adénome et avec le pourcentage de composante villeuse. Il est plus exprimé au niveau de polypes hyperplasiques et de dysplasies de bas grade pour diminuer ensuite dans les dysplasies de haut grade (Bartman et al., 1999). Son expression reste élevée dans les adénocarcinomes mucineux, notamment de type MSI. L'expression *de novo* de MUC6 reste en général inférieure à celle de MUC5AC. Des modifications des mucines membranaires ont également été décrites, avec une diminution de l'expression des gènes MUC4, MUC12 et MUC13 et une augmentation de l'expression de MUC1 dans le cancer colique par rapport au tissu sain, mais sans différence

notable au niveau rectal (Packer et al., 2004). L'expression de MUC1 au niveau du côlon droit ou sa co-expression avec MUC2 est un facteur de risque pour les métastases ganglionnaires loco-régionales (Jang *et al.* 2002).

Des modifications pathologiques de la glycosylation ont été mises en évidence dans le cancer colorectal, avec une corrélation entre les altérations des structures glycaniques et la progression tumorale (Brockhausen, 2006; Malagolini et al., 2007). On observe ainsi une augmentation des antigènes Tn, sialyl-Tn, antigène T, sialyl-T, sialyl-Lewis^a, sialyl-Le^x, et une diminution des core 3, core 4 et des chaînes poly-N-acétylactosamines de type 2 avec une diminution des chaînes de type 1.

L'antigène Tn est souvent rencontré dans les mucines dérivées des tumeurs alors que sa présence est inhabituelle dans les mucines normales, ce qui suggère un blocage de l'extension au-delà du premier sucre dans certaines cellules tumorales (Varki, 2009). Le résidu de GalNAc lié à une Ser ou Thr peut également être modifié directement par l'addition d'acide sialique, ce qui est un signal de terminaison de la biosynthèse des chaînes O-glycanniques. Ainsi, la terminaison prématurée de cette biosynthèse aboutit à l'expression de formes incomplètes des O-glycannes, avec principalement l'apparition d'antigène Sialyl-Tn (sTn) : NeuAc α 2-6GalNAc α 1-O-Ser/Thr ou des antigènes Sialyl-T : NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr ou Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc α 1-O-Ser/Thr; ou disialyl-T : NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc α 1-O-Ser/Thr. Ces structures sont des exemples d'antigènes glucidiques associés aux tumeurs (AGAT), surexprimés dans les cancers y compris le cancer colorectal, avec pour celui-ci, une réduction d'expression des cores 3 et 4 corrélée à une augmentation des glycanes basés sur un core 1 et une densité de glycosylation plus élevée que la normale (Holst et al., 2015) (Figure 12).

La O-acétylation des résidus d'acide sialique bloque la reconnaissance du sialyl-Tn par des anticorps dirigés contre cet antigène. Ce blocage peut être enlevé par voie enzymatique par les bactéries du tractus intestinal. Dans les cancers, de nombreuses modifications des acides sialiques ont été décrites, avec en particulier une diminution de leur O-acétylation (Shen et al., 2004). Cette modification est également présente dans les cancers colorectaux (Corfield et al., 1999).

Quand un core 1 sialylé est formé, la synthèse du core 2 n'est plus possible. Le core 1 sialylé NeuAc α 2-6(Gal β 1-3)GalNAc peut être synthétisé seulement par addition d'un résidu d'acide sialique sur le core 1 mais non pas par l'addition d'un résidu de galactose sur l'antigène sialyl-Tn car l'acide sialique empêche l'activité de la core 1 β 1-3 galactosyltransférase. L'augmentation de l'antigène sialyl-Tn dans le cancer colorectal peut s'expliquer également suite à une diminution de l'expression de la β 6GlcNAc-T (l'enzyme nécessaire à la synthèse du core 2) dans le cancer colorectal, entraînant une augmentation des antigènes sialylés (Yang et al., 1994).

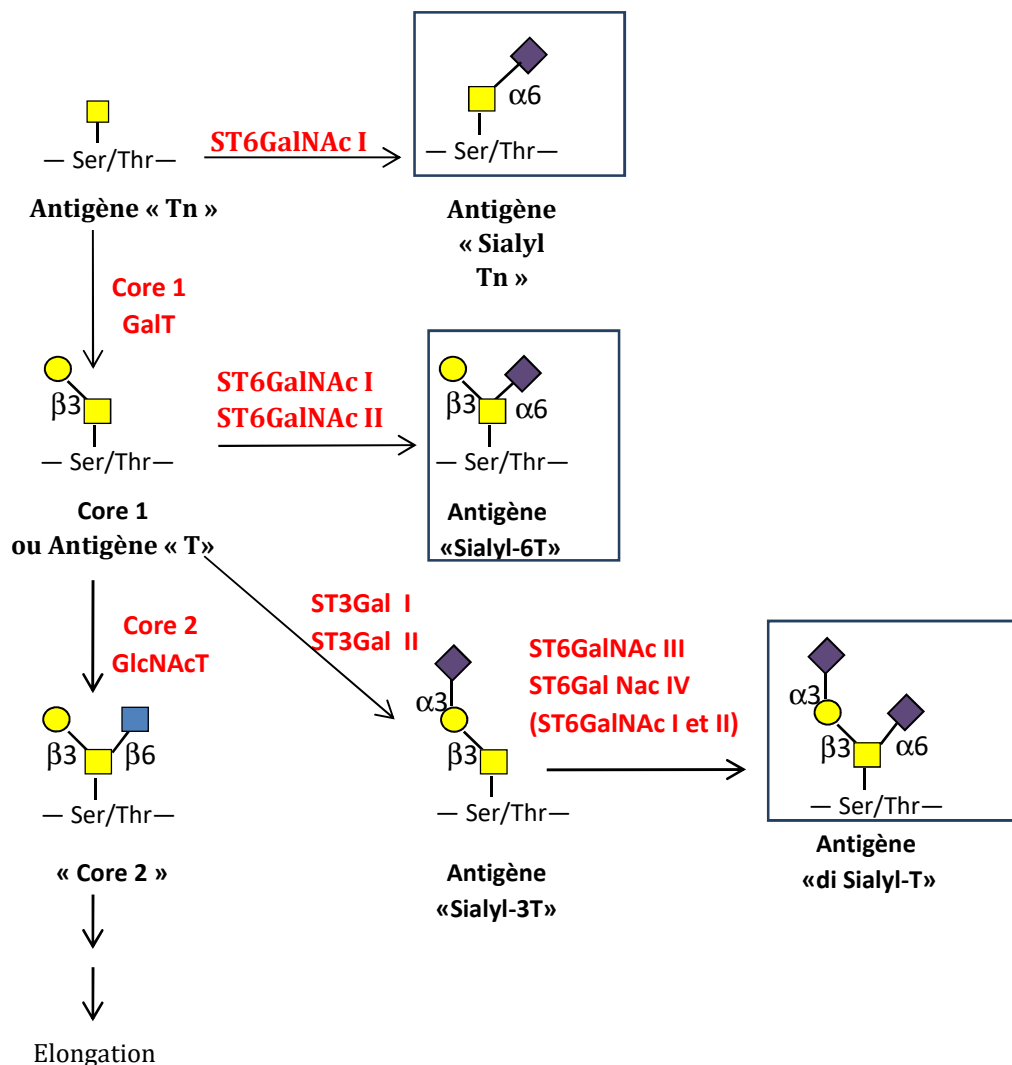


Figure 12. Voies de biosynthèse des O-glycannes sialyl Tn, sialyl T et disialyl T surexprimés dans de nombreux cancers.

Les GTs impliquées et les activités sialyltransférasiques (ST3Gal I, ST3Gal II, et ST6GalNAc I, ST6GalNAc II, ST6GalNAc III, ST6GalNAc IV) sont indiquées en rouge. Les structures encadrées ne peuvent plus être allongées conduisant à une terminaison prématurée de la synthèse avec formes incomplètes de O-glycannes principalement (Byrd and Bresalier, 2004).

Des modifications de glycosylation terminale sont donc observées dans de multiples types de cancers (Dube and Bertozzi, 2005). Concernant le cancer colorectal, les AGATs rencontrés sont des antigènes de type sLe^x, sLe^a, sialyl-Tn, TF (Thomsen-Friedenreich antigen), Le^y, Globo H GM2 (Dube and Bertozzi, 2005; Niederhafner et al., 2008). Leur détection par des lectines ou des anticorps monoclonaux peut aider à obtenir des informations à des fins diagnostiques et/ou pronostiques. Une diminution des antigènes T et Tn avec l'augmentation des formes sialylées (sialyl T, sialyl Tn, sialyl Le^x) ont été observées également au niveau des métastases du cancer colorectal, avec des altérations plus importantes au niveau des métastases par rapport à la tumeur primitive (Bresalier et al., 1996). Les structures sialylées semblent jouer un rôle dans l'adhésion des cellules tumorales qui implique des interactions avec des ligands associés aux membranes basales ainsi qu'aux cellules endothéliales.

En ce qui concerne les enzymes impliquées dans la biosynthèse des mucines, l'activité de C3Gnt (impliquée dans la synthèse de core 3) est très basse dans les tumeurs coliques et quasi absente des cellules tumorales en culture (Varki, 2009). L'expression de ST3Gal I peut être augmentée dans les cancers ayant pour conséquence une augmentation des antigènes sialyl-T.

D'autres changements sont décrits dans les cancers comme l'augmentation de la synthèse de glycannes branchés ou la réexpression d'antigènes glycosidiques oncofoetaux. En effet, une augmentation du branchement en β 1,6 de GlcNAc des N-Glycannes a été observée et associée à une augmentation d'expression et d'activité de la GlcNAc transférase V (Takahashi et al., 2009). Certaines structures, connues sous le terme d'antigènes oncofoetaux, exprimées par les cellules au cours de l'embryogenèse, réapparaissent lors du processus de transformation cancéreuse (Feizi, 1985). En particulier, l'expression aberrante de structures antigéniques de type sialyl Lewis^x : NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc ou sialyl Le^a : NeuAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc a été observée dans de nombreux cancers tels que les cancers du poumon, de l'estomac et du rein (Fukuda, 1996). Les structures sLe^x peuvent ainsi utiliser les propriétés de liaison avec les sélectines pour envahir les tissus (Varki, 2009). Dans le cancer du côlon, l'expression de l'antigène sLe^x, impliqué dans les métastases, augmente, alors que celle de l'antigène Sda (NeuAc α 2-3[GalNAc β 1-4]Gal β 1-3GlcNAc), abondant dans le côlon sain, diminue (Groux-Degroote et al., 2014; Malagolini et

al., 2007). On constate également une diminution de l'activité de l'enzyme β 4GalNAc-TII impliquée dans la synthèse de Sd^a/Cad (Malagolini et al., 1991).

Des variations de sulfatation des chaînes glycaniques ont également été décrites dans les cancers. Les O-glycanes des tumeurs sont souvent moins sulfatés et plus sialylés par rapport aux mucines normales (Brockhausen, 1999). Une diminution de la GlcNAc-6-sulfatation est associée à la transformation maligne des cellules coliques, et une diminution de l'épitope 6-sulfo sLe^x concomitante à une augmentation de l'expression de l'épitope sLe^x a été observée. Une diminution de l'expression de la GlcNAc6ST3, sulfotransférase majeure dans le côlon, a été observée pendant le processus de transformation maligne des cellules coliques et pourrait expliquer ces observations (Uchimura et al., 1998). Les cellules épithéliales coliques normales expriment les épitopes 3-sulfo Le^a et 3-sulfo Le^x. L'expression du 3-sulfo Le^a et du 3-sulfo Le^x est diminuée dans les cellules cancéreuses coliques (Yamachika et al., 1997); ces observations peuvent être liées à l'expression du gène *GAL3ST2*, impliqué dans la biosynthèse de ces déterminants, qui est diminuée dans les adénocarcinomes coliques non mucineux (Seko et al., 2002). Une autre structure sialylée a été décrite dans le cancer colorectal, un hexasaccharide de core 3 sialyl-Le^x (NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc) qui semble être en compétition avec un autre antigène sulfo-Le^x (SO₃-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc) retrouvé dans la muqueuse colique normale (Robbe-Masselot et al., 2009).

Objectifs des travaux de thèse

Le cancer colorectal est la deuxième cause de décès par cancer dans le monde, constituant un problème majeur de santé publique avec une incidence annuelle d'environ 1 million de cas. Le nombre absolu de cas va très certainement augmenter dans les prochaines décennies du fait du vieillissement et de l'expansion des populations dans les pays développés ou en voie de développement. Malgré les campagnes de dépistage, les progrès des techniques chirurgicales et l'évolution des traitements adjuvants permettant une prise en charge plus précoce et plus active des récidives, la mortalité des patients atteints de cancer colorectal reste encore élevée.

Cette forte mortalité s'explique d'une part du fait d'un dépistage souvent tardif des tumeurs coliques (la plupart des CRC ne sont pas détectés avant d'avoir envahi d'autres organes ou des ganglions lymphatiques) et d'autre part par le nombre important de patients présentant des récidives dans les 5 ans suivant la résection de la tumeur primaire. Il est par conséquent urgent d'identifier des biomarqueurs permettant de détecter les CRC à des stades précoces, de suivre le développement des tumeurs pendant la durée du traitement et de prédire les récidives.

L'objectif de ces travaux de thèse a été de rechercher de tels marqueurs diagnostiques et/ou pronostiques pour le cancer colorectal, utilisables en routine clinique.

De nombreuses cellules cancéreuses présentent des altérations de l'expression et de la glycosylation des mucines. Ces altérations, en particulier l'apparition de nouvelles structures glycaniques, confèrent à la cellule tumorale un répertoire de ligands potentiels pour l'interaction avec d'autres récepteurs à la surface de la cellule, qui facilitent la survie des cellules tumorales durant les étapes d'invasion et de dissémination des métastases. Les mucines peuvent contribuer aux propriétés biologiques des tumeurs à chaque stade de la progression maligne.

Au cours de cette thèse nous avons cherché à exploiter les altérations d'expression et de glycosylation des mucines afin d'identifier de potentiels biomarqueurs pronostiques ou prédictifs. Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes focalisés en particulier

sur les modifications de glycosylation des mucines intestinales en comparant les profils de glycosylation des mucines de patients ayant un cancer colorectal avec ceux d'individus sains mais également en corrélant l'expression de certains glycanes avec le stade de la tumeur, le risque de récurrence et l'état de différenciation. Les résultats obtenus démontrent une très forte diminution du niveau d'expression des O-glycanes sialylés basés sur un core 3 dans la tumeur, corrélée à une forte augmentation des O-glycanes sialylés basés sur un core 1. Aucune corrélation n'a pu être faite entre les stades des tumeurs et les répertoires de glycosylation des mucines. Cependant, à l'exception des antigènes sialyl-Tn, les tumeurs de patients ayant récidivé présentaient moins d'altérations dans leur profil de glycosylation de mucines, comparées aux tumeurs sans récurrence (Mihalache et al., 2015).

Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons étudié les modifications d'expression des gènes codant pour les glycosyltransférases responsables de la synthèse de motifs glycaniques exprimés spécifiquement dans les tumeurs coliques. En particulier nous avons étudié les sialyl- et sulfo-transférases impliqués potentiellement dans la synthèse des antigènes sialyl et sulfo-Le^x dont le ratio d'expression est inversé entre tumeur et muqueuse saine. Nous avons démontré une diminution significative de l'expression des Gal-3-O-sulfotransférases ainsi que de faibles variations de l'expression des α 2,3-sialyltransférases, qui pourraient expliquer l'inversion des ratios d'expression de ces 2 antigènes.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons analysé les modifications d'expression de DMBT1 (deleted in malignant brain tumor 1) dans les lésions carcinomateuses et polypoïdes bénignes ou pré-cancéreuses, en confrontant les données obtenues avec les caractéristiques histologiques et moléculaires. Nous avons observé une expression relativement basse dans la muqueuse colique normale et dans les lésions polypoïdes non néoplasiques telles que les polypes hyperplasiques et adénomes/polypes sessiles festonnés, avec une augmentation de l'expression de DMBT1 dans les lésions pré-néoplasiques de type adénome conventionnel notamment de haut grade chez des patients non porteurs de cancer colique mais aussi de bas grade chez les patients atteints de cancer, avec pour ceux-ci une augmentation de l'expression de DMBT1 dans la muqueuse saine au voisinage de la lésion tumorale. Globalement l'expression diminue au sein de la tumeur avec une expression encore plus faible au niveau du front d'invasion à l'exception des tumeurs bien différenciées et des tumeurs mucin-secrétantes qui conservent une expression plus

importante de DMBT1 sans différence notable au niveau du front d'invasion par rapport à l'expression globale. Une expression diminuée a été observée également au niveau des métastases ganglionnaires, mais aucune corrélation n'a pas pu être établie avec le stade de la maladie. En revanche, on a observé une bonne corrélation avec l'instabilité microsatellitaire, les tumeurs instables exprimant plus intensément DMBT1, de façon significative, par rapport aux tumeurs stables. Aucune corrélation n'a été trouvée par rapport à la survie.

RESULTATS

1^{ère} partie - La caractérisation structurale de la O-glycosylation des mucines peut fournir d'importantes informations pour aider à prévenir la récurrence du cancer colorectal

Publication : **Structural characterization of mucin O-glycosylation may provide important information to help prevent colorectal tumor recurrence**

Adriana Mihalache, Jean-François Delplanque, B elinda Ringot-Destrez, Cindy Wavelet, Pierre Gosset, Bertrand Nunes, Sophie Groux-Degroote, Renaud Léonard, and Catherine Robbe-Masselot

Frontiers in Oncology 2015, volume 5, DOI: 10.3389/fonc.2015.00217

1.1. Démarche expérimentale

Les objectifs de ce travail étaient de caractériser les éventuelles altérations qualitatives et/ou quantitatives des O-glycannes port es par les mucines intestinales de patients atteints de cancer colorectal, afin d'identifier de potentiels nouveaux marqueurs diagnostiques et/ou pronostiques de cette pathologie.

Dix patients op er es d'un cancer colorectal à l'hôpital Saint Philibert de Lille ont été inclus dans notre étude, avec pour chaque patient des pièces opératoires provenant de la tumeur et de la muqueuse saine d'un point de vue anatomopathologique à distance de la tumeur. 5 échantillons contrôles ont également été inclus dans l'étude, ils provenaient de la muqueuse de résection saine de patients op er es pour des diverticuloses coliques. Pour chaque patient inclus dans l'étude, des données cliniques concernant la localisation de la tumeur, le stade TNM, la survie, l'état de différenciation des tumeurs et la présence ou non d'une composante mucineuse étaient disponibles. Toutes ces informations sont résumées dans le tableau 9.

Après broyage des tissus, les mucines ont été purifiées par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium puis les glycanes ont été lib er es par b eta-élimination en milieu réducteur. Ces glycanes ont ensuite été perméthylés avant d'être analys es par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF. La perm ethylation permet d'accroitre de

façon significative la détection des ions (donc des structures glycaniques) et de quantifier de manière relative les différents oligosaccharides présents dans les échantillons. Chaque ion correspondant à un glycane sur les spectres MS obtenus a ensuite été fragmenté en mode MS/MS afin de déterminer l'enchaînement et la nature des oses qui composent le glycane.

Table 9 : Caractéristiques cliniques des échantillons tumoraux (et de leur marge de résection appariée), polypes et témoins utilisés dans cette étude.

Patient	Age	Sexe	Stade TNM	Localisation	Etat de différenciation	Récidive
1	46	F	III	Droit	Peu différencié	Non
2	54	F	II	Droit	Moyennement différencié	Non
3	96	M	II	Transverse	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Oui
4	69	M	IV	Droit	Moyennement différencié	Oui
5	63	F	II	Transverse	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Non
6	66	F	II	Droit	Bien différencié	Non
7	81	F	III	Gauche	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Oui
8	80	M	IV	Droit	Peu différencié	Pas de suivi
9	61	M	III	Gauche	Moyennement différencié	Non
10	66	M	IV	Droit	Mucineux	Non

Echantillons témoins			
Patient	Age	Sexe	Localisation
1	70	M	Gauche
2	57	M	Gauche
3	57	F	Gauche
4	63	F	Gauche
5	44	F	Gauche

1.2. La glycosylation des mucines est altérée dans les tumeurs mais aussi dans les marges de résection

L'analyse des spectres MS et MS/MS obtenus pour chaque échantillon de mucines provenant de pièces opératoires d'individus sains et de patients atteints de cancer colorectal montre une très forte diversité de O-glycanes (Figure 13). Plus de 60 ions ont été retrouvés sur les spectres qui correspondaient à des oligosaccharides (Tableau 10). De plus chaque ion peut correspondre à une ou plusieurs structures isomériques, augmentant encore le degré de complexité de la glycosylation de ces mucines.

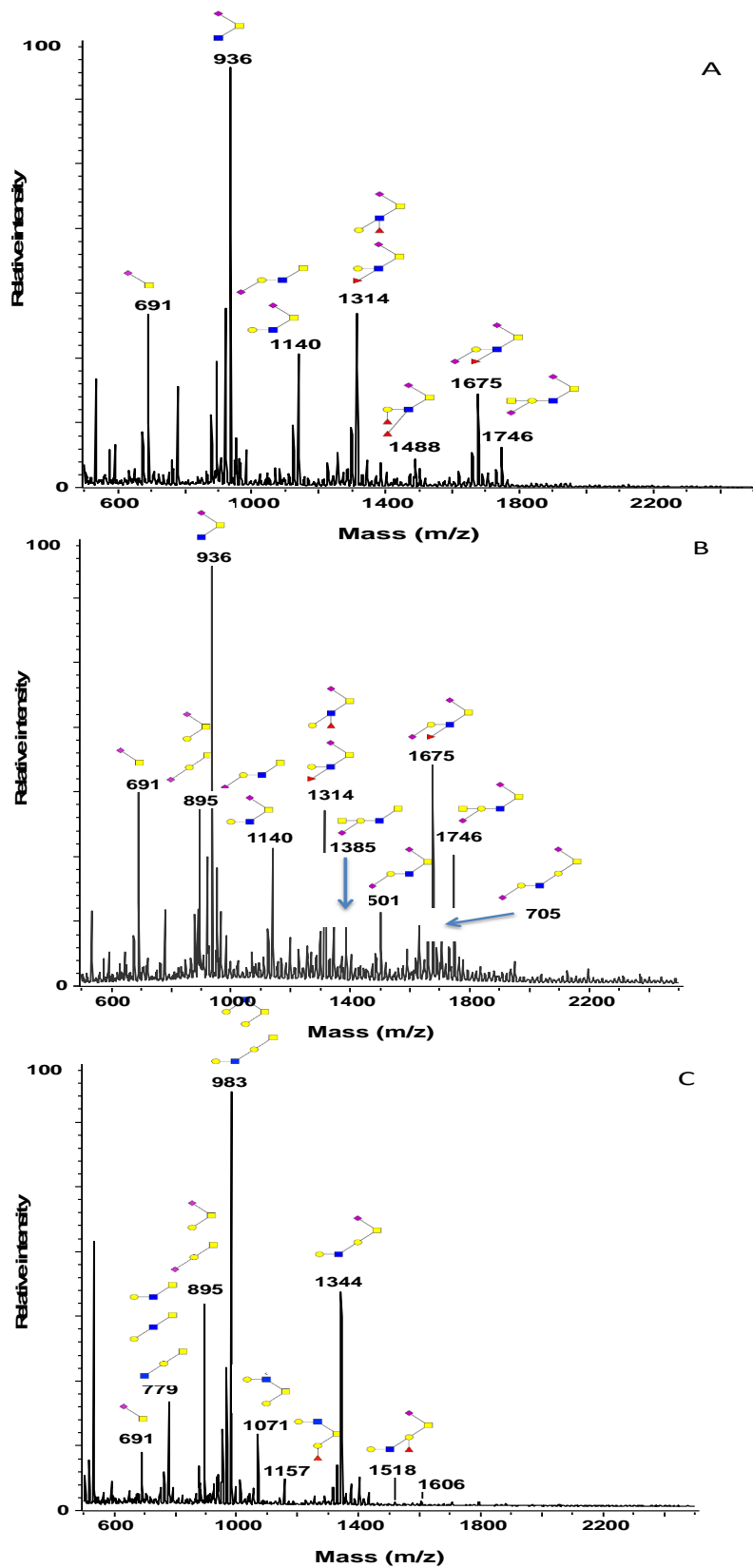















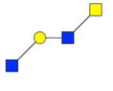
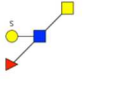

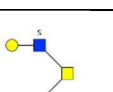
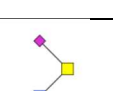
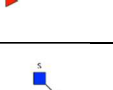
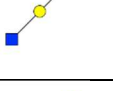

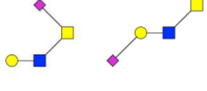
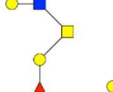
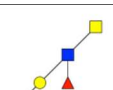
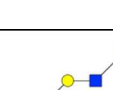
Figure 13. Caractérisation structurale de la O-glycosylation des mucines.

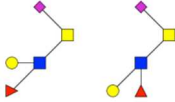

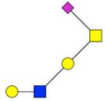
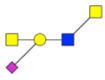
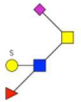
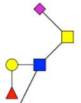
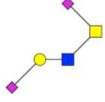
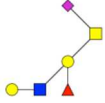
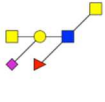
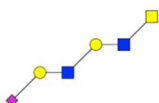
Spectres MS -MALDI-TOF, acquis en mode positif $[M+Na]^+$ (ou $[M+2Na-H]^+$ pour les espèces sulfatées) des O-glycanes perméthylés portés par les mucines purifiées à partir de : **(A)** muqueuse contrôle ; **(B)** marge de résection ; **(C)** tissu tumoral apparié. Symboles : Fuc : triangle rouge ; GlcNAc : carré bleu ; GalNAc : carré jaune ; Gal : rond jaune ; NeuAc : losange violet ; Sulfate : S

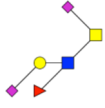


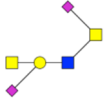
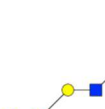
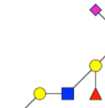
Tableau 10 : Structures ou séquences proposées pour les oligosaccharides neutres et acides identifiés sur les mucines intestinales issues de muqueuses saines ainsi que des tumeurs et de leurs marges de résections appariées.

Le pourcentage relatif de chaque oligosaccharide a été calculé en intégrant les surfaces des pics sur les spectres MS. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm déviation standard du pourcentage d'expression de chaque oligosaccharide pour une même condition.

Proposition de structures ou de séquences glycaniques	[M+Na] ⁺ ou [M+2Na-H] ⁺ pour les espèces sulfatées	Tumeurs	Marges de résection	Contrôles sains
	534	5.6 \pm 5.7	1.8 \pm 2.1	1.0 \pm 1.4
	575	1.7 \pm 1.5	5.8 \pm 6.7	3.8 \pm 2.5
	663	0.2 \pm 0.4	0.3 \pm 0.6	1.0 \pm 1.4
	691	7.1 \pm 7.1	5.2 \pm 5.3	5.8 \pm 4.9
	708	0.5 \pm 1	0.3 \pm 0.6	0.4 \pm 0.5
	749	0.4 \pm 0.8	1.0 \pm 2.2	0
	779	4.2 \pm 1.5	5.0 \pm 3.8	5.6 \pm 0.4
	867	0.8 \pm 1.1	0.3 \pm 0.6	0
	895	10.9 \pm 3.6	7.7 \pm 4.2	5.7 \pm 0.6
	908	0.6 \pm 1.0	1.3 \pm 1.8	0.8 \pm 1.1
	936	12.1 \pm 11.2	24.2 \pm 10.2	30.8 \pm 11.6
	953	1.4 \pm 0.6	3.0 \pm 1.8	1.9 \pm 0.7

	983	7.5 ± 8.3	2.0 ± 0.7	1.6 ± 0.3
	1024	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.5
	1041	0.0 ± 0.1	0.3 ± 0.6	0.2 ± 0.2
	1069	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.8 ± 0.1
	1071	0.6 ± 1.5	0	0
	1110	0.3 ± 0.5	0.7 ± 1.1	0.7
	1112	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.3	0.3 ± 0.4
	1127	0	0.3 ± 0.8	0
	1140	2.9 ± 2.8	4.4 ± 1.9	7.0
	1157	1.9 ± 1.2	0.4 ± 0.7	0.3 ± 0.4
	1198	0.0 ± 0.1	0.4 ± 0.6	0
	1228	0.8 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.6 ± 0.2
	1256	3.5 ± 1.8	2.7 ± 4.0	1.5 ± 0.4

	1314	3.3±2.4	7.0±4.3	8.0±1.4
	1331	0.1±0.3	0.1±0.4	0.1±0.2
	1344	7.5±5.5	3.3±6.0	1.1±0.4
	1385	0.7±1.4	1.9±2.3	0.7±1.0
	1402	0.8±0.6	3.2±1.4	7.1±0.3
3 Hex, 2 HexNAc, GalNAcol	1432	0.9±0.8	0.2±0.2	0.2±0.3
2 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1473	0.1±0.2	0.1±0.2	0.2±0.3
	1488	0.3±0.6	0.8±1.7	0.7±1.0
2 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1490	0.2±0.4	0	0
	1501	0.5±0.6	0.6±0.9	1.6±0.7
	1518	1.7±1.8	0.4±0.6	0.2±0.4
	1559	0.1±0.2	0.1±0.2	0.1±0.2
2 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1576	0±0.1	0	0.1±0.2
	1589	0.3±0.3	0.3±0.5	0.4±0.1
3 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1606	0.7±0.8	0	0.1±0.1
2 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1647	0.6±0.8	0.2±0.4	0.3

	1675	9.4±1.2	2.5±2.4	3.3±0.7
3 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1677	1.0±1.3	0.4±1	0
	1705	3.2±3.4	2.5±6.0	0.6±0.1
	1718	0.2±0.3	0.1±0.3	0.1±0.1
	1746	0.9±2	1.9±2.3	1.1±1.5
2 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1763	0.2±0.2	0.2±0.3	0.3±0.1
3 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1780	0.5±0.8	0	0
	1793	0.3±0.4	0.2±0.4	0
2 Hex, 3 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1834	0.1±0.1	0.2±0.3	0.1±0.1
3 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1851	0.4±0.8	0	0.1±0.1
	1879	0.2±0.5	0.3±0.8	0
4 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1881	0.4±0.7	0	0
4 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1898	0±0.1	0.1±0.2	0
3 Hex, 4 HexNAc, GalNAcol	1922	0.2±0.5	0.1±0.3	0.1±0.1
2 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1937	0±0.1	0	0.1±0.1
3 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1939	0.1±0.2	0	0
3 Hex, 2 HexNAc, 3 Fuc, GalNAcol	1954	0.1±0.2	0	0
4 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAcol	1997	0.1±0.2	0	0
3 Hex, 3 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	2025	0.4±0.5	0.1±0.2	0.1±0.1
5 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	2055	0.6±0.9	0	0

Les O-glycanes étaient constitués de 2 à 10 résidus de monosaccharides. La plupart des ions ont été retrouvés sur tous les spectres, seul leur niveau d'expression variait. Afin de déterminer si des modifications dans la formation des noyaux ou de la périphérie des mucines pouvaient être observées entre échantillons contrôle versus tumeur, les ions parents ont été fragmentés et la séquence des oligosaccharides a ainsi pu être déterminée.

Les niveaux d'expression des oligosaccharides sont très variables d'un échantillon à l'autre, comme le montrent les valeurs d'écart-type calculés. L'hétérogénéité semble plus marquée au niveau des mucines provenant de patients atteints de cancer colorectal, par rapport aux individus sains. En effet, un seul ion n'a pas été retrouvé dans les tumeurs alors que 16 structures étaient absentes de la muqueuse saine et 11 ions n'ont pas été identifiés dans les marges de résection.

Trois noyaux différents ont été principalement retrouvés pour les mucines présentes au niveau du côlon, le core 3 (GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-ser/thr) étant majoritaire par rapport au core 1 (Gal β 1-3GalNAc α 1-ser/thr) et au core 2 (Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1-Ser/Thr).

La plupart des structures oligosaccharidiques sont acides, portant un ou plusieurs résidus d'acide sialique et/ou de sulfate. La structure majoritaire « de base » correspond à un core 3 portant un acide sialique lié en α 2-6 sur la GalNAc du point d'attache (ion à m/z 936 sur les spectres). De nombreux oligosaccharides sont ensuite formés à partir de l'élongation de ce core 3 sur la branche du bas. Cependant, une plus grande proportion de structures basées sur un core 1 a été retrouvée dans la zone tumorale par rapport aux marges de résection et aux contrôles sains. Il s'agit par exemple des ions à m/z 534 (de 5.6% dans la tumeur à 1% dans la muqueuse intestinale saine), 691 (de 7,1% à 5.8%), 983 (de 7,5% à 1,6%) et 1256 (de 3,5% à 1,5%). Le taux d'expression des glycanes basés sur un core 3 passe de 64% dans la muqueuse de contrôle à 56,5% dans les marges de résection et à seulement 27,5% dans les tumeurs. Au contraire le taux d'expression des oligosaccharides de core 1 augmente dans les tumeurs, variant de 13% dans les contrôles à 21% dans les marges de résection et à 41% dans les zones tumorales. Les niveaux d'expression des glycanes de core 1 et de core 3 sont significativement différents entre contrôles et tumeurs (valeur de p de 0.0038 et 0.0062 respectivement).

Parmi les 60 glycanes identifiés, plus d'un tiers d'entre eux présente des gradients croissants ou décroissants d'expression de la muqueuse contrôle vers la marge de résection puis la tumeur (Figure 14).

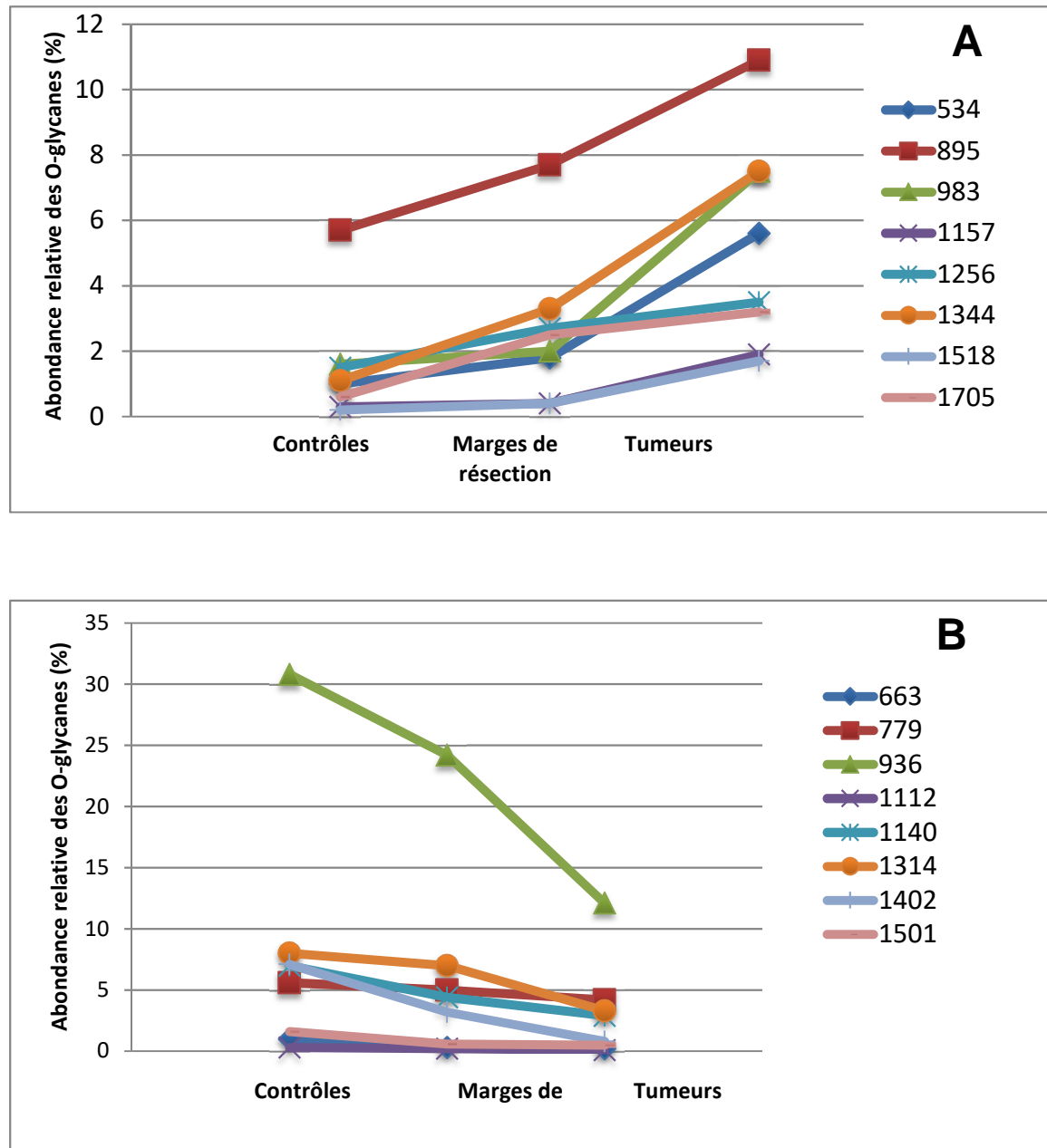


Figure 14. Gradients du niveau d'expression des O-glycanes de mucines coliques issues de contrôles sains (n=5), de marges de résection (n=10) et des tumeurs appariées (n=10). La moyenne est représentée pour toutes les mesures. (A) Gradient croissant d'expression des glycanes des contrôles vers les tumeurs. (B) Gradient décroissant d'expression des glycanes des contrôles vers les tumeurs.

On note une diminution des oligosaccharides basés sur un core 3 sialylé (ions à m/z 936, 1140 et 1314) dans les tumeurs comparées aux marges de résection et aux contrôles ; le pourcentage relatif d'expression de ces 3 structures variant de 18 à 36 puis 46 % de l'ensemble des O-glycanes, respectivement dans les 3 zones. Une augmentation des oligosaccharides basés sur un core 1 sialylé (ions à m/z 895, 1344, 1518 et 1793) semble corrélée à la diminution d'expression des glycanes de core 3 ; le pourcentage relatif d'expression de ces 3 structures variant de 7 à 12 puis 21 % de l'ensemble des O-glycanes, respectivement dans les 3 zones.

Comme décrit précédemment (Robbe Masselot *et al.*, 2009), une augmentation de l'expression de l'antigène disialyl Lewis^x à m/z 1675 a été observée dans les échantillons tumoraux (9.4% des O-glycanes totaux) comparés aux marges de résection (2.5%) et aux contrôles (3.3%). Son homologue 6-sulfo sialyl Lewis^x diminue dans les tumeurs (0.8% des glycanes totaux) comparé aux marges de résection (3.2%) et aux contrôles (7.1%). Les autres différences les plus significatives entre tumeurs et contrôles concernent les ions à m/z 534 (de 5,6 % dans la tumeur à 1% dans le contrôle), 936 (de 12,1% à 30,8%), 983 (de 7,5% à 1,6%), 1344 (de 7,5% à 1,1%) et 1705 (de 3,2% à 0,6%).

Tous ces O-glycanes basés sur un core 1 semblent suivre la même voie de biosynthèse : l'antigène T à m/z 534 est tout d'abord allongé par une GlcNAc pour former l'ion à m/z 779. Un résidu de galactose est alors lié à la GlcNAc pour former l'ion à m/z 983, qui va ensuite être substitué par un ou deux résidus d'acide sialique pour donner les ions à m/z 1344 et 1705 respectivement.

Le niveau global de sialylation des O-glycanes de mucines ne varie pas beaucoup entre tumeurs, marges de résection et muqueuses contrôles, il représente respectivement 67%, 71% et 78% des O-glycanes totaux. Par contre, une diminution du niveau de sulfatation des mucines a été retrouvée dans les tumeurs (3,4 % des glycanes totaux) comparé aux marges de résection (5,7%) et aux contrôles (9,4%).

1.3. Comparaison des répertoires de glycosylation des mucines selon le stade TNM des tumeurs colorectales

Comme décrit précédemment dans le chapitre 2.6 (Classification du cancer colorectal), la classification TNM permet de classer les tumeurs colorectales en 4 stades, selon le degré d'envahissement de la paroi colique et des organes voisins par contiguïté, l'envahissement ganglionnaire et les métastases à distance.

Dans notre étude, 4 patients présentaient un cancer colorectal au stade II, 3 patients avaient un CCR de stade III et 3 avaient un CCR de stade IV. 3 ions semblent présenter une augmentation de leur niveau d'expression au stade IV comparés aux deux autres stades (Figure 15).

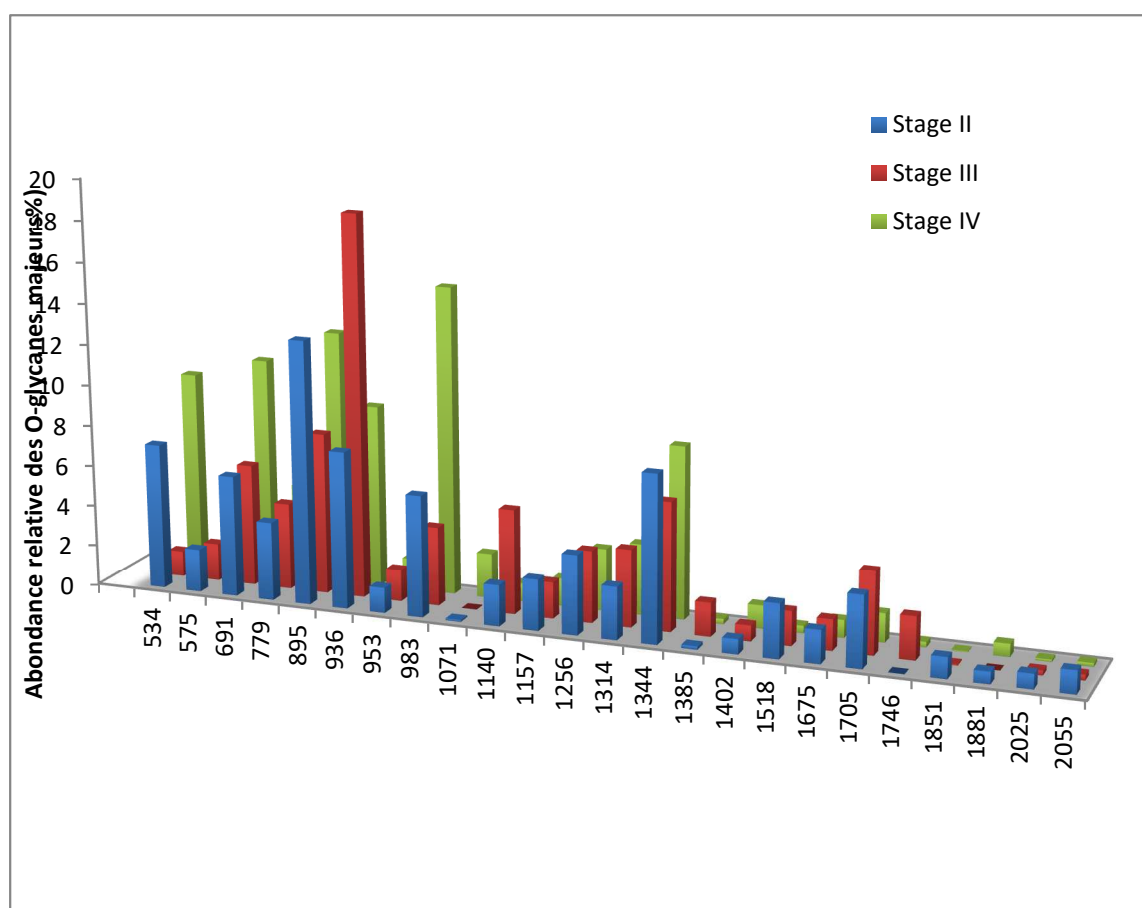


Figure 15. Comparaison de l'abondance relative des O-glycans majoritaires purifiés à partir de tumeurs au stade II (n=4), au stade III (n= 3) et au stade IV (n=3).

Une légère augmentation du niveau d'expression des ions à m/z 534, 691 et 983 a été observée dans les tumeurs au stade IV, comparés aux tumeurs au stade II et III.

Il s'agit de l'ion à m/z 534 (antigène T) qui correspond à 7,1% des oligosaccharides totaux détectés au stade II, à 1,2% des glycanes au stade III et à 9,7% des O-glycanes au stade IV ; de l'ion à m/z 691 (antigène sialyl-Tn) qui passe de 5,9% au stade II à 6% au stade III et à 10,7 au stade IV. Le dernier ion est l'ion à m/z 983 est un tétrasaccharide basé sur un core 1, son niveau d'expression passe de 6% au stade II à 3,9% au stade III et à 15,1% au stade IV.

Cependant, vu le faible échantillonnage ainsi que les valeurs d'écart-type élevées, il n'est pas possible de conclure sur des potentielles modifications de la glycosylation corrélables au stade TNM de la tumeur.

1.4. Comparaison des répertoires de glycosylation des mucines selon l'état de différenciation des tumeurs

Les adénocarcinomes colorectaux sont constitués d'une prolifération de cellules tumorales s'organisant sous forme de glandes de tailles variées et/ou sous forme solide, d'amas et de plages. Selon la classification des tumeurs du système digestif faite par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) les adénocarcinomes coliques ont été gradés en bien-, moyennement, peu- et indifférencié selon le pourcentage de la composante glandulaire. L'adénocarcinome mucineux est, quant à lui, défini par la présence d'une composante mucineuse majoritaire de plus de 50% faite de plages de mucus extracellulaire qui englobe des glandes ou des plages de cellules tumorales. On observe dans le mucus une néoexpression de MUC5AC qui n'est pas sécrétée dans le côlon à l'état normal.

D'après la figure 16, des différences de niveau d'expression des oligosaccharides semblent exister entre les différents états de différenciation de la tumeur. L'adénocarcinome mucineux se caractérise par une très forte augmentation du nombre de structures glycaniques basées sur un core 1 et dépourvues d'acide sialique. En effet, 3 ions à m/z 534, 779 et 983 représentent à eux seuls plus de 50% des oligosaccharides totaux. Ces ions correspondent respectivement à l'antigène T (Gal β 1-3GalNAcol), à un trisaccharide de core 1 (GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAcol) et à un tétrasaccharide de core 1 (Gal β 1-3/4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAcol). On note également une diminution importante des structures sialylées,

et notamment celles basées sur un core 3 (ions à m/z 936, 1140 et 1314) ne sont plus ou très peu exprimées.

Cette diminution du taux d'expression des structures sialylées basées sur un core 3 est également retrouvée dans les adénocarcinomes coliques peu et bien différenciés mais de façon moins significative. Par contre, les adénocarcinomes moyennement différenciés expriment toujours au sein des mucines sécrétées ces structures sialylées. De plus les adénocarcinomes moyennement différenciés se caractérisent par un taux de sialylation significativement plus élevé, en comparaison des autres stades de différenciation : plus de 65 % des O-glycanes portent de l'acide sialique dans ces adénocarcinomes moyennement différenciés, contre moins de 30% dans les autres types d'adénocarcinomes.

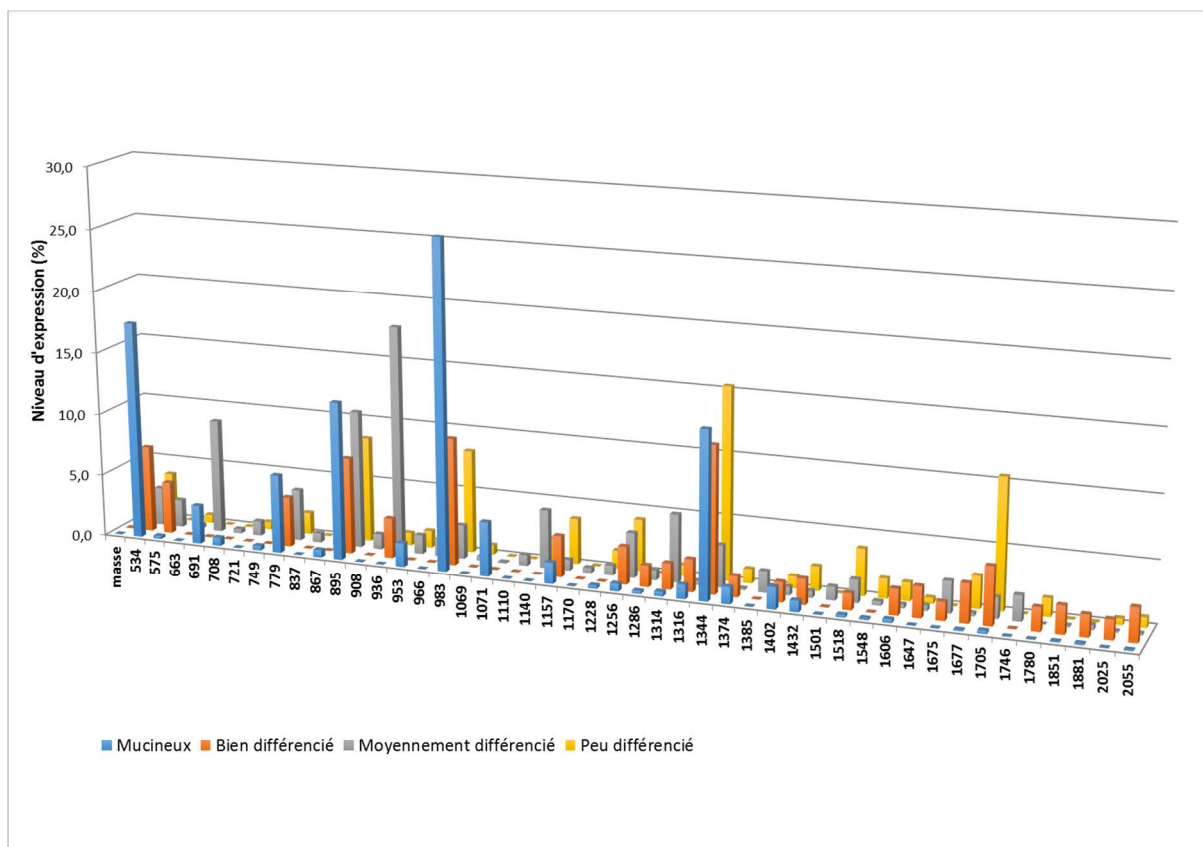


Figure 16. Comparaison de l'abondance relative des O-glycanes majoritaires purifiés à partir de tumeurs mucineuses (n=1), bien différenciées (n= 1), moyennement différenciées (n=6) ou peu différenciées (n=2).

1.5. Les tumeurs avec récurrence peuvent être différenciées des tumeurs sans récurrence

Dans cette étude, tous les patients ont été opérés et les tumeurs colorectales résectionnées. Sur les 10 patients inclus, 3 patients opérés d'un cancer colorectal ont récidivé moins de 5 ans après l'opération. Nous avons recherché dans ce travail s'il était possible d'identifier des structures glycaniques utilisables pour prédire cette récurrence, ce qui permettrait d'adapter les traitements post-opératoires et notamment les chimiothérapies.

Les profils de glycosylation des mucines issues de tumeurs qui ont récidivé ou non ont été comparés et confrontés aux données obtenues dans les muqueuses contrôles. Les figures 17 et 18 mettent en évidence les différences de niveaux d'expression des glycanes dans chacune des conditions.

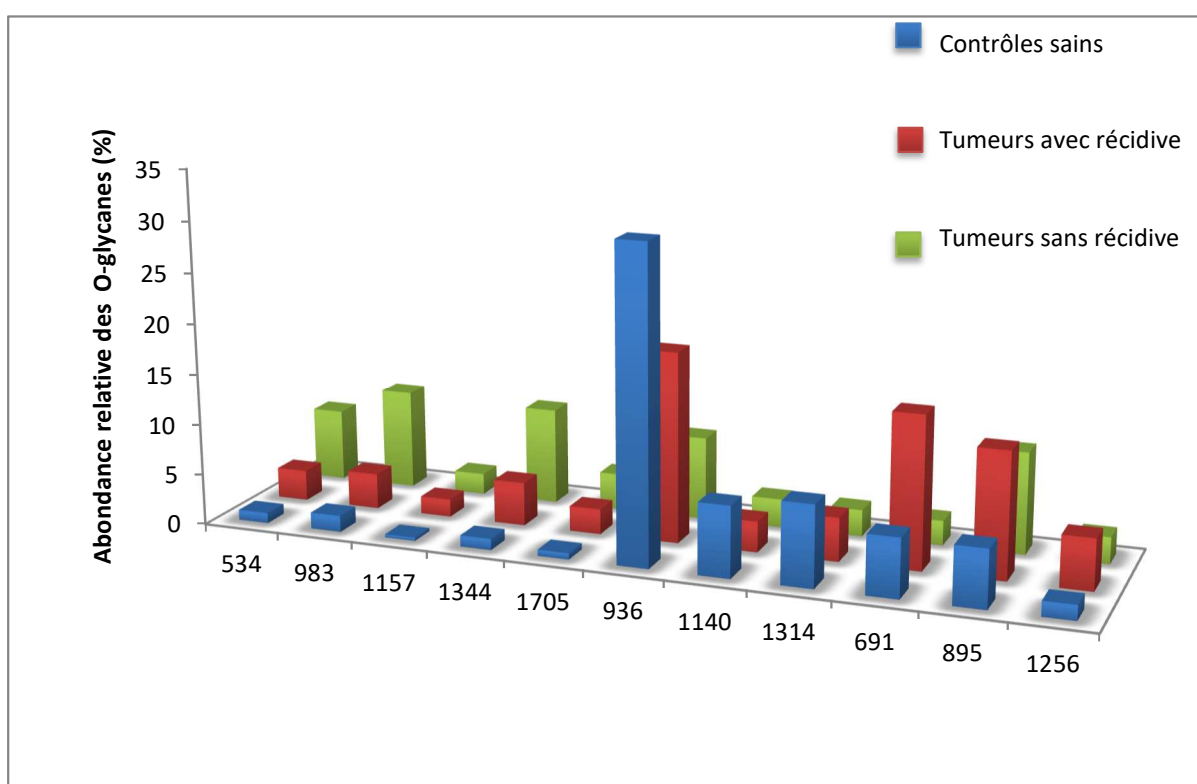


Figure 17. Comparaison de l'abondance relative des O-glycanes majoritaires purifiés à partir de contrôles (n=5), tumeurs avec récurrence (n=3) et tumeurs sans récurrence (n=6).

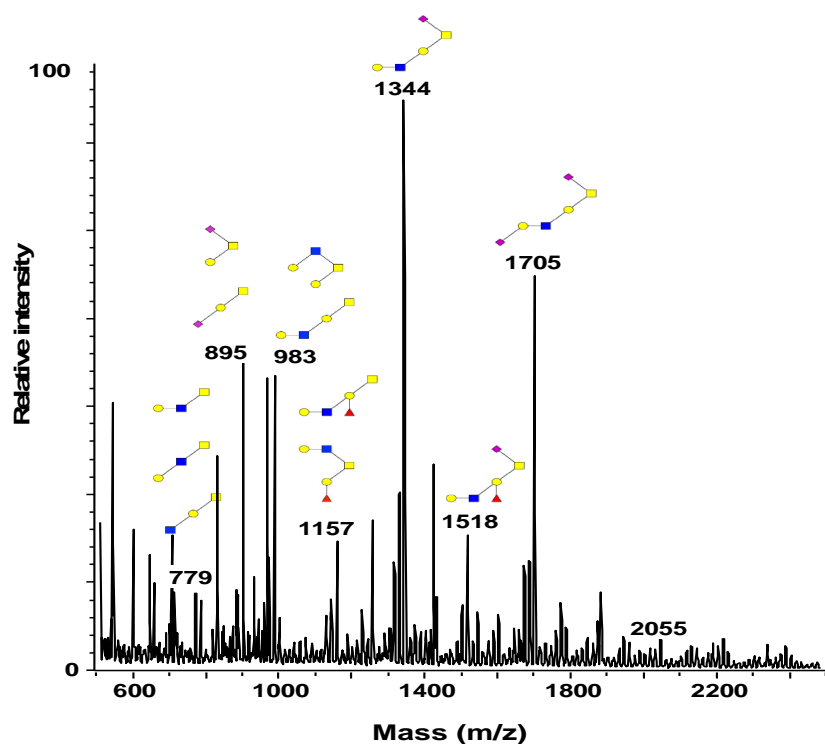
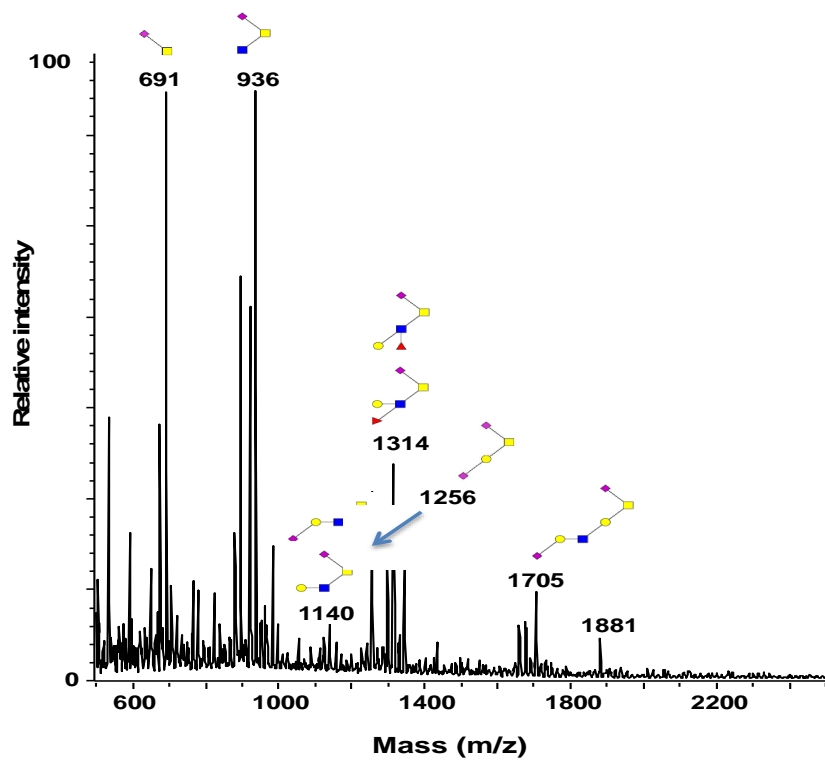


Figure 18. Comparaison des répertoires de glycosylation des mucines purifiées à partir de tumeurs avec ou sans récurrence.

Spectres MS -MALDI-TOF, acquis en mode positif $[M+Na]^+$ (ou $[M+2Na-H]^+$ pour les espèces sulfatées) des O-glycanes perméthylés portés par les mucines purifiées à partir de : **(A)** tumeurs avec récurrence; **(B)** tumeurs sans récurrence; (Symboles : Fuc : triangle rouge ; GlcNAc : carré bleu ; GalNAc : carré jaune ; Gal : rond jaune ; NeuAc : losange violet ; Sulfate : S

Trois sortes de différences ont été retrouvées :

- les ions à m/z 534, 983, 1157, 1344 et 1705, qui correspondent tous à des O-glycanes basés sur un core 1, présentent un gradient croissant d'expression des contrôles vers les tumeurs sans récurrence. Les tumeurs avec récurrence présentent un niveau intermédiaire d'altérations avec une augmentation moins prononcée du niveau d'expression de ces ions
- les ions à m/z 936, 1140 et 1314, qui correspondent tous à des O-glycanes sialylés de core 3, montrent un gradient décroissant d'expression des contrôles vers les tumeurs sans récurrence. A nouveau, les tumeurs avec récurrences présentent des niveaux d'altérations intermédiaires.
- Les ions à m/z 691, 895 et 1256, correspondant respectivement aux antigènes sialyl-Tn, sialyl T et disialyl T, sont plus exprimés dans les tumeurs avec récurrence que dans les tumeurs sans récurrence ou dans les contrôles. Le niveau d'expression de l'antigène sialyl-Tn est significativement différent entre tumeurs avec et sans récurrence ($p=0,012$).

1.6. Conclusion de cette étude

Dans cette étude, nous avons tout d'abord comparé les profils de glycosylation des mucines issues des tumeurs, des muqueuses saines à distance des tumeurs ainsi que des contrôles provenant d'individus sans pathologie intestinale. Nous avons ainsi pu mettre en évidence des différences dans le niveau d'expression de certains oligosaccharides lors de la progression tumorale, et notamment une diminution du taux d'expression des structures sialylées basées sur un core 3 corrélées à une augmentation du taux d'expression des structures sialylées basées sur un core 1. Ces résultats d'analyse structurale des oligosaccharides sont en accord avec les travaux portant sur l'analyse des niveaux d'expression des glycosyltransférases impliquées dans la synthèse des cores des O-glycanes. En effet, plusieurs études ont démontré, par PCR (polymerase chain reaction) quantitative une surexpression du gène codant la $\beta 1,3$ -galactosyltransférase (*C1GALT1*), responsable de la synthèse des O-glycanes de core 1, dans les tumeurs de patients atteints de cancer colorectaux (Barrow et al., 2013; Hung et al., 2014). En parallèle d'autres études de PCR

quantitative ont démontré une diminution importante du niveau d'expression du gène codant la β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6 (β 3Gn-T6) qui est impliquée dans la synthèse des glycanes de core 3 (Iwai et al., 2005).

Parmi les glycanes basés sur un core 1, on retrouve aussi bien des petites structures (antigènes T à m/z 534, sialyl T à m/z 895 et disialyl T à m/z 1256) que des structures plus complexes (ions à m/z 1344, 1518 et 1705 qui comprennent de 5 à 6 monosaccharides). Il a été proposé que l'apparition de structures basées sur un core 1 soit due à une glycosylation incomplète (Hakomori, 1983a, 1983b, 1985; Hakomori and Kannagi, 1983; Hakomori et al., 1983). Nos résultats suggèrent plutôt une compétition entre la β 3Gn-T6 dans le tissu sain et la C1GALT1 dans le tissu cancéreux.

Nous avons ensuite cherché à corrélérer différents paramètres cliniques caractérisant la tumeur avec des profils spécifiques d'expression d'oligosaccharides portés par les mucines. Nous avons plus particulièrement comparé les répertoires glycaniques des tumeurs en fonction du stade TNM, de l'état de différenciation des tissus tumoraux et de la récurrence tumorale.

Tous les glycanes majoritaires sont retrouvés quel que soit le stade TNM de la tumeur. Des variations de leur niveau d'expression ont été observées, avec par exemple une plus forte expression des ions à m/z 534, 691 et 983 au stade T4, mais ces différences ne semblent pas significatives. Les modifications de la glycosylation des mucines apparaissent certainement précocement dans les étapes de carcinogénèse colique.

En comparaison des adénocarcinomes bien, moyennement et peu différenciés, le profil de glycosylation des mucines dans les adénocarcinomes mucineux semble très différent. Aucune structure complexe (au-delà de 5 monosaccharides) n'a été retrouvée. 3 structures représentent plus de 50% des oligosaccharides totaux, ce qui conduit à un répertoire de glycosylation très simplifié. Les glycanes sont essentiellement basés sur du core 1 et sont peu sialylés, en comparaison des tissus sains. Ces différences de glycosylation des mucines dans l'adénocarcinome mucineux peuvent s'expliquer par le fait que cette tumeur néo-exprime MUC5AC, contrairement aux autres adénocarcinomes. Dans des conditions physiologiques, MUC5AC est présente dans l'appareil respiratoire, la muqueuse gastrique et

génitale et n'est quasi jamais présente dans la muqueuse colique saine. Elle est également présente à l'état embryonnaire, dans l'intestin, chez l'homme. En revanche, elle est exprimée de façon aberrante par certaines tumeurs. Ainsi, les tumeurs vilieuses peu dysplasiques réagissent positivement aux anticorps anti-MUC5AC mais l'expression de cette mucine diminue lorsque le grade de dysplasie augmente et peut disparaître totalement quand la tumeur se transforme en adénocarcinome.

Les adénocarcinomes moyennement différenciés présentent un taux de sialylation des mucines deux fois plus élevé que les autres états de différenciation, suggérant un rôle des acides sialiques dans le processus de différenciation des cellules épithéliales lors de la carcinogénèse.

Dans notre étude, nous avons analysé le profil de glycosylation des mucines intestinales présentes dans la tumeur de patients atteints de CCR. Un suivi des patients a permis de déterminer que 3 d'entre eux ont récidivé moins de 3 ans après l'opération. Les profils de glycosylation des mucines dans les tumeurs avec ou sans récurrence sont très différents. Nous avons démontré que le niveau d'expression de l'antigène sialyl-Tn à m/z 691 était significativement plus élevé dans les tumeurs avec récurrence, par rapport aux tumeurs sans récurrence. Ce résultat est en accord avec les études précédentes démontrant que la surexpression des antigènes Tn et sialyl-Tn est une caractéristique de tumeurs colorectales peu différenciées et à un stade avancé (Giuffrè, 1996; Itzkowitz et al., 1989). Chik *et al.* ont démontré plus récemment que la surexpression des antigènes sialyl-Tn était corrélée à une augmentation du niveau d'expression du gène codant pour l'alpha 2,6 sialyltransférase (*ST6GALNAC1*) et une diminution du gène codant pour la core 1 synthase (*C1GALT1*) dans la lignée cellulaire mucineuse de cancer du côlon LS174T (Chik et al., 2014). Notre analyse structurale de la glycosylation des mucines provenant de tumeurs avec récurrence démontre une plus grande proportion de glycanes basés sur un core 3 et une plus faible expression de glycanes basés sur un core 1, comparé aux tumeurs sans récurrence. Ces données suggèrent que la core 1 synthase est moins exprimée ou moins active dans les tumeurs avec récurrence, ce qui pourrait expliquer, au moins partiellement, la forte expression d'antigènes sialyl-Tn dans ces tumeurs.

Un niveau d'expression plus élevé des antigènes sialyl T et disialyl T a été observé dans les tumeurs avec récurrence, par rapport aux tumeurs sans récurrence, même si ces différences n'étaient pas significatives. La sialylation des antigènes T est gouvernée par l'action de la ST6GalNAc-II et il a été montré qu'une augmentation du niveau d'expression de son ARNm est corrélée avec un mauvais pronostic pour les patients opérés de cancers colorectaux avec métastases.

Nos résultats suggèrent que la glycosylation des mucines de tumeurs avec récurrence s'apparente, au moins partiellement, à celle des individus sains. Le caractère plus agressif de ces tumeurs avec récurrence pourrait ainsi s'expliquer par le fait que le système de défense immunitaire n'est pas autant activé que dans le cadre d'une tumeur arborant des glycanes de core 1. Les glycanes de core 3 mimeraient en quelque sorte une situation physiologique normale.

En conclusion, notre travail nous a permis d'observer de nombreuses modifications de la glycosylation des mucines intestinales entre les tissus normaux et cancéreux, mais il est difficile d'identifier des marqueurs spécifiques d'un stade donné de développement du cancer du côlon avec si peu de données. Cette étude reste encore préliminaire dans la mesure où il n'y a eu que 10 patients inclus et les résultats devront être confirmés en incluant un plus grand nombre de patients. Il sera également intéressant de corréler les profils de glycosylation des mucines avec d'autres paramètres cliniques comme les traitements pré-opératoires.

2ème partie – Etude de l’expression des sialyltransférases et sulfotransférases impliquées dans la glycosylation des mucines coliques.

2.1 Démarche expérimentale

Les objectifs de ce travail étaient de caractériser d’éventuelles modifications d’expression de GTs ou SulfoTs impliquées dans la synthèse des déterminants glycaniques 3-sulfo-Lewis x et Sialyl Lewis x portés par les O-glycannes des mucines intestinales de patients atteints de cancer colorectal, afin d’identifier de potentiels nouveaux marqueurs diagnostiques et/ou pronostiques de cette pathologie. En effet, des différences du niveau d’expression de certains oligosaccharides lors de la progression tumorale avaient été mises en évidence avant le début de ma thèse, en particulier une augmentation de l’expression de l’antigène di-sialyl-Lewis^x dans la tumeur et une diminution de l’expression de l’antigène sulfo-sialyl-Lewis^x. Cette découverte est particulièrement importante dans la mesure où : (1) ces antigènes sont basés sur le core 3 sialylé en 6 sur la GalNAc-ol, spécifique des mucines coliques et (2) ces antigènes ont exactement la même structure mis à part la présence d’un résidu de sulfate ou d’acide sialique sur le galactose périphérique (Figure 19). Il semble donc qu’il existe une compétition entre une activité Gal-3-O-sulfotransférasique et une activité α 2,3-sialyltransférasique pour le galactose terminal de la chaîne glycanique.

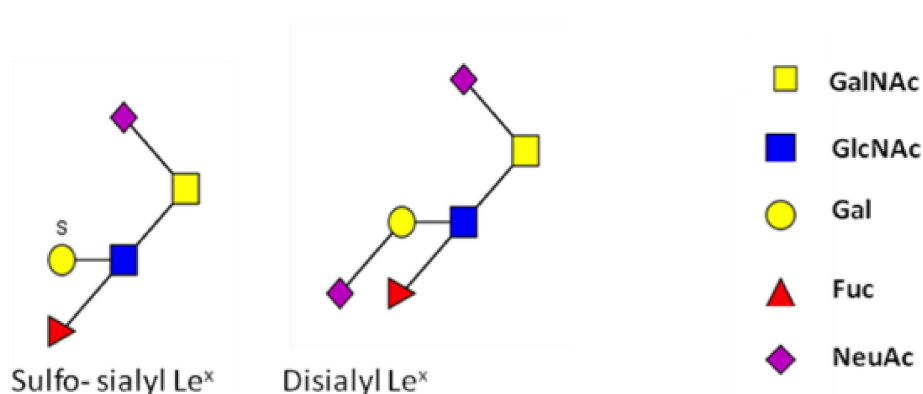


Figure 19 : Représentation schématique des déterminants glycaniques périphériques 3-sulfo Le^x et Sialyl Le^x, basés sur le core 3 sialylé en 6 sur la GalNAc-ol spécifique des mucines coliques.

En parallèle, nous avons montré dans l'étude décrite dans la première partie (publication Mihalache *et al.*, 2015) que le taux d'expression des glycanes basés sur un core 3 passe de 64% dans la muqueuse de contrôle à 56,5% dans les marges de résection et à seulement 27,5% dans les tumeurs. Au contraire le taux d'expression des oligosaccharides de core 1 augmente dans les tumeurs, variant de 13% dans les contrôles à 21% dans les marges de résection et à 41% dans les zones tumorales. L'expression des enzymes responsables de la biosynthèse des cores 1 et 3 est donc également susceptible d'être modifiée au cours de la transformation maligne dans le côlon.

Dans le but d'identifier quelles enzymes peuvent être impliquées dans ces modifications de glycosylation et de sulfatation des mucines au cours de la progression tumorale, nous avons étudié par PCR quantitative l'expression de gènes de glycosyltransférases et sulfotransférases potentiellement impliquées dans la glycosylation des mucines coliques (plus particulièrement dans la biosynthèse des motifs glycaniques présentés précédemment dont l'expression est modifiée dans les tumeurs), dans des échantillons de côlon sain et tumoral provenant des mêmes patients. Une telle étude pourrait également identifier certains gènes de glycosyl- ou sulfotransférases comme de potentiels marqueurs pronostiques/diagnostiques pour la maladie.

Pour cette étude, nous avons inclus des échantillons de côlon sain et tumoral de 20 patients à des stades d'évolution différents (n = 2 pour le stade I, n = 6 pour stade II, n=4 pour stade III et n = 8 pour stade IV) ainsi que des échantillons de côlon sain de onze témoins (tableau 11). Les ARN totaux ont été extraits puis quantifiés et analysés sur un Bioanalyseur Agilent. Après synthèse des ADN complémentaires, des PCR quantitatives ont été mises au point, en utilisant la chimie SYBRGreen, pour un gène normalisateur (*HPRT*), pour les 5 gènes d' α 2,3-sialyltransférases (*ST3GAL1*, *ST3GAL2*, *ST3GAL3*, *ST3GAL4*, *ST3GAL6*), les 3 gènes de Gal-3-O-sulfotransférases (*GAL3ST2*, *GAL3ST3*, *GAL3ST4*) et le gène de la Core 3 synthétase, potentiellement exprimés dans la muqueuse colique. Les résultats encore incomplets concernant l'expression de la Core 1 synthétase ne sont pas présentés dans ce manuscrit.

2.2. Etude de l'expression des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases, d' α 2,3-sialyltransférases et de la core 3 synthétase dans les tumeurs, les marges de résection, et les témoins.

Nous avons donc voulu déterminer si l'expression de glycosyl- et sulfotransférases impliquées dans la glycosylation terminale et la sulfatation des mucines coliques (i.e. α 2,3-sialyltransférases, Gal-3-O-sulfotransférases) ainsi que l'expression de la Core 3 synthétase étaient affectées par la transformation maligne. Vingt patients opérés d'un cancer colorectal à l'hôpital Saint Philibert de Lille ont été inclus dans notre étude, avec pour chaque patient des échantillons provenant de la tumeur et de la muqueuse saine d'un point de vue anatomopathologique à distance de la tumeur. Onze échantillons contrôles ont également été inclus dans l'étude, ils provenaient de la muqueuse de résection saine de patients opérés pour des diverticuloses coliques. Pour chaque patient inclus dans l'étude, des données cliniques concernant la localisation de la tumeur, le stade TNM, la survie, étaient disponibles. Toutes ces informations sont résumées dans le tableau 11.

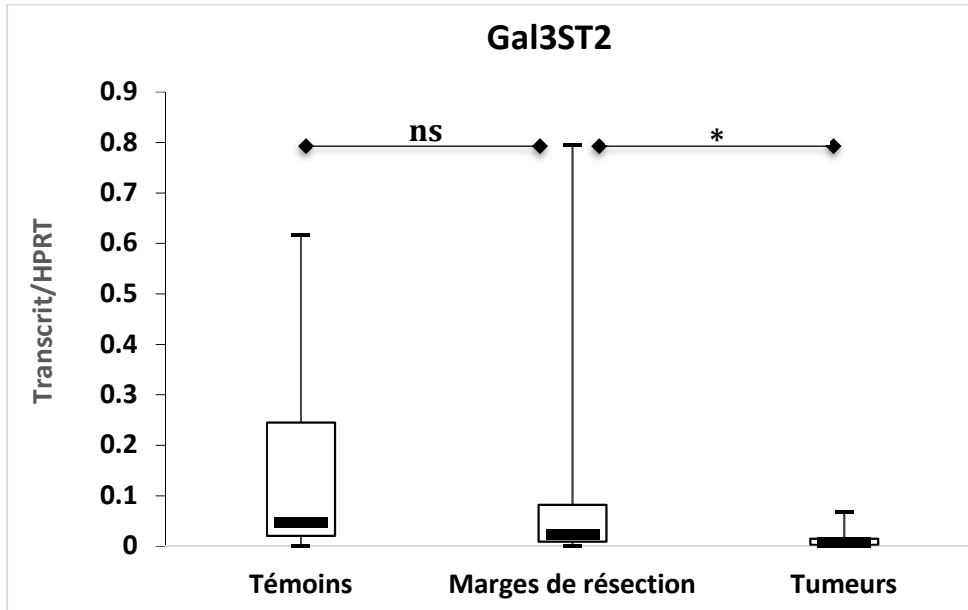
Tableau 11. Caractéristiques cliniques des échantillons témoins et tumoraux (et de leur marge de résection appariée) utilisés dans cette étude.

Patient	Age	Sexe	Stade TNM	Localisation	Etat de différenciation	Récidive
1	46	F	III	Droit	Peu différencié	Non
2	54	F	II	Droit	Moyennement différencié	Non
3	96	M	II	Transverse	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Oui
4	69	M	IV	Droit	Moyennement différencié	Oui
5	63	F	II	Transverse	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Non
6	66	F	II	Droit	Bien différencié	Non
7	81	F	III	Gauche	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Oui
8	80	M	IV	Droit	Peu différencié	Pas de suivi
9	61	M	III	Gauche	Moyennement différencié	Non
10	66	M	IV	Droit	Mucineux	Non
11	74	M	I	Rectum	Moyennement différencié	Non
12	73	M	I	Rectum	Mucineux	Non
13	84	F	II	Rectum	Moyennement différencié	Non
14	84	M	II	Droit	Moyennement différencié	Non
15	92	F	IV	Droit	Moyennement différencié avec composante	Décès post-

					mucineuse	opératoire
16	85	M	IV	Droit	Moyennement différencié	Pas de suivi
17	76	M	IV	Droit	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Oui
18	67	M	III	Gauche	Moyennement différencié	Oui
19	45	F	IV	Rectum	Peu différencié	Oui
20	81	F	IV	Droit	Moyennement différencié	Décès post-opératoire

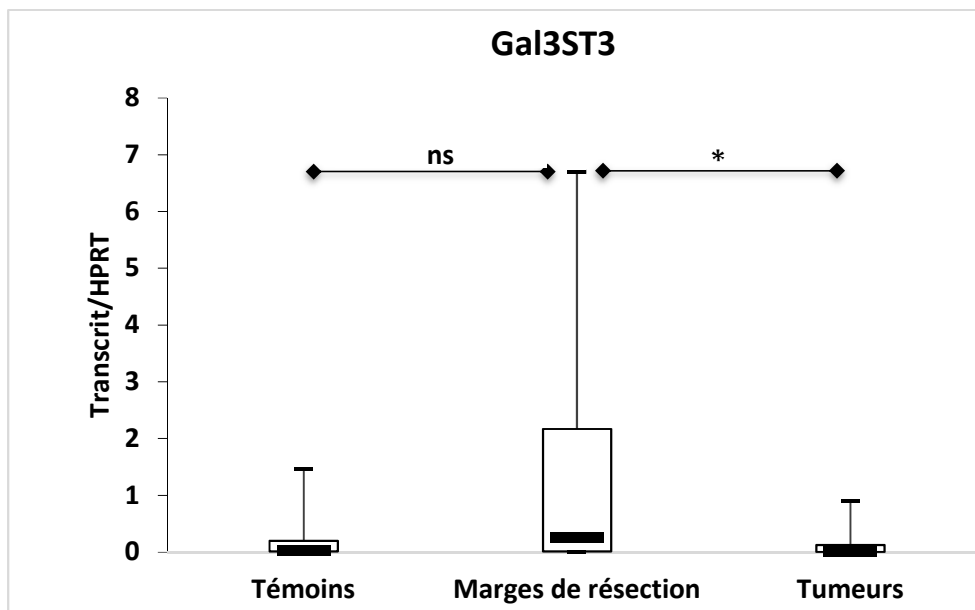
Patient	Age	Sexe	Localisation
1	70	M	Gauche
2	57	M	Gauche
3	57	F	Gauche
4	63	F	Gauche
5	44	F	Gauche
6	64	M	Gauche
7	50	M	Gauche
8	75	M	Gauche
9	79	F	Rectum
10	81	F	Gauche
11	47	F	Gauche

Les ARN de ces différents tissus ont été extraits et utilisés pour quantifier l'expression des gènes par qRT-PCR. Nous n'avons pas observé de différences significatives entre l'expression des différents gènes de sialyltransférases (*ST3GAL1*, *ST3GAL2*, *ST3GAL3*, *ST3GAL4* and *ST3GAL6*), de Gal-3-O-sulfotransférases (*GAL3ST2*, *GAL3ST3* and *GAL3ST4*) et de la core 3 synthétase entre les contrôles sains et la muqueuse des marges de résection (Figure 20). Les variations inter-individuelles sont importantes pour l'expression des différents gènes, à la fois dans les contrôles sains et la muqueuse des marges de résection. L'expression de tous les gènes de Gal-3-O-sulfotransférases et des gènes de sialyltransférases *ST3GAL3*, *ST3GAL4* et *ST3GAL6* est significativement diminuée dans les échantillons tumoraux par rapport aux marges de résection appariées, alors que l'expression des gènes *ST3GAL1*, *ST3GAL2* et de la core 3 synthétase n'est pas affectée (Figure 20). L'expression diminuée des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases pourrait expliquer la diminution du taux de sulfatation observée dans les tumeurs par rapport aux marges de résection et aux contrôles sains.



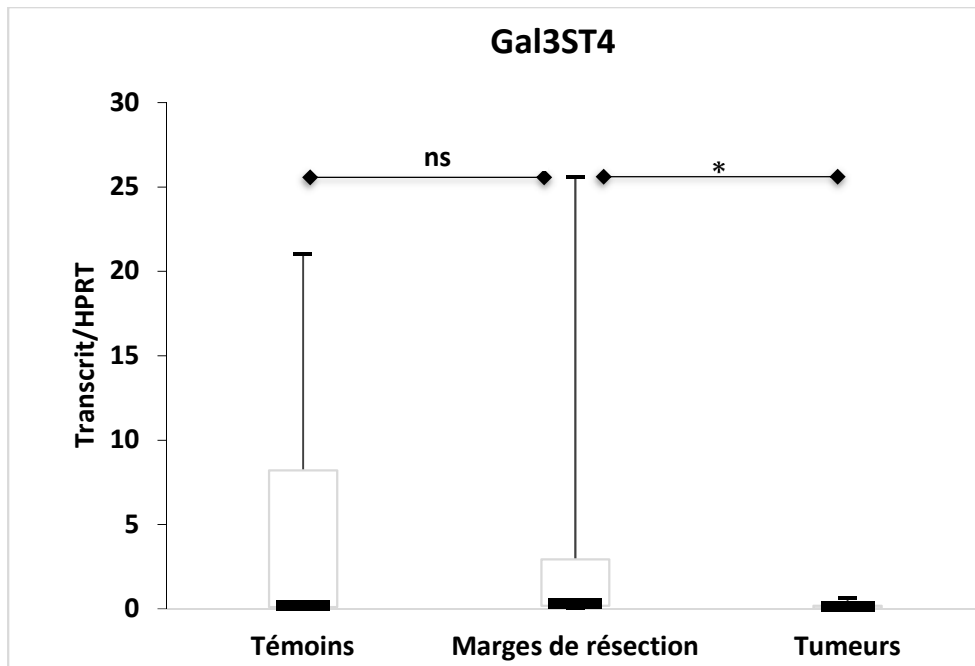
Témoins/marges de résection : ns ($p = 0,2963$)

Marges de résection /tumeurs : $p = 0.03878$



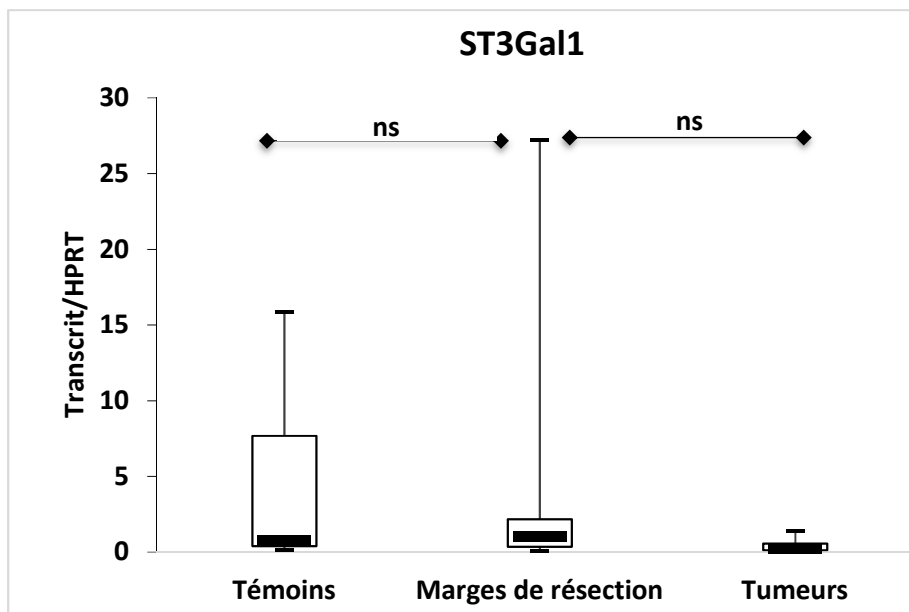
Témoins/marges de résection : ns ($p = 0,1138$)

Marges de résection /tumeurs : $p = 0,0544$



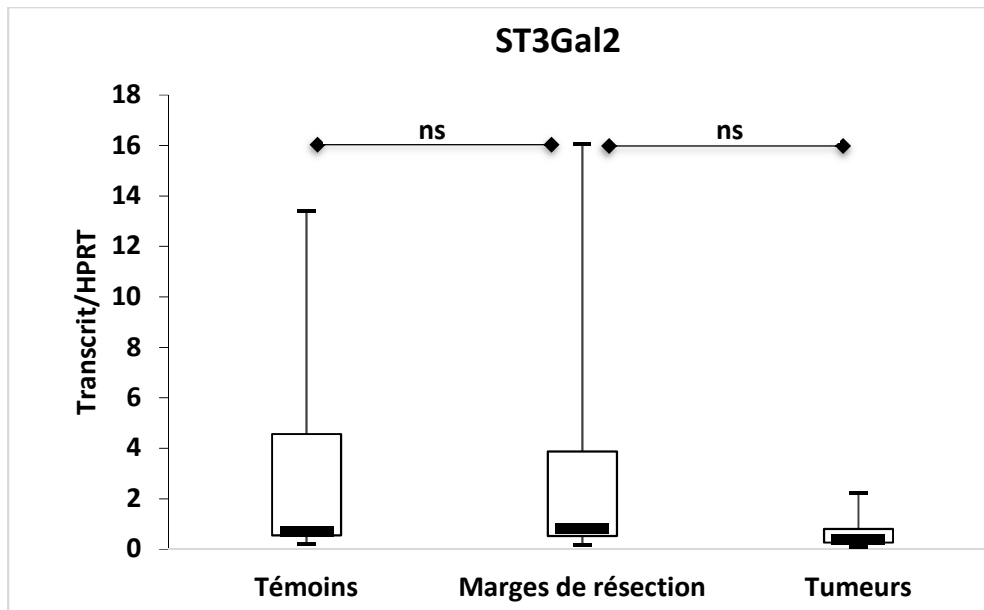
Témoins/marges de résection : ns ($p = 0,5968$)

Marges de résection /tumeurs : $p = 0,0364$



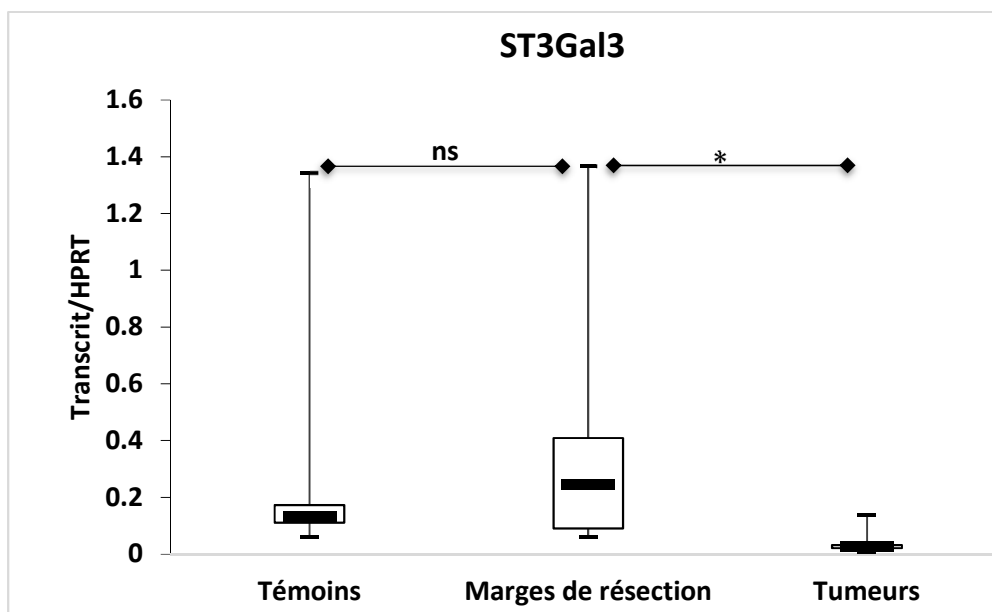
Témoins/marges de résection : ns ($p = 0,8027$)

Marges de résection /tumeurs : ns ($p = 0.0854$)



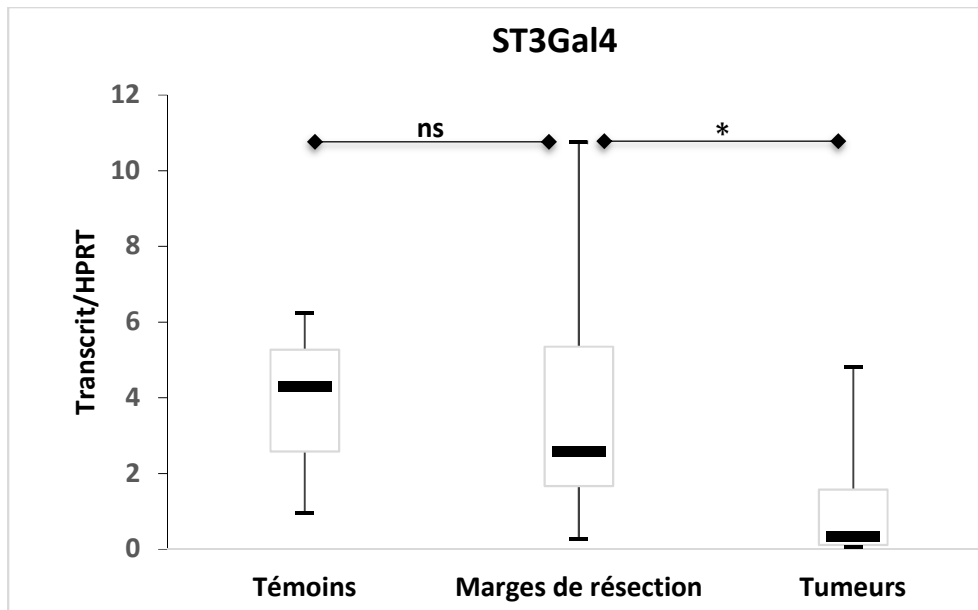
Témoins/marges de résection : ns ($p = 0,8354$)

Marges de résection /tumeurs : ns ($p = 0,091$)



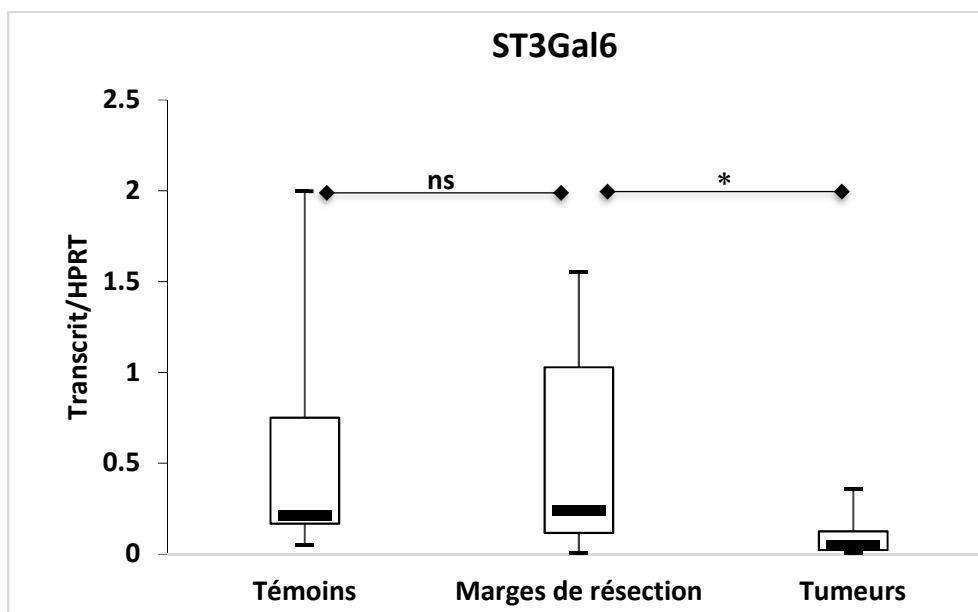
Témoins/marges de résection : ns ($p = 0,5265176$)

Marges de résection /tumeurs : **$p = 0,0050$**



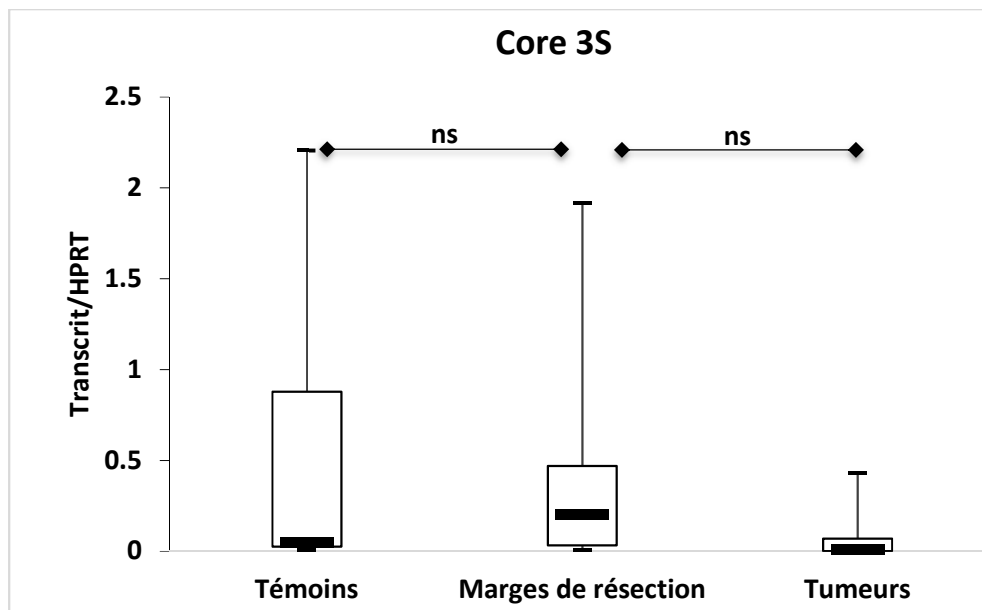
Témoins/marges de résection : ns ($p = 0,1196$)

Marges de résection /tumeurs : $p = 0,0297$



Témoins/marges de résection : ns ($p = 0,2930$)

Marges de résection /tumeurs : $p = 0,0123$



Témoins/marges de résection : ns ($p = 0.452$)

Marges de résection /tumeurs : ns ($p = 0.059$)

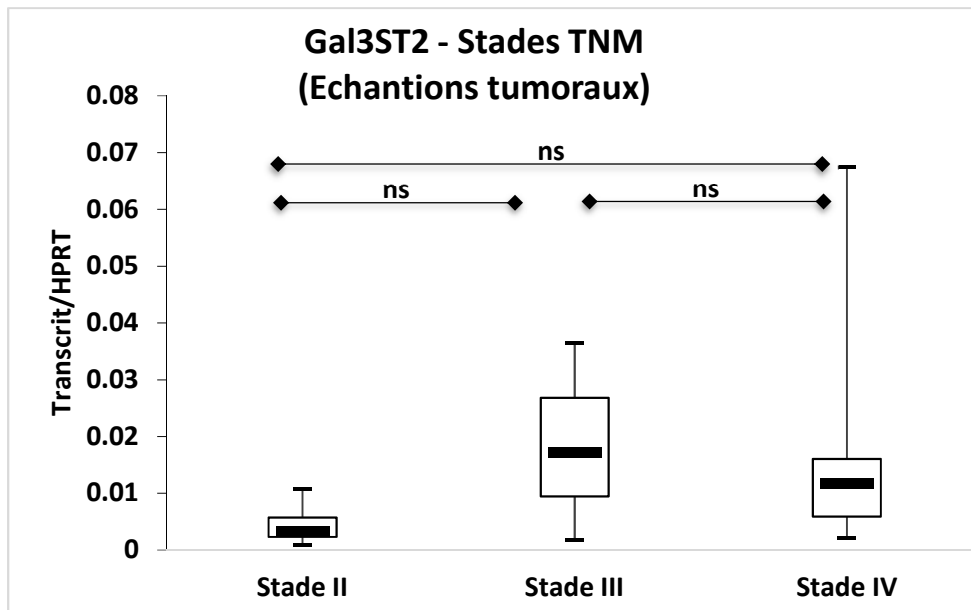
Figure 20. Expression des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases (*GAL3ST2*, *GAL3ST3*, *GAL3ST4*), d' α 2,3-sialyltransférases (*ST3GAL1*, *ST3GAL2*, *ST3GAL3*, *ST3GAL4*, *ST3GAL6*) et de la core 3 synthétase dans les tumeurs coliques, les marges de résection appariées ($n = 20$), et les contrôles sains ($n = 11$).

(* : $p < 0.05$; ns : non significatif)

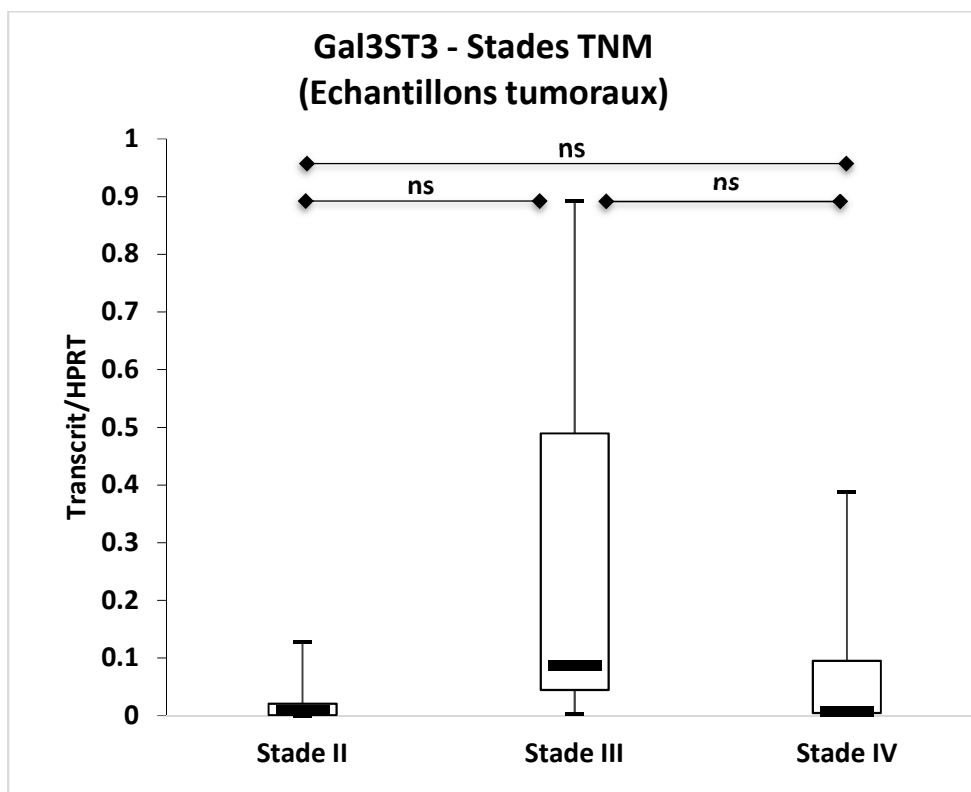
2.3. Comparaison de l'expression des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases, d' α 2,3-sialyltransférases et de la core 3 synthétase selon le stade TNM des tumeurs colorectales

Dans notre étude, 2 patients présentaient un cancer colorectal au stade I, 6 patients avaient un CCR de stade II, 4 patients avaient un CCR de stade III, et 8 avaient un CCR de stade IV.

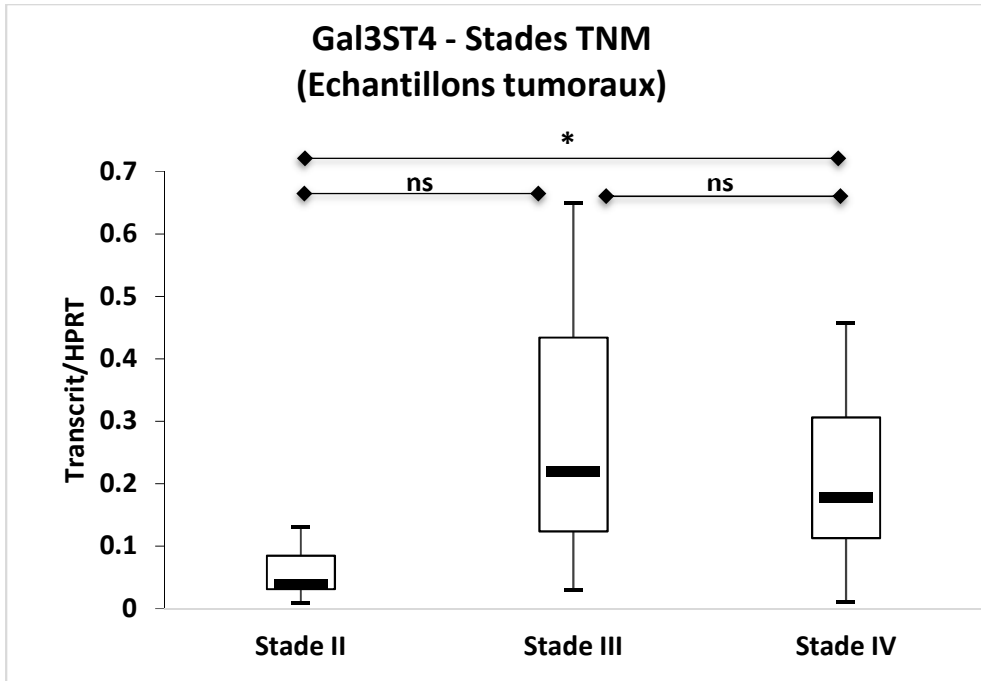
L'analyse par qPCR de l'expression des α 2,3-sialyltransférases, des Gal-3-O-sulfotransférases et de la core 3 synthétase dans les tumeurs de stades TNM 2, 3 et 4 démontre à nouveau une hétérogénéité prononcée entre les différents patients, mais aucune variation significative de l'expression de ces gènes entre les différents stades TNM (Figure 21).



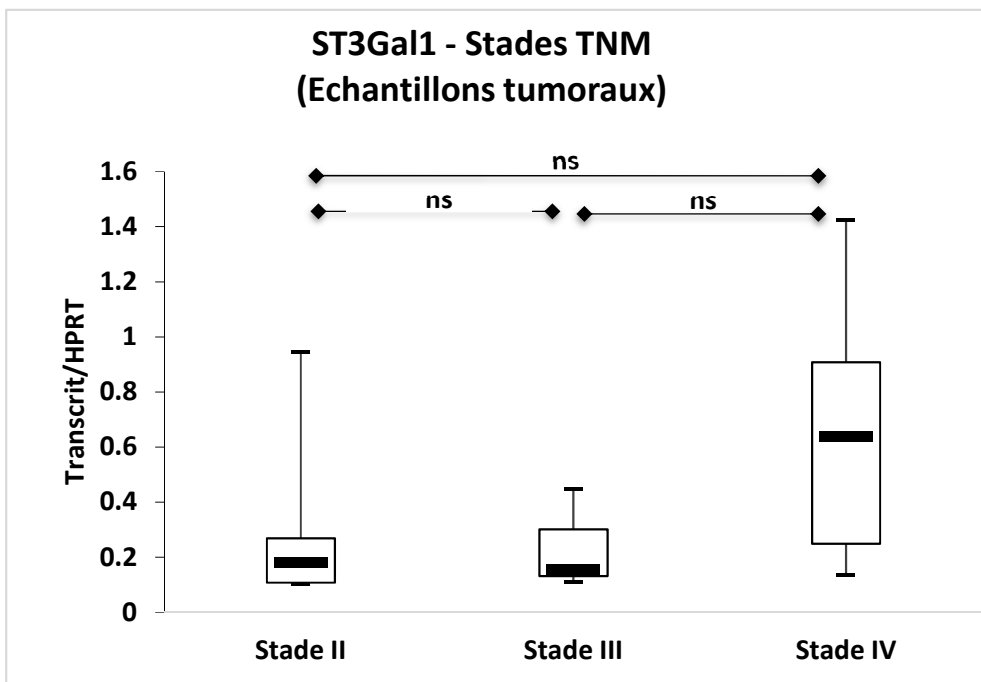
II/III : ns (p=0.297); II/IV: ns (p=0.168); III/IV: ns (p=0.966)



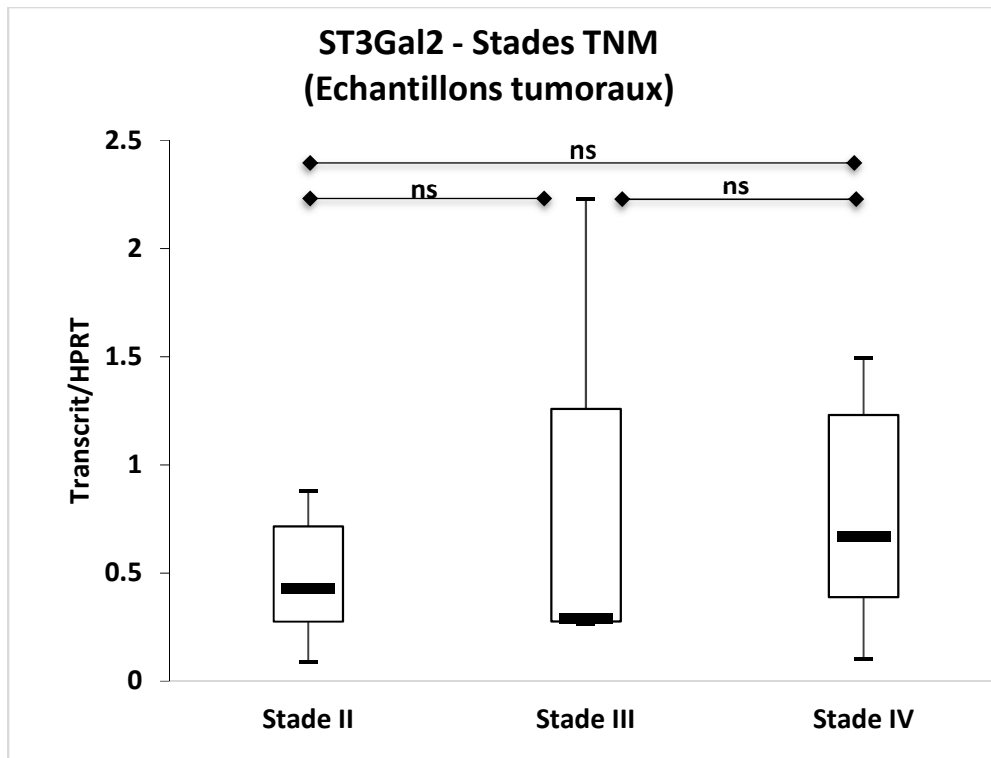
II/III : ns (p=0.402); II/IV: ns (p=0.389); III/IV: ns (p=0.492)



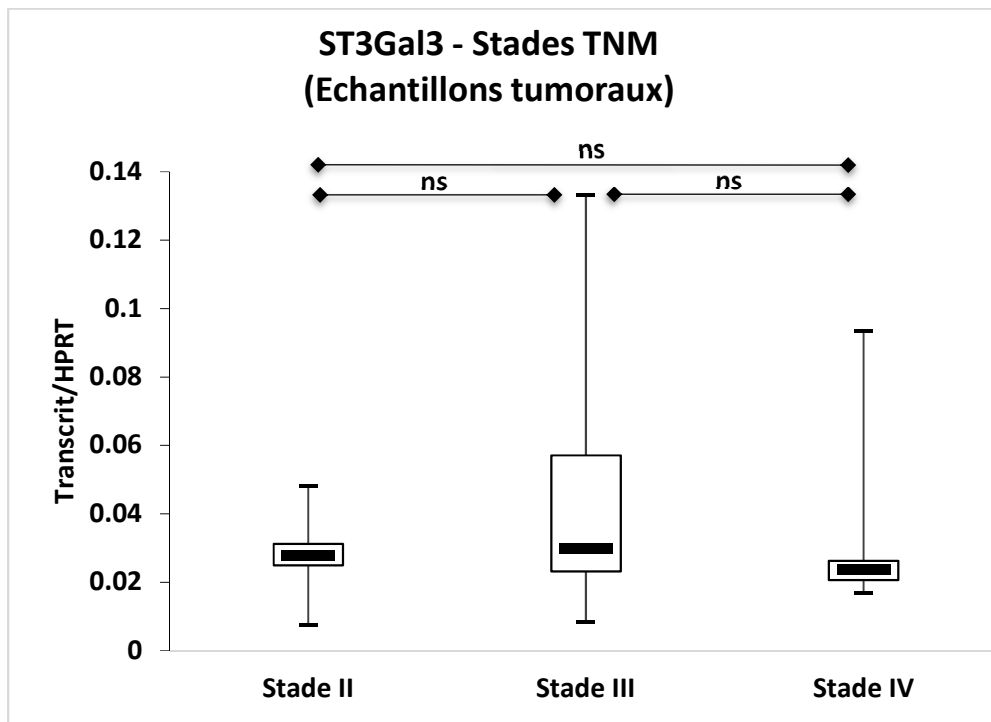
II/III : ns (p=0.319); II/IV: **p =0.053**; III/IV: ns (p=0.706)



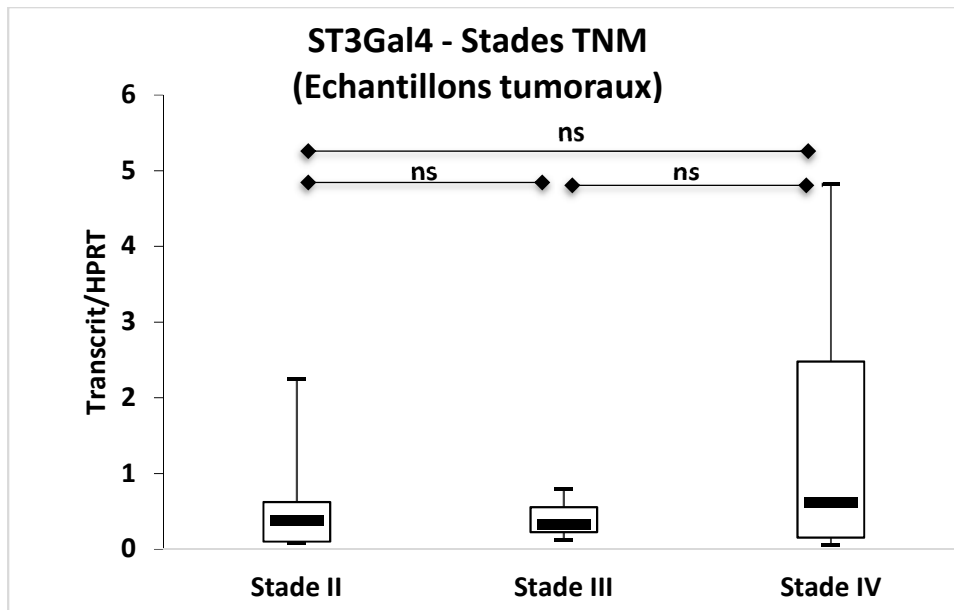
II/III : ns (p=0.725); II/IV: ns (p =0.213); III/IV: ns (p=0.147)



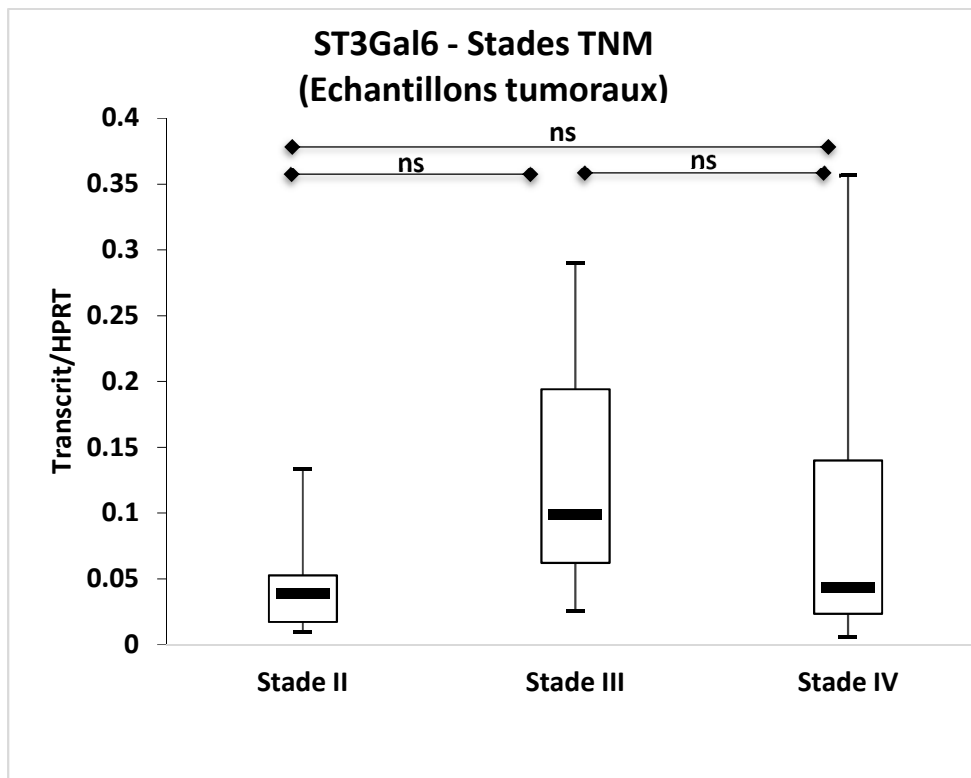
II/III : ns ($p=0.561$); II/IV: ns ($p=0.338$); III/IV: ns ($p=0.844$)



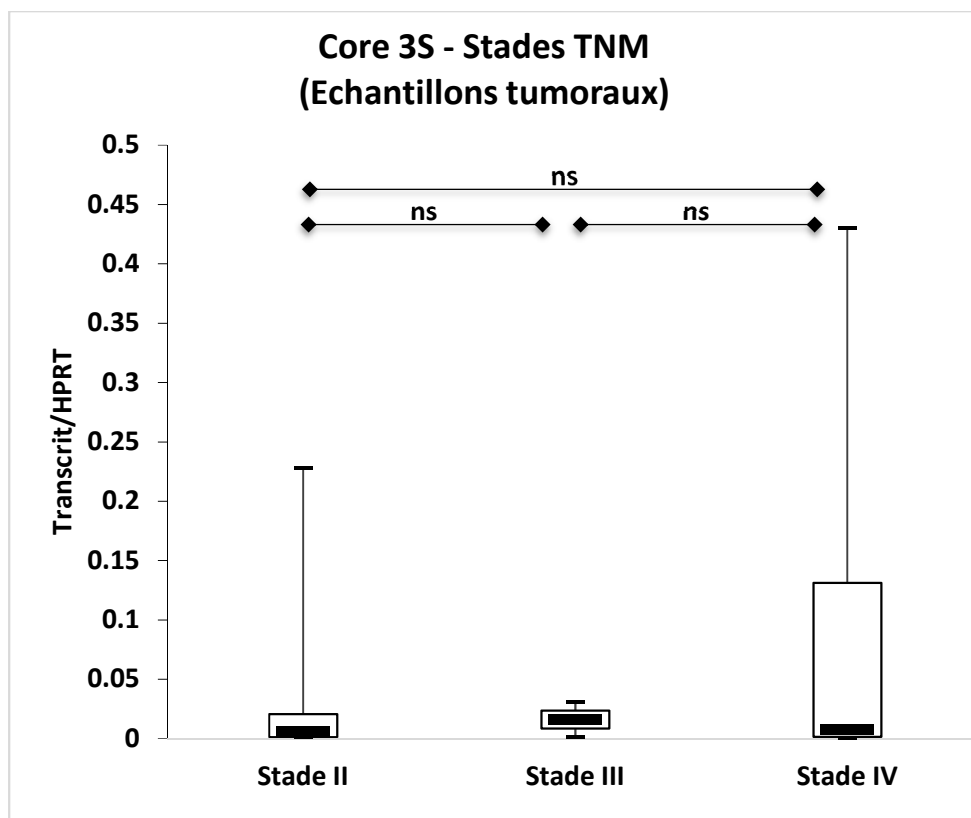
II/III : ns ($p=0.455$); II/IV: ns ($p=0.653$); III/IV: ns ($p=0.720$)



II/III : ns ($p=0.590$); II/IV: ns ($p=0.256$); III/IV: ns ($p=0.142$)



II/III : ns ($p=0.371$); II/IV: ns ($p=0.321$); III/IV: ns ($p=0.740$)



II/III : ns ($p=0.505$); II/IV: ns ($p=0.449$); III/IV: ns ($p=0.224$)

Figure 21. Expression des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases (*GAL3ST2*, *GAL3ST3*, *GAL3ST4*), d' α 2,3-sialyltransférases (*ST3GAL1*, *ST3GAL2*, *ST3GAL3*, *ST3GAL4*, *ST3GAL6*) et de la core 3 synthétase dans les tumeurs coliques de différents stades TNM ($n=2$ pour le stade 2 ; $n=4$ pour le stade 3 ; $n=8$ pour le stade 4).

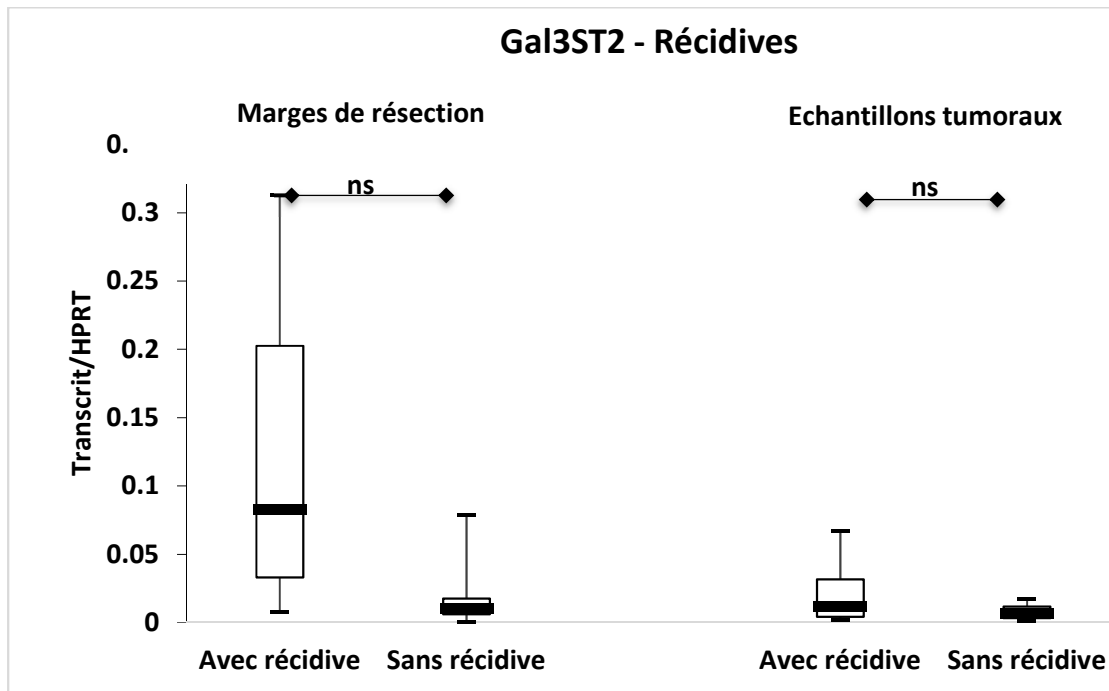
(* : $p<0.05$; ns : non significatif)

2.4. Comparaison de l'expression des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases, d' α 2,3-sialyltransférases et de la core 3 synthétase selon la récurrence.

Sur les 20 patients opérés de tumeurs colo-rectales utilisées dans cette étude, 6 patients ont récidivé moins de 5 ans après l'opération. Nous avons voulu déterminer s'il était possible d'utiliser le niveau d'expression de certaines glycosyl- ou sulfotransférases pour prédire cette récurrence.

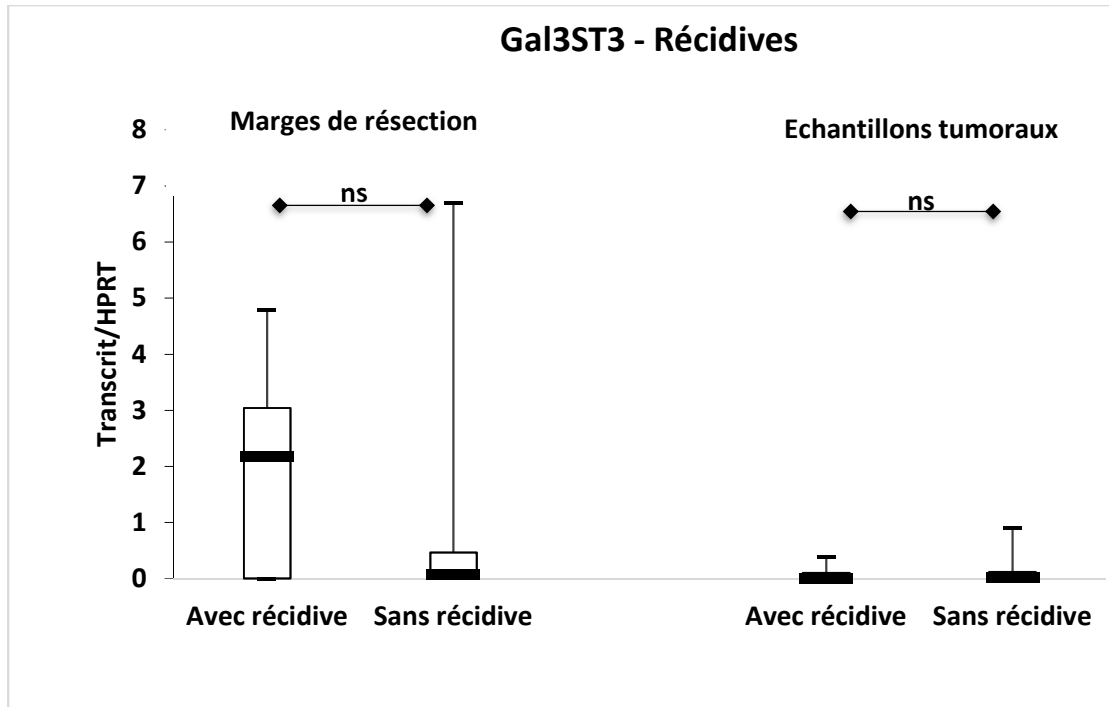
L'expression des gènes d' α 2,3-sialyltransférases, de Gal-3-O-sulfotransférases et de la Core 3 synthétase a été comparée dans les tumeurs qui ont récidivé ou non, ainsi que dans les marges de résection appariées. Les analyses réalisées par qPCR de l'expression de ces gènes dans les tumeurs ayant récidivé ou non, et dans leurs zones de résection appariées, n'ont

montré aucune différence significative d'expression entre les deux catégories de tumeurs et de zones de résection (Figure 22).



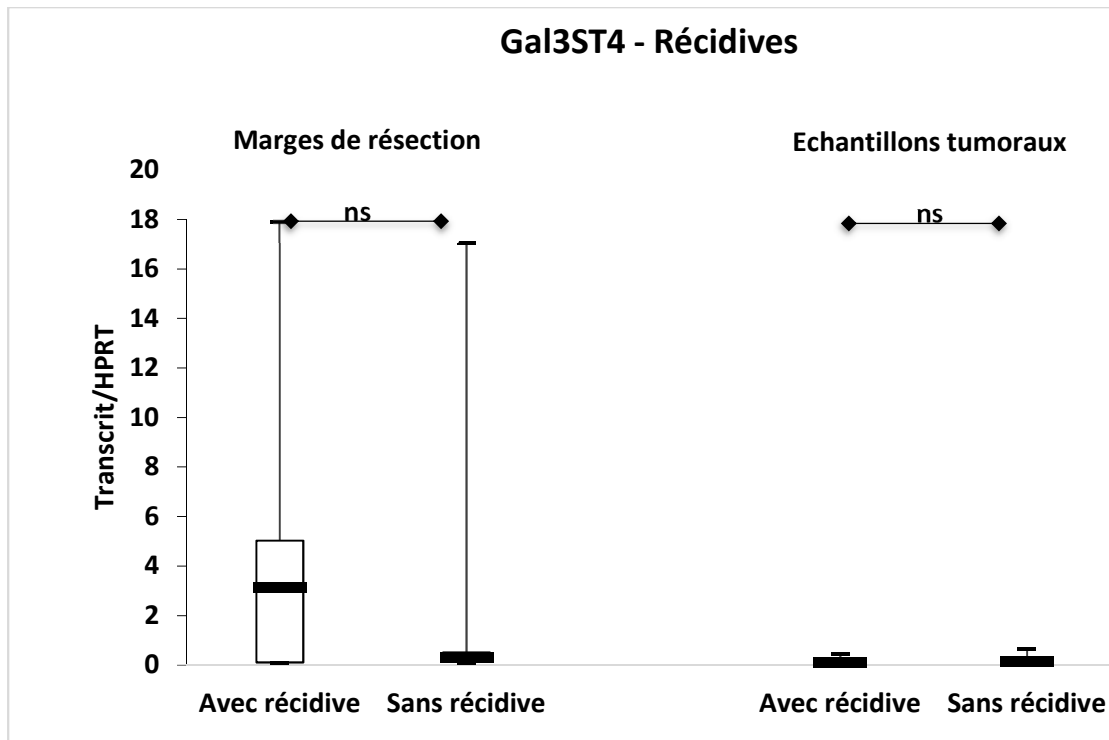
Marges de résection : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.130$)

Tumeurs : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.217$)



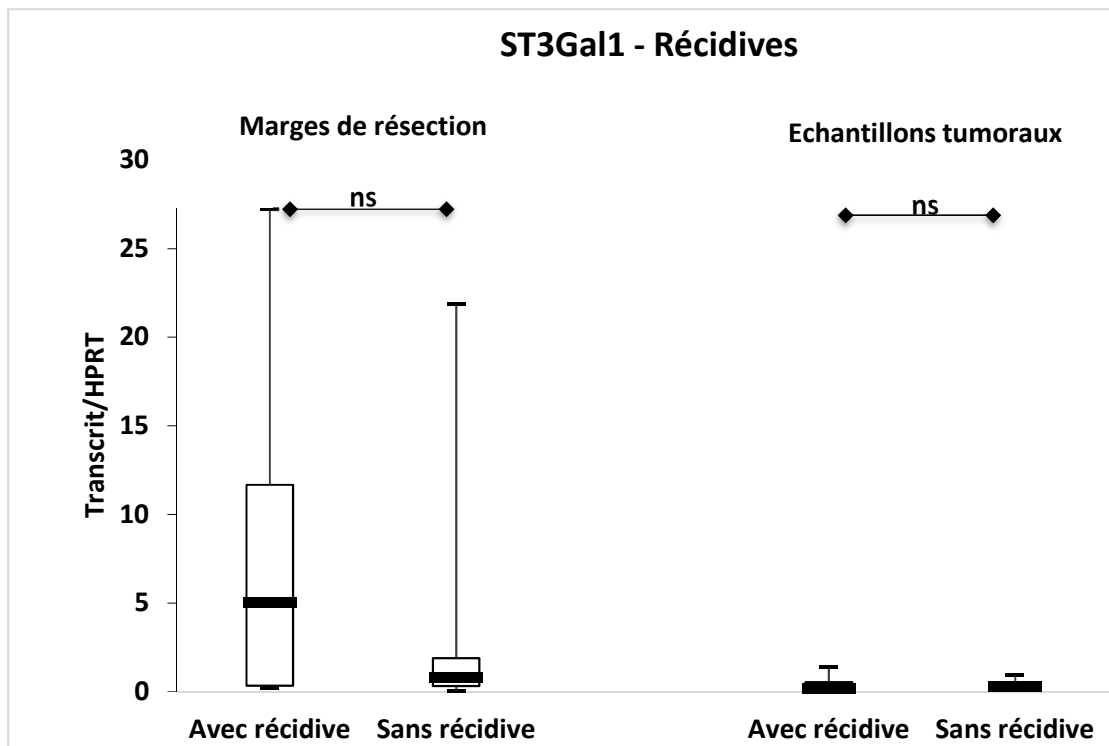
Marges de résection : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.764$)

Tumeurs : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.704$)



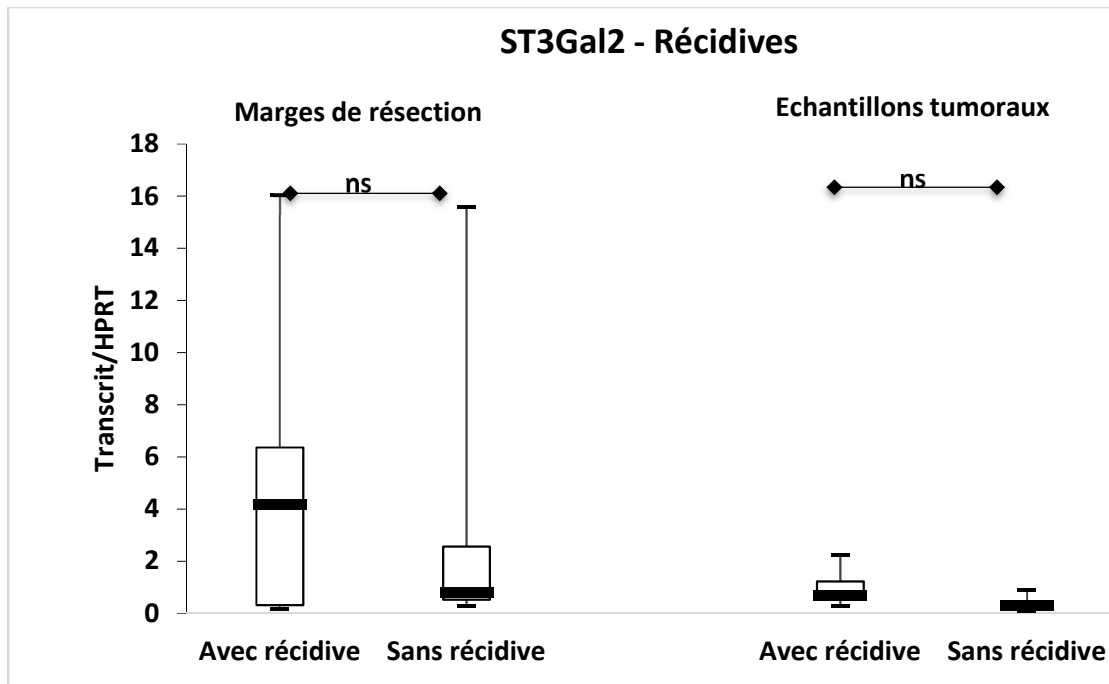
Marges de résection : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.472$)

Tumeurs : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.949$)



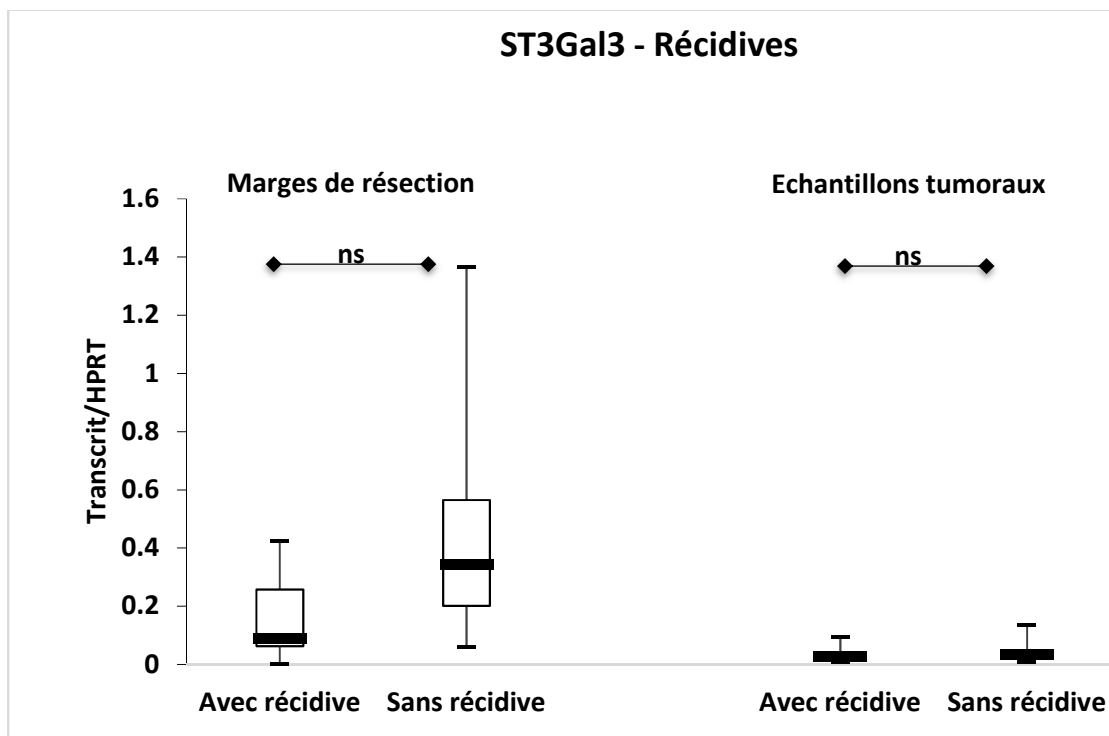
Marges de résection : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.347$)

Tumeurs : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.707$)



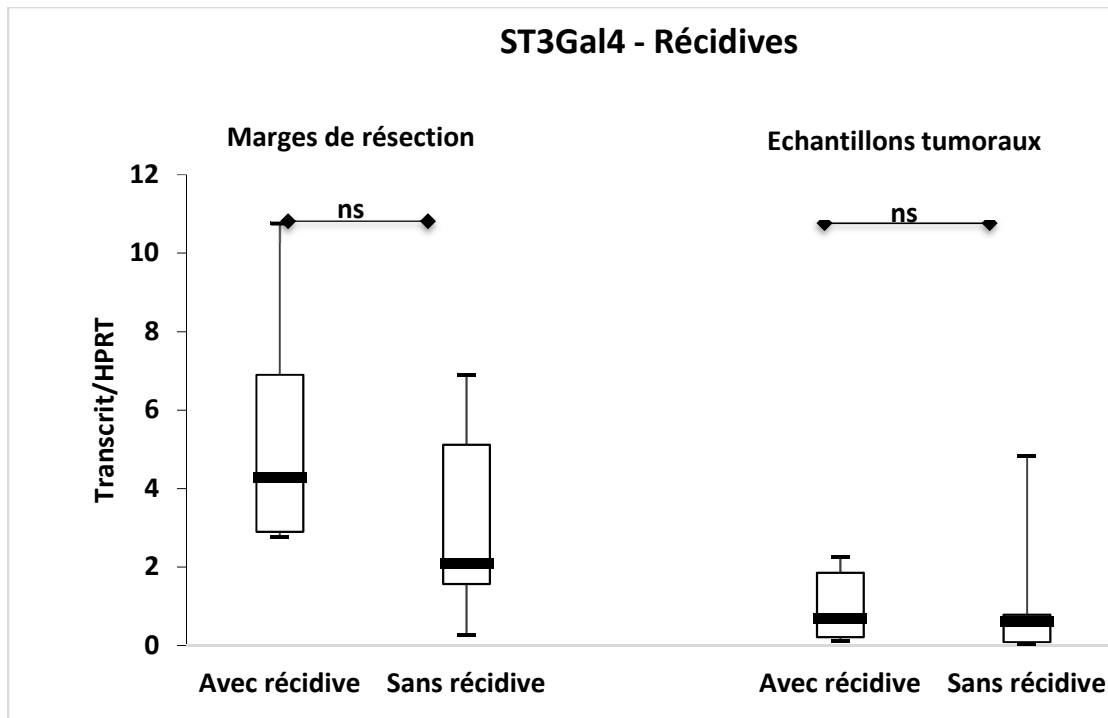
Marges de résection : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.165$)

Tumeurs : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.555$)



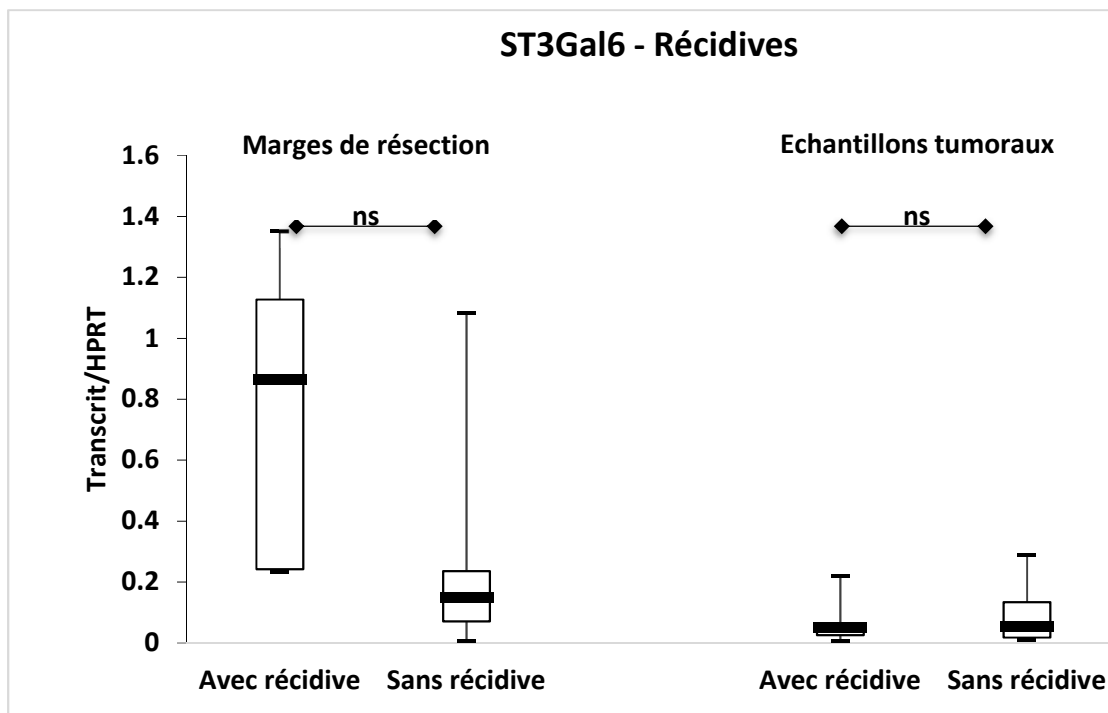
Marges de résection : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.191$)

Tumeurs : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.429$)



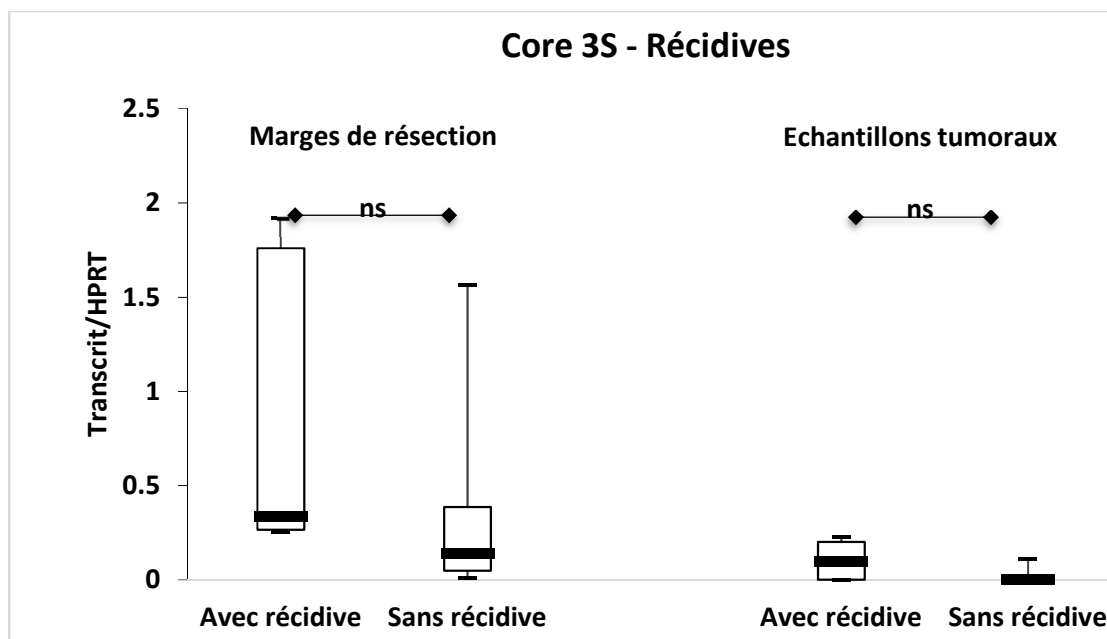
Marges de résection : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.294$)

Tumeurs : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.390$)



Marges de résection : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.104$)

Tumeurs : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.700$)



Marges de résection : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.262$)

Tumeurs : Récurrence/Sans récurrence : ns ($p = 0.254$)

Figure 22. Expression des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases (*GAL3ST2*, *GAL3ST3*, *GAL3ST4*), d' α 2,3-sialyltransférases (*ST3GAL1*, *ST3GAL2*, *ST3GAL3*, *ST3GAL4*, *ST3GAL6*) et de la core 3 synthétase dans les tumeurs coliques et les marges de résection provenant de patients ayant récidivé avant 5 ans ($n = 6$) ou pas ($n = 10$).

2.5. Conclusion de cette étude.

Nous avons montré que l'expression de tous les gènes de Gal-3-O-sulfotransférases est significativement et fortement diminuée dans les échantillons tumoraux par rapport aux marges de résection appariées, ce qui pourrait expliquer la diminution du taux de sulfatation observée dans les tumeurs par rapport aux marges de résection et aux contrôles sains.

L'expression du gène codant la Core 3 synthétase a tendance à diminuer dans les tumeurs par rapport aux marges de résection ($p = 0.059$), ce qui est en corrélation avec la diminution des structures glycaniques basées sur un core 3 dans les tumeurs coliques. Néanmoins, ces résultats devront être confirmés en incluant un plus grand nombre de patients. Une étude de l'expression de la Core 1 synthétase est en cours et semble nécessaire pour mieux comprendre la diminution des structures basées sur un core 3 et l'augmentation concomitante des structures basées sur un core 1 dans les mucines de tumeurs coliques.

Aucune différence significative d'expression des gènes étudiés n'a été détectée entre les marges de résection et les témoins sains, ni entre les tumeurs de différents stades TNM, ou entre les tumeurs ayant récidivé ou non. Une étude incluant un nombre de cas plus important est là aussi nécessaire pour confirmer les résultats obtenus.

3ème partie – Modifications d’expression et de localisation de DMBT1 (deleted in malignant brain tumor 1) dans le cancer colorectal

3.1. Démarche expérimentale

Afin de mieux appréhender le rôle de DMBT1 dans la carcinogenèse colique, nous avons décidé d’étudier son expression et sa localisation (1) dans des tumeurs colorectales, les muqueuses non-tumorales de voisinage et à distance ainsi que dans les adénomes, les métastases ganglionnaires et hépatiques quand elles étaient disponibles pour les mêmes patients, (2) dans différents polypes et leur muqueuse de voisinage appariée, et (3) au niveau de la muqueuse saine de patients opérés pour diverticulose colique et considérés comme témoins sains. Tous les patients ont été traités aux hôpitaux Saint Philibert et Saint Vincent du GHICL. Les informations les concernant sont résumées dans le tableau 12.

Les études ont été réalisées par immunohistochimie sur coupes de tissus fixées en paraffine avec anticorps mono- et polyclonal dirigés contre DMBT1. Nous avons ensuite cherché à corrélérer les données obtenues avec différents paramètres :

- pour les tumeurs : le stade TNM, la survie, l’état de différenciation des tumeurs, la présence ou non d’une composante mucineuse, la présence d’instabilités microsatellitaires, la survie.
- pour les polypes : le type et la taille du polype, le degré de différenciation (bas ou haut grade pour les adénomes)

Nous avons également comparé l’expression au niveau des adénomes des patients avec et sans cancer colique associé.

Pour les patients avec cancer pour lesquels nous disposons du tissu frais congelé, une comparaison entre l’expression de DMBT1 en immunohistochimie et l’expression de son gène par technique de RT-qPCR a été réalisée.

Tableau 12 : Caractéristiques cliniques des échantillons tumoraux (et de leur marge de résection appariée), polypes et témoins utilisés dans cette étude.

Echantillons tumoraux							
Patient	Age	Sexe	Stade TNM	Localisation	Etat de différenciation	Récidive	Tissu frais disponible
1	46	F	III	Droit	Peu différencié	Non	Oui
2	54	F	II	Droit	Moyennement différencié	Non	Oui
3	96	M	II	Transverse	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Oui	Oui
4*	69	M	IV	Droit	Moyennement différencié	Oui	Oui
5	63	F	II	Transverse	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Non	Oui
6	66	F	II	Droit	Bien différencié	Non	Oui
7*	81	F	III	Gauche	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Oui	Oui
8	80	M	IV	Droit	Peu différencié	Pas de suivi	Oui
9*	61	M	III	Gauche	Moyennement différencié	Non	Oui
10	66	M	IV	Droit	Mucineux	Non	Oui
11*	74	M	I	Rectum	Moyennement différencié	Non	Oui
12	73	M	I	Rectum	Mucineux	Non	Oui
13*	84	F	II	Rectum	Moyennement différencié	Non	Oui
14*	84	M	II	Droit	Moyennement différencié	Non	Oui
15*	92	F	IV	Droit	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Décès post-opératoire	Oui
16*	85	M	IV	Droit	Moyennement différencié	Pas de suivi	Oui
17	76	M	IV	Droit	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Oui	Oui
18	67	M	III	Gauche	Moyennement différencié	Oui	Oui
19	45	F	IV	Rectum	Peu différencié	Oui	Oui
20	81	F	IV	Droit	Moyennement différencié	Décès post-opératoire	Oui
21	84	M	II	Gauche	Moyennement différencié	Oui	Non
22	78	F	III	Droit	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Oui	Non
23	80	M	IV	Droit	Moyennement différencié	Oui	Non
24	81	F	III	Droit	Peu différencié	Oui	Non
25*	58	M	II	Gauche	Moyennement différencié	Non	Non
26*	66	M	II	Gauche	Moyennement différencié	Non	Non

27	52	F	II	Transverse	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Pas de suivi	Non
28	78	F	II	Droit	Moyennement différencié	Non	Non
29	75	M	IV	Droit	Moyennement différencié	Pas de suivi	Non
30	75	M	III	Rectum	Moyennement différencié	Non	Non
31	80	M	III	Droit	Mucineux	Non	Non
32	80	F	II	Rectum	Peu différencié	Pas de suivi	Non
33	78	M	I	Gauche	Bien différencié	Décès post-opératoire	Non
34	67	M	III	Gauche	Moyennement différencié	Non	Non
35	58	F	II	Gauche	Moyennement différencié	Non	Non
36	69	M	IV	Droit	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Non	Non
37	78	M	IV	Droit	Moyennement différencié	Non	Non
38	76	F	II	Gauche	Moyennement différencié	Non	Non
39	82	F	II	Gauche	Moyennement différencié	Oui	Non
40	72	F	II	Gauche	Bien différencié	Oui	Non
41	77	M	II	Gauche	Bien différencié avec composante mucineuse	Non	Non
42	82	M	IV	Gauche	Bien différencié avec composante mucineuse	Décès post-opératoire	Non
43	36	F	III	Gauche	Moyennement différencié	Non	Non
44	58	M	IV	Gauche	Bien différencié	Oui	Non
45	55	M	III	Gauche	Bien différencié avec composante mucineuse	Pas de suivi	Non
46*	81	M	II	Droit	Moyennement différencié	Pas de suivi	Non
47	58	M	IV	Rectum	Moyennement différencié	Non	Non
48*	55	F	III	Droit	Peu différencié	Non	Non
49	78	F	II	Droit	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Non	Non
50*	64	M	III	Gauche	Moyennement différencié	Décès post-opératoire	Non
51	44	M	I	Gauche	Moyennement différencié	Pas de suivi	Non
52	54	M	III	Droit	Bien différencié	Pas de suivi	Non
53	45	M	II	Gauche	Moyennement différencié	Oui	Non
54	67	M	III	Gauche	Moyennement différencié	Non	Non
55	79	M	III	Gauche	Moyennement différencié	Oui	Non
56	74	F	II	Droit	Moyennement différencié avec	Non	Non

						composante mucineuse		
57	86	F	III	Rectum	Peu différencié	Pas de suivi	Non	
58*	72	M	IV	Rectum	Moyennement différencié	Non	Non	
59	54	M	IV	Rectum	Bien différencié	Non	Non	
60	72	M	III	Droit	Moyennement différencié	Oui	Non	
61*	79	M	IV	Gauche	Moyennement différencié	Décès post-opératoire	Non	
62	72	M	IV	Gauche	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Non	Non	
63	72	M	II	Droit	Moyennement différencié	Non	Non	
64	69	F	IV	Gauche	Moyennement différencié	Décès post-opératoire	Non	
65*	72	M	III	Droit	Moyennement différencié	Oui	Non	
66	88	M	III	Droit	Peu différencié	Oui	Non	
67	55	M	III	Rectum	Moyennement différencié	Oui	Non	
68	46	M	II	Droit	Moyennement différencié avec composante mucineuse	Décès post-opératoire	Non	
69	70	M	I	Gauche	Bien différencié	Non	Non	
Echantillons polypes								
Patient	Age	Sexe	Taille (mm)	Localisation	Type de polype	Muqueuse saine de voisinage disponible		
4*	69	M	9	Droit	Adénome tubuleux de bas grade	Oui		
7*	81	F	2	Gauche	Adénome tubuleux de bas grade	Oui		
9*	61	M	19	Gauche	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui		
11*	74	M	3	Rectum	Adénome tubuleux de bas grade	Oui		
13*	84	F	6	Rectum	Adénome tubuleux de bas grade	Oui		
14*	84	M	16	Droit	Adénome tubuleux de bas grade	Oui		
15*	92	F	5	Droit	Adénome tubuleux de bas grade	Oui		
16*	85	M	9	Droit	Adénome tubuleux de bas grade	Oui		
25*	58	M	11	Gauche	Adénome tubuleux de bas grade	Oui		
26*	66	M	6	Gauche	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui		
46*	81	M	3	Droit	Adénome vilieux de bas grade	Oui		
48*	55	F	3	Droit	Adénome tubuleux de bas grade	Oui		
50*	64	M	10	Gauche	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui		
58*	72	M	11	Rectum	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui		
61*	79	M	10	Gauche	Adénome tubuleux de	Oui		

					bas grade	
65*	72	M	6	Droit	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
70	79	F	14	Droit	Adénome tubulovilleux avec foyer d'ADK intramucueux	Non
71	84	F	35	Rectum	Adénome tubulovilleux avec foyer d'ADK intramucueux	Oui
72	60	M	15	Gauche	Adénome tubulovilleux avec foyer d'ADK intramucueux	Non
73	87	F	11	Gauche	Adénome tubulovilleux avec foyer d'ADK intramucueux	Oui
74	77	M	20	Droit	Adénome vilieux avec foyer d'ADK intramucueux	Non
75	60	F	15	Droit	Adénome vilieux avec foyer d'ADK intramucueux	Oui
76	71	F	10	Gauche	Adénome vilieux avec foyer d'ADK intramucueux	Oui
77	102	F	20	Rectum	Adénome vilieux avec foyer d'ADK intramucueux	Oui
78	56	F	25	Rectum	Adénome vilieux avec foyer d'ADK intramucueux	Oui
79	78	M	15	Gauche	Adénome vilieux avec foyer d'ADK intramucueux	Oui
80	72	M	15	Gauche	Adénome tubuleux de bas grade	Oui
81	57	M	10	Gauche	Adénome tubuleux de bas grade	Oui
82	60	M	15	Droit	Adénome tubulovilleux de haut grade	Oui
83	72	F	16	Gauche	Adénome tubulovilleux de haut grade	Oui
84	43	M	18	Gauche	Adénome tubulovilleux de haut grade	Oui
85	71	M	14	Gauche	Adénome tubulovilleux de haut grade	Oui
86	80	M	40	Gauche	Adénome tubulovilleux de haut grade	Oui
87	58	F	17	Gauche	Adénome tubulovilleux de haut grade	Non
88	62	M	21	Gauche	Adénome tubulovilleux de haut grade	Oui
89	49	M	10	Gauche	Adénome tubulovilleux de haut grade	Oui
90	59	F	10	Gauche	Adénome tubulovilleux de haut grade	Non
91	47	M	25	Rectum	Adénome vilieux de haut grade	Oui

92	67	M	17	Droit	Adénome vilieux de haut grade	Non
93	61	M	12	Droit	Adénome vilieux de haut grade	Oui
94	79	M	50	Droit	Adénome vilieux de haut grade	Oui
95	62	M	20	Gauche	Adénome vilieux de haut grade	Oui
96	63	M	20	Gauche	Adénome tubuleux de bas grade	Oui
97	65	F	12	Transverse	Adénome tubuleux de bas grade	Non
98	64	M	12	Droit	Adénome tubuleux de bas grade	Non
99	70	M	17	Gauche	Adénome tubuleux de bas grade	Oui
100	61	M	9	Gauche	Adénome tubuleux de bas grade	Non
101	80	M	20	Gauche	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
102	56	M	20	Rectum	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
103	50	M	10	Rectum	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
104	86	F	12	Droit	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
105	57	M	12	Gauche	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
106	83	M	10	Droit	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
107	64	F	20	Gauche	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
108	49	F	20	Rectum	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
109	56	M	15	Gauche	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
110	82	M	11	Droit	Adénome tubulovilleux de bas grade	Non
111	76	F	12	Gauche	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
112	56	M	25	Gauche	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
113	60	M	10	Gauche	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
114	59	M	10	Non renseigné	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
115	76	M	11	Rectum	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
116	75	M	20	Gauche	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
117	56	M	20	Rectum	Adénome tubulovilleux de bas grade	Oui
118	72	M	11	Gauche	Adénome vilieux de bas grade	Oui
119	58	F	20	Gauche	Adénome vilieux de bas grade	Oui
120	61	M	10	Gauche	Adénome vilieux de bas grade	Oui

					grade	
121	75	M	20	Rectum	Adénome vilieux de bas grade	Oui
122	58	M	17	Non renseigné	Adénome festonné traditionnel	Oui
123	80	F	22	Gauche	Adénome festonné traditionnel	Oui
124	74	M	7	Droit	Adénome festonné traditionnel	Oui
125	45	M	8	Non renseigné	Polype hyperplasique	Non
126	52	M	10	Gauche	Polype hyperplasique	Oui
127	59	M	11	Rectum	Polype hyperplasique	Non
128	51	M	15	Gauche	Polype hyperplasique	Non
129	56	M	8	Rectum	Polype hyperplasique	Oui
130	44	F	10	Gauche	Polype hyperplasique	Oui
131	73	M	4	Gauche	Polype hyperplasique	Oui
132	45	F	6	Gauche	Polype hyperplasique	Oui
133	56	M	12	Gauche	Polype hyperplasique	Oui
134	43	M	7	Gauche	Polype hyperplasique	Oui
135	56	F	8	Droit	Polype hyperplasique	Oui
136	57	F	7	Rectum	Polype hyperplasique	Oui
137	77	F	2	Non renseigné	Polype hyperplasique	Oui
138	68	F	9	Gauche	Polype hyperplasique	Non
139	55	F	2	Rectum	Polype hyperplasique	Oui
140	72	M	10	Gauche	Polype hyperplasique	Oui
141	54	M	10	Droit	Polype hyperplasique	Oui
142	75	M	10	Rectum	Polype hyperplasique	Oui
143	74	M	10	Gauche	Polype hyperplasique	Oui
144	59	M	15	Gauche	Polype mixte	Oui
145	80	F	13	Gauche	Polype mixte	Oui
146	45	M	12	Gauche	Polype mixte	Oui
147	62	F	11	Droit	Adénome/polype sessile festonné	Oui
148	49	M	15	Gauche	Adénome/polype sessile festonné	Non
149	53	M	10	Transverse	Adénome/polype sessile festonné	Oui
150	80	M	8	Droit	Adénome/polype sessile festonné	Oui
151	51	M	10	Droit	Adénome/polype sessile festonné	Oui
152	64	M	9	Transverse	Adénome/polype sessile festonné	Oui
153	57	M	19	Transverse	Adénome/polype sessile festonné	Oui
154	51	F	12	Droit	Adénome/polype sessile festonné	Non
Echantillons témoins						
Patient	Age	Sexe	Localisation	Tissu frais disponible		
1	70	M	Gauche	Oui		
2	57	M	Gauche	Oui		
3	57	F	Gauche	Oui		
4	63	F	Gauche	Oui		
5	44	F	Gauche	Oui		

6	64	M	Gauche	Oui
7	50	M	Gauche	Oui
8	75	M	Gauche	Oui
9	79	F	Rectum	Oui
10	81	F	Gauche	Oui
11	47	F	Gauche	Oui
12	46	F	Gauche	Non
13	73	M	Gauche	Non
14	67	F	Gauche	Non
15	60	F	Gauche	Non
16	73	M	Gauche	Non
17	79	F	Gauche	Non
18	40	M	Gauche	Non
19	49	F	Gauche	Non
20	55	M	Gauche	Non
21	67	F	Gauche	Non
22	77	M	Gauche	Non
23	67	F	Gauche	Non
24	53	M	Gauche	Non
25	61	M	Gauche	Non
26	66	F	Gauche	Non
27	46	F	Gauche	Non

Les patients avec * disposent à la fois d'une lésion tumorale et d'un polype.

ADK = adénocarcinome ; la localisation sigmoïdienne a été assimilée au côlon gauche et celle recto-sigmoïdienne au rectum.

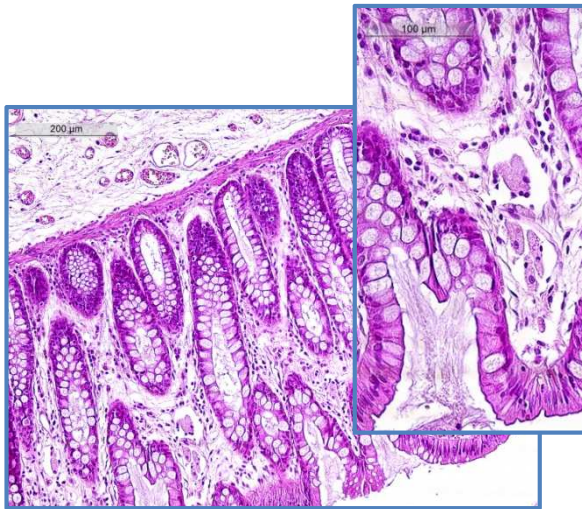
3.2. Expression et localisation de DMBT1

3.2.1. Expression et localisation de DMBT1 dans les côlons sains

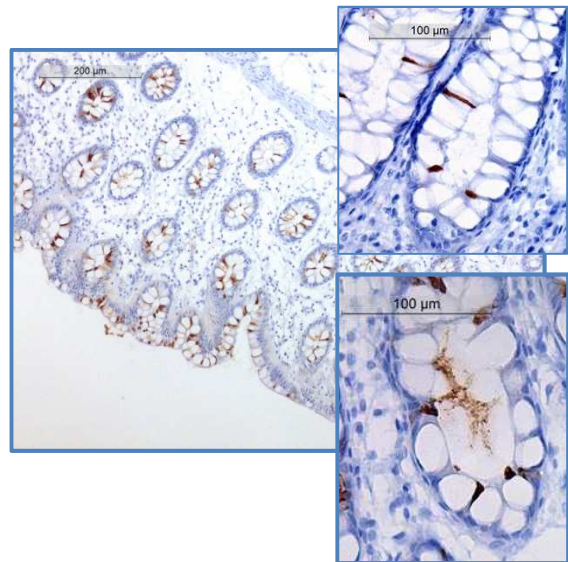
L'expression de DMBT1 au niveau de la muqueuse colique a été évaluée de manière semi-quantitative et exprimée sous la forme de % de cellules marquées par rapport au volume cellulaire total comme indiqué dans le chapitre « Matériels et méthodes ». Elle est relativement faible dans les côlons sains, la moyenne calculée pour 27 patients choisis comme témoins étant de 19%. Les témoins sont des patients opérés pour diverticulose colique avec ou sans diverticulite associée, et un cas de prolapsus rectal. Les prélèvements ont été effectués au niveau des berges chirurgicales. L'âge moyen des témoins était de 61 ans.

Histologiquement la muqueuse colique est revêtue en surface et au niveau des cryptes par un épithélium muco-sécrétant fait majoritairement de cellules caliciformes, avec quelques entérocytes intercalés visibles sur la coloration standard HES (Figure 23a). L'expression de la protéine DMBT1 au niveau de cet épithélium se fait de plusieurs façons : soit au niveau du

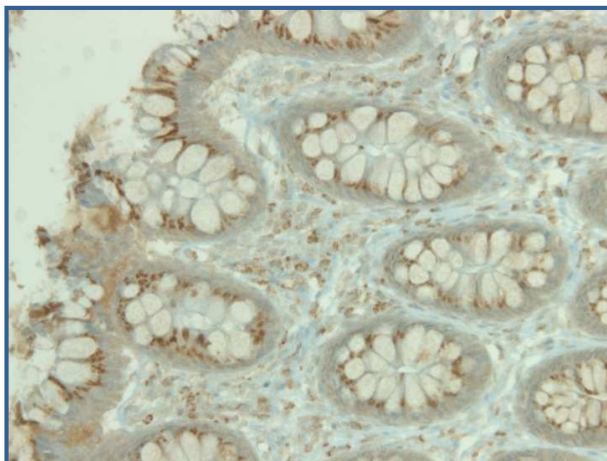
cytoplasme des entérocytes intercalés entre les cellules caliciformes au niveau des cryptes mais aussi au niveau de l'épithélium de surface (Figure 23b), soit elle s'exprime en position supra-nucléaire au niveau de toutes les cellules (Figure 23c). Parfois on détecte un marquage cytoplasmique au sein des cellules caliciformes avec, pour certaines cellules, un marquage au niveau des vacuoles du mucus (Figure 23d). Pour certains cas le marquage hétérogène, avec focalement des zones fortement marquées comme dans la figure 23d.



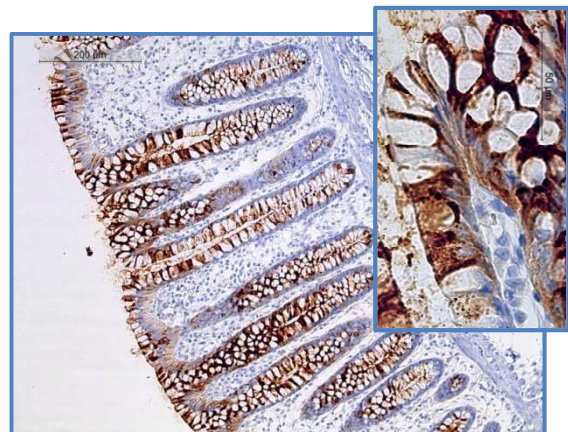
23a. Muqueuse colique histologiquement normale (HES 100x, 200x).



23b. Marquage avec DMBT1 monoclonal – cellules entérocytaires marquées en surface et au niveau des cryptes (100x, 400x haut droite), avec parfois du mucus intra-luminal (200x bas droite).



23c. Marquage avec DMBT1 polyclonal – marquage entérocytaire cytoplasmique au niveau des cryptes et supra-nucléaire au niveau des cellules caliciformes superficielles (200x).

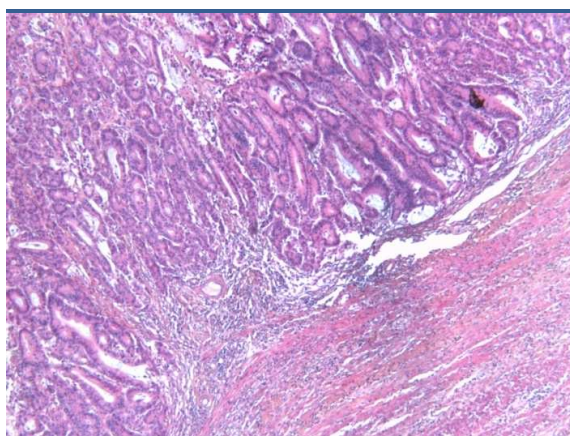


23d. Marquage avec DMBT1 monoclonal – marquage au niveau du cytoplasme des cellules caliciformes (100x, 400x).

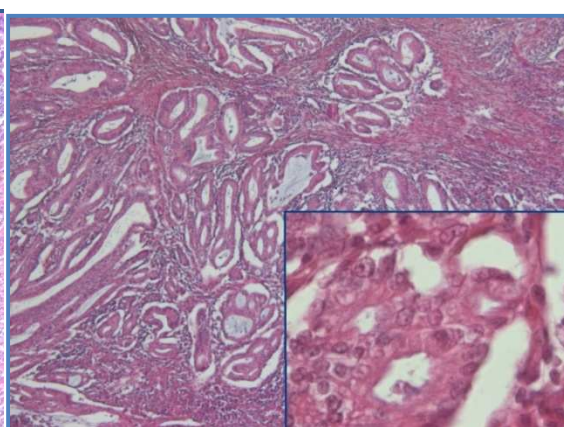
Figure 23. Immunolocalisation de DMBT1 dans la muqueuse colique normale.

3.2.2. Expression et localisation de DMBT1 dans les tumeurs coliques

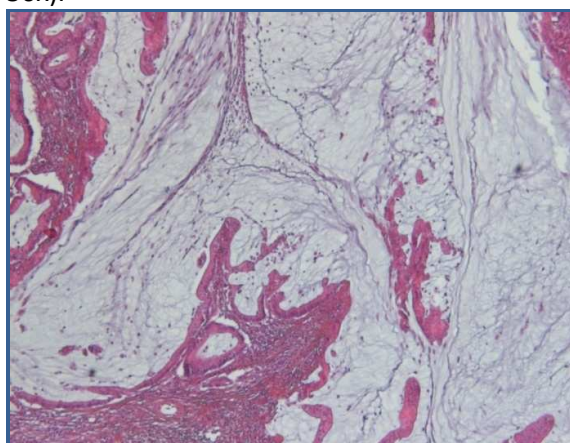
Les groupes histologiques des tumeurs de notre série étaient l'adénocarcinome colique bien différencié (7 cas, Figure 24a), moyennement différencié (37 cas, Figure 24b), bien ou moyennement différencié avec composante mucineuse minoritaire (de moins de 50%) (15 cas, Fig. 24c), l'adénocarcinome mucineux (8 cas) et l'adénocarcinome peu différencié (8 cas, Figure 24d).



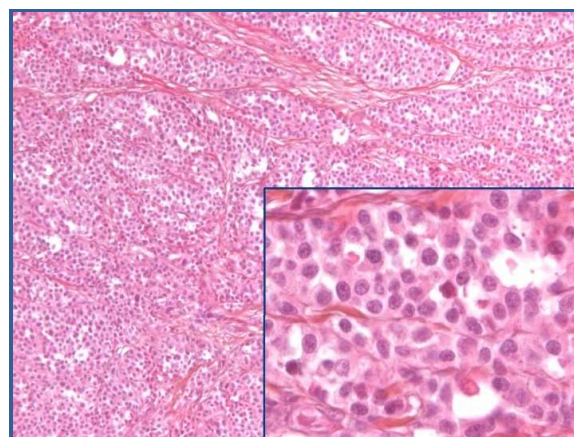
24a. Adénocarcinome bien différencié (HES 50x).



24b. Adénocarcinome moyennement différencié (HES 50x, 400x).



24c. Adénocarcinome moyennement différencié avec la composante mucineuse (HES, 50x).

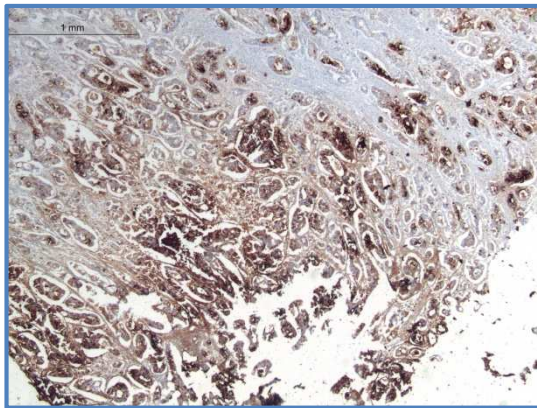


24d. Adénocarcinome peu différencié (HES 100x, 400x).

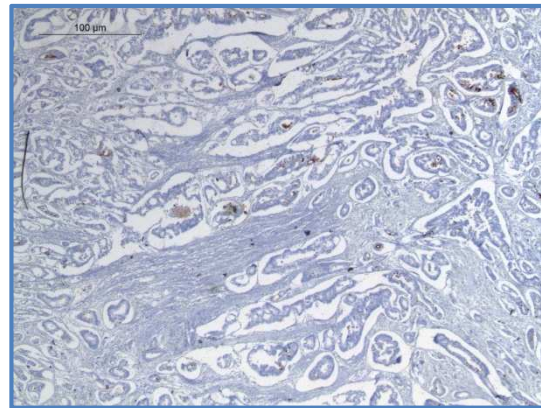
Figure 24. Coloration HES de coupes de tumeurs coliques provenant des différents groupes histologiques.

L'expression de DMBT1 a été étudiée dans les tumeurs coliques présentant les différents types histologiques décrits précédemment. L'expression de DMBT1 au niveau tumoral était souvent hétérogène même au sein de la même tumeur, avec des zones plus exprimées que

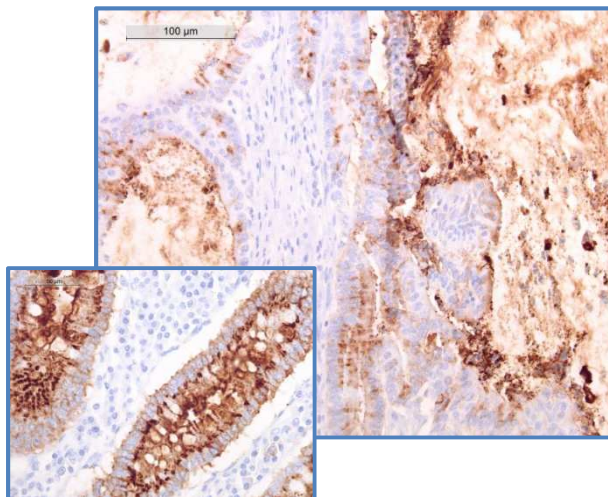
d'autres (Figure 25). Aucune corrélation n'a pu être faite entre la localisation de la protéine et les différents groupes histologiques. Nous avons observé des cellules exprimant DMBT1 de façon diffuse au niveau de tout le cytoplasme, d'autres avec des marquages ou renforcements supranucléaires ou alors un marquage ponctiforme non systématisé autour des noyaux, trahissant la perte de polarité de la cellule tumorale (Figure 26).



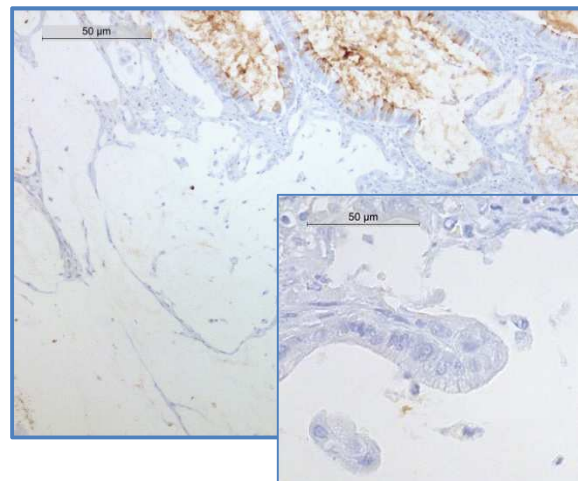
25a. Marquage avec DMBT1 monoclonal : Adénocarcinome moyennement différencié (25x) : zone fortement marquée.



25b. Marquage avec DMBT1 monoclonal : Adénocarcinome moyennement différencié (25x) : zone peu marquée (la même tumeur que 25a).

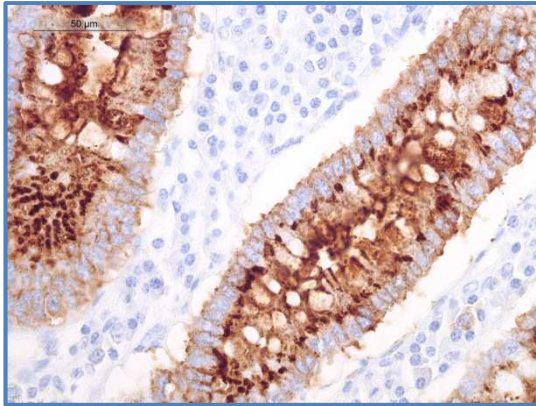


25c. Marquage avec DMBT1 monoclonal : Adénocarcinome moyennement différencié avec composante mucosécrétante (200x, 400x) : marquage cytoplasmique plus ou moins exprimé au niveau des cellules avec marquage au niveau du mucus extracellulaire.

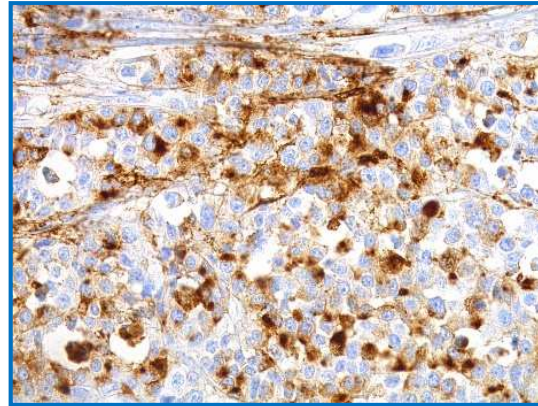


25d. Marquage avec DMBT1 monoclonal : Adénocarcinome moyennement différencié avec composante mucosécrétante (200, 400x) : zone avec expression moins importante cytoplasmique et au niveau du mucus extracellulaire (la même tumeur que 25c).

Figure 25. Expression hétérogène de DMBT1 au sein des tumeurs.



26a. Marquage avec DMBT1 monoclonal : Adénocarcinome moyennement différencié avec composante mucosécrétante (400x) marquage cytoplasmique et au niveau du mucus intra-cytoplasmique avec renforcement supranucléaire.



26b. Marquage avec DMBT1 monoclonal : Adénocarcinome peu différencié (400x) : marquage cytoplasmique non systématisé autour des noyaux.

Figure 26. Immunolocalisation hétérogène de DMBT1 au niveau des cellules tumorales des différentes tumeurs.

Le niveau d'expression de DMBT1 au niveau tumoral était lui aussi variable d'une tumeur à l'autre. Le pourcentage global d'expression variait de 0% à 93%, avec une moyenne de 27%. De même, au niveau du front d'invasion on observe une expression variable entre 0 et 98%, avec une moyenne de 17%. Cette différence d'expression entre la tumeur dans sa globalité et le front d'invasion est statistiquement significative ($< 0,0001$). Le pourcentage de cellules tumorales marquées par rapport à la globalité de cellules tumorales a été calculé pour chaque cas. 5 groupes différents ont été constitués, correspondant respectivement à 0-5%, 6-25%, 26-50%, 51-75% et 76-100%. Nous avons ensuite calculé le pourcentage de cas dans chacun des groupes (Figure 27). La figure 27 nous montre que la répartition est très variable (Fig. 27a), avec une forte diminution vers le front d'invasion (Fig. 27b) et une augmentation au sein de la composante mucineuse des tumeurs, avec une moyenne de 64% (Fig. 27c).

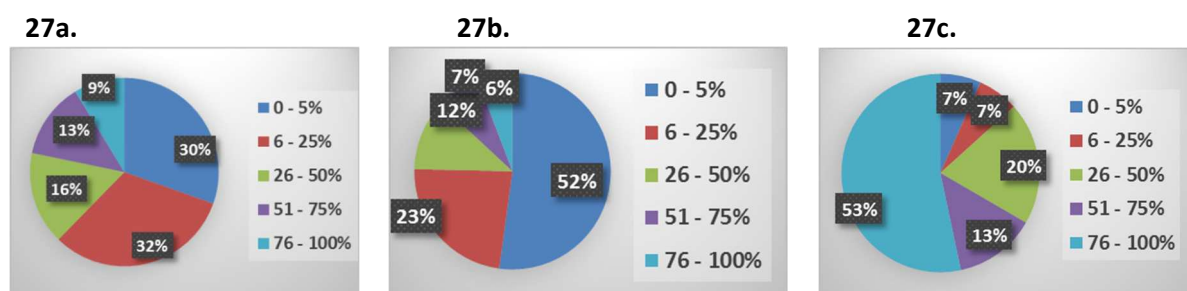


Figure 27. Niveau d'expression de DMBT1 au niveau tumoral.
a) global, b) au niveau du front d'invasion, et c) la composante mucineuse des adénocarcinomes muco-sécrétants.

3.2.3. Expression et localisation de DMBT1 dans la muqueuse de transition

L'expression de DMBT1 au niveau de la muqueuse non-tumorale au voisinage de la tumeur était forte pour de nombreuses tumeurs avec une moyenne de 60% de cellules marquées. Environ 45% des cas expriment très fortement DMBT1 (plus de 75% de cellules marquées), ce qui est bien plus important qu'au niveau de la tumeur. Il a été montré une différence significative par rapport à l'expression au niveau tumoral (globale et partie profonde) avec un $p < 0,001$. L'expression était soit supranucléaire soit au niveau basal, supranucléaire, membranaire et apical avec uniquement le centre du cytoplasme non-marqué (Figure 28).

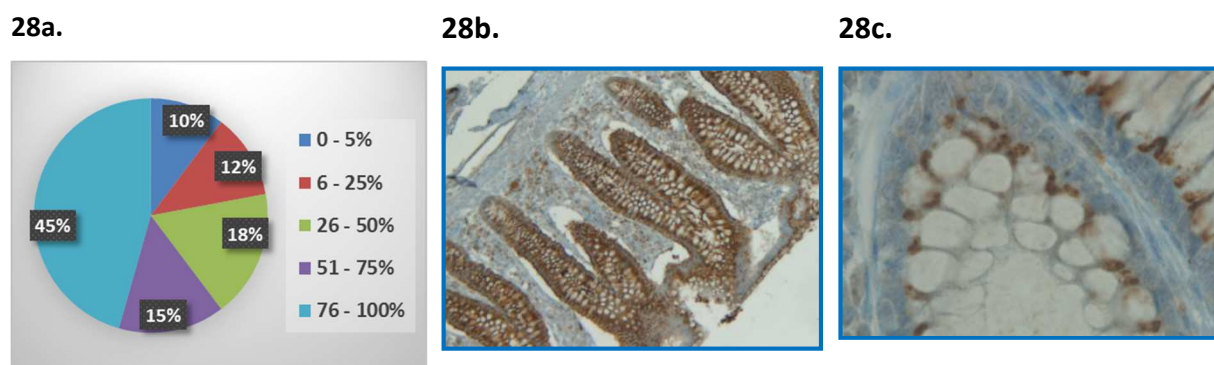


Figure 28. Expression de DMBT1 au niveau de la muqueuse non tumorale à proximité.
a) Expression forte pour la plupart des tumeurs ; b) Expression basale, supranucléaire, membranaire latérale et apicale, sans marquage cytoplasmique au niveau des vacuoles de mucus (50x, polyclonal) ; c) Expression supranucléaire (400x, polyclonal).

3.2.4. Expression et localisation de DMBT1 dans la muqueuse saine à distance

Elle était variable d'un cas à l'autre avec une moyenne d'expression de 36%, plus élevée par rapport aux patients contrôle sans antécédents d'adénocarcinome qui présentaient en moyenne 19% de cellules marquées mais la différence n'est pas significative statistiquement, avec un $p=1$. Plus de la moitié des cas présentaient un niveau d'expression faible (moins de 25% de cellules marquées), donc similaire aux patients « contrôle ». Cependant 18% des cas exprimaient plus de 75 % de cellules marquées, avec une expression similaire à celle de la muqueuse de transition (Figure 29).

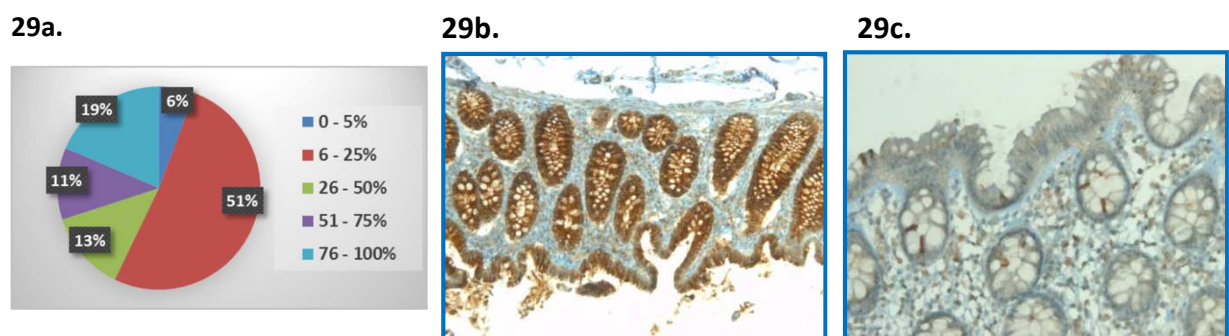


Figure 29. Expression de DMBT1 au niveau de la muqueuse non tumorale à distance.

a) Niveau d'expression variable dans la muqueuse colique à distance ; b) Forte expression de DMBT1 à distance comparable à celle de la muqueuse non tumorale à proximité (100x, polyclonal) ; c) Expression de DMBT1 à distance comparable à celle de la muqueuse saine des patients sans carcinome colique (X200, polyclonal).

3.2.5. Expression et localisation de DMBT1 dans les adénomes des patients avec tumeur

La plupart des adénomes inclus dans cette étude expriment fortement DMBT1, avec un pourcentage variant de 18 à 100% d'expression de la protéine sur la coupe, pour une moyenne de 69%. Plus de la moitié expriment DMBT1 à plus de 75% de marquage. L'expression de DMBT1 est majoritairement retrouvée au niveau cytoplasmique ou au niveau basal, supranucléaire, membranaire latéral et apical, sans marquage au niveau du cytoplasme, comme décrit précédemment au niveau de la muqueuse de transition à proximité de l'adénocarcinome (Figure 30). Focalement il a été retrouvé également une expression ponctiforme supranucléaire comme décrit précédemment au niveau tumoral et au niveau de la muqueuse non tumorale à proximité. L'expression de DMBT1 au niveau des adénomes est plus importante qu'au niveau des tumeurs, avec une différence

statistiquement significative ($p < 0,001$). Il existe également une différence d'expression statistiquement significative par rapport à la muqueuse saine à proximité des adénomes ($p < 0,004$) et à distance ($p < 0,003$).

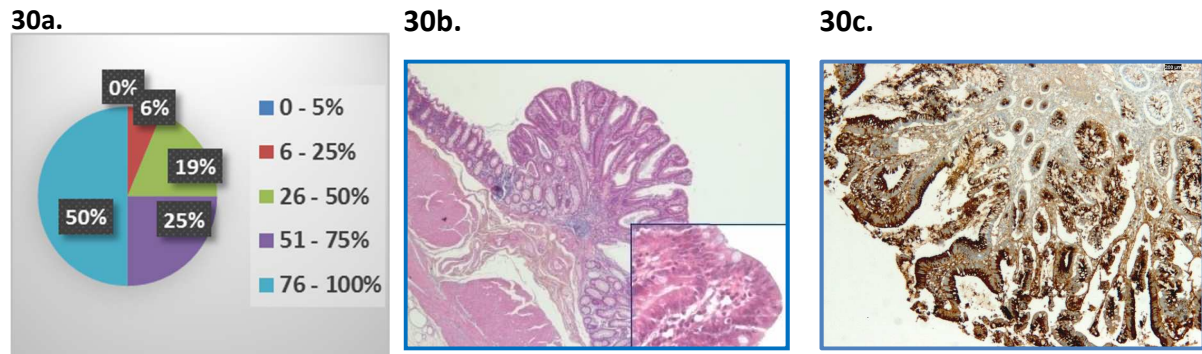


Figure 30. Expression de DMBT1 au niveau des adénomes.

a) Forte expression avec 50% de cas à plus de 75% de cellules marquées; 1b) Adénome HES 2,5x, 200x ; c) DMBT1 – forte expression cytoplasmique ou au niveau membranaire latéral, basal, apical, sans marquage cytoplasmique central (100x, monoclonal).

3.2.6. Expression et localisation de DMBT1 dans les métastases ganglionnaires

L'expression était assez faible, avec une moyenne d'expression de 9% et une différence statistiquement significative par rapport à la tumeur primitive ($p < 0,0001$). La localisation était cytoplasmique diffuse ou sous forme d'amas non-systématisés ou ponctiforme péri-nucléaire (Figure 31).

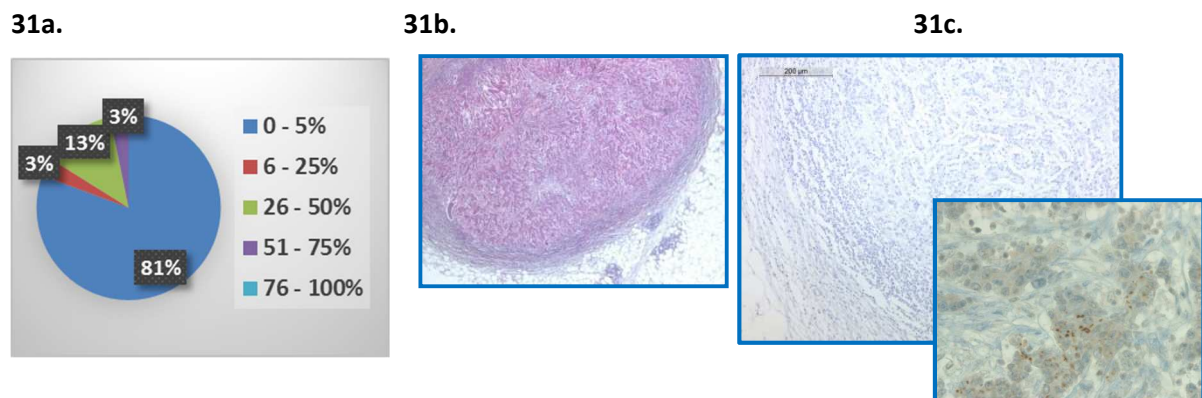


Figure 31. Expression de DMBT1 au niveau des métastases ganglionnaires.

a) Niveau d'expression variable, en général basse, dans les métastases ganglionnaires ; b) Métastase ganglionnaire HES 25X ; c) Expression de DMBT1 monoclonal quasi absente (100x) avec expression focale intracytoplasmique de DMBT1 polyclonal pour le même cas (400x, bas droite).

3.2.7. Expression et localisation de DMBT1 dans les métastases à distance

L'expression de DMBT1 était plutôt faible avec une moyenne de 21%, sans différence significative par rapport aux tumeurs ($p=0,31$) mais le faible nombre de patients biopsiés ne permet pas de formuler une conclusion définitive. La localisation cellulaire de la protéine est superposable à celle de la tumeur primitive, avec souvent un marquage intracytoplasmique (Figure 32).

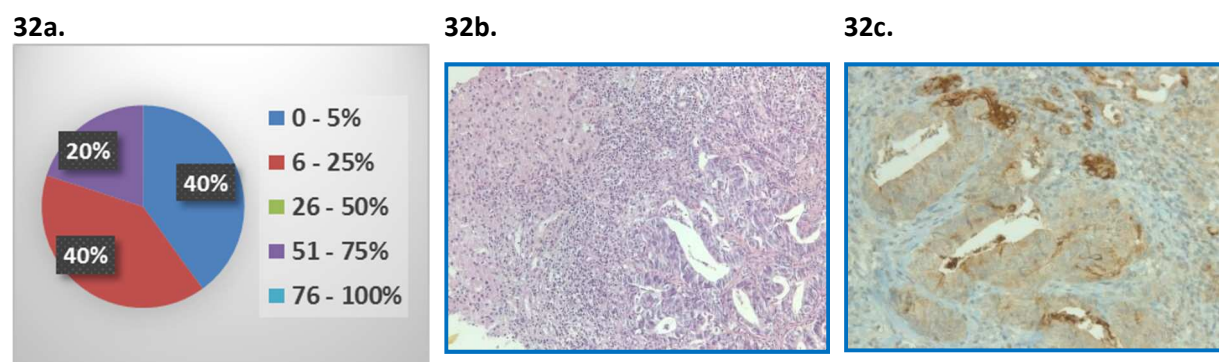
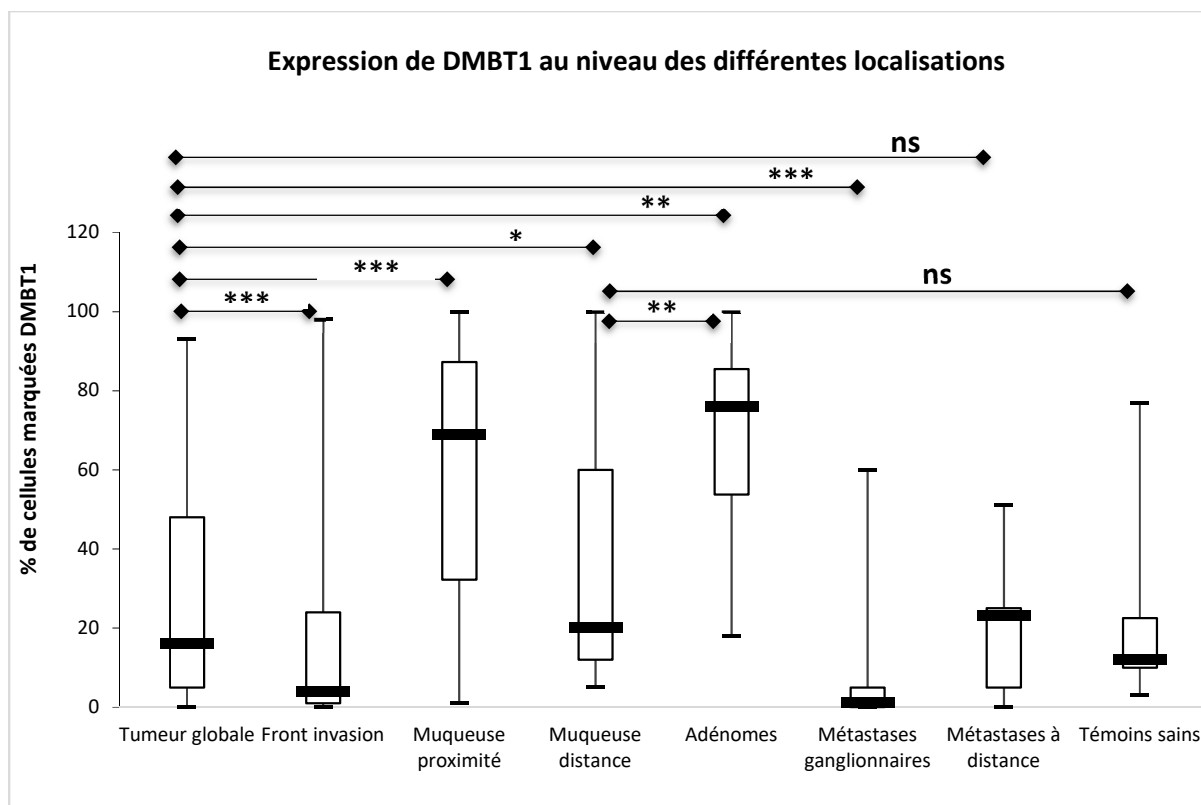


Figure 32. Expression de DMBT1 au niveau des métastases hépatiques.

a) Faible expression de DMBT1 ; b) Métastase hépatique (HES x100). Parenchyme hépatique à gauche, tumeur à droite. c) DMBT1 polyclonal au niveau de la métastase hépatique, expression cytoplasmique (x200).

La figure 33 synthétise l'expression de DMBT1 au niveau des différentes localisations. On retrouve la présence d'une corrélation moyenne entre l'expression de DMBT1 au niveau tumoral vs ganglionnaire ($p = 0,57$), et une corrélation élevée vs le niveau tumoral profond ($p = 0,87$). Cette corrélation élevée se vérifie notamment pour le carcinome moyennement différencié ($p < 0,0001$), sans nette différence pour le carcinome bien différencié ($p=0,14$) ou les adénocarcinomes muco-sécrétants ($p=0,12$), avec une différence proche de la significativité pour les adénocarcinomes peu différenciés ($p=0,07$).



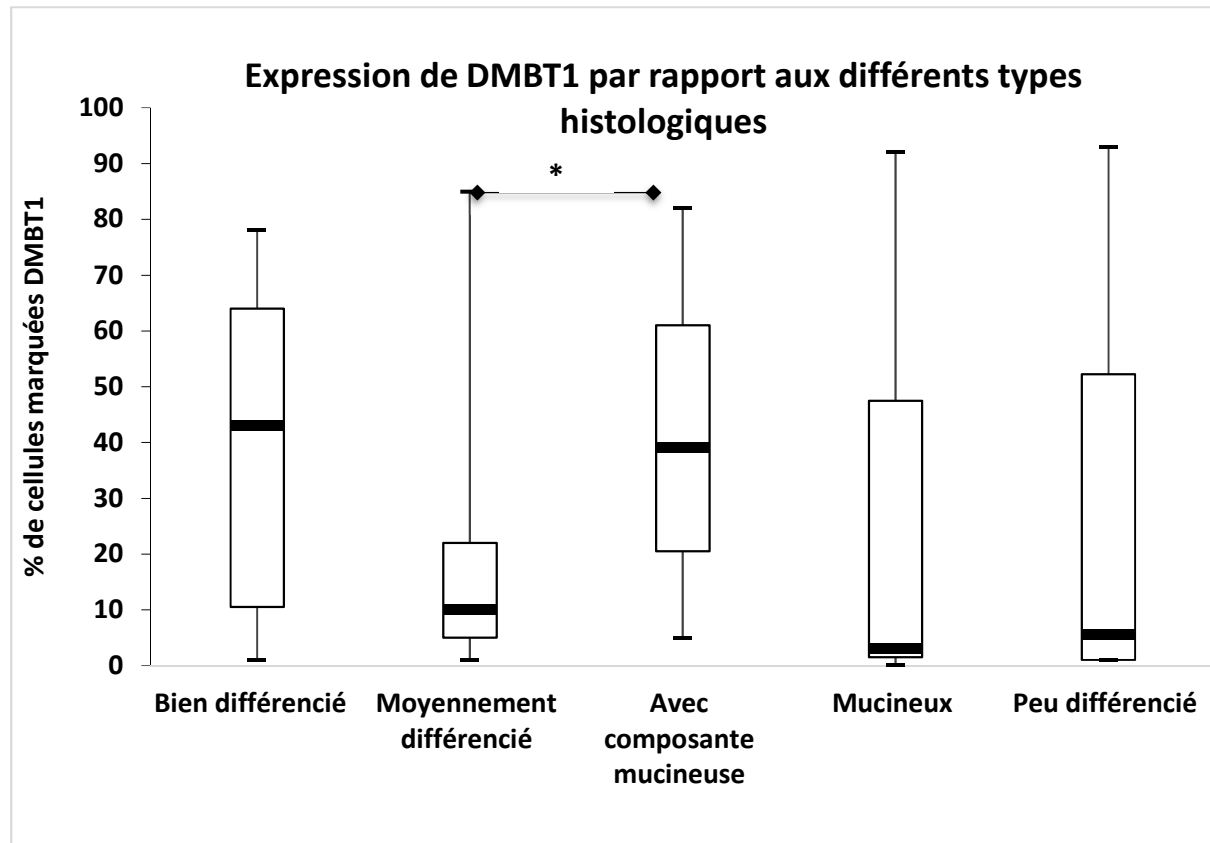
Tumeur globale/front d'invasion : **p<0,0001**
Tumeur globale/muqueuse de proximité : **p<0,0001**
Tumeur globale/muqueuse à distance : **p=0,01**
Tumeur globale/adénomes : **p=0,001**
Tumeur globale/métastases ganglionnaires : **p<0,0001**
Tumeur globale/métastases à distance : ns (p=0,31)
Adénomes/muqueuse à distance : **p=0,003**
Muqueuse à distance /témoins sains : ns (p=1)

Figure 33. Expression de DMBT1 au niveau des différentes localisations.
(* : p<0,05 ; ** : p<0,005 ; *** : p<0,0005 ; ns = non significatif)

3.2.8. Corrélation entre l'expression de DMBT1 et l'état de différenciation et/ou la présence d'une composante mucineuse dans la tumeur

D'après la Figure 34, le niveau d'expression de DMBT1 est plus élevé au niveau des adénocarcinomes mucosécrétants (adénocarcinomes bien ou moyennement différenciés avec composante mucineuse et adénocarcinomes mucineux). Ce résultat n'est pas surprenant puisque DMBT1 est une mucine-like co-sécrétée avec les mucines. Il semble aussi plus élevé dans les adénocarcinomes bien différenciés, ce qui peut s'expliquer par la présence plus fréquente d'une composante adénomateuse en bordure de la lésion tumorale

exprimant de façon plus importante DMBT1. L'étude statistique montre une différence significative notamment entre le groupe avec composante mucineuse vs moyennement différencié ($p=0,01$).



Adénocarcinome moyennement différencié/Adénocarcinome muco-sécrétant : $p=0,01$

Figure 34. Expression de DMBT1 en fonction de l'état de différenciation et/ou la présence d'une composante mucineuse au sein de la tumeur.

3.2.9. Corrélation entre l'expression de DMBT1 et le stade TNM

Comme le montre la figure 35, le niveau d'expression de DMBT1 dans les tumeurs coliques ne peut être corrélé au stade TNM ($p=0,11$). Le stade I semble exprimer moins de DMBT1 mais nous n'avons eu que cinq cas, ce qui est insuffisant pour tirer de réelles conclusions. Il semble augmenter pour le stade II avec 34,5% des cas exprimant plus de 50% pour diminuer ensuite pour le stade III avec 15% des cas exprimant plus de 50% et le stade IV avec 10%.

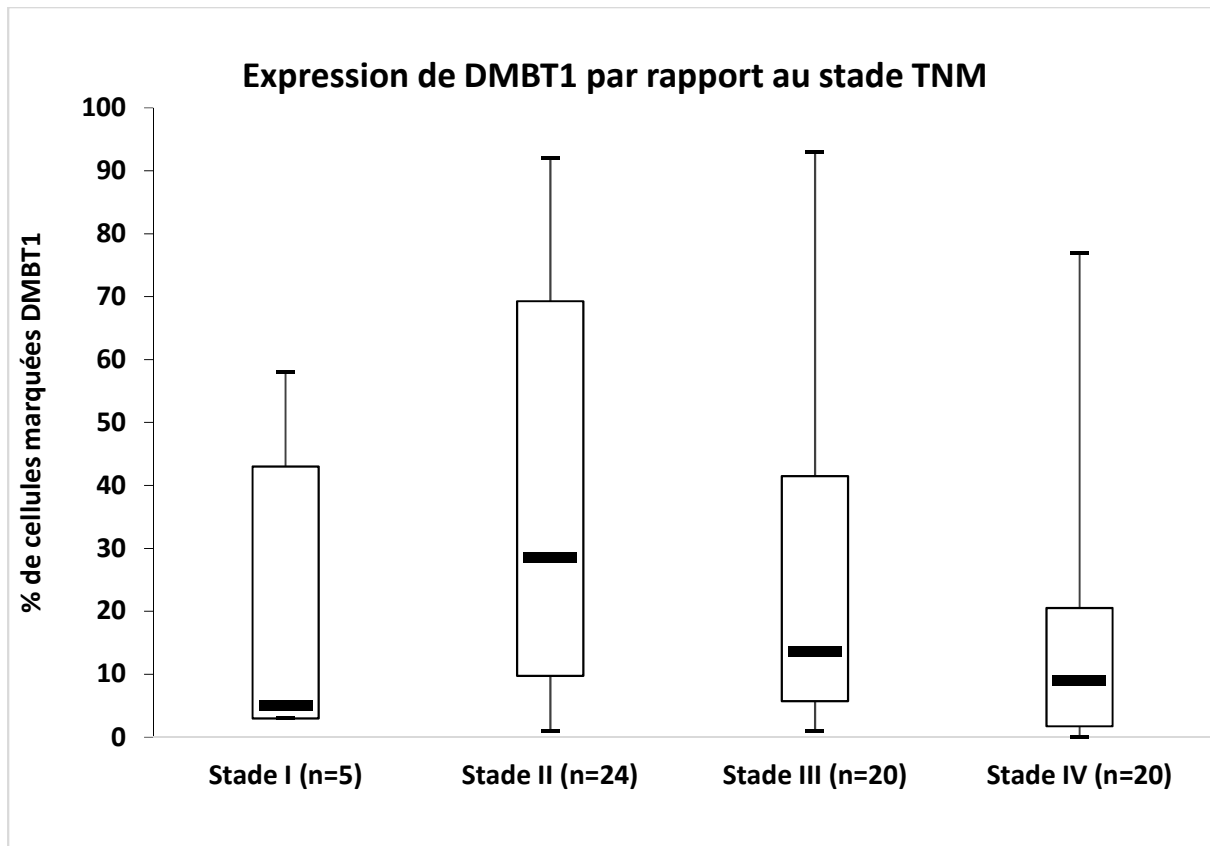
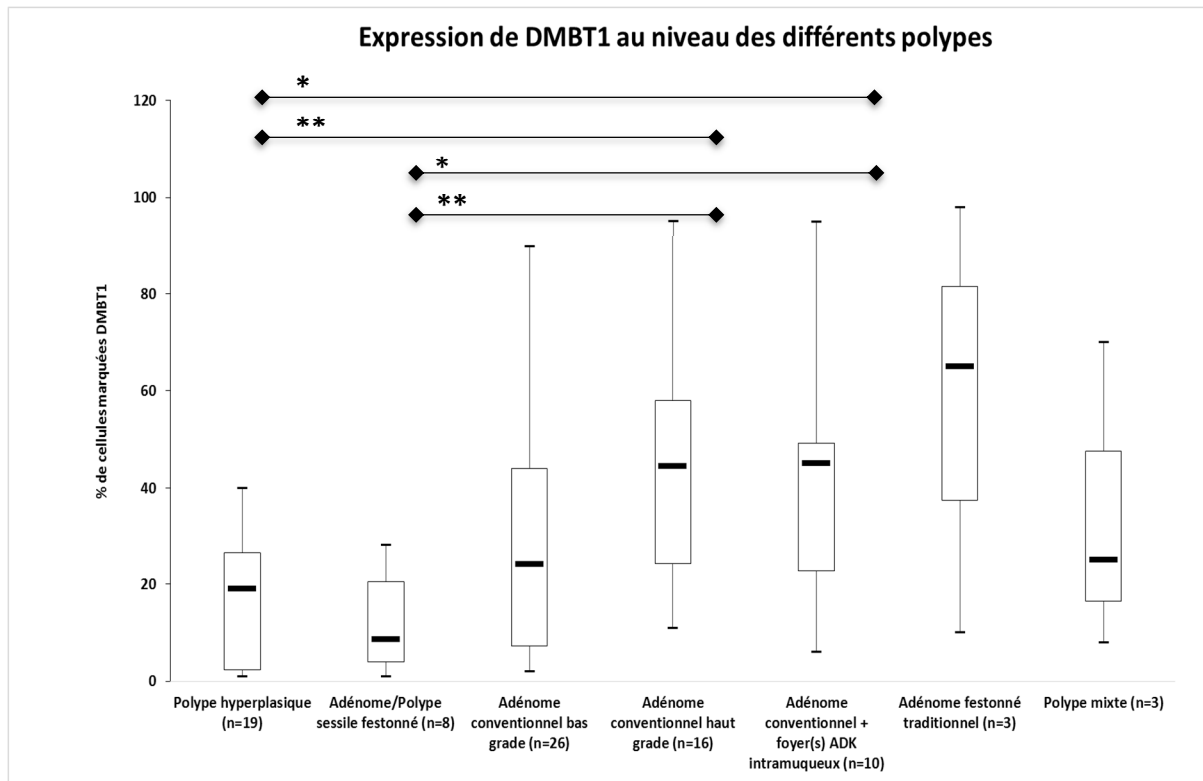


Figure 35. Expression de DMBT1 dans les tumeurs coliques en fonction du stade TNM.

Le nombre total de cas pour chaque stade est indiqué dans la légende. Il n'est pas observé de différence significative entre les stades : $p=0,11$.

3.2.10. Expression et localisation de DMBT1 dans les polypes

Les résultats concernant l'expression de DMBT1 au niveau de différents polypes sont synthétisés dans la Figure 36.



Polype hyperplasique/Adénome conventionnel avec dysplasie de haut grade : $p=0,0037$

Polype hyperplasique/ Adénome avec foyer(s) d'ADK intra-muqueux : $p=0,0094$

Adénome-polype sessile festonné / Adénome conventionnel avec dysplasie de haut grade : $p=0,002$

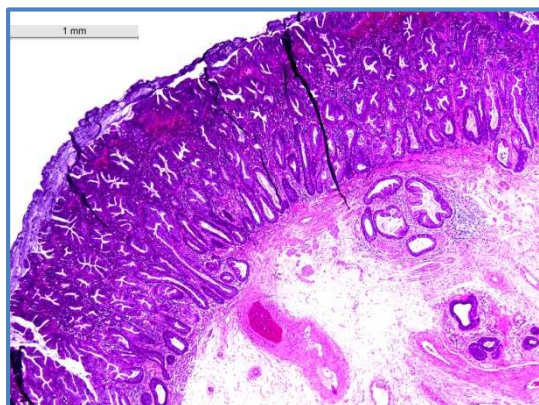
Adénome-polype sessile festonné/ Adénome avec foyer(s) d'ADK intra-muqueux : $p=0,0086$

Figure 36. Expression de DMBT1 au niveau des différents polypes.

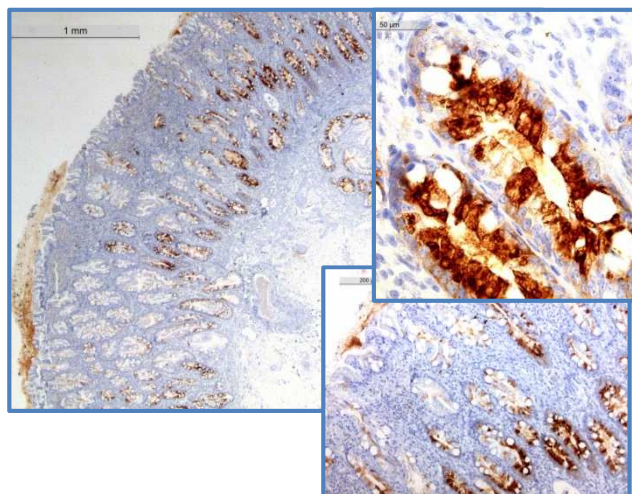
(* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,005$; ADK = adénocarcinome)

On observe ainsi une différence d'expression entre les polypes hyperplasiques et les adénomes/polypes sessiles festonnés d'un côté et les adénomes conventionnels notamment de haut grade avec ou sans foyer(s) d'adénocarcinome intramuqueux de l'autre côté, avec une signification statistique ($p < 0,05$). Pour les premiers polypes mentionnés, on observe souvent un marquage plus intense au fond des cryptes, notamment pour les adénomes/polypes sessiles festonnés, avec parfois une expression étendue vers la surface des cryptes notamment pour les polypes hyperplasiques (Figure 37).

36a.



36b.



36c.



36d.

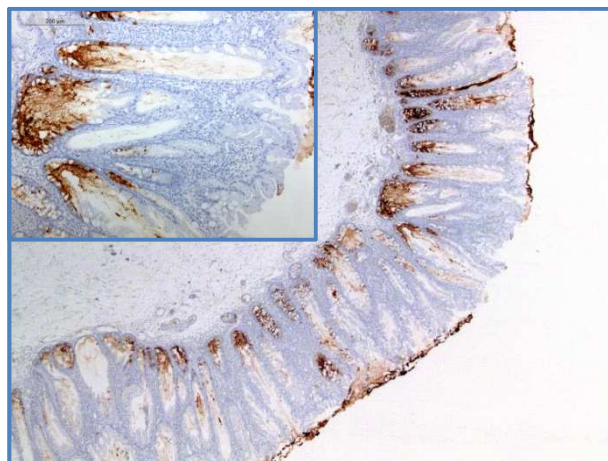


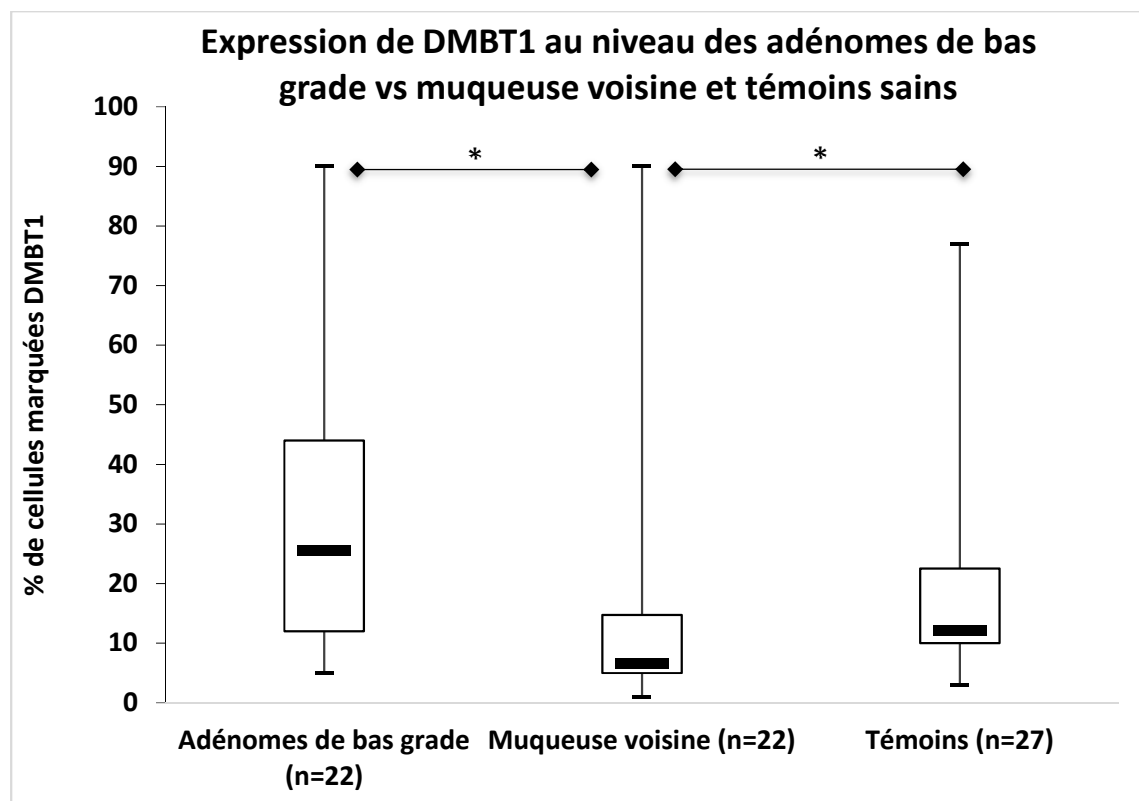
Figure 37. Localisation de l'expression de DMBT1 au niveau des polypes hyperplasiques et les adénomes/polypes sessiles festonnés.

a) Polype hyperplasique HES (25x), b) DMBT1 monoclonal polype hyperplasique (25x, 100x bas droite, 400x haut droite), c) Adénome/polype sessile festonné HES (25x), d) DMBT1 monoclonal adénome/polype sessile festonné (25x, 100x)

Concernant les adénomes conventionnels, l'expression est assez hétérogène, avec des zones de plus forte expression que d'autres d'un polype à l'autre, et aussi au sein du même polype, avec une moyenne d'expression de 32% pour les adénomes de bas grade, de 42% pour les adénomes de haut grade et de 43,7% au niveau des adénomes avec foyer(s) d'adénocarcinome intramuqueux. La différence d'expression entre ces 3 groupes n'est pas significative. Les adénomes festonnés traditionnels semblent aussi exprimer DMBT1 de façon significative, contrairement aux polypes mixtes qui semblent avoir une expression plus proche du premier groupe des polypes hyperplasiques et sessiles festonnés, mais le

faible nombre d'échantillons ne permet pas de l'affirmer avec certitude. Néanmoins on peut constater que l'apparition de la dysplasie au sein du polype entraîne une surexpression de DMBT1.

Par rapport à la muqueuse saine de voisinage, on observe une nette différence d'expression statistiquement significative uniquement pour les adénomes de bas grade ($p=0,01$) (Figure 38). Pour ceux-ci on retrouve également une expression significativement plus basse au niveau de la muqueuse de voisinage par rapport au témoins ($p=0,02$).



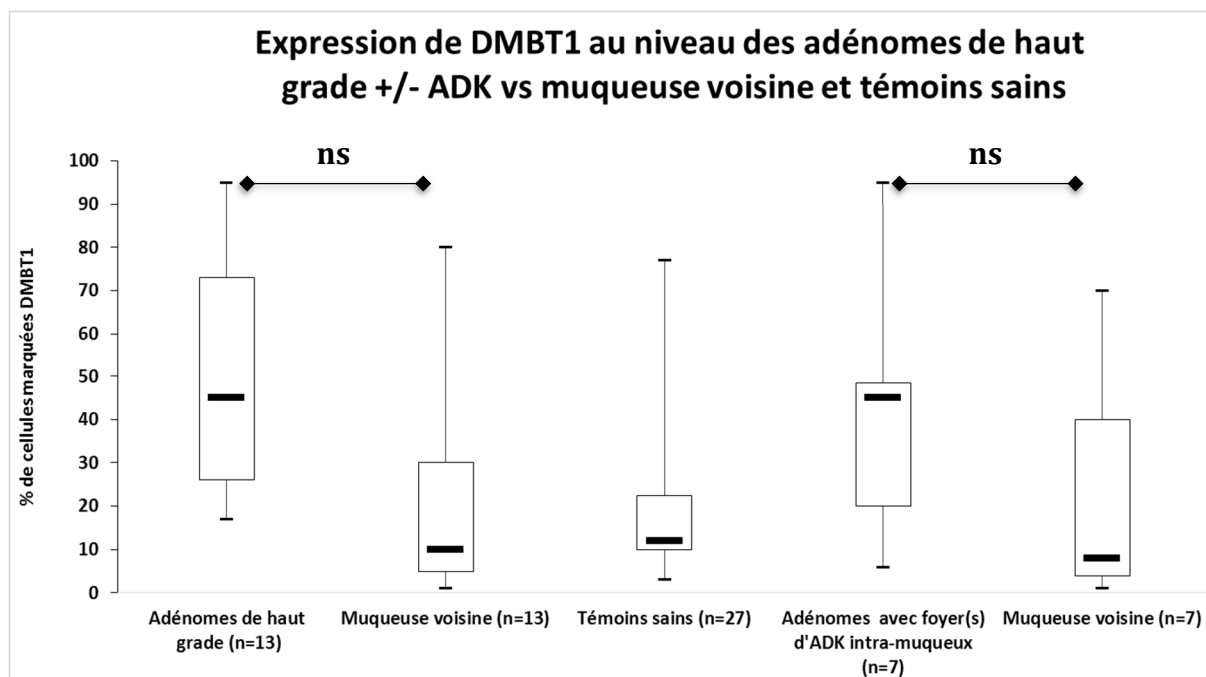
Adénome avec dysplasie de bas grade/muqueuse voisine : $p=0,01$

Adénome avec dysplasie de bas grade/Témoins : $p=0,02$

Figure 38. Expression de DMBT1 au niveau des adénomes avec dysplasie de bas grade par rapport à la muqueuse saine de voisinage et aux témoins sains.

(* : $p<0,05$)

En comparant les médianes pour chaque groupe de polypes, on observe qu'il existe des différences importantes pour d'autres groupes de polypes que les adénomes de bas grade, notamment les adénomes conventionnels avec dysplasie de haut grade avec ou sans foyer(s) d'adénocarcinome intramuqueux mais le test statistique manque de puissance car les effectifs sont faibles (Figure 39).



Adénomes de haut grade/muqueuse voisine : ns (p=0,17)

Adénomes avec foyer(s) d'adénocarcinome intramuqueux/muqueuse voisine : ns (p=0,23)

Figure 39. Expression de DMBT1 au niveau des adénomes avec dysplasie de haut grade +/- foyer(s) d'adénocarcinome intramuqueux.

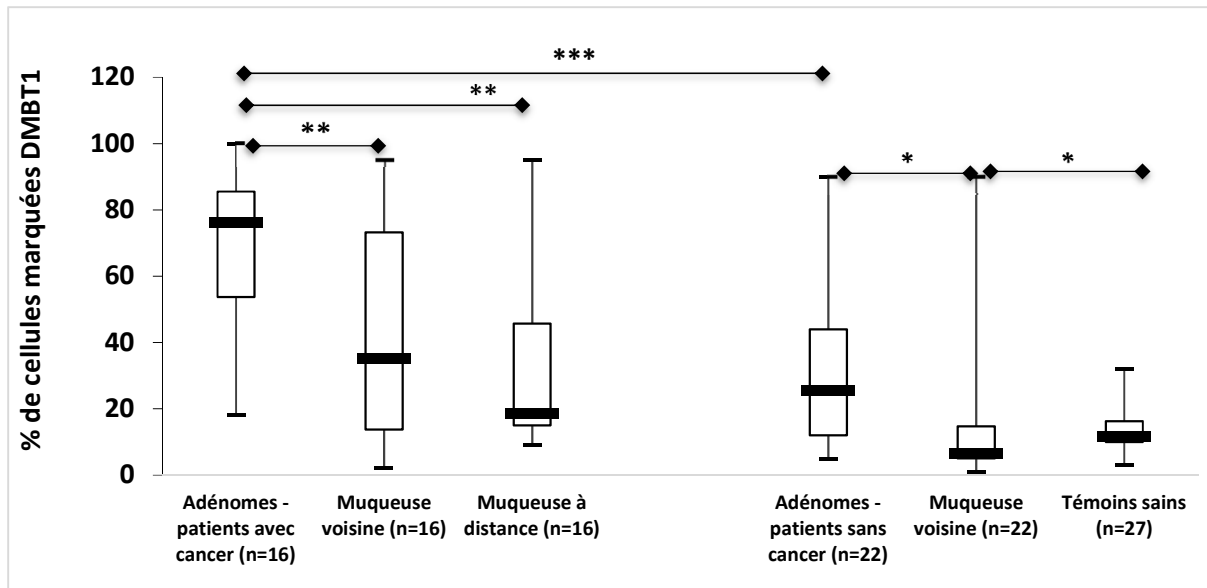
(ns : non significatif).

Par rapport à la taille, tous polypes confondus, il n'a pas été observé de corrélation entre l'expression de DMBT1 et la taille du polype. Par contre, en analysant la corrélation de manière séparée en fonction du groupe histologique de la lésion, on note que la taille du polype est fortement corrélée à l'expression de DMBT1 pour les adénomes conventionnels + foyer(s) d'adénocarcinomes intramuqueux ($\rho = 0,85$), les polypes hyperplasiques ($\rho = 0,7$) et les adénomes/polypes sessiles festonnés ($\rho = 0,67$).

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée par groupe de polypes en fonction de la localisation ou du sous-type histologique (pour les adénomes : tubuleux, tubulovilleux ou vilieux), certainement du fait d'effectifs trop faibles.

Etant donné les modifications observées lors de la séquence muqueuse saine – adénome – carcinome, nous avons comparé l'expression de DMBT1 au niveau des adénomes des patients avec tumeurs versus sans tumeurs. Pour ces derniers nous avons pris en compte uniquement les adénomes avec dysplasie de bas grade pour pouvoir effectuer une comparaison pertinente, car tous les adénomes retrouvés chez les patients avec tumeurs

étaient de bas grade. Nous avons constaté une expression plus forte, significative ($p=0,002$) au sein des adénomes de patients avec tumeurs par rapport aux autres (Figure 40).



Adénomes (patients avec cancer)/muqueuse de voisinage : $p=0,004$

Adénomes (patients avec cancer)/muqueuse à distance : $p=0,003$

Adénomes (patients avec cancer)/ adénomes (patients sans cancer) : $p=0,0002$

Adénomes (patients sans cancer)/ muqueuse de voisinage : $p=0,01$

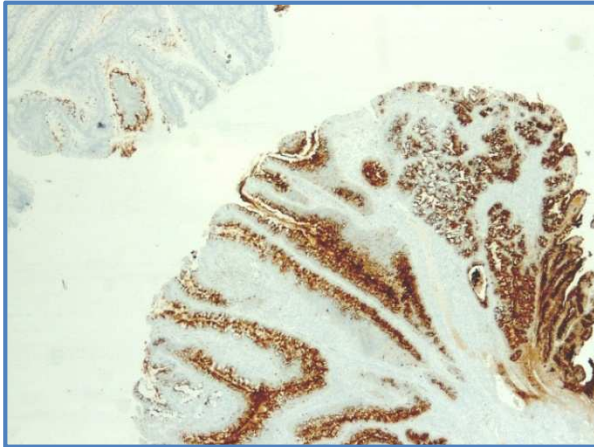
Adénomes (patients sans cancer)/témoins sains : $p=0,02$

Figure 40. Expression de DMBT1 au niveau des adénomes des patients ayant des tumeurs (avec la muqueuse saine de voisinage et à distance – premier groupe) versus les patients sans tumeurs (avec la muqueuse de voisinage et les témoins sains – 2^{ème} groupe).

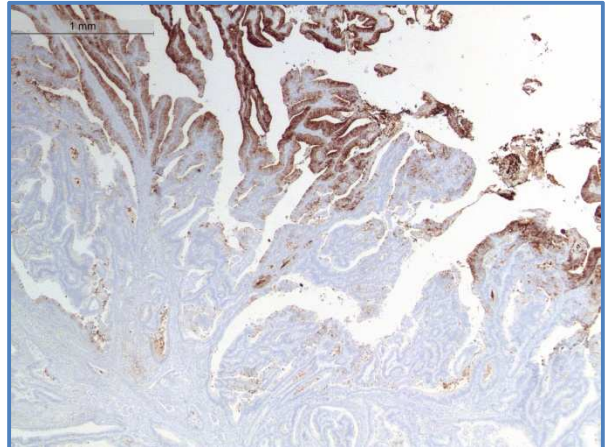
(* : $p<0,05$; ** : $p<0,005$; $p<0,0005$)

L'expression au sein des adénomes est assez hétérogène avec des zones plus marquées, notamment en surface et d'autres moins marquées (Figure 41). La localisation du marquage au niveau cellulaire est comparable à celle observée pour les adénomes des patients ayant un cancer. Il n'est pas observé une différence de distribution cellulaire du marquage en fonction du degré de dysplasie.

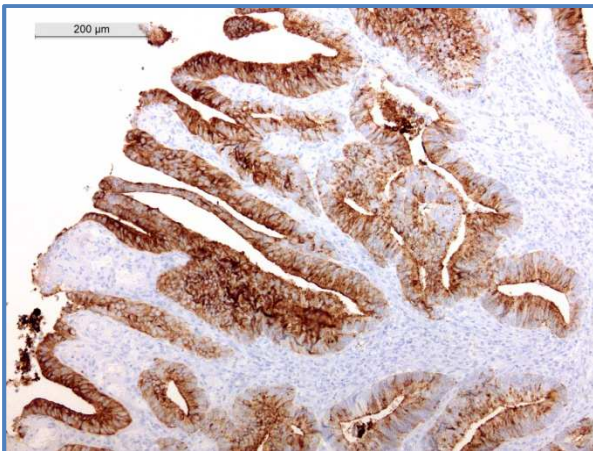
41a.



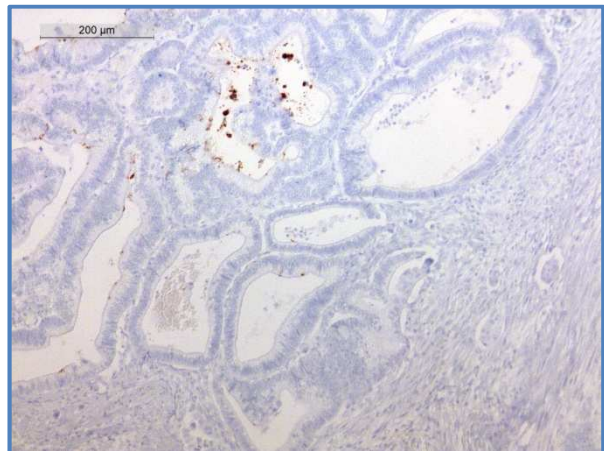
41b.



41c.



41d.



41e.

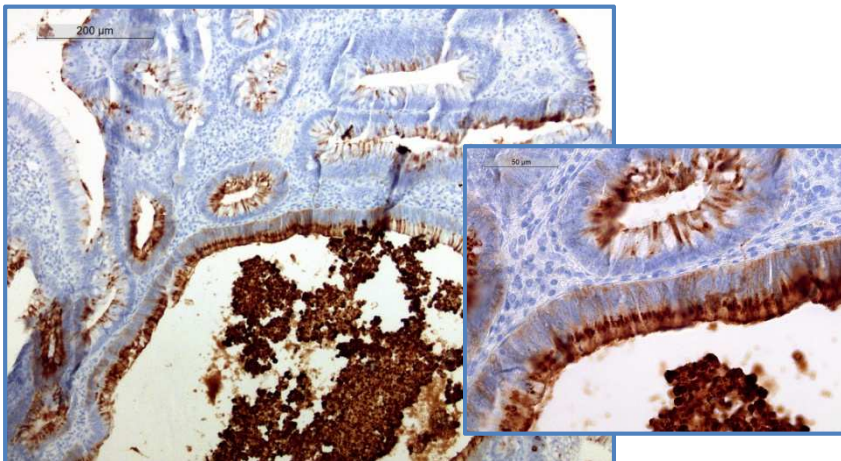


Figure 41. Expression de DMBT1 dans les adénomes.

a) Expression hétérogène de DMBT1 avec des zones moins marquées au niveau des zones de dysplasie de bas grade (haut à gauche) et plus marquées au niveau des zones de dysplasie de haut grade (bas à droite) (25x) ; b), c) et d) expression hétérogène au sein d'un adénome de haut grade avec foyer de carcinome intramuqueux (b, 25x): des zones de dysplasie modérée fortement marquées (c, 100x) et des zones de haut grade avec des aspects carcinomateux in-situ très peu marquées (d, 100x) ; e) adénome avec dysplasie de bas grade montrant un marquage cytoplasmique avec renforcement supra-nucléaire et apical (100x, 400x).

Au niveau des polypes mixtes, on constate une expression plus forte au sein de la composante adénomateuse et moins étendue au niveau de la composante hyperplasique (Figure 42).

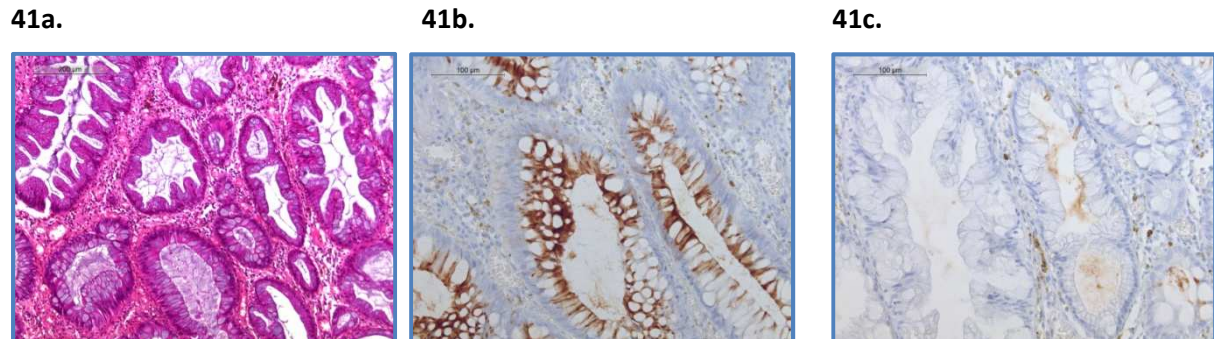


Figure 42. Expression de DMBT1 au niveau d'un polype mixte.

a) HES 100x, b) zone adénomateuse (200x) plus marquée avec DMBT1 que la zone hyperplasique c) (200x).

3.3. Corrélation entre l'expression de DMBT1 et la survie

Deux approches ont été réalisées. La première approche consiste à grouper les patients en plusieurs classes en fonction du % d'expression de DMBT1 au niveau tumoral global afin d'étudier la survie en fonction de ceux-ci. Pour cela, nous visualisons la distribution de cette donnée à l'aide de l'histogramme représenté dans la figure 43.

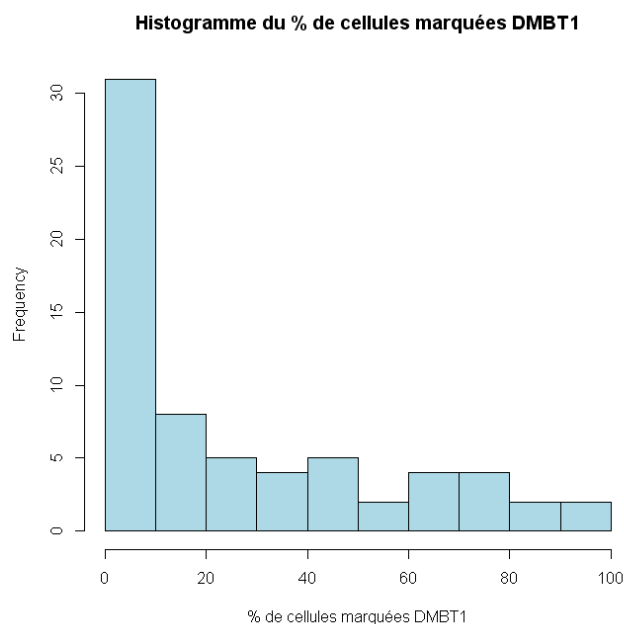


Figure 43. Histogramme du % de cellules marquées par DMBT1 au niveau tumoral.

Au vu de cette répartition, et afin d'assurer un minimum de 10% de l'effectif global dans chaque modalité, le découpage qui a été pris en compte est représenté dans le tableau 13.

Tableau 13 : Les groupes de patients établis en fonction du % d'expression de DMBT1 au niveau tumoral global afin de réaliser les courbes de survie.

Groupe	Valeurs du % DMBT1	n
1	< 5%	14
2	[5 - 25%]	27
3	[25% - 50%]	11
4	[50% - 75%]	8
5	≥ 75%	7

La courbe de survie globale obtenue par la méthode de Kaplan-Meier est représentée dans la figure 44.

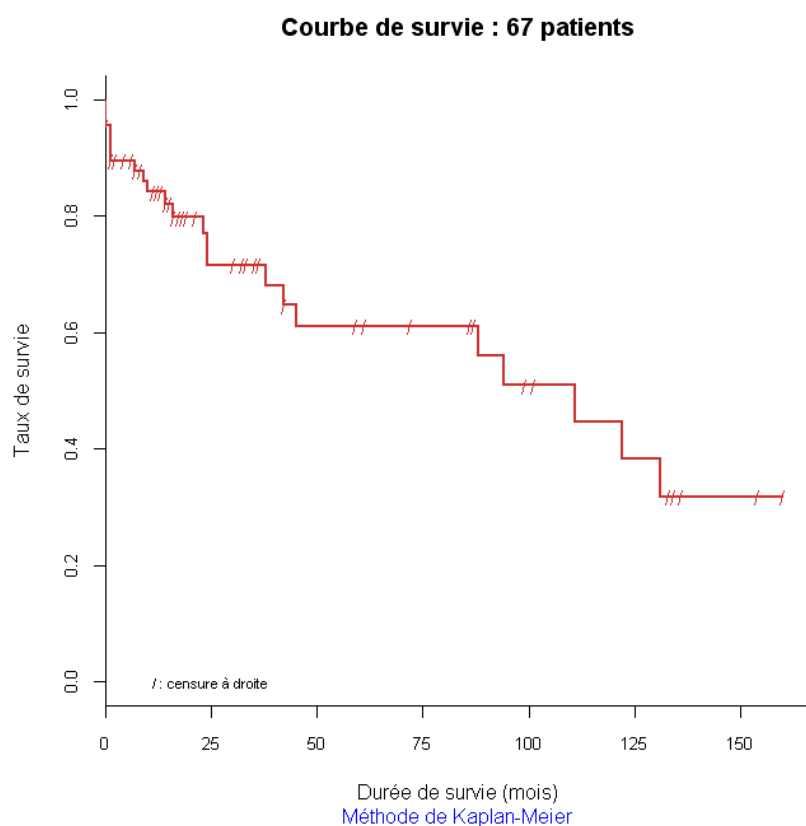


Figure 44. Courbe de survie globale obtenue par la méthode de Kaplan-Meier en fonction de l'expression de DMBT1 au niveau tumoral.

La médiane de survie est de 111 mois après le prélèvement. Un nombre important de patients ont été perdus de vue, avec la présence au niveau du graphique de nombreuses censures à droite au début de la courbe.

Par la même méthode, des courbes de survie sont obtenues pour chacun des groupes (Figure 45).

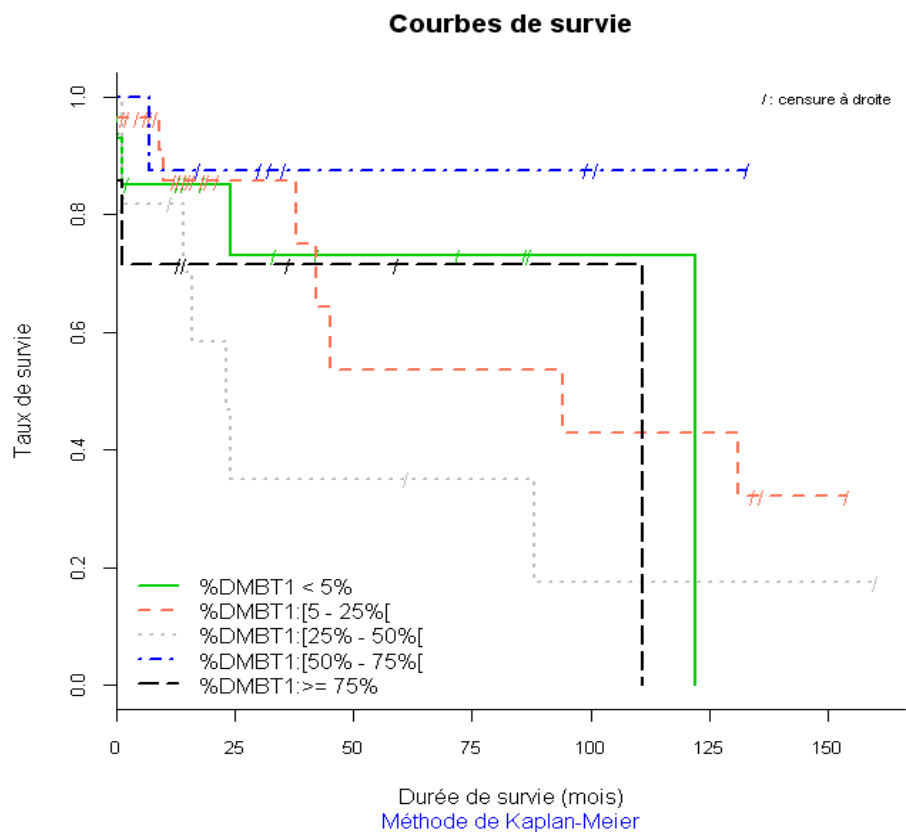


Figure 45 : Les courbes de survie globale obtenues par la méthode de Kaplan-Meier en fonction de l'expression de DMBT1 au niveau tumoral pour les groupes de <math>< 5\%</math>, $5-25\%$, $25-50\%$, $50-75\%$ et $\geq 75\%$.

Les médianes de survie pour chacun des groupes sont répertoriées dans le tableau 14:

Tableau 14 : Médianes de survie pour chacun des groupes d'expression de DMBT1 au niveau tumoral : <5%, 5-25%, 25-50%, 50-75%, ≥75%.

Groupe	Valeurs du % DMBT1	Médiane de survie en mois
1	< 5%	122
2	[5 - 25%]	94
3	[25% - 50%]	23
4	[50% - 75%]	/
5	≥ 75%	111

Etant donné que les courbes se coupent, nous ne pouvons faire un test du logrank global pour tester si les distributions de survie entre les 5 groupes diffèrent significativement.

La deuxième approche consiste à intégrer les données de % de DMBT1 au niveau tumoral global dans un modèle semi-paramétrique de Cox afin d'étudier l'influence de cette donnée sur la survie des patients. Egalement, nous avons introduit le stade TNM comme facteur dans le modèle.

Les conditions d'application du modèle de Cox ont été vérifiées comme suit :

- la log-linéarité du %DMBT1 a été vérifiée graphiquement à l'aide des résidus de la martingale
- l'hypothèse des risques proportionnels a été vérifiée numériquement pour chaque variable (%DMBT1 et stade TNM)

Dans un premier temps, les modèles de Cox univariés ont été individualisés pour chaque variable. Ensuite, un modèle de Cox multivarié a été mis en œuvre. Les résultats sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Hazard Ratio des modèles de Cox univariés et multivariés expliquant le délai de survie post-prélèvement

Hazard Ratio des modèles de Cox univariés et multivariés expliquant le délai de survie post-prélèvement							
		Univarié			multivarié		
Variable	n	HR	IC 95%	p	HR	IC 95%	p
% DMBT1 au niveau tumoral global	67	1,002	[0,988 – 1,017]	0,77	1,012	[0,996 – 1,029]	0,13
Stade TNM (ref= I)							
II	24	0,63	[0,069 – 5,75]	0,68	0,45	[0,05 – 4,32]	0,49
III	20	1,73	[0,21 – 13,93]	0,61	1,57	[0,19 – 12,73]	0,37
IV	20	2,93	[0,37 – 23,51]	0,31	3,07	[0,38 – 24,63]	0,29

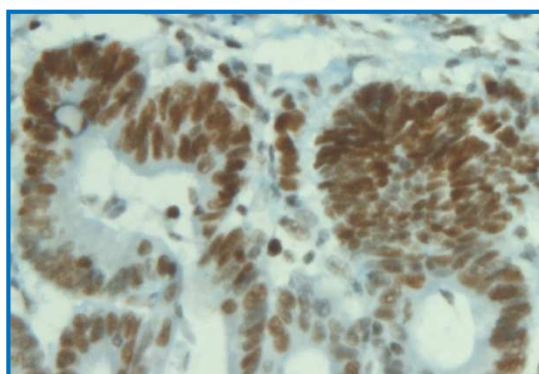
(HR : hazard ratio, IC : intervalle de confiance)

Il ne semble donc pas y avoir de relation entre l'expression de DMBT1 et la survie des patients (que ce soit en la considérant seule, ou ajustée sur le stade TNM), d'ailleurs de manière étonnante, ni entre le stade TNM et la survie. Mais le nombre de perdus de vue est important dès le début du suivi comme l'indiquent les courbes de survie. Un échantillon de plus grande taille est donc nécessaire pour savoir si ces hypothèses sont conservées.

3.4. Corrélation entre l'expression de DMBT1 et l'instabilité microsatellitaire

L'absence d'expression d'un des gènes majeurs du système MMR a été étudiée en immunohistochimie. L'immunohistochimie permet donc la détermination indirecte du statut MSI des échantillons étudiés par la mise en évidence de cette absence d'expression dans la cellule tumorale, les cellules normales contaminantes ou infiltrantes servant de contrôle d'expression. L'étude a été réalisée avec les anticorps anti-MLH1, MSH2, PMS1 et MSH6, elle est incomplète à ce jour (en cours). La figure 46 montre deux cas, un stable et un instable.

46a. MSH2 - Tumeur stable (200x).



46b. MSH2 – Tumeur instable (200x).

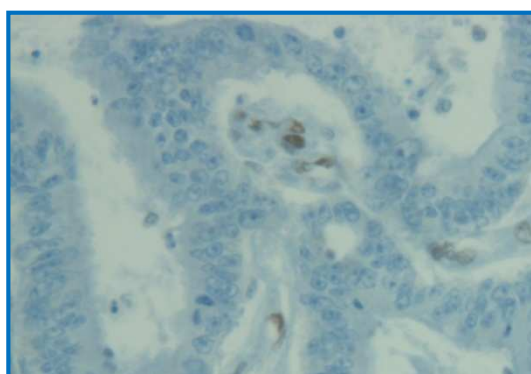


Figure 46. Immunodétection de MSH2.

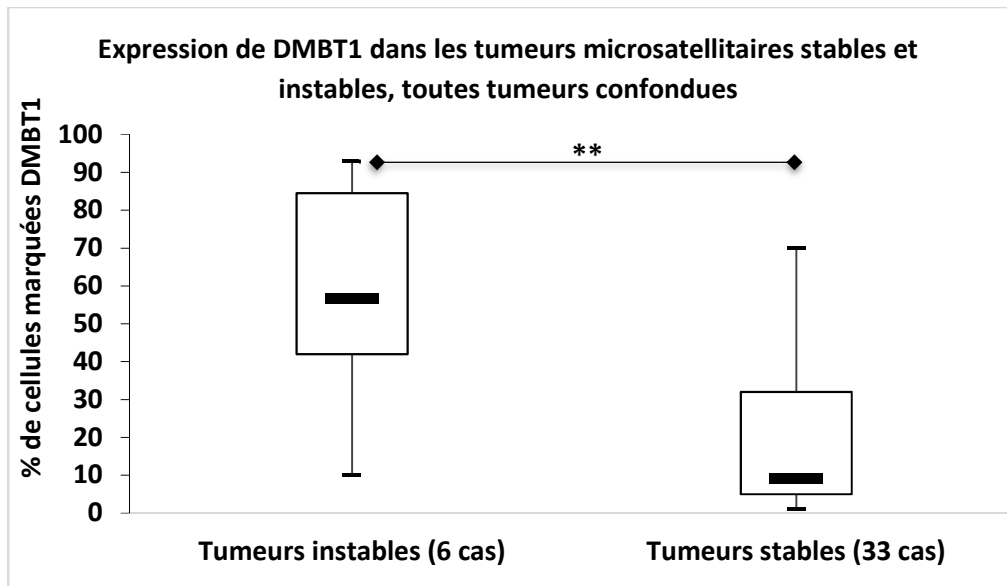
a) Tumeur stable avec marquage nucléaire au niveau des cellules tumorales et témoin interne positif avec des cellules du stroma tumoral marquées ; b) Tumeur instable avec absence de marquage au niveau des cellules tumorales et témoin interne positif.

Des données de biologie moléculaire ont été disponibles pour les patients qui avaient bénéficiés d'une recherche clinique en vue d'améliorer leur traitement. Toutes ces données sont synthétisées dans le tableau 16.

Tableau 16 : Marqueurs d'instabilité microsatellitaire et expression de DMBT1.

Nombre des cas	MLH1	MSH2	PMS1	MSH6	Biologie moléculaire	Total cas	Expression DMBT1% (moyenne)
Stable	30	34	30	34	4	33 stables	18
Instable	5	1	5	1 Non renseigné	0	6 instables	58

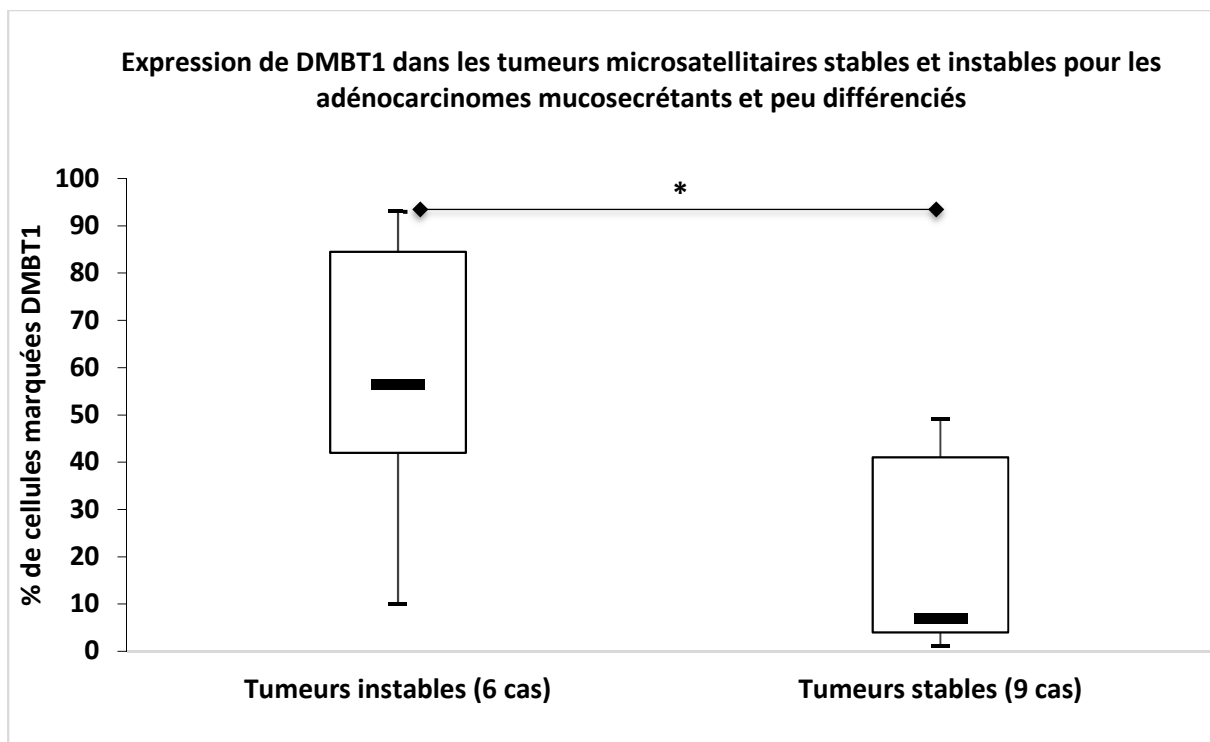
6 patients sur les 39 cas examinés présentaient une instabilité microsatellitaire, dont 4 ayant des tumeurs mucio-sécrétantes et 2 adénocarcinomes peu différenciés. On constate une expression de DMBT1 nettement supérieure pour les cas avec instabilité microsatellitaire ($p = 0,005$) (Figure 47). Les tumeurs instables sont fréquemment de type mucineux ou peu différencié, ce qui pourrait expliquer l'association avec l'expression de DMBT1. Cependant, parmi les 39 cas de tumeurs stables, 4 cas présentaient des tumeurs mucio-sécrétantes et 5 cas peu différenciés. La comparaison de l'expression de DMBT1 pour ces cas par rapport aux tumeurs instables, montre une préservation de la différence d'expression, beaucoup plus élevée pour les tumeurs instables ($p=0,02$)(Figure 48).



Tumeurs instables/tumeurs stables : $p=0,005$

Figure 47. Expression de DMBT1 dans les tumeurs microsatellites stables et instables, toutes tumeurs confondues.

(** : $p = 0,005$).



Tumeurs instables/tumeurs stables : $p=0,02$

Figure 48. Expression de DMBT1 dans les tumeurs microsatellites stables et instables pour les adénocarcinomes mucosécrétants et peu différenciés.

(* : $p < 0,05$).

3.5. Comparaison entre l'expression de DMBT1 monoclonal vs polyclonal en immunohistochimie

Lors de la lecture des lames marquées par les deux anticorps pour les mêmes cas, nous avons pu observer une différence parfois significative de l'expression de DMBT1 au niveau de toutes les localisations (tissu tumoral, muqueuse saine au voisinage et à distance, adénomes et métastases), avec un marquage plus important pour l'anticorps polyclonal (en dehors du bruit de fond présent uniquement avec cet anticorps). Cette différence est confirmée par l'étude statistique qui met en évidence une valeur $p < 0,0001$, avec un coefficient de corrélation Spearman de 0,57. En effet, l'anticorps polyclonal traduit un marquage punctiforme supranucléaire souvent assez diffus qui n'apparaît que très rarement avec l'anticorps monoclonal (Figure 49).

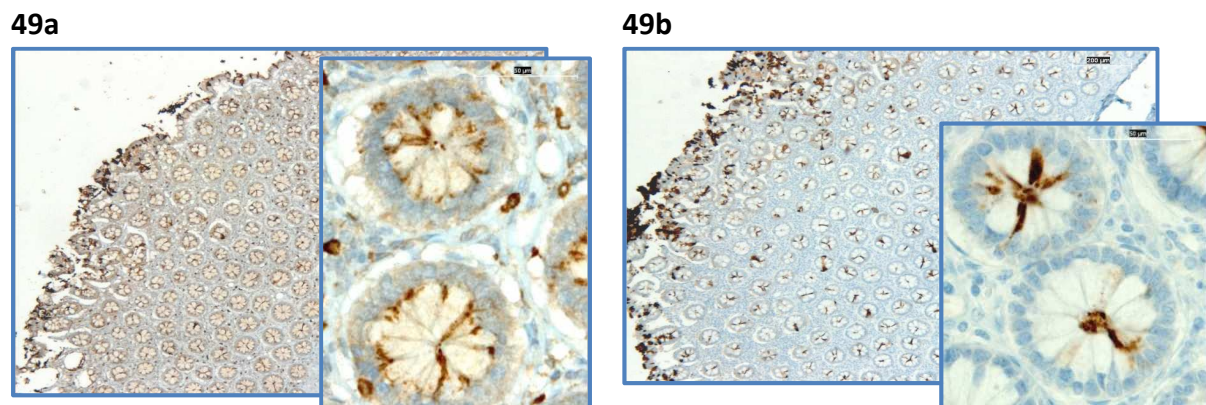


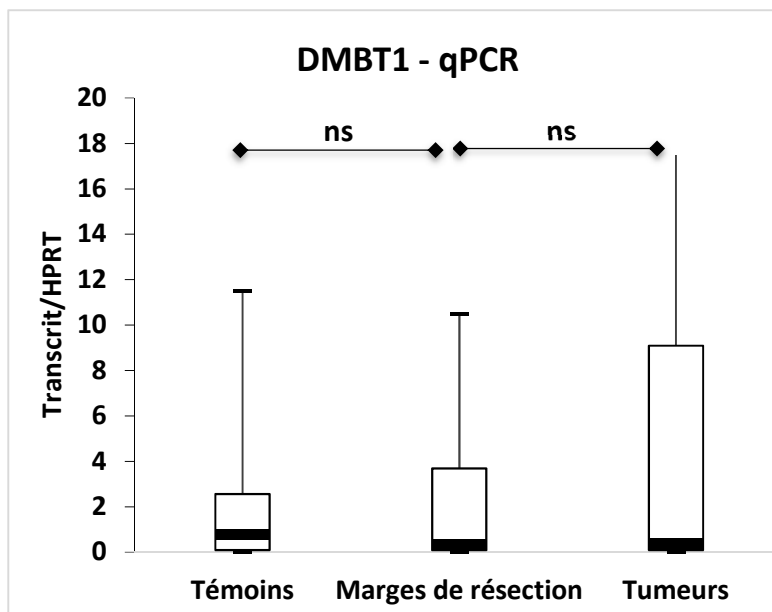
Figure 49. Expression de DMBT1 versus polyclonal.

Marquage plus diffus au niveau de la muqueuse saine à distance du même patient, avec l'anticorps polyclonal (figure 48a, 25x, 400x) vs monoclonal (figure 48b, 25x, 400x), avec l'absence de marquage punctiforme supra-nucléaire avec ce dernier

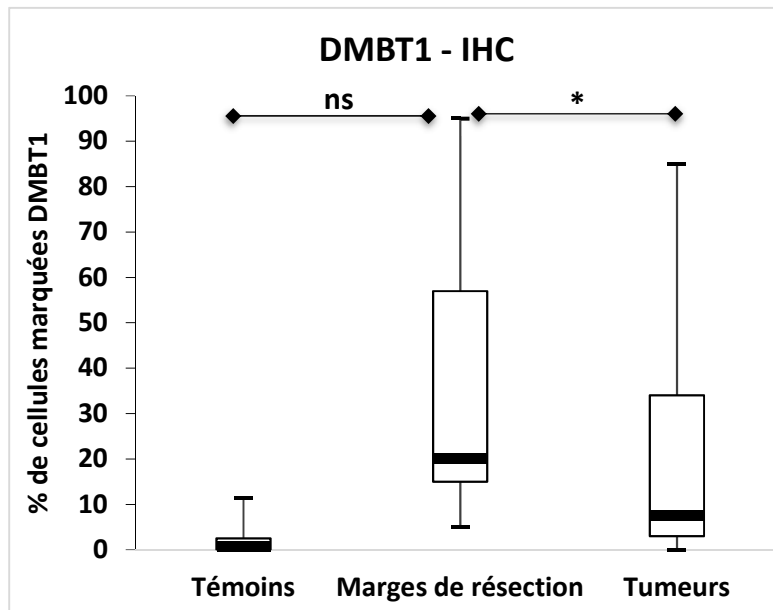
3.6. Comparaison entre l'expression de DMBT1 en immunohistochimie et l'expression du gène *DMBT1* quantifiée par RT-qPCR

Des échantillons appariés des 20 tumeurs coliques et la muqueuse au niveau des marges de résection correspondantes ainsi que des échantillons de muqueuse saine des 10 témoins ont été analysés par une technique d'immunohistochimie et RT-qPCR.

Il existe une bonne corrélation entre les séries de résultats concernant les échantillons tumoraux ($p = 0,69$), mais aucune corrélation pour la muqueuse saine des marges de résection ($p = 0$) ni pour celle des témoins ($p = 0,22$). Contrairement aux résultats immunohistochimiques montrant une différence significative d'expression entre les échantillons tumoraux et la muqueuse à distance ($p=0,02$) il n'est pas retrouvé de différence significative en qPCR ($p = 0,18$). Pour aucune des séries de résultats il n'est observé de différence significative entre la muqueuse à distance des patients porteurs de tumeurs par rapport à celle des témoins (Figure 50).



Témoins/marges de résection : ns ($p=0,91$)
 Tumeurs/ marges de résection : ns ($p=0,18$)



Témoins/marges de résection : ns ($p=0,23$)

Tumeurs/ marges de résection : **$p=0,02$**

Figure 50. Expression comparative de DMBT1 au niveau des ARNm (qPCR) et au niveau protéique (IHC)

(ns = non significatif ; * : $p>0,05$; IHC = immunohistochimie).

De cette figure on observe plutôt une augmentation des ARNm codant pour DMBT1 au niveau des tumeurs par rapport à la muqueuse saine à distance, comme l'indique aussi la figure 51. En effet, des 20 patients analysés, 12 montrent une augmentation au niveau tumoral, avec une très mauvaise corrélation avec l'immunohistochimie où le rapport est inversé.

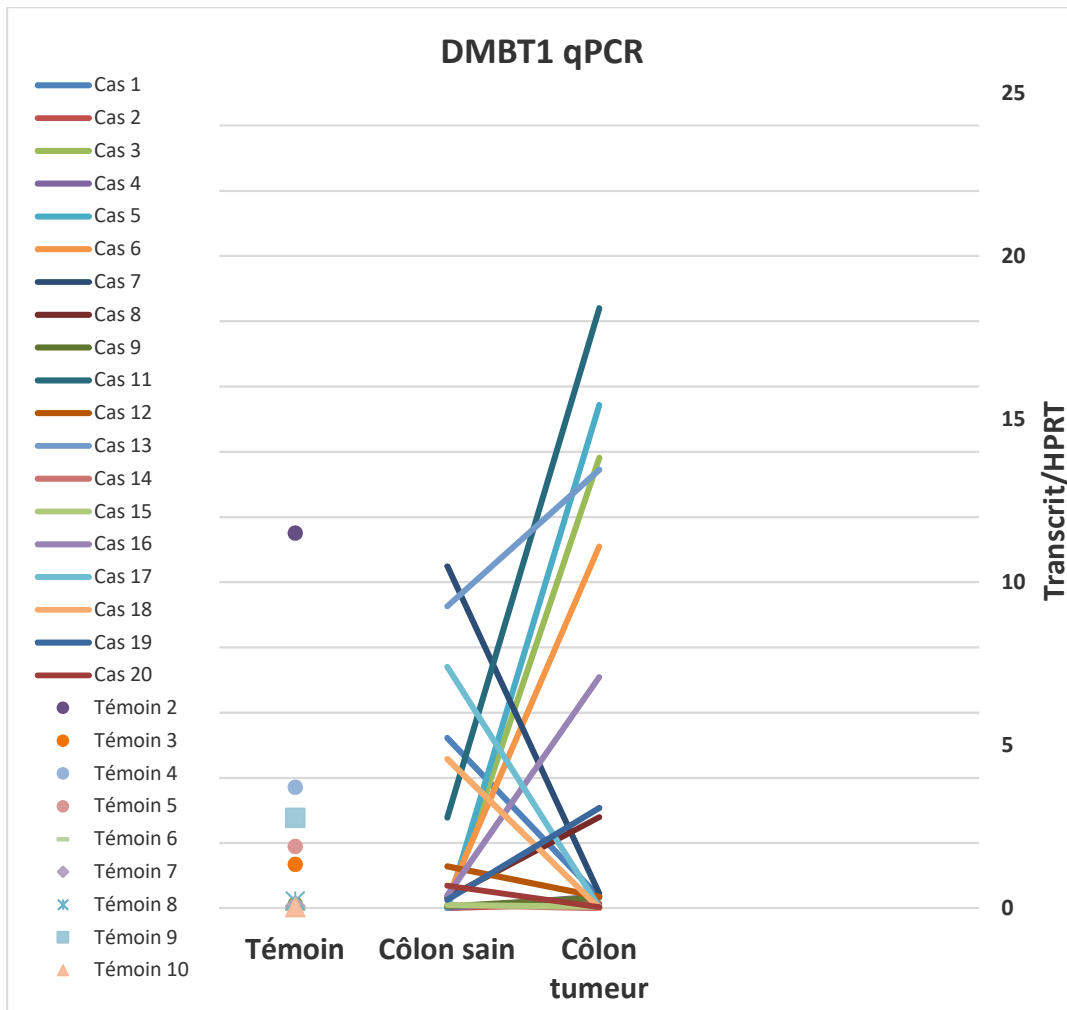


Figure 51. Expression de DMBT1 évaluée par RT-qPCR – augmentation de l’expression de DMBT1 au sein des tumeurs par rapport aux marges de résection pour 12 patients/20.

3.7. Conclusions de cette étude

L’expression de DMBT1 est hétérogène à la fois au sein des lésions tumorales et des lésions polypoïdes. Cette glycoprotéine est assez peu exprimée au sein de la muqueuse colique saine, avec une localisation souvent homogène notamment au niveau des cellules absorbatives. Son expression reste basse dans les polypes considérés bénins comme les polypes hyperplasiques, mais aussi dans les adénomes/polypes sessiles festonnés qui ne portent pas de lésions dysplasiques. On constate une augmentation de l’expression de DMBT1 au sein des lésions adénomateuses, plus exprimée de façon significative dans les dysplasies du haut grade avec ou sans composante adénocarcinomateuse intra-muqueuse et les lésions adénomateuses de bas grade de patients ayant déjà un cancer, l’expression

étant significativement plus élevée par rapport à des adénomes avec dysplasie de bas grade des patients sans tumeurs. Il semblerait qu'une augmentation de l'expression de DMBT1 soit présente dans d'autres lésions adénomateuses aussi comme l'adénome festonné traditionnel et dans une moindre mesure dans les polypes mixtes, mais ceci reste à confirmer en raison des effectifs trop faibles.

L'expression de DMBT1 augmente également dans la muqueuse saine avoisinant les lésions, modérément au niveau des polypes dysplasiques et beaucoup plus au voisinage des tumeurs avec des valeurs significatives statistiquement. Ceci pourrait s'expliquer par le rôle dans la protection de l'épithélium colique conféré par DMBT1.

L'expression de DMBT1 est plus faible au niveau tumoral de façon générale, en étant significativement plus faible qu'au niveau de la muqueuse colique saine à distance, celle-ci ayant une expression proche, d'un point de vue statistique, de l'expression observée au niveau des témoins. Néanmoins, elle reste élevée au sein de certains types de tumeurs notamment les adénocarcinomes avec mucin-sécrétion en comparaison notamment avec les adénocarcinomes moyennement différenciés qui ont une expression très faible de DMBT1. Concernant les tumeurs mucin-sécrétantes l'expression plus élevée de DMBT1 est expliquée par la structure de cette molécule car c'est une mucine-like co-sécrétée avec les mucines coliques. L'expression relativement élevée au sein des adénocarcinomes bien différenciés, même si statistiquement non significative, peut s'expliquer par la présence plus fréquente d'une composante adénomateuse au niveau de l'adénocarcinome bien différencié, exprimant DMBT1, et la bonne différenciation peut expliquer par elle-même la conservation du DMBT1 au sein de ces lésions. Il existe une perte de l'expression vers le front d'invasion, significatif d'un point de vue statistique notamment pour les adénocarcinomes moyennement différenciés, et à la limite de la significativité pour ceux peu différenciés.

Aucune variation de l'expression de DMBT1 n'a pu être corrélée avec le stade mais nous avons constaté une diminution significative au sein des métastases ganglionnaires, sans variations significatives au niveau des métastases à distance, mais pour celles-ci l'effectif est également trop faible.

Des informations intéressantes sont fournies par l'étude de l'instabilité microsatellitaire. Elle montre une corrélation d'expression de DMBT1 avec le phénotype instable. Celui-ci est

rencontré plus fréquemment dans le cadre des tumeurs muco-sécrétantes et peu différenciées, comme nous l'avons observé aussi dans notre étude. Cependant, dans notre série on retrouve des tumeurs appartenant à ces deux groupes qui sont stables et d'une façon intéressante, elles expriment DMBT1 moins intensément par rapport aux tumeurs instables du même groupe histologique.

En conclusion, DMBT1 semble être modifié le long de la voie de cancérogénèse adénome – carcinome et aussi celle de l'instabilité microsatellitaire, sans que son rôle soit élucidé.

DISCUSSION-PERSPECTIVES

Discussion générale

Les cancers colorectaux représentent la deuxième cause de mortalité en France et sont un problème majeur de santé publique. Malgré le développement des campagnes de dépistage, les progrès des techniques chirurgicales et l'évolution des traitements adjuvants permettant une prise en charge plus précoce et plus active des récidives, la mortalité des patients atteints de cancer colorectal reste encore élevée.

Le risque de récurrence d'un cancer colorectal est très élevé quand les patients sont opérés pour une tumeur de stade III et IV mais également de stade II à haut risque (T4 ou nombre de ganglions examinés < 12). Le choix du traitement pour les tumeurs de stade II à haut risque demeure un challenge pour les cliniciens dans la mesure où une chimiothérapie adjuvante post-opératoire améliore la survie pour moins de 5% des patients. Connaissant tous les effets secondaires liés à ce type de traitement (nausées, vomissements, chutes de cheveux, baisse des globules blancs, rouges et plaquettes...), la découverte de marqueurs de mauvais pronostic permettrait aux oncologues d'évaluer la nécessité ou non de prescrire ces séances de chimiothérapie.

Ainsi, les améliorations pronostiques du CCR viendront d'un diagnostic plus précoce permettant la résection dans de bonnes conditions de la tumeur primitive, mais aussi du contrôle de la dissémination des métastases. L'identification de marqueurs moléculaires suffisamment sensibles et spécifiques permettrait de différencier par exemple les tumeurs à haut risque de récurrence par rapport aux tumeurs ne présentant pas de risque de récurrence.

Dans ce contexte, notre étude a porté sur la recherche de tels marqueurs exprimés par les mucines intestinales de patients opérés pour un cancer colorectal.

De nombreuses modifications d'expression et de glycosylation des mucines ont été observées dans le cancer colorectal (Byrd and Bresalier, 2004; Kudelka et al., 2015; Kufe, 2009). Des différences par rapport aux mucines normales ont été décrites au niveau

génomique et post-translational. La synthèse de MUC2, la mucine majoritairement sécrétée dans le colon, est diminuée dans le cancer colorectal, au niveau de la tumeur primitive et dans les métastases (Hanski et al., 1997). La distribution de MUC2 au niveau des cellules caliciformes se modifie au niveau des adénomes par rapport à la muqueuse saine, avec une expression augmentée dans le cytoplasme et l'appareil de Golgi et diminuée dans la vésicule de mucus des cellules caliciformes (Myerscough et al., 2001). Une expression *de novo* de MUC5AC, une mucine de l'épithélium foveolaire gastrique, a été observée notamment dans les adénocarcinomes mucineux ainsi que dans les tumeurs microsatellites instables (Arai et al., 2007; Losi et al., 2004; Park et al., 2008). Les mucines MUC5AC et MUC6 sont également fortement exprimées dans les lésions adénomateuses pré-néoplasiques, en étant absentes au niveau de la muqueuse colique normale (Bartman et al., 1999). Il n'a pas été observé de corrélation entre la sécrétion élevée des mucines et la survie et progression du cancer colorectal (Farhat et al., 2008). Une diminution d'expression de DMBT1, une glycoprotéine mucine-like co-sécrétée avec les mucines intestinales a été rapportée dans le cancer colorectal par une seule étude (Mori et al., 1999). Son expression dans les lésions pré-néoplasiques de type adénome, et dans les autres types de polypes n'est pas connue à l'heure actuelle.

Les altérations dans la glycosylation des mucines incluent une réduction en nombre et taille des chaînes glycaniques au niveau des apomucines, des diminutions de certains antigènes normalement exprimés dans la muqueuse colique, l'expression *de novo* de nouveaux antigènes, et l'expression aberrante de certains antigènes de groupes sanguins (Byrd and Bresalier, 2004; Holst et al., 2015; Kudelka et al., 2015; Yang et al., 1994). Bien que les O-glycanes des mucines soient connus depuis longtemps comme étant impliqués dans la carcinogénèse colique, aucun n'a été étudié comme potentiel marqueur de pronostic.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons comparé le profil de O-glycosylation des mucines provenant des tumeurs avec et sans récurrence, et nous avons en parallèle étudié l'expression des gènes de différentes glycosyltransférases impliquées dans la synthèse de ces structures glycaniques.

En parallèle, nous avons étudié la localisation et l'expression de la glycoprotéine « mucine-like » DMBT1 dans le cancer colorectal et au niveau des polypes bénins et pré-néoplasiques.

Nous avons ainsi observé des différences significatives dans le niveau d'expression des O-glycanes entre les deux groupes des tumeurs avec et sans récurrence. Comme rapporté dans les conclusions des résultats du chapitre 1.6., le niveau d'expression de l'antigène sialyl-Tn à m/z 691 était significativement plus élevé dans les tumeurs avec récurrence, par rapport aux tumeurs sans récurrence. Ce résultat est en accord avec les études précédentes démontrant que la surexpression des antigènes Tn et sialyl-Tn est une caractéristique de tumeurs colorectales peu différenciées et à un stade avancé (Giuffrè, 1996; Itzkowitz et al., 1989). Notre analyse structurale de la glycosylation des mucines provenant de tumeurs avec récurrence démontre une plus grande proportion de glycanes basés sur un core 3 et une plus faible expression de glycanes basés sur un core 1, comparé aux tumeurs sans récurrence. Ces données suggèrent que la core 1 synthétase est moins exprimée ou moins active dans les tumeurs avec récurrence, ce qui pourrait expliquer, au moins partiellement, la forte expression d'antigènes sialyl-Tn dans ces tumeurs.

Dans les tumeurs avec récurrence, nous avons également observé un niveau plus élevé des antigènes sialyl T et disialyl T, mais sans différence significative statistiquement. La sialylation de l'antigène T est réalisée par ST6GalNAc-II et une augmentation de son niveau d'ARNm a été corrélée avec une survie diminuée chez les patients avec métastases ganglionnaires (Schneider et al., 2001). L'élongation incomplète des O-glycanes avec l'apparition de ces formes sialylées tronquées dans les tumeurs avec récurrences peut être expliquée par différentes origines. Des modifications épigénétiques peuvent être impliquées, conduisant à l'extinction des gènes des glycosyltransférases nécessaires pour la synthèse des structures O-glycanniques plus complexes, car une diminution significative de l'activité enzymatique a été décrite dans les cancers (Vavasseur et al., 1995; Yang et al., 1994). La régulation négative des gènes codant pour l'enzyme Core 1 et/ou sa chaperonne Cosmc peut également conduire à l'apparition des antigènes Tn et sialyl Tn (Ju and Cummings, 2005; Schietinger et al., 2006). Des modifications de transcription des différents gènes induits par l'hypoxie peuvent également être impliquées dans les stades avancés de cancer (Kannagi, 2004).

Dans notre étude, la modification des O-glycanes la plus importante observée au niveau des tumeurs avec récurrence par rapport à celles sans récurrence concerne la balance entre le niveau d'expression des glycanes basés sur un core 1 et un core 3. Au niveau des tumeurs sans récurrence, nous avons observé une importante diminution des glycanes basés sur un core 3 corrélée à une augmentation des glycanes basés sur un core 1. Par rapport aux témoins sains, le profil de glycosylation des mucines provenant des tumeurs avec récurrence est moins modifié par rapport à ceux sans récurrence. Nos résultats suggèrent que la glycosylation des mucines de tumeurs avec récurrence s'apparente, au moins partiellement, à celle des individus sains. Le caractère plus agressif de ces tumeurs avec récurrence pourrait ainsi s'expliquer par le fait que le système de défense immunitaire n'est pas autant activé que dans le cadre d'une tumeur arborant des glycanes de core 1. Les glycanes de core 3 mimeraient en quelque sorte une situation physiologique normale.

Un autre antigène modifié dans le cancer colorectal est le Sda/Cad. Des études ont montré une diminution de l'expression de l'Ag Sda et de la Sda synthétase dans le cancer colorectal (Dohi and Kawamura, 2008; Groux-Degroote et al., 2014; Malagolini et al., 2007). Dans notre étude portant sur 10 patients, nous n'avons pas observé de différences entre les niveaux d'expression de cet Ag au niveau des échantillons tumoraux, des berges de résection et des témoins sains. Une de nos études précédentes portant sur la glycosylation de MUC2 dans 3 carcinomes colorectaux humains nous avait permis de démontrer que les glycanes disialylés comportant des épitopes Sda/Cad (correspondant à l'ion à m/z 1746) sont présents à la fois dans les tissus normaux et cancéreux alors que les glycanes monosialylés avec épitopes Sda/Cad sont diminués (Robbe-Masselot et al., 2009). Cette étude confirme le fait que les mucines des carcinomes colorectaux conservent un certain niveau d'expression des antigènes Sda/Cad. Une explication pour l'absence de différences dans le niveau d'expression de ces antigènes entre les témoins sains et les tumeurs peut résider dans l'origine des échantillons car des études ont démontré que l'antigène Sda/Cad est exprimé plus particulièrement au niveau du côlon descendant (Groux-Degroote et al., 2014; Joncquel Chevalier Curt et al., 2015). Les résultats présentés ici sont des moyennes des pourcentages de chaque oligosaccharide de tous les échantillons mais au niveau individuel, les résultats montrent des différences significatives entre les niveaux d'expression de ces antigènes (résultats non présentés dans ce manuscrit).

La comparaison de la glycosylation entre les tumeurs, les marges de résection et les témoins sains ont démontré la présence de gradients d'expression des O-glycanes majeurs : les O-glycanes basés sur un core 3 diminuent des témoins vers les tumeurs et les O-glycanes basés sur un core 1 augmentent. Ces résultats témoignent des possibles altérations dans le niveau d'expression des gènes codant pour les glycosyltransférases ou le niveau d'activité de ces enzymes. Des études ont montré une surexpression du gène *C1GALT1* au niveau des carcinomes colorectaux, induisant un comportement agressif des cellules tumorales (Barrow et al., 2013; Hung et al., 2014). Une diminution de la core 3 synthétase a également été décrite dans les carcinomes (Iwai et al., 2005).

La comparaison entre les profils de glycosylation au niveau des marges de résection et des témoins sains montrent des altérations au niveau des marges de résection bien qu'histologiquement saines, suggérant que des altérations moléculaires sont présentes, pouvant contribuer au risque de récurrence pour certains patients.

Dans notre étude, aucune corrélation n'a pas pu être établie entre les O-glycanes et le stade tumoral. Cependant, des variations des niveaux d'expression de certains glycanes ont été observés pour le stade IV, notamment une expression plus élevée des ions à m/z 534 (antigène T), 691 (antigène sialyl Tn) et 983, non significatives statistiquement.

La modification de la balance des antigènes di-sialyl-Lewis^x et sulfo-sialyl-Lewis^x, ainsi que celle des Core 1 et Core 3, suggère des altérations dans l'expression ou l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse de ces glycanes. Dans le but d'identifier quelles enzymes peuvent être impliquées dans ces modifications, nous avons étudié par PCR quantitative l'expression de gènes de glycosyltransférases et sulfotransférases potentiellement impliquées dans la sialylation et sulfatation des glycanes basés sur un Core 3 (*GAL3ST2*, *GAL3ST3*, *GAL3ST4*, *ST3GAL1*, *ST3GAL2*, *ST3GAL3*, *ST3GAL4* et *ST3GAL6*), ainsi que les core 3- et core 1 synthétases. Nous avons démontré une diminution de l'expression des gènes de Gal-3-O-sulfotransférases au niveau des échantillons tumoraux par rapport aux marges de résection ce qui pourrait expliquer la diminution du taux de sulfatation observée dans les tumeurs par rapport aux marges de résection et aux contrôles sains. Ceci renforce une observation antérieure qui suggérait une diminution de l'expression du gène *GAL3ST2*

dans les adénocarcinomes coliques non mucineux (Seko et al., 2002), impliqué dans la diminution de la biosynthèse du 3-sulfo Le^a et du 3-sulfo Le^x.

L'expression de ST3Gal I peut être augmentée dans les cancers, ayant pour conséquence une augmentation des antigènes sialyl-T (Varki, 2009). Dans notre étude, l'expression des gènes de sialyltransférases *ST3GAL3*, *ST3GAL4* et *ST3GAL6* est significativement diminuée dans les échantillons tumoraux par rapport aux marges de résection appariées, alors que l'expression des gènes *ST3GAL1*, *ST3GAL2* n'est pas affectée. Aucune modification significative n'a été observée pour la core 3 synthétase.

De même, aucune différence significative d'expression des gènes étudiés n'a été détectée entre les marges de résection et les témoins sains, ni entre les tumeurs de différents stades TNM, ou entre les tumeurs ayant récidivé ou non. Une étude incluant un nombre de cas plus important est là aussi nécessaire pour confirmer les résultats obtenus.

Concernant l'expression de *DMBT1*, nos résultats démontrent que, si certaines tumeurs n'expriment que peu ou pas du tout *DMBT1*, d'autres tumeurs au contraire montrent une très forte surexpression de la protéine. L'étude de Mori avait montré une réduction des ARNm dans 16.7% des cas de cancer colorectal par rapport aux tissus sains correspondant et avait conclu à une perte d'expression de *DMBT1* dans les cancers coliques (Mori et al., 1999). Notre étude montre une expression hétérogène de *DMBT1* dans les tumeurs de différents grades histologiques et stades TNM et une localisation cellulaire aussi hétérogène. L'étude de Mollenhauer avait montré une localisation de *DMBT1* au niveau du pôle apical des cellules des épithéliums unistratifiés du tube digestif en rapport avec une fonction de protection de la muqueuse assurée par *DMBT1* (Mollenhauer et al., 2002b).

Les facteurs régulant l'expression de cette protéine sont certainement très complexes et nombreux. Le rôle joué par *DMBT1* dans les tumeurs coliques ne peut par conséquent pas être réduit à un simple gène suppresseur de tumeur, comme suggéré par Mori et collaborateurs. Une étude récente utilisant des SNP arrays a mis en évidence des régions du génome comportant une perte d'hétérozygotie avec des disomies et polysomie uniparentales sur différents chromosomes impliquant des gènes candidats pour la cancérogénèse colique parmi lesquels on retrouve aussi *DMBT1* (Torabi et al., 2015). Une autre étude a démontré que l'expression de *DMBT1* pouvait être induite par l'interleukine

IL-22 (Fukui et al., 2011). L'expression d'IL-22 est fortement augmentée dans les tissus inflammatoires intestinaux chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques. L'IL-22 est impliquée dans la progression tumorale et un polymorphisme génétique de l'interleukine serait associé à un risque accru de développer un cancer du côlon (Thompson et al., 2010). Il serait intéressant de déterminer par immunohistochimie s'il existe une corrélation entre l'expression de DMBT1 dans la tumeur et l'expression de l'IL-22 dans les adénomes pré-cancéreux et les tumeurs.

Nos travaux réalisés avec un anticorps monoclonal DMBT1 contre l'isoforme gp340 démontrent qu'il existe une sécrétion basale, globalement faible, de DMBT1, localisée notamment au niveau des entérocytes mais parfois également au niveau des cellules caliciformes, au sein des cryptes et de l'épithélium de surface, avec un marquage cytoplasmique diffus, apical et latéro-basal, et plus rarement polarisé au niveau supranucléaire, avec souvent les vacuoles de mucus épargnées. L'expression de DMBT1 reste faible dans les polypes considérés bénins comme les polypes hyperplasiques, mais aussi dans les adénomes/polypes sessiles festonnés qui ne portent pas de lésions dysplasiques, contrairement à la sécrétion de MUC2 qui augmente dans les polypes hyperplasiques et les polypes festonnés et dans une moindre mesure dans les adénomes conventionnels. La sécrétion de DMBT1 augmente au sein des lésions adénomateuses, plus exprimée de façon significative dans les dysplasies de haut grade avec ou sans composante adénocarcinome intra-muqueuse et les lésions adénomateuses de bas grade de patients ayant déjà un cancer, l'expression étant significativement plus élevée par rapport à des adénomes avec dysplasie de bas grade des patients sans tumeurs. Il semblerait qu'une augmentation de l'expression de DMBT1 soit présente dans d'autres lésions adénomateuses comme l'adénome festonné traditionnel et dans une moindre mesure dans les polypes mixtes, mais ceci reste à confirmer en raison des effectifs trop faibles. La localisation cellulaire de DMBT1 au niveau des différentes lésions est souvent cytoplasmique diffuse avec parfois une expression au sein des vacuoles de mucus, ou ailleurs un renforcement supranucléaire et apical, et parfois une disposition péri-nucléaire au niveau des tumeurs peu-différenciées qui comportent une perte de polarité cellulaire. On ne peut conclure à une délocalisation de la protéine du pôle apical des cellules normales vers les zones basales

et latéro-basales des cellules tumorales correspondant à la matrice extracellulaire, comme décrit par Mollenhauer (Mollenhauer et al., 2002b) mais plutôt à une expression *de novo* ou surexpression de DMBT1 au niveau des cellules caliciformes coliques avec la disposition signalée par Mollenhauer, ce qui confèrerait à la protéine un rôle dans la différenciation épithéliale et un avantage à la cellule contre l'évolution vers le cancer. Cette surexpression est retrouvée aussi, de façon inconstante et focale, au niveau de la muqueuse saine des témoins, ceci pouvant traduire des modifications au niveau cellulaire d'une muqueuse histologiquement saine mais provenant de patients atteints de diverticulose avec probablement des épisodes inflammatoires résolus histologiquement lors de l'intervention chirurgicale. Ceci pourrait expliquer aussi le niveau plus faible d'expression de DMBT1 au niveau de la muqueuse saine au voisinage des polypes bénins.

L'expression de DMBT1 augmente également dans la muqueuse saine avoisinant les lésions pré-néoplasiques et tumorales des patients opérés pour cancer, modérément au niveau des polypes dysplasiques et beaucoup plus au voisinage des tumeurs avec des valeurs significatives statistiquement. Ceci pourrait s'expliquer par le rôle dans la protection de l'épithélium colique conféré par DMBT1, observé aussi au niveau d'autres types de tumeurs comme celles pulmonaires (Mollenhauer et al., 2002c) et mammaires (Braidotti et al., 2004). L'expression de DMBT1 est plus faible au niveau tumoral de façon générale, en étant significativement plus faible qu'au niveau de la muqueuse colique saine à distance, celle-ci ayant une expression proche, d'un point de vue statistique, de l'expression observée au niveau des témoins. Une évolution similaire peut être observée pour l'expression de MUC2 qui diminue de l'adénome vers le carcinome, ce qui est en accord avec l'observation faite sur les souris déficientes en *Muc2*, à savoir la perte d'expression de MUC2 qui favorise la progression vers le cancer colique par la séquence adénome-carcinome ou *de novo* (Mizoshita et al., 2007). Néanmoins, la sécrétion de DMBT1 reste élevée au sein de certains types de tumeurs notamment les adénocarcinomes avec mucin-sécrétion (notamment les adénocarcinomes bien- et modérément différenciés avec composante mucineuse minoritaire) en comparaison notamment avec les adénocarcinomes moyennement différenciés sans composante mucineuse qui ont une expression très faible de DMBT1. Concernant les tumeurs mucin-sécrétantes l'expression plus élevée de DMBT1 est expliquée par la structure de cette molécule car c'est une mucine-like co-sécrétée avec les mucines

coliques. En effet, de nombreuses études ont montré une expression de MUC2 conservée voir augmentée jusqu'à 100% des cas selon les études dans la variante d'adénocarcinome mucineux, augmentation qui est souvent corrélée à un profil d'instabilité microsatellitaire (Biemer-Hüttmann et al., 2000; Blank et al., 1994; Onodera et al., 2009; Weiss et al., 1996). Cependant, l'expression au niveau des carcinomes mucineux (avec composante mucineuse de plus de 50%) n'est pas significativement plus élevée par rapport aux autres types de tumeurs ce qui suggère probablement une autre voie moléculaire par rapport au groupe mucin-secrétant de façon minoritaire (composante mucineuse de moins de 50%). Une étude sur l'expression de DMBT1 au niveau gastrique (Conde et al., 2007b) a donné des résultats comparables car il a été montré une augmentation significative de DMBT1 uniquement au sein des adénocarcinomes bien différenciés par rapport aux autres types (adénocarcinomes moyennement- et peu différenciés, et adénocarcinomes mucineux).

L'expression relativement élevée de DMBT1 au sein des adénocarcinomes bien différenciés, même si statistiquement non significative, peut s'expliquer par la présence plus fréquente d'une composante adénomateuse au niveau de l'adénocarcinome bien différencié, exprimant DMBT1, et la bonne différenciation peut expliquer par elle-même la conservation de DMBT1 au sein de ces lésions. Il existe une perte de l'expression vers le front d'invasion, significatif d'un point de vue statistique notamment pour les adénocarcinomes moyennement différenciés, et à la limite de la significativité pour ceux peu différenciés.

Aucune variation de l'expression de DMBT1 n'a pu être corrélée avec le stade mais nous avons constaté une diminution significative au sein des métastases ganglionnaires, sans variations significatives au niveau des métastases à distance, mais pour celles-ci l'effectif est également trop faible. En parallèle les modifications de MUC2, notamment sa co-expression avec MUC1, entraînent un risque plus élevé de métastases ganglionnaires en engageant le pronostic de la maladie (Jang et al., 2002).

Des informations intéressantes sont fournies par l'étude de l'instabilité microsatellitaire. Celle-ci montre une corrélation d'expression de DMBT1 avec le phénotype instable. Celui-ci est rencontré plus fréquemment dans le cadre des tumeurs muco-sécrétantes et peu différenciées, comme nous l'avons observé aussi dans notre étude. Cependant, dans notre série on retrouve des tumeurs appartenant à ces deux groupes qui sont stables et d'une façon intéressante, elles expriment DMBT1 moins intensément par rapport aux tumeurs

instables du même groupe histologique. Cette corrélation avec l'instabilité microsatellitaire est comparable à celles observée pour MUC2 comme décrit plus haut dans ce chapitre.

Les résultats présentés ont été obtenus en utilisant un anticorps monoclonal anti-DMBT1 gp340. Une étude plus limitée a été réalisée avec un anticorps polyclonal, avec des résultats différents en termes de % d'expression car pour plusieurs cas, nous avons observé une expression plus élevée en utilisant l'anticorps polyclonal en raison de l'apparition beaucoup plus fréquente d'un marquage supranucléaire diffus au niveau des cellules de muqueuse saine et/ou tumorale. Mais globalement, nous avons observé les mêmes tendances d'expression témoignant de la voie muqueuse saine – adénome – carcinome ainsi que la corrélation avec l'instabilité microsatellitaire avec plus de corrélation avec les carcinomes mucineux et l'absence de corrélation avec le front d'invasion ou les métastases ganglionnaires ou à distance (données non présentées dans cette étude). En raison de la bonne qualité du marquage avec l'anticorps monoclonal, et le bruit de fond parfois très important avec le polyclonal avec des variations importantes d'un lot à l'autre, nous avons favorisé l'anticorps monoclonal pour l'interprétation des résultats de l'ensemble de l'étude.

L'étude de l'expression du gène *DMBT1* montre des résultats qui se corrélaient assez bien avec l'immunohistochimie au niveau des prélèvements tumoraux (malgré l'hétérogénéité tumorale) mais moins bien au niveau des marges de résections alors que le marquage de *DMBT1* en immunohistochimie est beaucoup plus homogène à ce niveau. En conséquence, on observe plutôt une augmentation de l'expression de *DMBT1* au niveau tumoral par rapport à la muqueuse saine à distance (12/20 patients). Aucune différence n'a été observée entre les témoins et la muqueuse en marge de résection. Ces résultats comparatifs restent à approfondir en réalisant les deux méthodes (immunohistochimie et RT-qPCR) en parallèle sur les mêmes tumeurs, voire par une technique de qPCR sur tissu paraffiné après microdissection du tissu d'intérêt, au niveau des zones choisies pour l'étude immunohistochimique.

La technique de l'hybridation *in situ* serait intéressante car elle présente l'avantage d'être très sensible, de détecter et de localiser spécifiquement les ARNm codant pour *DMBT1*, pour une étude comparative avec l'expression de la protéine au niveau des mêmes zones choisies. Cependant, elle présente de nombreuses contraintes techniques telles que des équipements sophistiqués et des étapes de prétraitements importantes.

Conclusions – perspectives

En conclusion, notre travail nous a permis d'observer de nombreuses modifications de la glycosylation des mucines intestinales entre les tissus normaux et cancéreux, dont certaines semblent liées à la présence ou non des récidives, mais il est difficile d'identifier des marqueurs spécifiques d'un stade donné de développement du cancer du côlon avec si peu de données. Cette étude reste encore préliminaire dans la mesure où il n'y a eu que 10 patients inclus et les résultats devront être confirmés en incluant un plus grand nombre de patients. Il sera également intéressant de corrélérer les profils de glycosylation des mucines avec d'autres paramètres cliniques comme les traitements pré-opératoires.

Les modifications aux niveaux des enzymes impliquées ne sont pas complètement élucidées. L'étude est en cours pour l'expression du gène impliqué dans la synthèse du core 1, et un nombre plus grand de patients inclus sera nécessaire pour confirmer les observations.

L'expression de DMBT1 semble être modifiée le long de la voie de cancérogénèse adénome – carcinome et aussi celle de l'instabilité microsatellitaire (étude réalisée partiellement, actuellement en cours), avec corrélations aussi avec les tumeurs mucin-sécrétantes, sans que son rôle dans la pathogènes du cancer colique soit élucidé.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel biologique

Trois groupes de patients ont été inclus dans l'étude : 69 patients traités pour un adénocarcinome (par chirurgie), 85 patients traités pour des polypes (par résection endoscopique) et 27 patients traités par chirurgie pour diverticulose colique avec ou sans diverticulite, ceux derniers étant sélectionnés comme témoins pour la muqueuse saine en berge de résection chirurgicale. Tous les patients ont été traités dans les hôpitaux Saint Philibert et Saint Vincent de Paul du Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, dans la période allant de janvier 2002 à juin 2015. Deux collections biologiques ont été réalisées. La première comportant des tissus frais a été réalisée conformément au protocole DC-2008-242 du Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche. Elle inclut uniquement des prélèvements des patients traités pour un cancer, et ceux des témoins. La deuxième a été réalisée avec l'accord du comité d'éthique CPP Nord-Ouest, la référence DC 2012-1712 pour des prélèvements paraffinés.

Un accord a été demandé aux patients.

L'identification des patients a été effectuée en utilisant DIAMIC (outil informatique de gestion des données dans le service d'Anatomie Pathologique). Pour la collection des tissus frais, les prélèvements des pièces opératoires ont été congelés immédiatement après l'opération. Pour le reste, des prélèvements paraffinés sont conservés selon le protocole habituel utilisé dans le laboratoire d'anatomie pathologique.

Données cliniques et sélection des cas

Pour chaque patient on a noté la date de naissance, la date de l'intervention chirurgicale (la date de la réception de la pièce chirurgicale au laboratoire), la date de la dernière consultation GHICL, la date et la cause du décès pour les personnes décédées, la présence ou non de métastases y compris celles biopsiées lors de l'intervention chirurgicale mais aussi des métastases décelées par l'imagerie non biopsiées dans nos hôpitaux. Une vérification de la dernière consultation au GHICL a été effectuée le 30/09/2015, date fixée pour l'arrêt du recueil des données cliniques. Cette vérification a été réalisée en utilisant Clinicom, un logiciel informatique utilisé pour la gestion des dossiers des patients au GHICL.

2. Extraction et purification des mucines

2.1. Extraction des mucines

Des échantillons de tissu frais provenant de 10 patients avec cancer (échantillons tumoraux et de muqueuses saines en marges de résection) et des 5 témoins ont été utilisés. Les patients ont été inclus dans l'étude comme indiqué au chapitre 1 « Matériel biologique ». Les échantillons sont solubilisés dans un tampon d'extraction pour mucines composé de chlorure de guanidine 4M et d'inhibiteur de protéases (EDTA 5 mM, benzamidine 10 mM, N-éthylmaléimide 5mM, soy bean trypsin inhibitor 0.1mg /ml, PMSF 1 mM, dithiothréitol 10 mM, azide de sodium 0.02%). Ce tampon est préparé extemporanément. Les échantillons sont ensuite passés dans un broyeur (gentleMACS Dissociator) avec le programme M Tubes protein. Le broyat récupéré est centrifugé à 100 g pendant 5 minutes à 20°C dans une centrifugeuse Thermo scientifique (Megafuge 16R). Selon les échantillons et leur quantité, les étapes de broyage et de centrifugation peuvent être répétées.

2.2. Ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium

Le surnageant est récupéré et amené à une densité de 1,4g/ml avec du chlorure de césium. Ces échantillons sont transférés dans des tubes Quick seal polyallomer de 13 mL (beckman) et qui sont ensuite scellés par chauffage. L'ultracentrifugation est réalisée à 308 400 g pendant 48 à 72 heures à température ambiante avec un rotor 70.1 Ti (Optima XE-90 ultracentrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, California).

La récupération des fractions se fait à l'aide d'un collecteur et d'une pompe péristaltique réglée à un débit de 500 µL/min. La densité de chaque fraction est mesurée par pesée, les tubes contenant les mucines auront une densité comprise entre 1,35 et 1,45 g/ml.

2.3. Détection des mucines

Les mucines sont repérées par le biais de la mesure de la densité de chaque fraction (comprise entre 1,35g/mL et 1,45g/mL pour les mucines) et de l'utilisation d'anticorps spécifiques anti-mucines à l'aide d'un slot blot. Pour cela, 20µL de chacune des fractions sont déposés sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil à slot blot. La membrane est

saturée par une solution à 5% de lait écrémé dans du TBS-T pendant 1 heure à température ambiante. L'immunodétection est réalisée en utilisant un anticorps anti-mucine au 1 : 1000 dans du TBS-T avec 5% de lait pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est lavée 5×10 minutes dans le TBS-T. Elle est ensuite incubée avec un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin le cas échéant marqué à la peroxydase (*Amersham Biosciences*) utilisé à une dilution au 1/10 000^e dans 5% de lait dans le TBS-T, 45 minutes sous agitation lente. Après 5×10 minutes de lavage, la révélation se fait par chimiluminescence (ECL-Advance, *Amersham Biosciences*).

3. Analyse structurale des chaînes glycaniques de mucines

3.1. Hydrolyse chimique des oligosaccharides

Les extraits lyophilisés sont dissous dans une solution de NaOH 0,1M contenant du BH₄Na 1M (378,4 mg pour 10 mL de NaOH 0,1M). La solution est incubée au bain marie à 45°C pendant 20 heures ou à 37°C pendant 3 jours. La réaction est arrêtée par addition d'une résine échangeuse de cations (Dowex 50x8, 20-50 mesh, forme H⁺) à 4°C et la solution est ensuite filtrée puis évaporée à sec. L'excédent de sels de borate est éliminé par codistillation avec du méthanol. Les glycanes libérés sont alors sous forme d'oligosaccharide-alditols.

3.2. Chromatographie échangeuse de cations

Les peptides sont éliminés du mélange par passage de la solution sur une colonne de résine échangeuse de cations (Dowex 50x2, 200-400 mesh, forme H⁺). Les oligosaccharides sont élués par de l'eau désionisée tandis que les peptides restent fixés sur la résine. La solution obtenue est ensuite concentrée sous évaporateur rotatif à 40°C puis lyophilisée.

3.3. Perméthylation des oligosaccharides

L'échantillon lyophilisé est repris dans 200 µL de DMSO. Une pointe de spatule de NaOH est ajoutée puis 300 µL de ICH₃. La solution est placée sous Argon puis sous agitation

pendant 1h30 à température ambiante. La réaction est stoppée par l'ajout de 1 mL d'acide acétique à 5%. Les échantillons sont ensuite déposés sur une colonne Oasis HLB préalablement lavée avec 3 mL de MeOH 100% puis équilibrée avec 3 ml d'eau milliQ. Après passage de l'échantillon, la colonne est lavée avec 4 mL de MeOH /eau (5/95, v/v) puis l'échantillon est élué par 3 mL de MeOH 100%.

3.4. Analyse des oligosaccharides par spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées sur un spectromètre de masse de géométrie MALDI-TOF-TOF de type Analyzer 4800 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Canada) équipé d'une source laser. Les échantillons ont été dissous dans un solvant méthanol/eau (50:50, v/v) à différentes dilutions et déposés sur une cible MALDI en addition avec une matrice DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoïque) à une dilution volume/volume. La puissance du laser appliqué sur la cible est de 2500 V. Pour chaque structure d'intérêt, l'intensité de 10 pics d'expériences indépendantes a été mesurée. La moyenne de ces intensités a été calculée.

Les spectres ESI-MS et ESI-MS/MS ont été réalisés sur un spectromètre de masse de géométrie Q-TOF et de type Q-Star Pulsar I (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Canada) équipé d'une source nanoélectrospray (Protana, Odense, Denmark). Les échantillons ont été dissous dans un solvant méthanol/eau/0,1% acide formique (50/50, v/v), à une concentration de 60pmol/ μ L. La tension appliquée au capillaire oscille entre 800 et 1000Volts.

Pour les spectres MS/MS, l'énergie de collision appliquée aux précurseurs varie de 20 à 90eV en fonction de l'état de charge et de la stabilité de l'ion sélectionné. L'acquisition a été réalisée en mode pulse d'ions (fonction « enhance » activée), et les spectres présentés résultent de l'accumulation de 50 à 100 cycles de balayage de la gamme de masse choisie. Toutes les analyses ont été réalisées en mode positif et en mode négatif.

3.5. Analyse statistique

Nous avons le test de Student *t* et avons considéré un seuil de significativité d'au moins 5% pour toutes les analyses.

4. Analyse de l'expression des sialyl- et sulfotransférases

4.1. Extraction d'ARN de tissus coliques et synthèse d'ADNc.

Des échantillons de tissu frais provenant de 20 patients avec cancer (échantillons tumoraux et de muqueuses saines en marges de résection) et des 11 témoins ont été utilisés. Les patients ont été inclus dans l'étude comme indiqué au chapitre 1 « Matériel biologique ». Les ARN totaux ont été isolés des différents tissus coliques grâce au kit d'extraction NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Germany), suivant les instructions du fabricant. La qualité et la quantité des ARN sont contrôlées grâce à au Bioanalyzer Agilent. La reverse-transcription est alors réalisée à partir d'1 µg d'ARN en présence d'un ratio 1 :1 d'oligo-dT et d'amorces hexamériques aléatoires grâce au kit AffinityScript™ QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene, Santa Clara, USA) dans un volume final de 20 µL.

4.2. Analyse par PCR quantitative.

Les séquences des amorces (Eurogentec, Seraing, Belgique) utilisées sont présentées dans le tableau 17. L'expression des gènes de sulfotransférases *GAL3ST2*, *GAL3ST3*, *GAL3ST4*, des gènes d'α2,3-sialyltransférases *ST3GAL1*, *ST3GAL2*, *ST3GAL3*, *ST3GAL4*, *ST3GAL6*, et du gène de la Core 3 synthétase a été analysée dans les différents échantillons témoins, tumoraux et les marges de résection appariées. Les analyses par PCR quantitative ont été réalisées sur l'appareil Mx3005p Quantitative System (Stratagene, La Jolla, CA, USA). La réaction de PCR (25 µL) est réalisée avec 12,5 µL de 2X Brilliant® SYBR® Green qPCR Mastermix (Stratagene), 300 nM d'amorces et 4 µL d'ADNc (1/40). La réaction est conduite suivant le cycle suivant : 10 minutes de dénaturation initiale à 94°C, puis 40 cycles d'amplification (30 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'hybridation au T_m, et 45 s d'élongation à 72°C) et une étape d'élongation finale de 5 min à 72°C. La fluorescence est mesurée à chaque cycle. L'analyse est réalisée grâce au logiciel Mx3005p. Pour chaque paire d'amorces, la spécificité de l'amplification a été vérifiée par le contrôle des courbes de dissociation, l'analyse sur gel des produits d'amplification et leur séquençage. L'efficacité des réactions d'amplification a été contrôlée par utilisation de dilutions sériées d'ADNc et est comprise entre 97 et 103%.

Le gène de l'Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransferase (*HPRT*) a été utilisé pour normaliser l'expression des gènes d'intérêt. Les quantifications ont été réalisées selon la méthode décrite par Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Table 17 : Séquence des amorces utilisées en PCR quantitative et température d'hybridation utilisée pour la réaction.

Amorce	Séquence	T _m (°C)
<i>HPRT</i> 5'	5'-GCC-AGA-CTT-TGT-TGG-ATT-TG-3	58
<i>HPRT</i> 3'	5'-CTC-TCA-TCT-TAG-GCT-TTG-TAT-TTT-G-3'	58
<i>ST3GAL1</i> 5'	5' GGG-CAG-ACA-GCA-AAG-GGA-A 3'	60
<i>ST3GAL1</i> 3'	5' GGC-CGT-CAC-GTT-AGA-CTC-AAA 3'	60
<i>ST3GAL2</i> 5'	5' GCC-TCC-GAC-TGG-TTT-GAC-A 3'	60
<i>ST3GAL2</i> 3'	5' GTC-CGG-TGG-AAG-ATC-CAT-GT 3'	60
<i>ST3GAL3</i> 5'	5'-GGG-TCA-CGA-ATT-GAC-TAT-G-3'	60
<i>ST3GAL3</i> 3'	5'-GTG-ATG-CGC-AGT-GTC-GTT-TT-3'	60
<i>ST3GAL4</i> 5'	5'-ATA-AGA-AGC-GGG-TGC-GAA-AGG-G-3'	60
<i>ST3GAL4</i> 3'	5'-TCC-GTG-GCT-GTT-GCA-TTG-GC-3'	60
<i>ST3GAL6</i> 5'	5'-GGC-CAT-ATT-CCT-GAG-TGC-TGT-C-3'	60
<i>ST3GAL6</i> 3'	5'-AGC-TGG-CTT-TGA-TAA-ACA-AGG-C-3'	60
<i>GAL3ST2</i> 5'	5'-CTG-AGC-AGG-ACC-CAA-AGG-T-3'	60
<i>GAL3ST2</i> 3'	5'-GCT-GAC-CAT-GTT-TCT-CAG-CA-3'	60
<i>GAL3ST3</i> 5'	5' AGC-TGG-TAC-CCC-AAG-CTG-TTC 3'	60
<i>GAL3ST3</i> 3'	5' GGC-AAA-GCG-AAA-CAG-GAT-GT 3'	60
<i>GAL3ST4</i> 5'	5' AGG-CTT-CTG-ACC-CCA-AAT-ACA-TC 3'	60
<i>GAL3ST4</i> 3'	5' CCA-AAA-CCT-TAG-CTG-ACC-CAA-AC 3'	60
<i>Core3S</i> 5'	5' GTG-GGA-CTT-CCA-CGA-CTC-CTT 3'	60
<i>Core3S</i> 3'	5' GCA-CCT-TGT-CTC-CTG-CCA-CT 3'	60

Les amorces ont été décrites par (García-Vallejo et al., 2006; Groux-Degroote et al., 2008; Pfaffl, 2001)

4.3. Analyse statistique

L'étude statistique a été réalisée par Laurène Norberciack, ingénieur biostatisticienne du Département de Recherche Médicale de GHICL.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R.

Nous avons tout d'abord effectué une analyse descriptive des données en calculant les médianes et étendues pour les données quantitatives étant donné le faible effectif, et les effectifs et fréquences pour les données qualitatives.

Nous avons réalisé une analyse de corrélation entre l'expression des gènes (*GAI3ST2*, *GAI3ST3*, *GAI3ST4*, *ST3GAL1*, *ST3GAL2*, *ST3GAL3*, *ST3GAL4*, et *ST3GAL6*) dosées sur le tissu tumoral puis sain des 20 patients par le calcul du coefficient de corrélation de Spearman.

Nous avons étudié s'il existait une différence d'expression significative de chaque gène entre le tissu tumoral et sain des patients par la mise en œuvre du test des rangs signés de Wilcoxon étant donné le faible effectif et l'absence de normalité des différences. Les p-valeurs ont été corrigées par la technique de Holm pour contrôler le risque d'erreur α du fait de la multiplicité des tests.

Pour analyser la différence d'expression des gènes entre le tissu sain des 20 patients et le tissu des 11 témoins, nous avons mis en œuvre le test de Mann-Whitney-Wilcoxon pour chaque gène, et avons corrigé les p-valeurs obtenues par la correction de Holm.

L'analyse suivante a été menée sur le tissu tumoral puis sain des 20 patients.

Afin d'estimer si les gènes s'exprimaient différemment, nous avons mis en œuvre le test de Quade étant donné le caractère répété des mesures.

Nous avons étudié l'influence des variables telles que le stade (pour le tissu tumoral), et la récurrence sur l'expression de chaque gène en menant une analyse de variance bivariée tout d'abord, via l'utilisation des tests de Mann-Whitney-Wilcoxon et Kruskal-Wallis en appliquant une correction des p-valeurs par la technique de Holm. Nous avons ensuite analysé l'ensemble des gènes au travers d'une analyse multivariée par l'utilisation d'un modèle linéaire mixte qui permet de prendre en compte les corrélations entre les mesures répétées, et de considérer des variables pouvant expliquer la variance.

Dans ce modèle, pour respecter la structure hiérarchique des données, le patient et la famille sont des effets aléatoires ; la famille, le stade (pour le tissu tumoral uniquement), la récurrence sont des effets fixes.

Aucune des données ne suivant une distribution normale même après correction par la technique de Holm des p-valeurs obtenues au test de Shapiro-Wilk, une transformation en log a été réalisée. Après transformation, toutes les données suivaient une loi normale.

Nous avons construit le modèle et la normalité des résidus a été vérifiée graphiquement à l'aide des QQ-plots. Nous avons ensuite interprété les résultats des modèles obtenus sur le tissu tumoral puis sain.

Nous avons considéré un seuil de significativité de 5% pour toutes les analyses.

Les représentations graphiques en boîte à moustache on les a réalisées en utilisant l'Excel, et en tenant compte des 1^{ère} et 3^{ème} percentiles (les extrémités des cylindres) et les valeurs minimale et maximale (extrémités des barres verticales) regroupées autour de la médiane (la barre à l'intérieur des cylindres).

5. Analyse de l'expression et de la localisation de DMBT1

5.1. Etude histologique

Les patients inclus dans cette étude ont été sélectionnés comme indiqué dans le premier chapitre « Matériel biologique ». Les lames effectuées lors de l'intervention chirurgicale ou endoscopique ont été réexaminées pour pouvoir choisir celles avec une lésion tumorale possédant le moins de nécrose tumorale, avec de la muqueuse non tumorale au voisinage et à distance, celles avec des métastases ganglionnaires et/ou hépatiques, et celles avec lésions adénomateuses associées. Pour les polypes, en cas de présence de plusieurs fragments sur plusieurs lames, les fragments les plus typiques pour la lésion en histologie ont été sélectionnés. Concernant les témoins, la berge chirurgicale a été examinée en microscopie pour attester l'absence d'importante inflammation.

Des coupes tissulaires de 4 µm ont été réalisées à partir des blocs archivés de tissus fixés et inclus en paraffine.

Une coloration par hématoxyline éosine safran (HES) a été effectuée pour grader les tumeurs. Les facteurs histopathologiques évalués et recherchés lors de cette relecture pour la cohorte de 69 patients sont :

- Le stade selon la classification TNM UICC 2009 7^{ème} édition, classification reprise dans la classification de tumeurs de l'OMS 2010. Pour les patients portant plusieurs tumeurs synchrones, la tumeur ayant le stade le plus avancé pour le patient a été choisie pour l'étude statistique, en excluant les autres pour garder l'indépendance des données.

- Le grade histopathologique

- Il a été précisé le type histologique de la tumeur et la présence ou absence d'une composante mucineuse minoritaire associée.

- Les lésions adénomateuses ont été évaluées et pour chaque patient présentant une ou plusieurs lésions de ce type, un ou plusieurs blocs ont été choisis pour l'étude immunohistochimique. Un seul d'entre eux a été inclus dans l'analyse statistique pour conserver l'indépendance des données, et le choix a tenu compte de la taille des polypes en choisissant le polype le plus grand pour analyse statistique.

- Les nodules tumoraux péritonéaux ont été considérés comme métastases ganglionnaires selon les critères formulés dans l'OMS (éditions 2000 et 2010).

- Pour les polypes, le type histologique a été réévalué et certains d'entre eux ont été reclassifiés selon les données actuelles de la littérature.

5.2. Etude immunohistochimique

Plusieurs coupes sériées ont été effectuées et marquées avec différents anticorps primaires : anti DMBT1 monoclonal pour toutes les lames et polyclonal pour une partie d'entre elles ; et les marqueurs d'instabilités microsatellitaires (anti MLH1, anti-MSH2, anti-PMS2 et MSH6) uniquement au niveau des lésions adénocarcinomateuses.

Technique

Elle a été effectuée de manière automatisée, en utilisant l'automate VENTANA BENCHMARK XT. Cet automate réalise les différentes étapes de :

- déparaffinage : réalisé par chauffage et par l'action d'une solution légèrement détergente (EZ prep, Ventana) qui favorise l'élimination de la paraffine après chauffage

- pré-traitement : réalisé par chaleur et à l'aide d'un tampon citrate légèrement acide (pH 6) dans le cadre du programme CC2 de Ventana, ou à l'aide d'un tampon Tris à pH légèrement basique dans le cadre du programme CC1 de Ventana. La durée de prétraitement et le programme utilisé dépendent de l'anticorps utilisé (voir tableau 18)
- blocage de l'activité de la peroxydase endogène : lames mises en contact avec de l'eau oxygénée pendant 8 minutes
- incubation : lames incubées avec les anticorps primaires. Les temps d'incubation dépendent des anticorps utilisés (voir Tableau 18).
- une amplification a été réalisée en utilisant le kit fourni par le producteur (Amplification kit)
- la biotine endogène a été bloquée en utilisant le kit fourni par le producteur (Endogenous biotin blocking kit)
- la détection des anticorps primaires a été effectuée en utilisant un anticorps secondaire biotinylé et en ajoutant le complexe peroxydase Horseradish (HRP)
- révélation : par le chromogène diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB + H₂O₂) produisant un précipité brun (DAB O₂)
- la contre coloration a été réalisée à l'hématoxyline associée au Bluing Reagent permettant d'obtenir un bleu clair.

Les dernières étapes de la technique sont la déshydratation, le passage dans des bains de xylène et le montage lame-lamelle.

Table 18 : Anticorps primaires : provenance, clonalité, dilution, prétraitement et incubation.

Anticorps	Provenance	Clonalité	Dilution	Prétraitement	Incubation
Anti-DMBT1	Thermo Fischer Scientific	Monoclonal gp340	1/120	CC1, 60' + blocage	32'
Anti-DMBT1	Dr Thornton, Manchester, UK	Polyclonal Anti-man gp340	1/250	CC2, 60' + amplification	60'
Anti-MLH1	Ventana	Monoclonal G168-728	Prédilué	CC1, 60' + amplification	32'
Anti-MSH2	Ventana	Monoclonal G219-1129	Prédilué	CC1, 60' + amplification	32'
Anti-MSH6	BD Biosciences	Monoclonal 44	1/100	CC1, 60'	32'
Anti-PMS2	BD Pharmingen	Monoclonal A16-4	1/40	CC1, 60' + amplification	20'

Interprétation des immunomarquages

L'expression de *DMBT1* a été évaluée de manière semi-quantitative et exprimée sous la forme de % de cellules marquées par rapport au volume cellulaire tumoral total. Compte tenu de l'expression souvent hétérogène d'un champ microscopique à l'autre, tous les champs ont été évalués et une moyenne a été calculée. Pour le front d'invasion tumoral, une ligne parallèle au front, d'une épaisseur de 1,25 mm (le diamètre du champ au grossissement 200x) a été évaluée pour toutes les tumeurs, n'importe le stade. L'expression au niveau de la muqueuse non-tumorale étant plus homogène, 500 cellules épithéliales ont été comptées.

L'expression immunohistochimique des protéines MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*) a été évaluée de manière qualitative par la présence ou l'absence, même faible, du marquage. Le seul marquage pour ces 4 protéines est nucléaire, en présence du témoin interne positif, même faible. Les cas négatifs avec l'absence de marquage au niveau tumoral mais avec la présence du témoin interne positif ont été considérés comme microsatellite instable. Les cas avec témoin interne absent ou présent mais uniquement à distance de la zone tumorale ont été considérés comme ininterprétables.

5.3. Analyse par PCR quantitative

L'extraction d'ARN de tissus coliques et synthèse d'ADNc ont été effectuées comme décrit dans le chapitre 4.1. L'analyse par PCR quantitative de l'expression du gène *DMBT1* a été réalisée comme décrit dans le chapitre 4.2. Les séquences des amorces *DMBT1* et *HPRT* (Eurogentec, Seraing, Belgique) utilisées sont présentées dans le tableau 19.

Tableau 19 : Séquence des amorces *DMBT1* et *HPRT* utilisées en PCR quantitative et température d'hybridation utilisée pour la réaction.

Amorce	Séquence	T _m (°C)
<i>HPRT 5'</i>	5'-GCC-AGA-CTT-TGT-TGG-ATT-TG-3	58
<i>HPRT 3'</i>	5'-CTC-TCA-TCT-TAG-GCT-TTG-TAT-TTT-G-3'	58
<i>DMBT1-F 5'</i>	TGC-TCT-GTC-TGC-CAA-ATC-AC	60
<i>DMBT1-R 3'</i>	GTC-ATT-GTC-TGC-CTG-CTT-GA	60

Les amorces DMBT1 ont été conçues avec Primer 3 software (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA) (Jumblatt et al., 2006).

5.4. Analyse statistique

L'étude statistique a été réalisée par Laurène Norberciack, ingénieur biostatisticienne du Département de Recherche Médicale de GHICL. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R. Tout d'abord une analyse descriptive des données a été effectuée en calculant les médianes et étendues pour les données quantitatives, étant donné le faible effectif, et les effectifs et fréquences pour les données qualitatives.

Un certain nombre de comparaisons 2 à 2 a été réalisé entre les données. Lorsque les mesures ont été réalisées chez les mêmes patients, des tests ont été mis en œuvre pour séries appariées : test de Student pour séries appariées si distribution normale, test des rangs signés de Wilcoxon sinon. Lorsque les échantillons étaient indépendants, les tests de Mann-Whitney-Wilcoxon et Kruskal-Wallis ont été utilisés (du fait de l'absence de normalité). Les p-valeurs ont été corrigées par la technique de Holm lorsque nécessaire.

Le niveau de corrélation entre deux variables quantitatives a été estimé par le coefficient de corrélation de Spearman. L'analyse de la liaison entre deux variables qualitatives a été réalisée par la mise en œuvre du test exact de Fisher (car règle de Cochran sur effectif minimum non vérifiée).

Chez les patients avec une tumeur, nous avons segmenté l'expression de DMBT1 au niveau tumoral global en classes afin d'étudier la survie en fonction de ces groupes d'expression.

Nous avons tout d'abord tracé la courbe de survie globale par la méthode de Kaplan-Meier, puis en fonction de chacun des groupes. Les courbes se croisant, nous n'avons pu appliquer un test du logrank global pour nous permettre de savoir si les distributions de survie diffèrent entre les groupes. Nous avons ensuite calculé les médianes de survie.

Afin d'étudier l'influence du stade TNM et de l'expression de DMBT1 au niveau tumoral global sur la survie, nous avons mis en œuvre des modèles de Cox univariés puis multivariés.

Les conditions d'application ont été vérifiées (graphiquement via les résidus de la martingale pour la log-linéarité, numériquement pour l'hypothèse des risques proportionnels).

Nous avons considéré un seuil de significativité d'au moins 5% pour toutes les analyses.

Les représentations graphiques en boîte à moustache ont été réalisées en utilisant Excel, et en tenant compte des 1^{ère} et 3^{ème} percentiles (les extrémités des cylindres) et les valeurs minimale et maximale (extrémités des barres verticales) regroupées autour de la médiane (la barre à l'intérieur des cylindres).

BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques

- Aksoy, N., Corfield, A.P., and Sheehan, J.K. (2000). Preliminary study pointing out a significant alteration in the biochemical composition of MUC2 in colorectal mucinous carcinoma. *Clin. Biochem.* *33*, 167–173.
- Alexandersson, B.T., Hreinsson, J.P., Stefansson, T., Jonasson, J.G., and Bjornsson, E.S. (2014). The risk of colorectal cancer after an attack of uncomplicated diverticulitis. *Scand. J. Gastroenterol.* *49*, 576–580.
- Amos-Landgraf, J.M., Heijmans, J., Wielenga, M.C.B., Dunkin, E., Krentz, K.J., Clipson, L., Ederveen, A.G., Groothuis, P.G., Mosselman, S., Muncan, V., et al. (2014). Sex disparity in colonic adenomagenesis involves promotion by male hormones, not protection by female hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 16514–16519.
- Arai, T., Kasahara, I., Sawabe, M., Kanazawa, N., Kuroiwa, K., Honma, N., Aida, J., and Takubo, K. (2007). Microsatellite-unstable mucinous colorectal carcinoma occurring in the elderly: comparison with medullary type poorly differentiated adenocarcinoma. *Pathol. Int.* *57*, 205–212.
- Atkin, W.S., Morson, B.C., and Cuzick, J. (1992). Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N. Engl. J. Med.* *326*, 658–662.
- Barrow, H., Tam, B., Duckworth, C.A., Rhodes, J.M., and Yu, L.-G. (2013). Suppression of core 1 Gal-transferase is associated with reduction of TF and reciprocal increase of Tn, sialyl-Tn and Core 3 glycans in human colon cancer cells. *PLoS One* *8*, e59792.
- Bartley, A.N., Thompson, P.A., Buckmeier, J.A., Kepler, C.Y., Hsu, C.-H., Snyder, M.S., Lance, P., Bhattacharyya, A., and Hamilton, S.R. (2010). Expression of gastric pyloric mucin, MUC6, in colorectal serrated polyps. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *23*, 169–176.
- Bartman, A.E., Sanderson, S.J., Ewing, S.L., Niehans, G.A., Wiehr, C.L., Evans, M.K., and Ho, S.B. (1999). Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *80*, 210–218.
- Batts, K.P. (2015). The pathology of serrated colorectal neoplasia: practical answers for common questions. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *28 Suppl 1*, S80-87.
- Beck, D.E. (2015). The importance of colorectal cancer screening. *Ochsner J.* *15*, 11–12.
- Benard, A., Goossens-Beumer, I.J., van Hoesel, A.Q., Horati, H., de Graaf, W., Putter, H., Zeestraten, E.C.M., Liefers, G.-J., van de Velde, C.J.H., and Kuppen, P.J.K. (2015). Nuclear expression of histone deacetylases and their histone modifications predicts clinical outcome in colorectal cancer. *Histopathology* *66*, 270–282.
- Bennett, E.P., Mandel, U., Clausen, H., Gerken, T.A., Fritz, T.A., and Tabak, L.A. (2012). Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* *22*, 736–756.
- Bergstrom, K.S.B., Kisson-Singh, V., Gibson, D.L., Ma, C., Montero, M., Sham, H.P., Ryz, N., Huang, T., Velcich, A., Finlay, B.B., et al. (2010). Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog.* *6*, e1000902.
- Bettington, M., Walker, N., Rosty, C., Brown, I., Clouston, A., Wockner, L., Whitehall, V., and Leggett, B. (2014). Critical appraisal of the diagnosis of the sessile serrated adenoma. *Am. J. Surg. Pathol.* *38*, 158–166.
- Biemer-Hüttmann, A.E., Walsh, M.D., McGuckin, M.A., Ajioka, Y., Watanabe, H., Leggett, B.A., and Jass, J.R. (1999). Immunohistochemical staining patterns of MUC1, MUC2, MUC4, and MUC5AC mucins in hyperplastic

- polyps, serrated adenomas, and traditional adenomas of the colorectum. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **47**, 1039–1048.
- Biemer-Hüttmann, A.E., Walsh, M.D., McGuckin, M.A., Simms, L.A., Young, J., Leggett, B.A., and Jass, J.R. (2000). Mucin core protein expression in colorectal cancers with high levels of microsatellite instability indicates a novel pathway of morphogenesis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **6**, 1909–1916.
- Bikker, F.J., van der Wal, J.E., Ligtenberg, A.J.M., Mollenhauer, J., de Bleeck-Hogervorst, J.M.A., van der Waal, I., Poustka, A., and Nieuw Amerongen, A.V. (2004). Salivary agglutinin/DMBT1SAG expression is up-regulated in the presence of salivary gland tumors. *J. Dent. Res.* **83**, 567–571.
- Binder-Foucard, F., Belot, A., Delafosse, P., Remontet, L., Woronoff, A., and Bossard, N. (2013). Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012: étude à partir des registres des cancers du réseau Francim (Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire).
- Bistrup, A., Bhakta, S., Lee, J.K., Belov, Y.Y., Gunn, M.D., Zuo, F.R., Huang, C.C., Kannagi, R., Rosen, S.D., and Hemmerich, S. (1999). Sulfotransferases of two specificities function in the reconstitution of high endothelial cell ligands for L-selectin. *J. Cell Biol.* **145**, 899–910.
- Blackburn, A.C., Hill, L.Z., Roberts, A.L., Wang, J., Aud, D., Jung, J., Nikolcheva, T., Allard, J., Peltz, G., Otis, C.N., et al. (2007). Genetic mapping in mice identifies DMBT1 as a candidate modifier of mammary tumors and breast cancer risk. *Am. J. Pathol.* **170**, 2030–2041.
- Blank, M., Klusmann, E., Krüger-Krasagakes, S., Schmitt-Gräff, A., Stolte, M., Bornhoeft, G., Stein, H., Xing, P.X., McKenzie, I.F., and Verstijnen, C.P. (1994). Expression of MUC2-mucin in colorectal adenomas and carcinomas of different histological types. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **59**, 301–306.
- Boland, C.R., Thibodeau, S.N., Hamilton, S.R., Sidransky, D., Eshleman, J.R., Burt, R.W., Meltzer, S.J., Rodriguez-Bigas, M.A., Fodde, R., Ranzani, G.N., et al. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* **58**, 5248–5257.
- Bork, U. (2014). Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **20**, 10296.
- Bork, U., Rahbari, N.N., Schölch, S., Reissfelder, C., Kahlert, C., Büchler, M.W., Weitz, J., and Koch, M. (2015). Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study. *Br. J. Cancer.*
- Braidotti, P., Nuciforo, P.G., Mollenhauer, J., Poustka, A., Pellegrini, C., Moro, A., Bulfamante, G., Coggi, G., Bosari, S., and Pietra, G.G. (2004). DMBT1 expression is down-regulated in breast cancer. *BMC Cancer* **4**, 46.
- Brenner, H., Hoffmeister, M., Arndt, V., and Haug, U. (2007). Gender differences in colorectal cancer: implications for age at initiation of screening. *Br. J. Cancer* **96**, 828–831.
- Bresalier, R.S., Ho, S.B., Schoepner, H.L., Kim, Y.S., Sleisenger, M.H., Brodt, P., and Byrd, J.C. (1996). Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterology* **110**, 1354–1367.
- Brockhausen, I. (1999). Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 67–95.
- Brockhausen, I. (2006). Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep.* **7**, 599–604.
- Bu, X.-D., Li, N., Tian, X.-Q., Li, L., Wang, J.-S., Yu, X.-J., and Huang, P.-L. (2010). Altered expression of MUC2 and MUC5AC in progression of colorectal carcinoma. *World J. Gastroenterol. WJG* **16**, 4089–4094.

- Bugajski, M., Kaminski, M.F., Orłowska, J., Mroz, A., Pachlewski, J., Rupinski, M., Zagorowicz, E., Rawa, T., and Regula, J. (2015). Suspicious macroscopic features of small malignant colorectal polyps. *Scand. J. Gastroenterol.* 1–7.
- Buisine, M.P., Janin, A., Maunoury, V., Audié, J.P., Delescaut, M.P., Copin, M.C., Colombel, J.F., Degand, P., Aubert, J.P., and Porchet, N. (1996). Aberrant expression of a human mucin gene (MUC5AC) in rectosigmoid villous adenoma. *Gastroenterology* 110, 84–91.
- Byrd, J.C., and Bresalier, R.S. (2004). Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 23, 77–99.
- Caiazza, F., Ryan, E.J., Doherty, G., Winter, D.C., and Sheahan, K. (2015). Estrogen receptors and their implications in colorectal carcinogenesis. *Front. Oncol.* 5, 19.
- Capon, C., Maes, E., Michalski, J.C., Leffler, H., and Kim, Y.S. (2001). Sd(a)-antigen-like structures carried on core 3 are prominent features of glycans from the mucin of normal human descending colon. *Biochem. J.* 358, 657–664.
- Carlson, D.M. (1968). Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J. Biol. Chem.* 243, 616–626.
- Chang, S.K., Dohrman, A.F., Basbaum, C.B., Ho, S.B., Tsuda, T., Toribara, N.W., Gum, J.R., and Kim, Y.S. (1994). Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer. *Gastroenterology* 107, 28–36.
- Cheng, H., Bjercknes, M., and Chen, H. (1996). CRP-ductin: a gene expressed in intestinal crypts and in pancreatic and hepatic ducts. *Anat. Rec.* 244, 327–343.
- Chik, J.H.L., Zhou, J., Moh, E.S.X., Christopherson, R., Clarke, S.J., Molloy, M.P., and Packer, N.H. (2014). Comprehensive glycomics comparison between colon cancer cell cultures and tumours: implications for biomarker studies. *J. Proteomics* 108, 146–162.
- Chiu, H.-M., Lee, Y.-C., Tu, C.-H., Chang, L.-C., Hsu, W.-F., Chou, C.-K., Tsai, K.-F., Liang, J.-T., Shun, C.-T., and Wu, M.-S. (2014). Effects of Metabolic Syndrome and Findings From Baseline Colonoscopies on Occurrence of Colorectal Neoplasms. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*
- Compton, C.C. (2006). Key issues in reporting common cancer specimens: problems in pathologic staging of colon cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 130, 318–324.
- Conde, A.R., Martins, A.P., Brito, M., Manuel, A., Ramos, S., Malta-Vacas, J., Renner, M., Poustka, A., Mollenhauer, J., and Monteiro, C. (2007a). DMBT1 is frequently downregulated in well-differentiated gastric carcinoma but more frequently upregulated across various gastric cancer types. *Int. J. Oncol.* 30, 1441–1446.
- Conde, A.R., Martins, A.P., Brito, M., Manuel, A., Ramos, S., Malta-Vacas, J., Renner, M., Poustka, A., Mollenhauer, J., and Monteiro, C. (2007b). DMBT1 is frequently downregulated in well-differentiated gastric carcinoma but more frequently upregulated across various gastric cancer types. *Int. J. Oncol.* 30, 1441–1446.
- Corfield, A.P., Myerscough, N., Warren, B.F., Durdey, P., Paraskeva, C., and Schauer, R. (1999). Reduction of sialic acid O-acetylation in human colonic mucins in the adenoma-carcinoma sequence. *Glycoconj. J.* 16, 307–317.
- Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J., and Henrissat, B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* 328, 307–317.

- Dash, C., Bostick, R.M., Goodman, M., Flanders, W.D., Patel, R., Shah, R., Campbell, P.T., and McCullough, M.L. (2015). Oxidative Balance Scores and Risk of Incident Colorectal Cancer in a US Prospective Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.* *181*, 584–594.
- De Lisle, R.C., Petitt, M., Isom, K.S., and Ziemer, D. (1998). Developmental expression of a mucinlike glycoprotein (MUCLIN) in pancreas and small intestine of CF mice. *Am. J. Physiol.* *275*, G219–227.
- Dekker, J., Rossen, J.W.A., Büller, H.A., and Einerhand, A.W.C. (2002). The MUC family: an obituary. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 126–131.
- Delannoy Philippe, 17. Groux-Degroote Sophie, and Robbe-Masselot, C. The Epithelial Mucins: Structure/Function. Roles in Cancer and Inflammatory diseases (Van Seuningen).
- Desseyn, J.L., Buisine, M.P., Porchet, N., Aubert, J.P., Degand, P., and Laine, A. (1998). Evolutionary history of the 11p15 human mucin gene family. *J. Mol. Evol.* *46*, 102–106.
- DeVita, V.T., Lawrence, T.S., and Rosenberg, S.A. (2011). *Cancer: principles & practice of oncology: primer of the molecular biology of cancer* (Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).
- Dohi, T., and Kawamura, Y.I. (2008). Incomplete synthesis of the Sda/Cad blood group carbohydrate in gastrointestinal cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1780*, 467–471.
- Drew, J.E., Farquharson, A.J., Mayer, C.D., Vase, H.F., Coates, P.J., Steele, R.J., and Carey, F.A. (2014). Predictive gene signatures: molecular markers distinguishing colon adenomatous polyp and carcinoma. *PLoS One* *9*, e113071.
- Dube, D.H., and Bertozzi, C.R. (2005). Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat. Rev. Drug Discov.* *4*, 477–488.
- Dyson, J.K., and Rutter, M.D. (2012). Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? *World J. Gastroenterol. WJG* *18*, 3839–3848.
- East, J.E., Vieth, M., and Rex, D.K. (2015). Serrated lesions in colorectal cancer screening: detection, resection, pathology and surveillance. *Gut*.
- e-cancer.fr (2015). Les données - Institut National Du cancer.
- El-Fasakhany, F.M., Uchimura, K., Kannagi, R., and Muramatsu, T. (2001). A novel human Gal-3-O-sulfotransferase: molecular cloning, characterization, and its implications in biosynthesis of (SO(4)-3)Galbeta-1-4(Fucalpha1-3)GlcNAc. *J. Biol. Chem.* *276*, 26988–26994.
- Eriksson, C., Frängsmyr, L., Danielsson Niemi, L., Loimaranta, V., Holmskov, U., Bergman, T., Leffler, H., Jenkinson, H.F., and Strömberg, N. (2007). Variant size- and glycoforms of the scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340 with differential bacterial aggregation. *Glycoconj. J.* *24*, 131–142.
- Faivre, J., Dancourt, V., Denis, B., Dorval, E., Piette, C., Perrin, P., Bidan, J.M., Jard, C., Jung, S., Levillain, R., et al. (2012). Comparison between a guaiac and three immunochemical faecal occult blood tests in screening for colorectal cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *48*, 2969–2976.
- Farhat, M.H., Barada, K.A., Tawil, A.N., Itani, D.M., Hatoum, H.A., and Shamseddine, A.I. (2008). Effect of mucin production on survival in colorectal cancer: a case-control study. *World J. Gastroenterol.* *14*, 6981–6985.
- Fearnhead, N.S., Wilding, J.L., and Bodmer, W.F. (2002). Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br. Med. Bull.* *64*, 27–43.

- Fedewa, S.A., Sauer, A.G., Siegel, R.L., and Jemal, A. (2015). Prevalence of Major Risk Factors and Use of Screening Tests for Cancer in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *24*, 637–652.
- Feizi, T. (1985). Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* *314*, 53–57.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Fiori, E., Lamazza, A., DE Masi, E., Schillaci, A., Crocetti, D., Antoniozzi, A., Sterpetti, A.V., and DE Toma, G. (2015). Association of liver steatosis with colorectal cancer and adenoma in patients with metabolic syndrome. *Anticancer Res.* *35*, 2211–2214.
- Forgue-Lafitte, M.-E., Fabiani, B., Levy, P.P., Maurin, N., Fléjou, J.-F., and Bara, J. (2007). Abnormal expression of M1/MUC5AC mucin in distal colon of patients with diverticulitis, ulcerative colitis and cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *121*, 1543–1549.
- Fukuda, M. (1996). Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res.* *56*, 2237–2244.
- Fukui, H., Sekikawa, A., Tanaka, H., Fujimori, Y., Katake, Y., Fujii, S., Ichikawa, K., Tomita, S., Imura, J., Chiba, T., et al. (2011). DMBT1 is a novel gene induced by IL-22 in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 1177–1188.
- García-Vallejo, J.J., Van Dijk, W., Van Het Hof, B., Van Die, I., Engelse, M.A., Van Hinsbergh, V.W.M., and Gringhuis, S.I. (2006). Activation of human endothelial cells by tumor necrosis factor- α results in profound changes in the expression of glycosylation-related genes. *J. Cell. Physiol.* *206*, 203–210.
- Gendler, S.J., and Spicer, A.P. (1995). Epithelial mucin genes. *Annu. Rev. Physiol.* *57*, 607–634.
- Gérard, J., André, T., Conroy, T., Legoux, J., Portier, G., Becouarn, Y., Bedenne, L., Bosset, J., Dorval, E., and Maingon, P. (2013). Cancer du rectum.
- Gibson, J.A., Hahn, H.P., Shahsafaei, A., and Odze, R.D. (2011). MUC expression in hyperplastic and serrated colonic polyps: lack of specificity of MUC6. *Am. J. Surg. Pathol.* *35*, 742–749.
- Giuffre, M. (1996). Reading research critically: the discussion section. *J. Perianesthesia Nurs. Off. J. Am. Soc. PeriAnesthesia Nurses Am. Soc. PeriAnesthesia Nurses* *11*, 417–420.
- Goldberg, Y., Barnes-Kedar, I., Lerer, I., Halpern, N., Plessner, M., Hubert, A., Kadouri, L., Goldshmidt, H., Solar, I., Strul, H., et al. (2014b). Genetic features of Lynch syndrome in the Israeli population. *Clin. Genet.*
- Goldberg, Y., Kedar, I., Kariiv, R., Halpern, N., Plessner, M., Hubert, A., Kaduri, L., Sagi, M., Lerer, I., Abeliovich, D., et al. (2014a). Lynch Syndrome in high risk Ashkenazi Jews in Israel. *Fam. Cancer* *13*, 65–73.
- Gong, J., Hutter, C., Baron, J.A., Berndt, S., Caan, B., Campbell, P.T., Casey, G., Chan, A.T., Cotterchio, M., Fuchs, C.S., et al. (2012). A pooled analysis of smoking and colorectal cancer: timing of exposure and interactions with environmental factors. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *21*, 1974–1985.
- Gouyer, V., Leteurtre, E., Zanetta, J.P., Lesuffleur, T., Delannoy, P., and Huet, G. (2001). Inhibition of the glycosylation and alteration in the intracellular trafficking of mucins and other glycoproteins by GalNAc α -O-bn in mucosal cell lines: an effect mediated through the intracellular synthesis of complex GalNAc α -O-bn oligosaccharides. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *6*, D1235-1244.

- Grady, W.M., and Carethers, J.M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* *135*, 1079–1099.
- Griffiths, B., Matthews, D.J., West, L., Attwood, J., Povey, S., Swallow, D.M., Gum, J.R., and Kim, Y.S. (1990). Assignment of the polymorphic intestinal mucin gene (MUC2) to chromosome 11p15. *Ann. Hum. Genet.* *54*, 277–285.
- Groux-Degroote, S., Krzewinski-Recchi, M.-A., Cazet, A., Vincent, A., Lehoux, S., Lafitte, J.-J., Van Seuning, I., and Delannoy, P. (2008). IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewisx epitopes in the human bronchial mucosa. *Biochem. J.* *410*, 213–223.
- Groux-Degroote, S., Wavelet, C., Krzewinski-Recchi, M.-A., Portier, L., Mortuaire, M., Mihalache, A., Trinchera, M., Delannoy, P., Malagolini, N., Chiricolo, M., et al. (2014). B4GALNT2 gene expression controls the biosynthesis of Sda and sialyl Lewis X antigens in healthy and cancer human gastrointestinal tract. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *53*, 442–449.
- Grundmann, U., Nerlich, C., Rein, T., and Zettlmeissl, G. (1990). Complete cDNA sequence encoding human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase. *Nucleic Acids Res.* *18*, 667.
- Gum, J.R., Hicks, J.W., Toribara, N.W., Rothe, E.M., Lagace, R.E., and Kim, Y.S. (1992). The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region. *J. Biol. Chem.* *267*, 21375–21383.
- Gunput, S.T.G., Ligtenberg, A.J.M., Terlouw, B., Brouwer, M., Veerman, E.C.I., and Wouters, D. (2015). Complement activation by salivary agglutinin is secretor status dependent. *Biol. Chem.* *396*, 35–43.
- Hafezi-Bakhtiari, S., Wang, L.M., Colling, R., Serra, S., and Chetty, R. (2015). Histological overlap between colorectal villous/tubulovillous and traditional serrated adenomas. *Histopathology* *66*, 308–313.
- Hakomori, S. (1983a). Glycolipid expression in ontogenesis and oncogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* *11*, 267–268.
- Hakomori, S. (1983b). Tumor-associated glycolipid antigens defined by monoclonal antibodies. *Bull. Cancer (Paris)* *70*, 118–126.
- Hakomori, S. (1985). Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res.* *45*, 2405–2414.
- Hakomori, S., and Kannagi, R. (1983). Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J. Natl. Cancer Inst.* *71*, 231–251.
- Hakomori, S., Patterson, C.M., Nudelman, E., and Sekiguchi, K. (1983). A monoclonal antibody directed to N-acetylneuraminosyl-alpha 2 leads to 6-galactosyl residue in gangliosides and glycoproteins. *J. Biol. Chem.* *258*, 11819–11822.
- Hannan, L.M., Jacobs, E.J., and Thun, M.J. (2009). The association between cigarette smoking and risk of colorectal cancer in a large prospective cohort from the United States. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *18*, 3362–3367.
- Hanski, C., Riede, E., Gratchev, A., Foss, H.D., Böhm, C., Klussmann, E., Hummel, M., Mann, B., Buhr, H.J., Stein, H., et al. (1997). MUC2 gene suppression in human colorectal carcinomas and their metastases: in vitro evidence of the modulatory role of DNA methylation. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *77*, 685–695.
- Harduin-Lepers (2010). Comprehensive Analysis of Sialyltransferases in Vertebrate Genomes. *Glycobiol. Insights* *29*.

Harduin-Lepers, A., Stokes, D.C., Steelant, W.F., Samyn-Petit, B., Krzewinski-Recchi, M.A., Vallejo-Ruiz, V., Zanetta, J.P., Augé, C., and Delannoy, P. (2000). Cloning, expression and gene organization of a human Neu5Ac alpha 2-3Gal beta 1-3GalNAc alpha 2,6-sialyltransferase: hST6GalNAcIV. *Biochem. J.* 352 Pt 1, 37–48.

Higuchi, T., Sugihara, K., and Jass, J.R. (2005). Demographic and pathological characteristics of serrated polyps of colorectum. *Histopathology* 47, 32–40.

Hikita, C., Vijayakumar, S., Takito, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Al-Awqati, Q. (2000). Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3. *J. Cell Biol.* 151, 1235–1246.

Hirono, H., Ajioka, Y., Watanabe, H., Baba, Y., Tozawa, E., Nishikura, K., Mukai, G., Honma, T., and Aoyagi, Y. (2004). Bidirectional gastric differentiation in cellular mucin phenotype (foveolar and pyloric) in serrated adenoma and hyperplastic polyp of the colorectum. *Pathol. Int.* 54, 401–407.

Hollingsworth, M.A., and Swanson, B.J. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer* 4, 45–60.

Holmskov, U., Mollenhauer, J., Madsen, J., Vitved, L., Gronlund, J., Tornoe, I., Kliem, A., Reid, K.B., Poustka, A., and Skjodt, K. (1999). Cloning of gp-340, a putative opsonin receptor for lung surfactant protein D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10794–10799.

Holst, S., Wuhrer, M., and Rombouts, Y. (2015). Glycosylation characteristics of colorectal cancer. *Adv. Cancer Res.* 126, 203–256.

Honke, K., Tsuda, M., Koyota, S., Wada, Y., Iida-Tanaka, N., Ishizuka, I., Nakayama, J., and Taniguchi, N. (2001). Molecular cloning and characterization of a human beta-Gal-3'-sulfotransferase that acts on both type 1 and type 2 (Gal beta 1-3/1-4GlcNAc-R) oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 276, 267–274.

Hounsell, E.F., Davies, M.J., and Renouf, D.V. (1996). O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconj. J.* 13, 19–26.

Howlander, N., Noone, A., Krapcho, M., Garshell, J., Miller, D., Altekruse, S., Kosary, C., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., et al. (2014). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011, National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on November 2013 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2014.

<http://www.cazy.org/fam/GT29.html> (2015). CAZy - GT29.

Hung, J.-S., Huang, J., Lin, Y.-C., Huang, M.-J., Lee, P.-H., Lai, H.-S., Liang, J.-T., and Huang, M.-C. (2014). C1GALT1 overexpression promotes the invasive behavior of colon cancer cells through modifying O-glycosylation of FGFR2. *Oncotarget* 5, 2096–2106.

Ikehara, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Kudo, T., Kono, M., Nishihara, S., Issiki, S., Morozumi, K., Itzkowitz, S., Tsuda, T., et al. (1999a). Cloning and expression of a human gene encoding an N-acetylgalactosamine-alpha2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I): a candidate for synthesis of cancer-associated sialyl-Tn antigens. *Glycobiology* 9, 1213–1224.

Ikehara, Y., Shimizu, N., Kono, M., Nishihara, S., Nakanishi, H., Kitamura, T., Narimatsu, H., Tsuji, S., and Tatematsu, M. (1999b). A novel glycosyltransferase with a polyglutamine repeat; a new candidate for GD1alpha synthase (ST6GalNAc V)(1). *FEBS Lett.* 463, 92–96.

Imai, M.A., Moriya, T., Imai, F.L., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., Uzawa, K., and Tanzawa, H. (2005). Down-regulation of DMBT1 gene expression in human oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* 15, 585–589.

International Agency for Research on Cancer, and World Health Organization (2008). World cancer report 2008 (Lyon : Geneva: International Agency for Research on Cancer ; Distributed by WHO Press).

Ishii, A., Ohta, M., Watanabe, Y., Matsuda, K., Ishiyama, K., Sakoe, K., Nakamura, M., Inokuchi, J., Sanai, Y., and Saito, M. (1998). Expression cloning and functional characterization of human cDNA for ganglioside GM3 synthase. *J. Biol. Chem.* *273*, 31652–31655.

Iitzkowitz, S.H., Yuan, M., Montgomery, C.K., Kjeldsen, T., Takahashi, H.K., Bigbee, W.L., and Kim, Y.S. (1989). Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res.* *49*, 197–204.

Iwai, T., Inaba, N., Naundorf, A., Zhang, Y., Gotoh, M., Iwasaki, H., Kudo, T., Togayachi, A., Ishizuka, Y., Nakanishi, H., et al. (2002). Molecular cloning and characterization of a novel UDP-GlcNAc:GalNAc-peptide beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T6), an enzyme synthesizing the core 3 structure of O-glycans. *J. Biol. Chem.* *277*, 12802–12809.

Iwai, T., Kudo, T., Kawamoto, R., Kubota, T., Togayachi, A., Hiruma, T., Okada, T., Kawamoto, T., Morozumi, K., and Narimatsu, H. (2005). Core 3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 4572–4577.

Jakobsson, H.E., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Schütte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., Sommer, F., Bäckhed, F., Hansson, G.C., and Johansson, M.E.V. (2015). The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep.* *16*, 164–177.

Jang, K.T., Chae, S.W., Sohn, J.H., Park, H.R., and Shin, H.S. (2002). Coexpression of MUC1 with p53 or MUC2 correlates with lymph node metastasis in colorectal carcinomas. *J. Korean Med. Sci.* *17*, 29–33.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* *61*, 69–90.

Jenab, M., Bueno-de-Mesquita, H.B., Ferrari, P., van Duijnhoven, F.J.B., Norat, T., Pischon, T., Jansen, E.H.J.M., Slimani, N., Byrnes, G., Rinaldi, S., et al. (2010). Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations: a nested case-control study. *BMJ* *340*, b5500–b5500.

Jenkinson, F., and Steele, R.J.C. (2010). Colorectal cancer screening – Methodology. *The Surgeon* *8*, 164–171.

Johnson, J.P., Rummel, M.M., Rothbacher, U., and Sers, C. (1996). MUC18: A cell adhesion molecule with a potential role in tumor growth and tumor cell dissemination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *213 (Pt 1)*, 95–105.

Joncquel Chevalier Curt, M., Lecointe, K., Mihalache, A., Rossez, Y., Gosset, P., Léonard, R., and Robbe-Masselot, C. (2015). Alteration or adaptation, the two roads for human gastric mucin glycosylation infected by *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* *25*, 617–631.

Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 415–428.

Jourdan, F., Sebbagh, N., Comperat, E., Mourra, N., Flahault, A., Olschwang, S., Duval, A., Hamelin, R., and Flejou, J.-F. (2003). Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, and hMSH2 immunohistochemical expression. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *443*, 115–121.

Ju, T., and Cummings, R.D. (2005). Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome. *Nature* *437*, 1252.

Ju, T., Brewer, K., D'Souza, A., Cummings, R.D., and Canfield, W.M. (2002). Cloning and expression of human core 1 beta1,3-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* *277*, 178–186.

Jumblatt, M.M., Imbert, Y., Young, W.W., Foulks, G.N., Steele, P.S., and Demuth, D.R. (2006). Glycoprotein 340 in normal human ocular surface tissues and tear film. *Infect. Immun.* *74*, 4058–4063.

- Kang, W., and Reid, K.B.M. (2003). DMBT1, a regulator of mucosal homeostasis through the linking of mucosal defense and regeneration? *FEBS Lett.* *540*, 21–25.
- Kang, W., Nielsen, O., Fenger, C., Madsen, J., Hansen, S., Tornøe, I., Eggleton, P., Reid, K.B.M., and Holmskov, U. (2002). The scavenger receptor, cysteine-rich domain-containing molecule gp-340 is differentially regulated in epithelial cell lines by phorbol ester. *Clin. Exp. Immunol.* *130*, 449–458.
- Kang, W., Nielsen, O., Fenger, C., Leslie, G., Holmskov, U., and Reid, K.B.M. (2005). Induction of DMBT1 expression by reduced ERK activity during a gastric mucosa differentiation-like process and its association with human gastric cancer. *Carcinogenesis* *26*, 1129–1137.
- Kannagi, R. (2004). Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression-The Warburg effect revisited. *Glycoconj. J.* *20*, 353–364.
- Kawashima, T., Okamoto, K., Muraguchi, T., Oku, T., and Shidoji, Y. (2010). Downregulation of trefoil factor 3 gene expression in the colon of the senescence-accelerated mouse (SAM)-P6 revealed by oligonucleotide microarray analysis. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* *31*, 169–175.
- Kelly, R.J., Rouquier, S., Giorgi, D., Lennon, G.G., and Lowe, J.B. (1995). Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J. Biol. Chem.* *270*, 4640–4649.
- Kikuchi, R., Takano, M., Takagi, K., Fujimoto, N., Nozaki, R., Fujiyoshi, T., and Uchida, Y. (1995). Management of early invasive colorectal cancer. Risk of recurrence and clinical guidelines. *Dis. Colon Rectum* *38*, 1286–1295.
- Kim, D.H., Kim, J.W., Cho, J.H., Baek, S.H., Kakar, S., Kim, G.E., Sleisenger, M.H., and Kim, Y.S. (2005). Expression of mucin core proteins, trefoil factors, APC and p21 in subsets of colorectal polyps and cancers suggests a distinct pathway of pathogenesis of mucinous carcinoma of the colorectum. *Int. J. Oncol.* *27*, 957–964.
- Kim, J.H., Lim, Y.J., Kim, Y.-H., Sung, I.-K., Shim, S.G., Oh, S.-O., Park, S.-S., Yang, S., Son, H.J., Rhee, P.-L., et al. (2007). Is metabolic syndrome a risk factor for colorectal adenoma? *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *16*, 1543–1546.
- Kim, Y.J., Kim, K.S., Kim, S.H., Kim, C.H., Ko, J.H., Choe, I.S., Tsuji, S., and Lee, Y.C. (1996). Molecular cloning and expression of human Gal beta 1,3GalNAc alpha 2,3-sialyltransferase (hST3Gal II). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *228*, 324–327.
- Kim, Y.J., Kim, K.S., Do, S., Kim, C.H., Kim, S.K., and Lee, Y.C. (1997). Molecular cloning and expression of human alpha2,8-sialyltransferase (hST8Sia V). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *235*, 327–330.
- Kinoshita, M., Nakamura, T., Ihara, M., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Tashiro, K., and Noda, M. (2001). Identification of human endomucin-1 and -2 as membrane-bound O-sialoglycoproteins with anti-adhesive activity. *FEBS Lett.* *499*, 121–126.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* *87*, 159–170.
- Kitagawa, H., and Paulson, J.C. (1993). Cloning and expression of human Gal beta 1,3(4)GlcNAc alpha 2,3-sialyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *194*, 375–382.
- Kitagawa, H., and Paulson, J.C. (1994). Cloning of a novel alpha 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. *J. Biol. Chem.* *269*, 1394–1401.
- Klein, A., Carnoy, C., Wieruszkeski, J.M., Strecker, G., Strang, A.M., van Halbeek, H., Roussel, P., and Lamblin, G. (1992). The broad diversity of neutral and sialylated oligosaccharides derived from human salivary mucins. *Biochemistry (Mosc.)* *31*, 6152–6165.

Kontou, N., Psaltopoulou, T., Soupos, N., Polychronopoulos, E., Xinopoulos, D., Linos, A., and Panagiotakos, D. (2012). Alcohol consumption and colorectal cancer in a Mediterranean population: a case-control study. *Dis. Colon Rectum* 55, 703–710.

Kosmidou, V., Oikonomou, E., Vlassi, M., Avlonitis, S., Katseli, A., Tspiras, I., Mourtzoukou, D., Kontogeorgos, G., Zografos, G., and Pintzas, A. (2014). Tumor heterogeneity revealed by KRAS, BRAF, and PIK3CA pyrosequencing: KRAS and PIK3CA intratumor mutation profile differences and their therapeutic implications. *Hum. Mutat.* 35, 329–340.

Krzewinski-Recchi, M.-A., Julien, S., Juliant, S., Teinturier-Lelièvre, M., Samyn-Petit, B., Montiel, M.-D., Mir, A.-M., Cerutti, M., Harduin-Lepers, A., and Delannoy, P. (2003). Identification and functional expression of a second human beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase, ST6Gal II. *Eur. J. Biochem. FEBS* 270, 950–961.

Kudelka, M.R., Ju, T., Heimbürg-Molinaro, J., and Cummings, R.D. (2015). Simple sugars to complex disease--mucin-type O-glycans in cancer. *Adv. Cancer Res.* 126, 53–135.

Kudo, S. (1993). Endoscopic mucosal resection of flat and depressed types of early colorectal cancer. *Endoscopy* 25, 455–461.

Kufe, D.W. (2009). Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 9, 874–885.

Laghi, A., Neri, E., and Regge, D. (2015). Editorial on the European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) and European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology (ESGAR) guideline on clinical indications for CT colonography in the colorectal cancer diagnosis. *Radiol. Med. (Torino)*.

Lai, G.Y., Park, Y., Hartge, P., Hollenbeck, A.R., and Freedman, N.D. (2013). The association between self-reported diabetes and cancer incidence in the NIH-AARP Diet and Health Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E497-502.

Lamblin, G., Degroote, S., Perini, J.M., Delmotte, P., Scharfman, A., Davril, M., Lo-Guidice, J.M., Houdret, N., Dumur, V., Klein, A., et al. (2001). Human airway mucin glycosylation: a combinatorial of carbohydrate determinants which vary in cystic fibrosis. *Glycoconj. J.* 18, 661–684.

Lamoril, J., Deybach, J.-C., and Bouzigarène, P. (2006). L'instabilité des microsatellites dans les cancers du côlon. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* 21, 211–222.

Le Pessot, F., and Buisine, M. (2010). Instabilité microsatellitaire et cancer colo-rectal. *Bull. L'Académie Int. Pathol.* 51, 37–42.

Lecomte, T., Andre, T., Bibeau, F., Boucher, E., Panis, Y., Laurent-Puig, P., Stremmsdoerfer, N., and Taieb, J. (2011). Cancer du côlon non métastatique.

Lee, C.G., Hahn, S.J., Song, M.K., Lee, J.K., Kim, J.H., Lim, Y.J., Koh, M.-S., Lee, J.H., and Kang, H.W. (2014). Vegetarianism as a Protective Factor for Colorectal Adenoma and Advanced Adenoma in Asians. *Dig. Dis. Sci.* 59, 1025–1035.

Lee, J.K., Bhakta, S., Rosen, S.D., and Hemmerich, S. (1999). Cloning and characterization of a mammalian N-acetylglucosamine-6-sulfotransferase that is highly restricted to intestinal tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 543–549.

Lee, Y.C., Kim, Y.J., Lee, K.Y., Kim, K.S., Kim, B.U., Kim, H.N., Kim, C.H., and Do, S.I. (1998). Cloning and expression of cDNA for a human Sia alpha 2,3Gal beta 1, 4GlcNA:alpha 2,8-sialyltransferase (hST8Sia III). *Arch. Biochem. Biophys.* 360, 41–46.

- Leito, J.T.D., Ligtenberg, A.J.M., Nazmi, K., de Blicke-Hogervorst, J.M.A., Veerman, E.C.I., and Nieuw Amerongen, A.V. (2008). A common binding motif for various bacteria of the bacteria-binding peptide SRCRP2 of DMBT1/gp-340/salivary agglutinin. *Biol. Chem.* *389*, 1193–1200.
- Levene, Y., Hutchinson, J.M., Tinkler-Hundal, E., Quirke, P., and West, N.P. (2015). The correlation between endoscopic and histopathological measurements in colorectal polyps. *Histopathology* *66*, 485–490.
- Li, X.J., and Snyder, S.H. (1995). Molecular cloning of Ebnerin, a von Ebner's gland protein associated with taste buds. *J. Biol. Chem.* *270*, 17674–17679.
- Ligtenberg, A.J.M., Veerman, E.C.I., Nieuw Amerongen, A.V., and Mollenhauer, J. (2007). Salivary agglutinin/glycoprotein-340/DMBT1: a single molecule with variable composition and with different functions in infection, inflammation and cancer. *Biol. Chem.* *388*, 1275–1289.
- Ligtenberg, A.J.M., Karlsson, N.G., and Veerman, E.C.I. (2010). Deleted in malignant brain tumors-1 protein (DMBT1): a pattern recognition receptor with multiple binding sites. *Int. J. Mol. Sci.* *11*, 5212–5233.
- Lindén, S.K., Florin, T.H.J., and McGuckin, M.A. (2008). Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *PLoS One* *3*, e3952.
- Lo-Guidice, J.M., Wieruszkeski, J.M., Lemoine, J., Verbert, A., Roussel, P., and Lamblin, G. (1994). Sialylation and sulfation of the carbohydrate chains in respiratory mucins from a patient with cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* *269*, 18794–18813.
- Losi, L., Scarselli, A., Benatti, P., Ponz de Leon, M., Roncucci, L., Pedroni, M., Borghi, F., Lamberti, I., Rossi, G., Marino, M., et al. (2004). Relationship between MUC5AC and altered expression of MLH1 protein in mucinous and non-mucinous colorectal carcinomas. *Pathol. Res. Pract.* *200*, 371–377.
- Lugli, A., Zlobec, I., Baker, K., Minoo, P., Tornillo, L., Terracciano, L., and Jass, J.R. (2007). Prognostic significance of mucins in colorectal cancer with different DNA mismatch-repair status. *J. Clin. Pathol.* *60*, 534–539.
- Lukas, M. (2010). Inflammatory bowel disease as a risk factor for colorectal cancer. *Dig. Dis. Basel Switz.* *28*, 619–624.
- Lutgens, M., Vermeire, S., Van Oijen, M., Vleggaar, F., Siersema, P., van Assche, G., Rutgeerts, P., Oldenburg, B., and Dutch Initiative on Crohn and Colitis (2015). A rule for determining risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *13*, 148–154.e1.
- Lynch, H.T., Rubinstein, W.S., and Locker, G.Y. (2004). Cancer in Jews: introduction and overview. *Fam. Cancer* *3*, 177–192.
- Mack, D.R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., and Hollingsworth, M.A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* *276*, G941-950.
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., and Hollingsworth, M.A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* *52*, 827–833.
- Malagolini, N., Dall'Olio, F., and Serafini-Cessi, F. (1991). UDP-GalNAc:NeuAc alpha 2,3Gal beta-R (GalNAc to Gal) beta 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase responsible for the Sda specificity in human colon carcinoma CaCo-2 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *180*, 681–686.
- Malagolini, N., Santini, D., Chiricolo, M., and Dall'Olio, F. (2007). Biosynthesis and expression of the Sda and sialyl Lewis x antigens in normal and cancer colon. *Glycobiology* *17*, 688–697.

- Mannori, G., Crottet, P., Cecconi, O., Hanasaki, K., Aruffo, A., Nelson, R.M., Varki, A., and Bevilacqua, M.P. (1995). Differential colon cancer cell adhesion to E-, P-, and L-selectin: role of mucin-type glycoproteins. *Cancer Res.* *55*, 4425–4431.
- Marcaurelle, L.A., and Bertozzi, C.R. (2002). Recent advances in the chemical synthesis of mucin-like glycoproteins. *Glycobiology* *12*, 69R–77R.
- McEver, R.P. (1994). Selectins. *Curr. Opin. Immunol.* *6*, 75–84.
- McEver, R.P., and Cummings, R.D. (1997). Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.* *100*, S97-103.
- Melnick, M., Chen, H., Zhou, Y., and Jaskoll, T. (2001). An alternatively spliced Muc10 glycoprotein ligand for putative L-selectin binding during mouse embryonic submandibular gland morphogenesis. *Arch. Oral Biol.* *46*, 745–757.
- Mihalache, A., Delplanque, J.-F., Ringot-Destrez, B., Wavelet, C., Gosset, P., Nunes, B., Groux-Degroote, S., Léonard, R., and Robbe-Masselot, C. (2015). Structural Characterization of Mucin O-Glycosylation May Provide Important Information to Help Prevent Colorectal Tumor Recurrence. *Front. Oncol.* *5*.
- Mills, S.E. (2007). *Histology for pathologists* (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).
- Mizoshita, T., Tsukamoto, T., Inada, K.I., Hirano, N., Tajika, M., Nakamura, T., Ban, H., and Tatematsu, M. (2007). Loss of MUC2 expression correlates with progression along the adenoma-carcinoma sequence pathway as well as de novo carcinogenesis in the colon. *Histol. Histopathol.* *22*, 251–260.
- Mochizuka, A., Uehara, T., Nakamura, T., Kobayashi, Y., and Ota, H. (2007). Hyperplastic polyps and sessile serrated “adenomas” of the colon and rectum display gastric pyloric differentiation. *Histochem. Cell Biol.* *128*, 445–455.
- Mollenhauer, J., Wiemann, S., Scheurlen, W., Korn, B., Hayashi, Y., Wilgenbus, K.K., von Deimling, A., and Poustka, A. (1997). DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat. Genet.* *17*, 32–39.
- Mollenhauer, J., Herbertz, S., Holmskov, U., Tolnay, M., Krebs, I., Merlo, A., Schröder, H.D., Maier, D., Breitling, F., Wiemann, S., et al. (2000). DMBT1 encodes a protein involved in the immune defense and in epithelial differentiation and is highly unstable in cancer. *Cancer Res.* *60*, 1704–1710.
- Mollenhauer, J., Herbertz, S., Helmke, B., Kollender, G., Krebs, I., Madsen, J., Holmskov, U., Sorger, K., Schmitt, L., Wiemann, S., et al. (2001a). Deleted in Malignant Brain Tumors 1 is a versatile mucin-like molecule likely to play a differential role in digestive tract cancer. *Cancer Res.* *61*, 8880–8886.
- Mollenhauer, J., Herbertz, S., Helmke, B., Kollender, G., Krebs, I., Madsen, J., Holmskov, U., Sorger, K., Schmitt, L., Wiemann, S., et al. (2001b). Deleted in Malignant Brain Tumors 1 is a versatile mucin-like molecule likely to play a differential role in digestive tract cancer. *Cancer Res.* *61*, 8880–8886.
- Mollenhauer, J., Helmke, B., Müller, H., Kollender, G., Lyer, S., Diedrichs, L., Holmskov, U., Ligtenberg, T., Herbertz, S., Krebs, I., et al. (2002a). Sequential changes of the DMBT1 expression and location in normal lung tissue and lung carcinomas. *Genes. Chromosomes Cancer* *35*, 164–169.
- Mollenhauer, J., Helmke, B., Müller, H., Kollender, G., Krebs, I., Wiemann, S., Holmskov, U., Madsen, J., Otto, H.F., and Poustka, A. (2002b). An integrative model on the role of DMBT1 in epithelial cancer. *Cancer Detect. Prev.* *26*, 266–274.

Mollenhauer, J., Helmke, B., Müller, H., Kollender, G., Lyer, S., Diedrichs, L., Holmskov, U., Ligtenberg, T., Hertzberg, S., Krebs, I., et al. (2002c). Sequential changes of the DMBT1 expression and location in normal lung tissue and lung carcinomas. *Genes. Chromosomes Cancer* 35, 164–169.

Moniaux, N., Escande, F., Porchet, N., Aubert, J.P., and Batra, S.K. (2001). Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 6, D1192-1206.

Mori, M., Shiraishi, T., Tanaka, S., Yamagata, M., Mafune, K., Tanaka, Y., Ueo, H., Barnard, G.F., and Sugimachi, K. (1999). Lack of DMBT1 expression in oesophageal, gastric and colon cancers. *Br. J. Cancer* 79, 211–213.

Morita, T., Tomita, N., Ohue, M., Sekimoto, M., Yamamoto, H., Ohnishi, T., Tada, M., Ikenaga, M., Miyake, Y., Sakita, I., et al. (2002). Molecular analysis of diminutive, flat, depressed colorectal lesions: are they precursors of polypoid adenoma or early stage carcinoma? *Gastrointest. Endosc.* 56, 663–671.

Morton, J.A., Pickles, M.M., and Vanhegan, R.I. (1988). The Sda antigen in the human kidney and colon. *Immunol. Invest.* 17, 217–224.

Müller, H., End, C., Weiss, C., Renner, M., Bhandiwad, A., Helmke, B.M., Gassler, N., Hafner, M., Poustka, A., Mollenhauer, J., et al. (2008). Respiratory Deleted in Malignant Brain Tumours 1 (DMBT1) levels increase during lung maturation and infection. *Clin. Exp. Immunol.* 151, 123–129.

Müller, H., Hu, J., Popp, R., Schmidt, M.H.H., Müller-Decker, K., Mollenhauer, J., Fisslthaler, B., Eble, J.A., and Fleming, I. (2012). Deleted in malignant brain tumors 1 is present in the vascular extracellular matrix and promotes angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 442–448.

Müller, H., Nagel, C., Weiss, C., Mollenhauer, J., and Poeschl, J. (2015). Deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1) elicits increased VEGF and decreased IL-6 production in type II lung epithelial cells. *BMC Pulm. Med.* 15, 32.

Myerscough, N., Sylvester, P.A., Warren, B.F., Biddolph, S., Durdey, P., Thomas, M.G., Carlstedt, I., and Corfield, A.P. (2001). Abnormal subcellular distribution of mature MUC2 and de novo MUC5AC mucins in adenomas of the rectum: immunohistochemical detection using non-VNTR antibodies to MUC2 and MUC5AC peptide. *Glycoconj. J.* 18, 907–914.

Nakagoe, T., Fukushima, K., Tanaka, K., Sawai, T., Tsuji, T., Jibiki, M., Nanashima, A., Yamaguchi, H., Yasutake, T., Ayabe, H., et al. (2002). Evaluation of sialyl Lewis(a), sialyl Lewis(x), and sialyl Tn antigens expression levels as predictors of recurrence after curative surgery in node-negative colorectal cancer patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 21, 107–113.

Nakayama, J., Fukuda, M.N., Fredette, B., Ranscht, B., and Fukuda, M. (1995). Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7031–7035.

Nara, K., Watanabe, Y., Maruyama, K., Kasahara, K., Nagai, Y., and Sanai, Y. (1994). Expression cloning of a CMP-NeuAc:NeuAc alpha 2-3Gal beta 1-4Glc beta 1-1'Cer alpha 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) from human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7952–7956.

Niederhafner, P., Reinis, M., Sebestík, J., and Jezek, J. (2008). Glycopeptide dendrimers, part III: a review. Use of glycopeptide dendrimers in immunotherapy and diagnosis of cancer and viral diseases. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 14, 556–587.

Ogino, S., Fuchs, C.S., and Giovannucci, E. (2012). How many molecular subtypes? Implications of the unique tumor principle in personalized medicine. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 12, 621–628.

Okajima, T., Fukumoto, S., Miyazaki, H., Ishida, H., Kiso, M., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K. (1999). Molecular cloning of a novel alpha2,3-sialyltransferase (ST3Gal VI) that sialylates type II lactosamine structures on glycoproteins and glycolipids. *J. Biol. Chem.* *274*, 11479–11486.

Onco Nord Pas-de-Calais Référentiels d'Organe (pour la région Nord - Pas-de-Calais).

Onodera, M., Nishigami, T., Torii, I., Sato, A., Tao, L.-H., Kataoka, T.R., Yoshikawa, R., and Tsujimura, T. (2009). Comparison between colorectal low- and high-grade mucinous adenocarcinoma with MUC1 and MUC5AC. *World J. Gastrointest. Oncol.* *1*, 69–73.

Oort, F.A., Terhaar Sive Droste, J.S., Van Der Hulst, R.W.M., Van Heukelem, H.A., Loffeld, R.J.L.F., Wesdorp, I.C.E., Van Wanrooij, R.L.J., De Baaij, L., Mutsaers, E.R., van der Reijt, S., et al. (2010). Colonoscopy-controlled intra-individual comparisons to screen relevant neoplasia: faecal immunochemical test vs. guaiac-based faecal occult blood test. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *31*, 432–439.

Orlich, M.J., Singh, P.N., Sabaté, J., Fan, J., Sveen, L., Bennett, H., Knutsen, S.F., Beeson, W.L., Jaceldo-Siegl, K., Butler, T.L., et al. (2015). Vegetarian Dietary Patterns and the Risk of Colorectal Cancers. *JAMA Intern. Med.*

Owens, S.R., Chiosea, S.I., and Kuan, S.-F. (2008). Selective expression of gastric mucin MUC6 in colonic sessile serrated adenoma but not in hyperplastic polyp aids in morphological diagnosis of serrated polyps. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *21*, 660–669.

Packer, L.M., Williams, S.J., Callaghan, S., Gotley, D.C., and McGuckin, M.A. (2004). Expression of the cell surface mucin gene family in adenocarcinomas. *Int. J. Oncol.* *25*, 1119–1126.

Park, E.T., Gum, J.R., Kakar, S., Kwon, S.W., Deng, G., and Kim, Y.S. (2008). Aberrant expression of SOX2 upregulates MUC5AC gastric foveolar mucin in mucinous cancers of the colorectum and related lesions. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *122*, 1253–1260.

Park, J.Y., Dahm, C.C., Keogh, R.H., Mitrou, P.N., Cairns, B.J., Greenwood, D.C., Spencer, E.A., Fentiman, I.S., Shipley, M.J., Brunner, E.J., et al. (2010). Alcohol intake and risk of colorectal cancer: Results from the UK Dietary Cohort Consortium. *Br. J. Cancer* *103*, 747–756.

Park, Y., Hunter, D.J., Spiegelman, D., Bergkvist, L., Berrino, F., van den Brandt, P.A., Buring, J.E., Colditz, G.A., Freudenheim, J.L., Fuchs, C.S., et al. (2005). Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *JAMA* *294*, 2849–2857.

Parkin, D.M. (2011). 5. Cancers attributable to dietary factors in the UK in 2010. II. Meat consumption. *Br. J. Cancer* *105 Suppl 2*, S24-26.

Pelaseyed, T., Bergström, J.H., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Birchenough, G.M.H., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Nyström, E.E.L., et al. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol. Rev.* *260*, 8–20.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* *29*, e45.

Phelip, J.M., Bouché, O., Conroy, T., Michel, P., Penna, C., Tournigand, C., Louvet, C., and Bedenne, L. (2014). “Cancer colorectal métastatique”. *Thésaurus National de Cancérologie Digestive*, février 2014.

Plumb, A.A., and Halligan, S. (2015). Colorectal cancer screening. *Semin. Roentgenol.* *50*, 101–110.

Podolsky, D.K. (2000). Mechanisms of regulatory peptide action in the gastrointestinal tract: trefoil peptides. *J. Gastroenterol.* *35 Suppl 12*, 69–74.

- Popat, S., Hubner, R., and Houlston, R.S. (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 609–618.
- Porchet, N., and Aubert, J.-P. (2004). [MUC genes: mucin or not mucin? That is the question]. *Médecine Sci.* MS 20, 569–574.
- Pretlow, T.P., Barrow, B.J., Ashton, W.S., O’Riordan, M.A., Pretlow, T.G., Jurcisek, J.A., and Stellato, T.A. (1991). Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res.* 51, 1564–1567.
- van Putten, P.G., Hol, L., van Dekken, H., Han van Krieken, J., van Ballegooijen, M., Kuipers, E.J., and van Leerdam, M.E. (2011). Inter-observer variation in the histological diagnosis of polyps in colorectal cancer screening. *Histopathology* 58, 974–981.
- Qazi, T.M., O’Brien, M.J., Farraye, F.A., Gould, R.W., Chen, C.A., and Schroy, P.C. (2014). Epidemiology of goblet cell and microvesicular hyperplastic polyps. *Am. J. Gastroenterol.* 109, 1922–1932.
- Raimondi, C., Nicolazzo, C., Gradilone, A., Giannini, G., De Falco, E., Chimenti, I., Varriale, E., Hauch, S., Plappert, L., Cortesi, E., et al. (2014). Circulating tumor cells: exploring intratumor heterogeneity of colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* 15, 496–503.
- Rampal, S., Yang, M.H., Sung, J., Son, H.J., Choi, Y., Lee, J.H., Kim, Y., Chang, D.K., Rhee, P., Rhee, J.C., et al. (2014). Association Between Markers of Glucose Metabolism and Risk of Colorectal Adenoma. *Gastroenterology* 147, 78–87.e3.
- Rigas, B., and Tsioulis, G.J. (2015). The evolving role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colon cancer prevention: a cause for optimism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 353, 2–8.
- Riondino, S. (2014). Obesity and colorectal cancer: Role of adipokines in tumor initiation and progression. *World J. Gastroenterol.* 20, 5177.
- Robbe, C., Capon, C., Coddeville, B., and Michalski, J.-C. (2004). Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochem. J.* 384, 307–316.
- Robbe, C., Paraskeva, C., Mollenhauer, J., Michalski, J.C., Sergi, C., and Corfield, A. (2005). DMBT1 expression and glycosylation during the adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 730–732.
- Robbe-Masselot, C., Herrmann, A., Maes, E., Carlstedt, I., Michalski, J.-C., and Capon, C. (2009). Expression of a core 3 disialyl-Le(x) hexasaccharide in human colorectal cancers: a potential marker of malignant transformation in colon. *J. Proteome Res.* 8, 702–711.
- Rodríguez-Piñeiro, A.M., and Johansson, M.E.V. (2015). The colonic mucus protection depends on the microbiota. *Gut Microbes* 0.
- Rosenstiel, P., Sina, C., End, C., Renner, M., Lyer, S., Till, A., Hellmig, S., Nikolaus, S., Fölsch, U.R., Helmke, B., et al. (2007). Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 8203–8211.
- Rossez, Y., Coddeville, B., Elass, E., Quinchon, J.-F., Vidal, O., Corfield, A.P., Gosset, P., Lacroix, J.-M., Michalski, J.-C., and Robbe-Masselot, C. (2011). Interaction between DMBT1 and galectin 3 is modulated by the structure of the oligosaccharides carried by DMBT1. *Biochimie* 93, 593–603.
- van Rossum, L.G., van Rijn, A.F., Laheij, R.J., van Oijen, M.G., Fockens, P., van Krieken, H.H., Verbeek, A.L., Jansen, J.B., and Dekker, E. (2008). Random comparison of guaiac and immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer in a screening population. *Gastroenterology* 135, 82–90.

- van Rossum, L.G.M., van Rijn, A.F., Verbeek, A.L.M., van Oijen, M.G.H., Laheij, R.J.F., Fockens, P., Jansen, J.B.M.J., Adang, E.M.M., and Dekker, E. (2011). Colorectal cancer screening comparing no screening, immunochemical and guaiac fecal occult blood tests: a cost-effectiveness analysis. *Int. J. Cancer* *128*, 1908–1917.
- Rousseau, K., Byrne, C., Kim, Y.S., Gum, J.R., Swallow, D.M., and Toribara, N.W. (2004). The complete genomic organization of the human MUC6 and MUC2 mucin genes. *Genomics* *83*, 936–939.
- Samyn-Petit, B., Krzewinski-Recchi, M.A., Steelant, W.F., Delannoy, P., and Harduin-Lepers, A. (2000). Molecular cloning and functional expression of human ST6GalNAc II. Molecular expression in various human cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1474*, 201–211.
- Sandler, R.S. (2010). Dietary and lifestyle measures to lower colorectal cancer risk. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *8*, 329–332.
- Sarrias, M.R., Grønlund, J., Padilla, O., Madsen, J., Holmskov, U., and Lozano, F. (2004). The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit. Rev. Immunol.* *24*, 1–37.
- Sasaki, K., Watanabe, E., Kawashima, K., Sekine, S., Dohi, T., Oshima, M., Hanai, N., Nishi, T., and Hasegawa, M. (1993). Expression cloning of a novel Gal beta (1-3/1-4) GlcNAc alpha 2,3-sialyltransferase using lectin resistance selection. *J. Biol. Chem.* *268*, 22782–22787.
- Sasaki, K., Kurata, K., Kojima, N., Kurosawa, N., Ohta, S., Hanai, N., Tsuji, S., and Nishi, T. (1994). Expression cloning of a GM3-specific alpha-2,8-sialyltransferase (GD3 synthase). *J. Biol. Chem.* *269*, 15950–15956.
- Scheidegger, E.P., Sternberg, L.R., Roth, J., and Lowe, J.B. (1995). A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 22685–22688.
- Schietinger, A., Philip, M., Yoshida, B.A., Azadi, P., Liu, H., Meredith, S.C., and Schreiber, H. (2006). A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumor-specific antigen. *Science* *314*, 304–308.
- Schneider, F., Kemmner, W., Haensch, W., Franke, G., Gretschel, S., Karsten, U., and Schlag, P.M. (2001). Overexpression of sialyltransferase CMP-sialic acid:Galbeta1,3GalNAc-R alpha6-Sialyltransferase is related to poor patient survival in human colorectal carcinomas. *Cancer Res.* *61*, 4605–4611.
- Seko, A., Nagata, K., Yonezawa, S., and Yamashita, K. (2002). Down-regulation of Gal 3-O-sulfotransferase-2 (Gal3ST-2) expression in human colonic non-mucinous adenocarcinoma. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* *93*, 507–515.
- Seth, R., Crook, S., Ibrahim, S., Fadhil, W., Jackson, D., and Ilyas, M. (2009). Concomitant mutations and splice variants in KRAS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signalling pathway in advanced colorectal cancer. *Gut* *58*, 1234–1241.
- Shen, Y., Kohla, G., Lrhorfi, A.L., Sipos, B., Kalthoff, H., Gerwig, G.J., Kamerling, J.P., Schauer, R., and Tiralongo, J. (2004). O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids in human colorectal carcinoma. *Eur. J. Biochem. FEBS* *271*, 281–290.
- Stolte, M. (2003). The new Vienna classification of epithelial neoplasia of the gastrointestinal tract: advantages and disadvantages. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *442*, 99–106.
- Suzuki, A., Hiraoka, N., Suzuki, M., Angata, K., Misra, A.K., McAuliffe, J., Hindsgaul, O., and Fukuda, M. (2001). Molecular cloning and expression of a novel human beta-Gal-3-O-sulfotransferase that acts preferentially on N-acetyllactosamine in N- and O-glycans. *J. Biol. Chem.* *276*, 24388–24395.

- Takahashi, N., Yamamoto, E., Ino, K., Miyoshi, E., Nagasaka, T., Kajiyama, H., Shibata, K., Nawa, A., and Kikkawa, F. (2009). High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in mucinous tumors of the ovary. *Oncol. Rep.* 22, 1027–1032.
- Takito, J., Yan, L., Ma, J., Hikita, C., Vijayakumar, S., Warburton, D., and Al-Awqati, Q. (1999). Hensin, the polarity reversal protein, is encoded by DMBT1, a gene frequently deleted in malignant gliomas. *Am. J. Physiol.* 277, F277-289.
- Teinturier-Lelièvre, M., Julien, S., Juliant, S., Guerardel, Y., Duonor-Cérutti, M., Delannoy, P., and Harduin-Lepers, A. (2005). Molecular cloning and expression of a human hST8Sia VI (alpha2,8-sialyltransferase) responsible for the synthesis of the diSia motif on O-glycosylproteins. *Biochem. J.* 392, 665–674.
- Ten Hagen, K.G., Fritz, T.A., and Tabak, L.A. (2003). All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 13, 1R–16R.
- Tenno, M., Saeki, A., Kézdy, F.J., Elhammer, A.P., and Kurosaka, A. (2002). The lectin domain of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 is involved in O-glycosylation of a polypeptide with multiple acceptor sites. *J. Biol. Chem.* 277, 47088–47096.
- Thompson, C.L., Plummer, S.J., Tucker, T.C., Casey, G., and Li, L. (2010). Interleukin-22 genetic polymorphisms and risk of colon cancer. *Cancer Causes Control* 21, 1165–1170.
- Tian, E., and Ten Hagen, K.G. (2009). Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation. *Glycoconj. J.* 26, 325–334.
- Torabi, K., Miró, R., Fernández-Jiménez, N., Quintanilla, I., Ramos, L., Prat, E., Del Rey, J., Pujol, N., Killian, J.K., Meltzer, P.S., et al. (2015). Patterns of somatic uniparental disomy identify novel tumor suppressor genes in colorectal cancer. *Carcinogenesis*.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 87–108.
- Tougeron, D., Sickersen, G., Mouillet, G., Zaanani, A., Trouilloud, I., Coriat, R., Aparicio, T., Des Guetz, G., Lecaille, C., Artru, P., et al. (2015). Predictors of disease-free survival in colorectal cancer with microsatellite instability: An AGEO multicentre study. *Eur. J. Cancer*.
- Tsai, C.-J., and Giovannucci, E.L. (2012). Hyperinsulinemia, insulin resistance, vitamin D, and colorectal cancer among whites and African Americans. *Dig. Dis. Sci.* 57, 2497–2503.
- Tsuchida, A., Okajima, T., Furukawa, K., Ando, T., Ishida, H., Yoshida, A., Nakamura, Y., Kannagi, R., Kiso, M., and Furukawa, K. (2003). Synthesis of disialyl Lewis a (Le(a)) structure in colon cancer cell lines by a sialyltransferase, ST6GalNAc VI, responsible for the synthesis of alpha-series gangliosides. *J. Biol. Chem.* 278, 22787–22794.
- Tsuchida, A., Ogiso, M., Nakamura, Y., Kiso, M., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2005). Molecular cloning and expression of human ST6GalNAc III: restricted tissue distribution and substrate specificity. *J. Biochem. (Tokyo)* 138, 237–243.
- Tsuji, S. (1996). Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases. *J. Biochem. (Tokyo)* 120, 1–13.
- Tytgat, K.M., Büller, H.A., Opdam, F.J., Kim, Y.S., Einerhand, A.W., and Dekker, J. (1994). Biosynthesis of human colonic mucin: Muc2 is the prominent secretory mucin. *Gastroenterology* 107, 1352–1363.
- Uchimura, K., Muramatsu, H., Kaname, T., Ogawa, H., Yamakawa, T., Fan, Q.W., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Habuchi, O., Yokoyama, I., et al. (1998). Human N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase involved in the

biosynthesis of 6-sulfo sialyl Lewis X: molecular cloning, chromosomal mapping, and expression in various organs and tumor cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 124, 670–678.

Uchimura, K., Fasakhany, F., Kadomatsu, K., Matsukawa, T., Yamakawa, T., Kurosawa, N., and Muramatsu, T. (2000). Diversity of N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferases: molecular cloning of a novel enzyme with different distribution and specificities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 291–296.

Umar, A., Boland, C.R., Terdiman, J.P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Rüschoff, J., Fishel, R., Lindor, N.M., Burgart, L.J., Hamelin, R., et al. (2004). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 261–268.

Van Klinken, B.J., Tytgat, K.M., Büller, H.A., Einerhand, A.W., and Dekker, J. (1995). Biosynthesis of intestinal mucins: MUC1, MUC2, MUC3 and more. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 814–818.

Varki, A. (2009). *Essentials of glycobiology* (Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Vavasseur, F., Yang, J.M., Dole, K., Paulsen, H., and Brockhausen, I. (1995). Synthesis of O-glycan core 3: characterization of UDP-GlcNAc: GalNAc-R beta 3-N-acetyl-glucosaminyltransferase activity from colonic mucosal tissues and lack of the activity in human cancer cell lines. *Glycobiology* 5, 351–357.

Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., and Augenlicht, L. (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 295, 1726–1729.

Vijayakumar, S., Takito, J., Gao, X., Schwartz, G.J., and Al-Awqati, Q. (2006). Differentiation of columnar epithelia: the hensin pathway. *J. Cell Sci.* 119, 4797–4801.

Vongmany, N., and Bousquet, P.-J. (2014). *Les cancers en France, Les Données, INCa, janvier 2014.*

Warburton, D.E., Charlesworth, S., Ivey, A., Nettlefold, L., and Bredin, S.S. (2010). A systematic review of the evidence for Canada's Physical Activity Guidelines for Adults. *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.* 7, 39.

Watanabe, T., Itabashi, M., Shimada, Y., Tanaka, S., Ito, Y., Ajioka, Y., Hamaguchi, T., Hyodo, I., Igarashi, M., Ishida, H., et al. (2012). Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2010 for the treatment of colorectal cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 17, 1–29.

Weiss, A.A., Babyatsky, M.W., Ogata, S., Chen, A., and Itzkowitz, S.H. (1996). Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in human normal, malignant, and inflammatory intestinal tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 44, 1161–1166.

Williams, S.J., McGuckin, M.A., Gotley, D.C., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., and Antalis, T.M. (1999). Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. *Cancer Res.* 59, 4083–4089.

Williams, S.J., Wreschner, D.H., Tran, M., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., and McGuckin, M.A. (2001). Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 276, 18327–18336.

Wilson, A.I., and Saunders, B.P. (2015). *New Paradigms in Polypectomy. Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* 25, 287–302.

Winterford, C.M., Walsh, M.D., Leggett, B.A., and Jass, J.R. (1999). Ultrastructural localization of epithelial mucin core proteins in colorectal tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 47, 1063–1074.

Wong, C.K.W., Fedorak, R.N., Prosser, C.I., Stewart, M.E., van Zanten, S.V., and Sadowski, D.C. (2012). The sensitivity and specificity of guaiac and immunochemical fecal occult blood tests for the detection of advanced colonic adenomas and cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* 27, 1657–1664.

World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research (2007). *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington DC: AICR.

World Health Organization, and International Agency for Research on Cancer (2010). *WHO classification of tumours of the digestive system* (Lyon: International Agency for Research on Cancer).

Wu, W., Kemp, B.L., Proctor, M.L., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Hong, W.K., and Mao, L. (1999). Expression of DMBT1, a candidate tumor suppressor gene, is frequently lost in lung cancer. *Cancer Res.* *59*, 1846–1851.

Yamachika, T., Nakanishi, H., Inada, K., Kitoh, K., Kato, T., Irimura, T., and Tatematsu, M. (1997). Reciprocal control of colon-specific sulfomucin and sialosyl-Tn antigen expression in human colorectal neoplasia. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *431*, 25–30.

Yang, J.M., Byrd, J.C., Siddiki, B.B., Chung, Y.S., Okuno, M., Sowa, M., Kim, Y.S., Matta, K.L., and Brockhausen, I. (1994). Alterations of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues. *Glycobiology* *4*, 873–884.

Yantiss, R.K. (2013). *Advances in surgical pathology*.

Yildiz, H.M., Carlson, T.L., Goldstein, A.M., and Carrier, R.L. (2015). Mucus Barriers to Microparticles and Microbes are Altered in Hirschsprung's Disease. *Macromol. Biosci.*

Yonezawa, S., Higashi, M., Yamada, N., Yokoyama, S., Kitamoto, S., Kitajima, S., and Goto, M. (2011). Mucins in human neoplasms: clinical pathology, gene expression and diagnostic application. *Pathol. Int.* *61*, 697–716.

Yuhara, H., Steinmaus, C., Cohen, S.E., Corley, D.A., Tei, Y., and Buffler, P.A. (2011). Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer? *Am. J. Gastroenterol.* *106*, 1911–1921; quiz 1922.

(2009). Les facteurs de risque du cancer colorectal - Facteurs de risque - Cancer du côlon - Les cancers - Info patient - Institut National Du Cancer.

(2014). A stool DNA test (Cologuard) for colorectal cancer screening. *Med. Lett. Drugs Ther.* *56*, 100–101.

ANNEXES



Structural characterization of mucin O-glycosylation may provide important information to help prevent colorectal tumor recurrence

Adriana Mihalache^{1,2}, Jean-François Delplanque¹, B elinda Ringot-Destrez¹, Cindy Wavelet¹, Pierre Gosset², Bertrand Nunes³, Sophie Groux-Degroote¹, Renaud L eonard¹ and Catherine Robbe-Masselot^{1*}

¹ Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR CNRS 8576, University of Lille, Villeneuve d'Ascq, France, ² Service d'Anatomie Pathologie, Faculté Libre de Médecine, Hôpital Saint Vincent de Paul, Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille, Lille, France, ³ Service Chirurgie Digestive, Faculté Libre de Médecine, Hôpital Saint Philibert, Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille, Lille, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Lucia Mendonça-Previato,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

Reviewed by:

Lucia Mendonça-Previato,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil
Anthony Peter Corfield,
University of Bristol, UK

*Correspondence:

Catherine Robbe-Masselot,
Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR 8576 CNRS/USTL, B timent C9, Cit  Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
catherine.robbe@univ-lille1.fr

Specialty section:

This article was submitted to Molecular and Cellular Oncology, a section of the journal *Frontiers in Oncology*

Received: 02 September 2015

Accepted: 22 September 2015

Published: 08 October 2015

Citation:

Mihalache A, Delplanque J-F, Ringot-Destrez B, Wavelet C, Gosset P, Nunes B, Groux-Degroote S, Léonard R and Robbe-Masselot C (2015) Structural characterization of mucin O-glycosylation may provide important information to help prevent colorectal tumor recurrence. *Front. Oncol.* 5:217. doi: 10.3389/fonc.2015.00217

Although colorectal cancer is a preventable and curable disease if early stage tumors are removed, it still represents the second cause of cancer-related death worldwide. Surgical resection is the only curative treatment but once operated the patient is either subjected to adjuvant chemotherapy or not, depending on the invasiveness of the cancer and risks of recurrence. In this context, we investigated, by mass spectrometry (MS), alterations in the repertoire of glycosylation of mucins from colorectal tumors of various stages, grades, and recurrence status. Tumors were also compared with their counterparts in resection margins from the same patients and with healthy controls. The obtained data showed an important decrease in the level of expression of sialylated core 3-based O-glycans in tumors correlated with an increase in sialylated core 1 structures. No correlation was established between stages of the tumor samples and mucin O-glycosylation. However, with the notable exception of sialyl Tn antigens, tumors with recurrence presented a milder alteration of glycosylation profile than tumors without recurrence. These results suggest that mucin O-glycans from tumors with recurrence might mimic a healthier physiological situation, hence deceiving the immune defense system.

Keywords: colorectal cancer, recurrence, glycosylation, human intestinal mucins, prognosis

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer-related death in the Western world (1). It arises as the result of an accumulation of genetic and epigenetic alterations leading to transformation of normal colonic epithelium to invasive adenocarcinomas, due to disorders in cell proliferation and differentiation (2).

Unlike many other malignancies, CRC is a preventable and curable disease if early stage tumors are removed. Actually surgical resection complemented or not with adjuvant chemotherapy is the only curative treatment. However, patient survival is highly dependent on the tumor stage at the

Abbreviations: CID, collision-induced-dissociation; CRC, colorectal cancer; CsCl, cesium chloride; PAS, periodic acid-Schiff

time of diagnosis. Metastatic CRC is frequently associated with recurrences within 5 years after surgery. In this context, there is an urgent need to identify biomarkers for early detection of CRC, to follow tumor development during the course of therapy and to predict recurrence.

Screening of risk populations currently remains based on fecal occult blood test and on colonoscopy for the possible discovery of polyps and invasive tumors. Despite the accuracy of these diagnostic methods, many CRC remain undetected until they have spread to the surrounding organs or lymph, correlating with poor prognosis because of the low sensitivity and specificity of these tests (3). Knowledge of the molecular mechanisms of colorectal carcinogenesis will help to improve tumor detection as well as treatment.

Altered glycosylation is a universal hallmark of cancer (4, 5). Many tumor-associated antigens defined by monoclonal antibodies raised against cancer cells are cell-surface carbohydrate epitopes (6, 7). Among all glycoproteins, mucins, the major component of the mucus gel covering and protecting the intestinal tract, are frequently altered in colon cancers. Alterations of mucin O-glycosylation include expression of relatively short truncated O-glycans and altered peripheral structures (8–13). Three types of alterations can lead to tumor-associated O-glycans: (i) neo-expression of antigens that are not expressed in embryonic or healthy tissues; (ii) expression of oncofetal antigens that are absent or rare in healthy adult tissues but expressed during embryonic development; and (iii) modified expression levels of antigens found in healthy tissues. All these alterations are important in tumor biology and can be useful in clinical management (14). In CRC, alterations of mucin O-glycans include reduced expression of core 3 [GlcNAc β 1-3GalNAc α -Ser/Thr] and core 4 [GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -Ser/Thr] based glycans (15, 16). Other features are an increased sialylation of mucin O-glycans and a decreased sulfation (13, 17, 18). We have previously described the increased expression of a core 3 disialyl-Lewis^x glycan in colorectal tumors, competing with its sulfo sialyl-Lewis^x counterpart in normal tissue (19).

Biosynthesis of mucin O-glycans is governed by several glycosyltransferases. It has been shown that during malignant transformation the level of expression of genes encoding glycosyltransferases as well as activities and Golgi localization of these enzymes are modified, leading to less complex structures or novel glycans (16, 20, 21). Overexpression of

core 1 β 1,3 galactosyltransferase (core 1 synthase) is associated with tumor growth and metastasis of colon cancer cells and with poor survival (22). Downregulation of core 2 β 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase (core 2 synthase) and β 1,3 N-acetylglucosaminyltransferase 6 (core 3 synthase) may be involved in maintaining the tumor phenotype (15, 21, 23–25).

The changes observed in colorectal cancer at the mucin O-glycosylation level reflect the alterations of gene expression of glycosyltransferases involved in their biosynthesis. Nevertheless, the accumulation of a given structure does not necessarily indicate which glycosyltransferase gene is altered. Indeed, multiple changes can lead to the accumulation of specific structures. For instance, it has been shown that sialyl-Lewis^x motifs accumulation can result either from an absence of sulfation of the type 1 chain Gal β 1-3GlcNAc allowing its sialylation or from an absence of α 2-6 sialylation of the core GalNAc that is replaced by the synthesis of the type 2 chain Gal β 1-4GlcNAc further sialylated to form sialyl Lewis^x motifs (26).

However, despite all these studies, many of the efforts focused on differential glycosylation of mucins on tumor detection and therapeutics remain investigative. Thus, in this work, we explored the differential expression of mucins and the expression level of the major O-glycans. The objective was to identify differences in mucin glycosylation between CRC of various stages and grades in order to propose new predictive or prognostic biomarkers in colon cancer.

Results

Cancer-Associated Alterations in Mucin O-Glycosylation are not Restricted to the Tumor but Spread in Resection Margins

To investigate potential differences in the profile of glycosylation of colon mucins during malignant transformation, colorectal tumor tissues were collected from 10 patients with tumors of different stages and grades (Table 1). Resection margins from the same patients were included in this study as well as five control mucosae from healthy individuals.

Purified mucins were analyzed for their glycan compositions and sequences. Oligosaccharides were released by base/borohydride treatment followed by desalting. The pool of oligosaccharide alditols obtained from each sample was thus permethylated before analysis by matrix-assisted laser desorption ionization–time of

TABLE 1 | Characteristics of the tumor samples (and their paired resection margins) used in this study.

Patient	Age	Gender	Tumor stage	Location	Differentiation	Recurrence
1	46	Female	III	Right	Poor	No
2	55	Male	II	Right	Moderate	No
3	97	Female	II	Transverse	Moderate	Yes
4	69	Male	IV	Right	Moderate	Yes
5	64	Female	II	Transverse	Moderate	No
6	67	Male	II	Right	Well	No
7	82	Male	III	Left	Moderate	Yes
8	80	Female	IV	Right	Poor	No follow-up
9	62	Male	III	Sigmoid	Moderate	No
10	67	Male	IV	Left	Mucinous	No

flight (MALDI-TOF) tandem MS and nano ESI Q-TOF MS/MS as previously published (27–29). The relative abundance of oligosaccharides was calculated based on integration of peaks on MS spectra.

As shown in **Figure 1** and **Table 2**, more than 60 ions corresponding to O-glycans carried by mucins were identified in this study. The O-glycans were 2–10 residues long and were mostly sialylated. Tumors presented the highest diversity, only one of the structure identified here being absent in these samples whereas 16 of them were absent in healthy controls and 11 in resection margins. Most of the oligosaccharides recovered in healthy mucosae were based on a sialylated core 3 structure [GlcNAc β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAcol], as described previously (19, 30). For example, expression of this trisaccharide on MS spectra, corresponding to the ion at m/z 936, represented around 30% of total glycans in healthy mucosae. A decreasing gradient of structures based on a core 3 was observed from healthy mucosae to tumoral samples, correlating with an increasing gradient of expression of structures based on a core 1 (Gal β 1-3GalNAcol). Core 3-based O-glycans represented 64% of the O-glycans population in healthy mucosae, 56.5% in resection margins and only 27.5% of total O-glycans in tumors. The trisaccharidic core 3 structure detected *via* the ion at m/z 936 dropped from 31% in healthy mucosa to 12% in the tumor. On the contrary, core 1 oligosaccharides ranged from 13% in healthy mucosae to 21% in resection margins and 41% in tumors. Levels of expression of core 1 and core 3 between controls and tumors were significantly different (p -value of 0.0038 and 0.0062, respectively).

Among the 60 O-glycans identified, around one-third followed either a decreasing gradient of expression or an increasing gradient from healthy controls to resection margins and tumors (**Figure 2**). A decrease in the level of expression of sialylated core 3 structures at m/z 936, 1,140, and 1,314 was observed in tumors compared to resection margins and controls, the relative percentage of these three O-glycans was 18, 36, and 46% of total glycans, respectively. An increased level of expression of sialylated core 1 structures seemed to correlate with the decrease of core 3 glycans, the relative percentage of ions at m/z 895, 1,344, 1,518, and 1,793 corresponded to 7% in controls, 12% in resection margins, and 21% in tumors.

As previously described (19), an increase in the disialyl-Lewis^x antigen at m/z 1,675 was observed in the tumor samples (9.4% of total O-glycans) compared to resection margins (2.5%) and controls (3.3%). Its 6-sulfo sialyl-Lewis^x counterpart decreased in tumors (0.8% of total glycans) compared to resection margins (3.2%) and controls (7.1%). Other significant differences between tumors and controls concerned the important increase in the level of expression of ions at m/z 534 (from 1 in controls to 5.6% in tumors); 983 (from 1.6 to 7.5%); 1,344 (from 1.1 to 7.5%); and 1,705 (from 0.6 to 3.2%). Interestingly, all these core 1-based glycans seem to follow the same biosynthetic pathway sequence: the T antigen at m/z 534 is first elongated by a GlcNAc residue to give the ion at m/z 779. A galactose residue is then linked to the GlcNAc residue to give the ion at m/z 983, which will further be substituted by one sialic acid residue (to give the ion at m/z 1344) or two sialic acid residues, giving the ion at m/z 1705.

The total sialylation level of mucin O-glycans did not significantly vary between tumors, resection margins and healthy

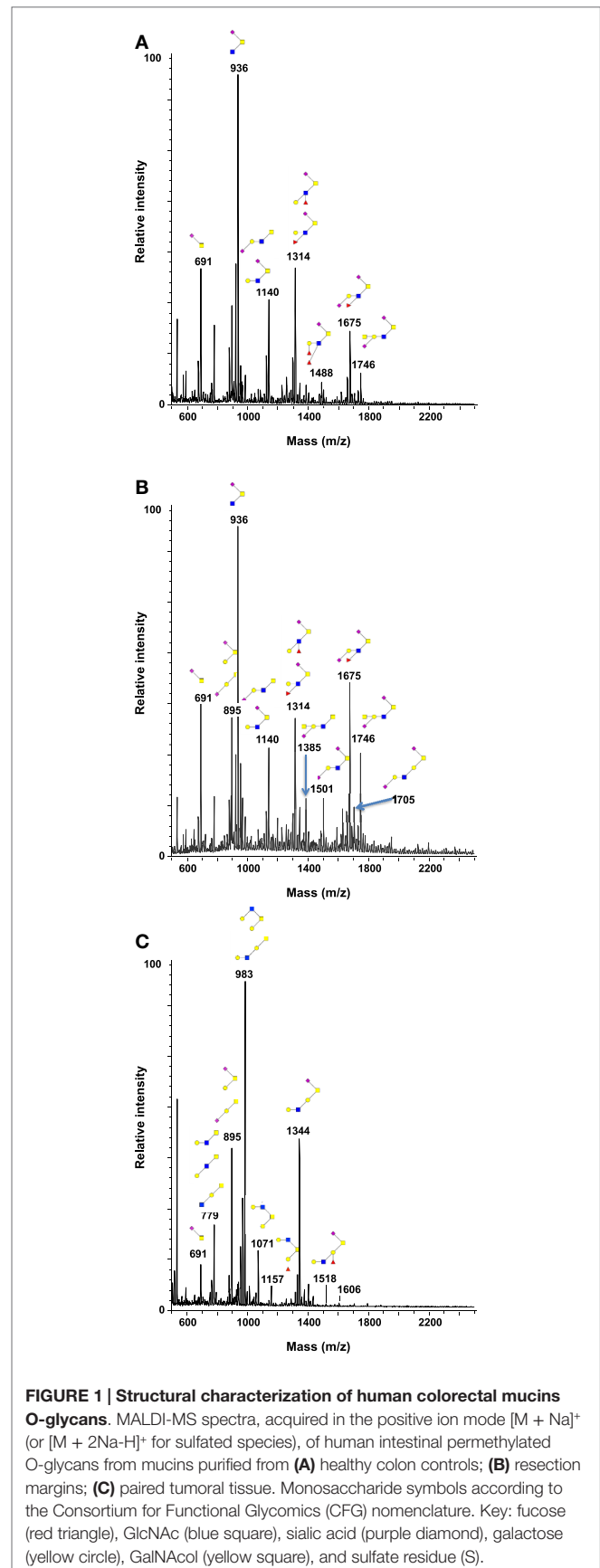








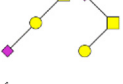











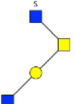
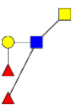
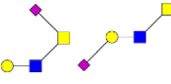

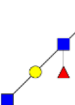
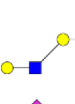
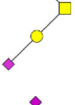
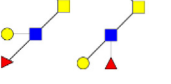

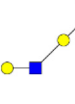
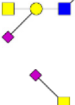
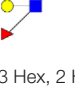
FIGURE 1 | Structural characterization of human colorectal mucin O-glycans. MALDI-MS spectra, acquired in the positive ion mode $[M + Na]^+$ (or $[M + 2Na - H]^+$ for sulfated species), of human intestinal permethylated O-glycans from mucins purified from **(A)** healthy colon controls; **(B)** resection margins; **(C)** paired tumoral tissue. Monosaccharide symbols according to the Consortium for Functional Glycomics (CFG) nomenclature. Key: fucose (red triangle), GlcNAc (blue square), sialic acid (purple diamond), galactose (yellow circle), GalNAcol (yellow square), and sulfate residue (S).

TABLE 2 | Proposed neutral and acidic oligosaccharide structures or sequences identified in human mucins from tumors and resection margins of patients with colorectal cancers and from colonic mucosa of healthy individuals.

Proposed structures or sequences of oligosaccharides	[M + Na] ⁺ or [M + 2Na-H] ⁺ for sulfated species	Tumors	Resection margins	Healthy controls
	534	5.6 ± 5.7	1.8 ± 2.1	1.0 ± 1.4
	575	1.7 ± 1.5	5.8 ± 6.7	3.8 ± 2.5
	663	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.6	1.0 ± 1.4
	691	7.1 ± 7.1	5.2 ± 5.3	5.8 ± 4.9
	708	0.5 ± 1	0.3 ± 0.6	0.4 ± 0.5
	749	0.4 ± 0.8	1.0 ± 2.2	0
	779	4.2 ± 1.5	5.0 ± 3.8	5.6 ± 0.4
	867	0.8 ± 1.1	0.3 ± 0.6	0
	895	10.9 ± 3.6	7.7 ± 4.2	5.7 ± 0.6
	908	0.6 ± 1.0	1.3 ± 1.8	0.8 ± 1.1
	936	12.1 ± 11.2	24.2 ± 10.2	30.8 ± 11.6
	953	1.4 ± 0.6	3.0 ± 1.8	1.9 ± 0.7
	983	7.5 ± 8.3	2.0 ± 0.7	1.6 ± 0.3
	1,024	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.5
	1,041	0.0 ± 0.1	0.3 ± 0.6	0.2 ± 0.2
	1,069	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.8 ± 0.1
	1,071	0.6 ± 1.5	0	0

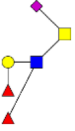

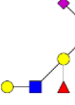

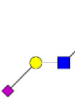


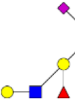

(Continued)

TABLE 2 | Continued

Proposed structures or sequences of oligosaccharides	[M + Na] ⁺ or [M + 2Na-H] ⁺ for sulfated species	Tumors	Resection margins	Healthy controls
	1,110	0.3 ± 0.5	0.7 ± 1.1	0.7
	1,112	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.3	0.3 ± 0.4
	1,127	0	0.3 ± 0.8	0
	1,140	2.9 ± 2.8	4.4 ± 1.9	7.0
	1,157	1.9 ± 1.2	0.4 ± 0.7	0.3 ± 0.4
	1,198	0.0 ± 0.1	0.4 ± 0.6	0
	1,228	0.8 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.6 ± 0.2
	1,256	3.5 ± 1.8	2.7 ± 4.0	1.5 ± 0.4
	1,314	3.3 ± 2.4	7.0 ± 4.3	8.0 ± 1.4
	1,331	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.4	0.1 ± 0.2
	1,344	7.5 ± 5.5	3.3 ± 6.0	1.1 ± 0.4
	1,385	0.7 ± 1.4	1.9 ± 2.3	0.7 ± 1.0
	1,402	0.8 ± 0.6	3.2 ± 1.4	7.1 ± 0.3
3 Hex, 2 HexNAc, GalNAcol	1,432	0.9 ± 0.8	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.3
2 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1,473	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.3

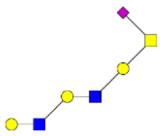
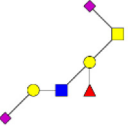
(Continued)

TABLE 2 | Continued

Proposed structures or sequences of oligosaccharides	[M + Na] ⁺ or [M + 2Na-H] ⁺ for sulfated species	Tumors	Resection margins	Healthy controls
	1,488	0.3 ± 0.6	0.8 ± 1.7	0.7 ± 1.0
2 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO3, GalNAcol	1,490	0.2 ± 0.4	0	0
	1,501	0.5 ± 0.6	0.6 ± 0.9	1.6 ± 0.7
	1,518	1.7 ± 1.8	0.4 ± 0.6	0.2 ± 0.4
	1,559	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2
2 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1,576	0 ± 0.1	0	0.1 ± 0.2
	1,589	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.1
3 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1,606	0.7 ± 0.8	0	0.1 ± 0.1
2 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAcol	1,647	0.6 ± 0.8	0.2 ± 0.4	0.3
	1,675	9.4 ± 1.2	2.5 ± 2.4	3.3 ± 0.7
3 Hex, 3 HexNAc, GalNAcol	1,677	1.0 ± 1.3	0.4 ± 1	0
	1,705	3.2 ± 3.4	2.5 ± 6.0	0.6 ± 0.1
	1,718	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.1
	1,746	0.9 ± 2	1.9 ± 2.3	1.1 ± 1.5
2 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 NeuAc, GalNAcol	1,763	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.3	0.3 ± 0.1
3 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, GalNAcol	1,780	0.5 ± 0.8	0	0

(Continued)

TABLE 2 | Continued

Proposed structures or sequences of oligosaccharides	[M + Na] ⁺ or [M + 2Na-H] ⁺ for sulfated species	Tumors	Resection margins	Healthy controls
	1,793	0.3 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0
2 Hex, 3 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAc	1,834	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.1
3 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, GalNAc	1,851	0.4 ± 0.8	0	0.1 ± 0.1
	1,879	0.2 ± 0.5	0.3 ± 0.8	0
4 Hex, 3 HexNAc, GalNAc	1,881	0.4 ± 0.7	0	0
4 Hex, 2 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO ₃ , GalNAc	1,898	0 ± 0.1	0.1 ± 0.2	0
3 Hex, 4 HexNAc, GalNAc	1,922	0.2 ± 0.5	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.1
2 Hex, 2 HexNAc, 2 Fuc, 1 NeuAc, GalNAc	1,937	0 ± 0.1	0	0.1 ± 0.1
3 Hex, 3 HexNAc, 1 Fuc, 1 SO ₃ , GalNAc	1,939	0.1 ± 0.2	0	0
3 Hex, 2 HexNAc, 3 Fuc, GalNAc	1,954	0.1 ± 0.2	0	0
4 Hex, 2 HexNAc, 1 NeuAc, GalNAc	1,997	0.1 ± 0.2	0	0
3 Hex, 3 HexNAc, 2 Fuc, GalNAc	2,025	0.4 ± 0.5	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1
5 Hex, 3 HexNAc, GalNAc	2,055	0.6 ± 0.9	0	0

The relative percentage of each oligosaccharide was calculated based on the integration of peaks on MS spectra. Results are presented as the mean ± SD of percentage of each oligosaccharide for a same condition.

Monosaccharide symbols according to the Consortium for Functional Glycomics (CFG) nomenclature. Key: fucose (red triangle), GlcNAc (blue square), sialic acid (purple diamond), galactose (yellow circle), GalNAc (yellow square), and sulfate residue (S).

controls and represented 67, 71, and 78% of total O-glycans, respectively. A decrease in the level of sulfation was observed in tumors (only 3.4% of total oligosaccharides) compared to resection margins (5.7%) and controls (9.4%).

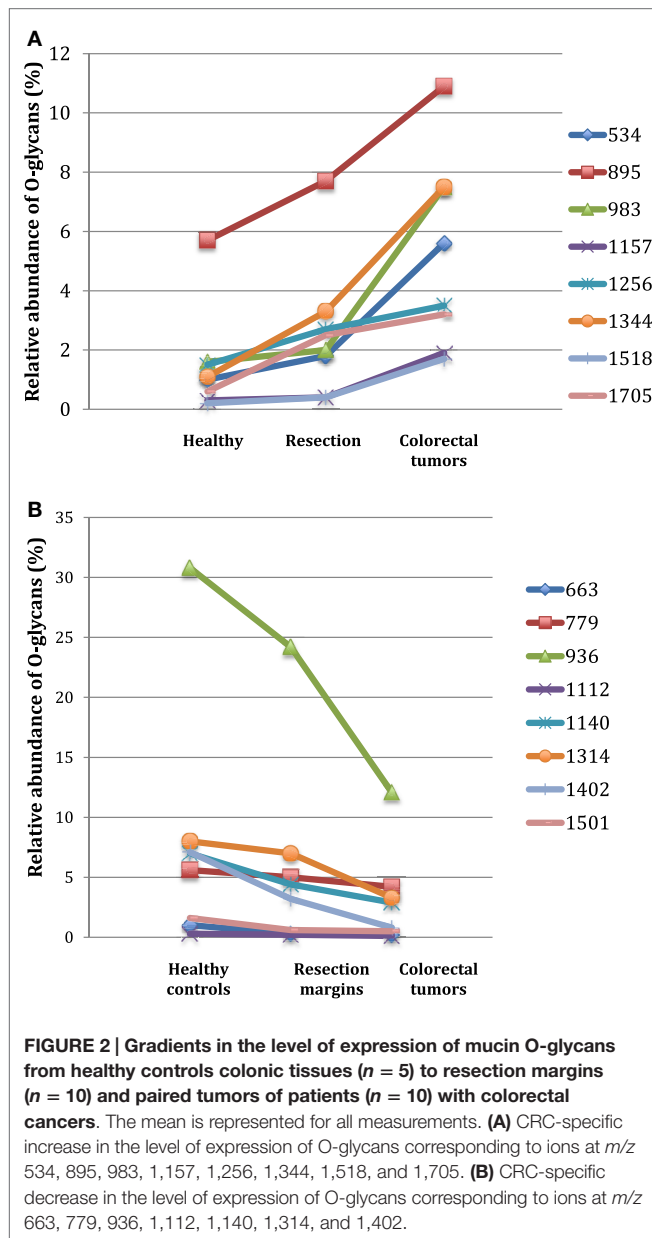
Generally, the levels observed for the resection margins are intermediate between the situation in healthy mucosa and what is observed in tumors. It has been shown that inflammation can affect the O-glycosylation profile, for instance, in the case of acute ulcerative colitis (31). Micro-inflammation could therefore explain the observed glycosylation pattern of resection margins. SD values (Table 2) indicated that levels of expression of oligosaccharides from tumors showed more heterogeneity and inter-individual variations than those from healthy controls. This result may be explained by the fact that tumoral samples presented different anatomo-pathological features such as degree of histological differentiation or tumoral stage.

Comparison of the Repertoire of Glycosylation of Mucin O-Glycans According to the Tumor Stage

Colorectal cancers are most commonly classified using the TNM staging system. This system takes into account three key factors

that are the invasiveness of the tumor (T), lymph nodes (N), and metastasis (M). Once the T, N, and M scores have been assigned (each of three factors are assigned either with a number 0–4 for T or 0–1 for N and M), an overall stage is determined, and thus treatment options may be proposed and explored. In stage 0, the cancer has not grown beyond the inner layer of the colon or rectum. In stage I, the cancer has grown into the submucosa and muscularis propria whereas in stage II the cancer has grown through all the layers of the colon or rectum with or without the perforation of visceral peritoneum. In stage IIc, the cancer has also grown into nearby organs or tissues, in contrast to stage IIb. Stage III is divided into three categories, depending on the extent to which the cancer has spread, and how many lymph nodes have been affected. Stage IV is the most advanced stage of colorectal cancers; it has metastasized to distant sites such as the liver or the lung. The cancer may or may not have grown through the wall of the colon or rectum, and lymph nodes may or may not have been affected.

In this study, four patients presented a cancer of stage II, three were of stage III, and three of stage IV. Compared to stages II and III, stage IV was characterized by a low increase in the level of expression of three ions: the ion at *m/z* 534, corresponding to the



T antigen represented 7.1% of total O-glycans in stage II to 1.2% in stage III and 9.7% in stage IV (Figure 3). The ion at *m/z* 691, corresponding to the sialyl Tn antigen increased from 5.9% of total O-glycans in stage II, 6% in stage III, and 10.7% in stage IV. The level of expression of the last ion at *m/z* 983, corresponding to a core 1 tetrasaccharide was 6% of total glycans in stage II, 3.9% in stage III, and 15.1% in stage IV. However, no direct link between carcinogenesis stages and O-glycans structure profile could be drawn from these results.

Tumors with Recurrence can be Distinguished from Tumors Without Recurrence

In this study, all patients underwent curative resection for colorectal cancers. The profiles of mucin O-glycans released from tumors with recurrence and from tumors without recurrence

were compared and confronted to the dataset from healthy controls. Figures 4 and 5 highlight differences between samples in the level of expression of oligosaccharides. Three kinds of differences could be identified: ions at *m/z* 534, 983, 1,157, 1,344, and 1,705, all corresponding to core 1 glycans, showed an increasing gradient of expression from healthy controls to tumors without recurrence. Tumors with recurrence presented an intermediate level of expression of these glycans.

On the contrary, ions at *m/z* 936, 1,140, and 1,314, all corresponding to sialylated core 3 glycans, showed a decreasing gradient of expression from controls to tumors without recurrence, with again an intermediate state for tumors with recurrences.

The last kind of differences concerned sialyl Tn, sialyl T, and disialyl T antigens at *m/z* 691, 895, and 1,256, respectively. Each of these three antigens was more expressed in tumors with recurrence than in tumors without recurrence and healthy controls. The levels of expression of sialyl Tn antigen between the two types of tumors were significantly different ($p = 0.012$).

Discussion

Colorectal cancer is the third most commonly diagnosed cancer in males and the second in females, with over 1.2 million new cases and around 600,000 deaths estimated to have occurred worldwide in 2008 (32). Surgical resection is the primary treatment modality for stages I–III CRC, and the most powerful tool for assessing prognosis following curative surgery remains pathologic analysis of the resected specimen. Currently, the parameters that determine pathologic stage are the strongest predictors of postoperative outcome. An intensive surveillance for patients with resected cancer is highly recommended, and is based on a clinical encounter with a physician every 3–6 months for the first 3 years and serial measurement of carcinoembryonic antigen (CEA) at each follow-up visit. However, approximately one in three people who develop CRC dies of this disease and more than 40% will have a disease recurrence, despite development of screening tests and surveillance for CRC in patients with colon polyps and/or family history and despite progress in surgical resection of tumors, adjuvant chemotherapy, and postoperative surveillance. Therefore, the challenge is to identify new cancer markers for prediction of the risk of recurrence after potentially curative resection.

Aberrant expression and glycosylation of mucins is a common feature of all adenocarcinomas (14, 33, 34). In colorectal cancer, the differences from normal mucins have been described both at the gene and post-translational levels. The synthesis of MUC2, the main intestinal secreted mucins, has been shown to be suppressed in colorectal cancer and its metastases (35). Distribution of MUC2 within goblet cells changes in adenomas compared to healthy mucosa, with, for example, an increased presence in the cytoplasm and Golgi apparatus and a decreased localization in the vesicle (36). A *de novo* expression of MUC5AC, a gastric foveolar mucin has been described in mucinous adenocarcinomas as well as in tumors exhibiting microsatellite instability (37–39). MUC5AC and MUC6 were also found in a high proportion of villous and tubulovillous adenomas but not in normal colonic biopsies (40). No significant association between

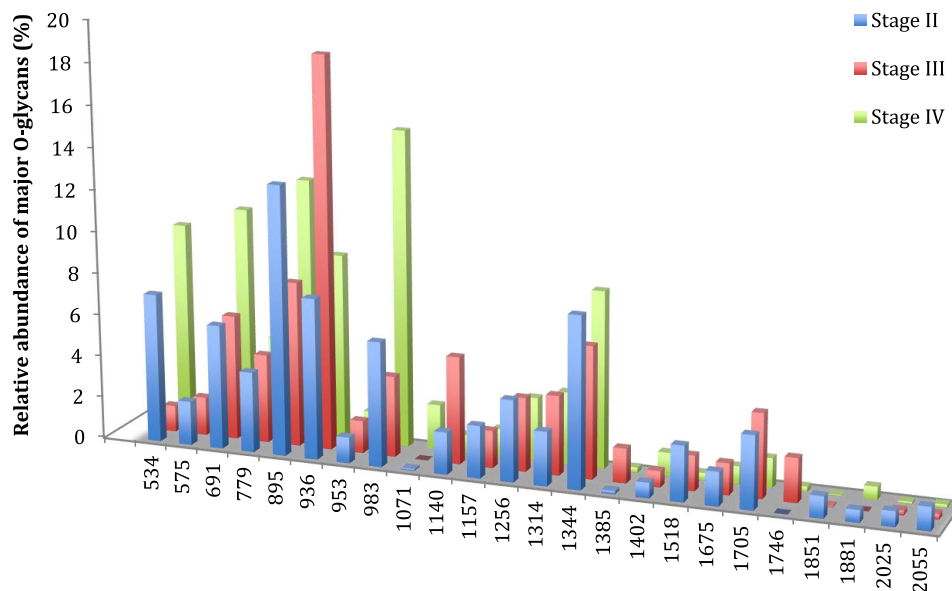


FIGURE 3 | Comparison of the relative abundance of major mucin O-glycans purified from tumors of stage II ($n = 4$), stage III ($n = 3$), or stage IV ($n = 3$). A low increase in the level of expression of ions at m/z 534, 691, and 983 was observed in stage IV colorectal tumors, compared to stages II and III.

high mucin content in colorectal cancer and overall survival or celerity of disease progression has yet been demonstrated (41).

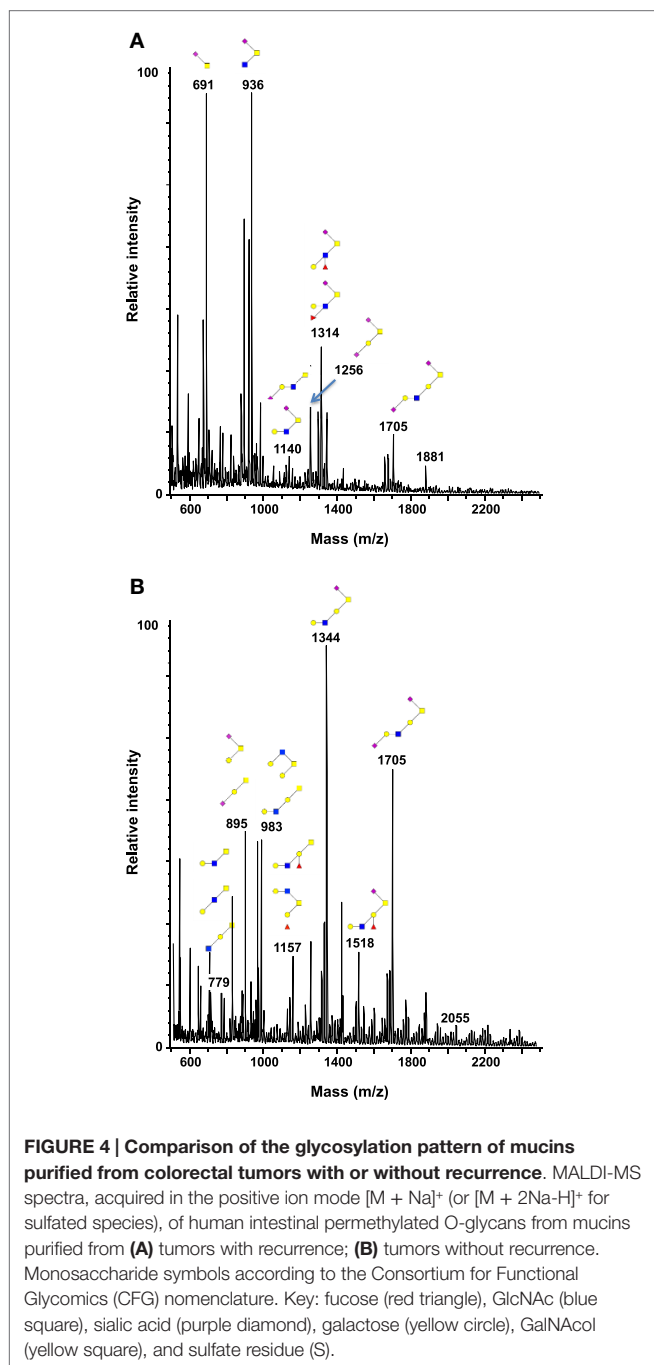
Alterations of mucin glycosylation in colorectal cancer include reduced number and length of carbohydrate side chains on apomucins, deletion of normally expressed antigens, *de novo* appearance of novel antigens, and expression of blood group-incompatible antigens (20, 33, 34, 42). Although mucin O-glycans have long been implicated in colorectal carcinogenesis, none of them have been explored as potential marker of recurrence. In this study, we compared the O-glycosylation profile of mucins from tumors with or without recurrence and have observed important differences in the level of expression of O-glycans between these two types of samples.

First of all, the level of expression of sialyl Tn antigens at m/z 691 is significantly higher in tumors with recurrence, compared to tumors without recurrence. This result is in agreement with previous studies demonstrating that overexpression of Tn and sialyl Tn antigens are characteristics of more advanced and poorly differentiated colon cancers (8, 43). In a recent study conducted by Chik et al., overexpression of sialyl Tn antigens was correlated with upregulation of alpha 2,6 sialyltransferase gene (*ST6GALNAC1*) and a decrease in core 1 synthase gene (*C1GALT1*) in the mucinous colorectal cancer cell line LS174T (44). Interestingly, our analysis of mucin glycosylation of tumors with recurrence demonstrated a higher proportion of core 3 O-glycans, and a weaker expression of

core 1 O-glycans, compared to tumors without recurrence. These data seem to indicate a less active or expressed core 1 synthase in tumors with recurrence, compared to tumors without recurrence. This result could, at least partially, explain the higher expression of sialyl Tn antigens in tumors with recurrence.

A generally higher level of expression of sialyl T and disialyl T antigens was also observed in tumors with recurrence, compared to tumors without recurrence, although these differences were not significant. Sialylation of the T antigen is governed by action of ST6GalNAc-II, and an overexpression of its mRNA level has been correlated to poor patient survival in CRC with lymph node metastases (45). The incomplete elongation of O-glycans resulting in the abundance of these sialylated truncated structures in tumors with recurrence may have different origins. Epigenetic silencing of glycosyltransferase genes necessary for the synthesis of more complex O-glycan core structures may, for instance, be involved, for some of related enzymatic activities are known to be significantly decreased in cancers (20, 46) Down regulation of the genes encoding core 1 enzyme and/or its chaperon Cosmc may also lead to the appearance of Tn and sialyl Tn antigens (47, 48). Hypoxia-induced transcription modification of several glycosyltransferase genes may also be involved in advanced tumoral stage (49).

In this work, we compared the pattern of glycosylation of mucins from three tumors with recurrence and six tumors without recurrence. Even if numbers of cases were relatively



small, the most striking feature of O-glycans from tumors with recurrence, compared to tumors without recurrence, concerned the balance between the level of expression of core 1- and core 3-based glycans. In tumors without recurrence, a strong decrease in core 3-based O-glycans, correlated to a high increase in core 1-based O-glycans, was observed. By contrast, in tumors with recurrence, the level of expression of core 3-based oligosaccharides remains important and only a slight increase in the proportion of core 1 O-glycans can be seen. Compared to healthy controls, the profile of glycosylation of mucins from

tumors with recurrence is less altered than the one of tumors without recurrence. In other words, mucin O-glycosylation from tumors with recurrence looks at least partially like the one of healthy controls. The high proportion of core 3 O-glycans in tumors with recurrence may contribute to mimic normal physiological conditions, rendering the immune defense system less efficient to fight the tumor cells.

In this study, we also compared the profile of glycosylation of mucins between tumors, resection margins, and healthy controls. No significant differences in the level of expression of Sda/Cad antigens were observed between these three types of samples. Previous studies have reported a loss of Sda synthase and Sda antigens in colorectal cancers (50–52). Our precedent study on glycosylation of MUC2 in three human colorectal carcinomas allowed us to demonstrate that the disialylated glycans with Sda/Cad epitope (corresponding to the ion at m/z 1746) were both recovered in normal and cancerous tissues whereas a decrease in the monosialylated glycans with Sda/Cad epitopes was found (19). This study confirms that mucins from colorectal carcinomas still express Sda/Cad antigens. One explanation for the absence of differences in the level of expression of these antigens between healthy controls and tumors may come from the origin of samples. Indeed, it has been demonstrated that Sda/Cad antigens are mainly expressed in the descending colon (29, 53) and results are presented here as the mean of percentage of each oligosaccharide for all samples from the same condition. Taken individually, results showed great differences in the level of expression of these antigens (data not shown).

Comparison of glycosylation between tumors, resection margins, and healthy controls indicate the presence of gradients of expression of major O-glycans: core 3 O-glycans decreased from healthy controls to tumors, and an increasing gradient of core 1 O-glycans was recovered. This result probably arises from alterations in the level of expression of genes encoding glycosyltransferases or in the activities of such enzymes. Previous studies have demonstrated, by quantitative real time RT-PCR, an overexpression of *CIGALT1* in tumors of patients with colorectal cancer, promoting the invasive behavior of tumoral cells (22, 54). Other studies, using quantitative real time PCR and immunohistochemistry have shown a downregulation of core 3 synthase in carcinomas (24).

Comparison of the glycosylation patterns of mucins from resection margins and healthy controls shows that alterations of mucin O-glycans are not only recovered in tumors but also in resection margins. This suggests that, even if margins of resection are macroscopically and anatomically safe, molecular alterations are nevertheless present and may contribute to the risk of recurrence for certain patients.

In this study, no correlation was established between mucin O-glycans and the stage of colorectal cancers. Variations in the level of expression of certain glycans have been observed, such as a higher expression of ions at m/z 534 (T antigen), 691 (sialyl Tn antigen), and 983 in stage IV. However, none of these alterations were significant. Even if numbers of samples in each stage was relatively low, one hypothesis may be that modifications of mucin glycosylation are an early step during colorectal carcinogenesis.

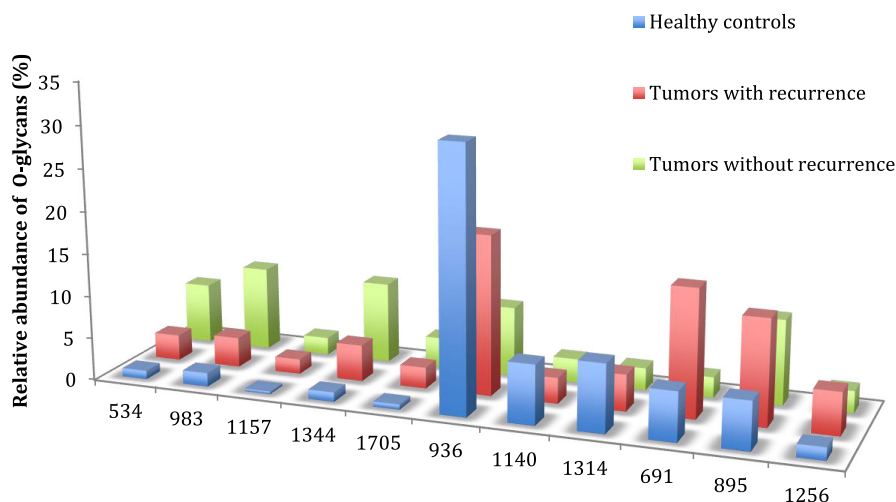


FIGURE 5 | Comparison of the relative abundance of major mucin O-glycans between healthy controls ($n = 5$), tumors with recurrence ($n = 3$), and tumors without recurrence ($n = 6$). The mean is represented for all measurements. A decrease in the level of expression of core 3-based glycans from healthy controls to tumors without recurrence is seen with the ions at m/z 936, 1,140, and 1,314 and an increase in the core 1-based glycans is represented by the ions at m/z 534, 983, 1,157, and 1,344. Tumors with recurrence expressed higher levels of sialyl Tn (ion at m/z 691), sialyl T (ion at m/z 895), and disialyl T antigens (ion at m/z 1,256), compared to healthy controls and tumors without recurrence.

In conclusion, our work demonstrated for the first time a possible correlation between mucin O-glycosylation patterns in the resected tumor of patients and the risk of recurrence. These findings might prove valuable as prognostic tools orienting the cure to be given to patients after resection.

Materials and Methods

Human Samples and Mucin Preparation

Fresh tissue samples from 10 individuals with colorectal carcinoma were taken at surgery. Specimens were obtained from the tumor as well as from resection margins. A summary of localization of tissue sampling, tumor stage, grade of differentiation, age, and sex of the donors is given in **Table 1**. Colorectal tissues from five healthy individuals were also included in this study. These samples were healthy resection margins of colonic tissues arising from patients with diverticulosis. The use of human tissues for this study was approved by the local hospital ethics committee and French Ministry of Higher Education and Research (DC-2008-242). All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Samples were frozen and stored at -20°C until used. A pathologist at the Saint Vincent Hospital of Lille carried out the CRC diagnosis of tumors. All samples were obtained with informed consent of the patients.

Isolation and Purification of Mucins from Colorectal Tissues

Mucins were solubilized in 4 M guanidine chloride solution containing 10 mM dithiothreitol, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 10 mM benzamidine, 5 mM *N*-ethylmaleimide, 0.1 mg/mL

soy bean trypsin inhibitor, and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride.

Cesium chloride was added to an initial density of 1.4 g/mL and mucins were purified by isopycnic density-gradient centrifugation (Beckman Coulter LE80K ultracentrifuge; 70.1 Ti rotor, 417 600 g at 15°C for 72 h). Fractions of 1 mL were collected from the bottom of the tube and analyzed for periodic acid-Schiff (PAS) reactivity and density. The mucin-containing fractions were pooled, dialyzed against water, and lyophilized.

Release of Oligosaccharides from Mucin by Alkaline Borohydride Treatment

The intestinal mucins were submitted to β -elimination under reductive conditions (0.1 M KOH, 1 M KBH₄ for 24 h at 45°C). The mixture of oligosaccharides alditols was purified by size exclusion chromatography on a column of Bio-Gel P2 (85 cm \times 2 cm ID, 400 mesh, Bio-Rad, Richmond, CA, USA) equilibrated and eluted with water (10 mL/h) at room temperature. The oligosaccharide fractions, detected by UV absorption at 206 nm, were pooled for structural analysis.

Permethylation and Mucin Glycosylation Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry

Permethylation of the mixture of oligosaccharide alditols was carried out with the sodium hydroxide procedure described by Ciucanu and Kerek (55). After derivatization, the reaction products were dissolved in 200 μL of methanol and further purified on a C18 Sep-Pak column (Waters, Milford, MA, USA). Permethylated oligosaccharides were analyzed by MALDI-TOF MS in positive ion reflective mode as $[M + \text{Na}]^{+}$. Quantification through the relative percentage of each

oligosaccharide was calculated based on integration of peaks on MS spectra.

Electrospray Mass Spectrometry (Nano-ESI-MS/MS)

All analyses were performed on a Q-STAR Pulsar Q-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, ON, Canada) fitted with a nano-electrospray ion source (Protana, Odense, Denmark). Oligosaccharides dissolved in water (60 pmol/ μ L) were acidified by addition of an equal volume of methanol/0.1% formic acid and sprayed from gold-coated "medium length" borosilicate capillaries (Protana). A potential of -800 V was applied to the capillary tip and the focusing potential was set at -100 V, the declustering potential varying between -60 and -110 V. For the recording of conventional mass spectra, TOF data were acquired by accumulation of 10 multiple channel acquisition scans over mass ranges of m/z 400–2,000. In the collision-induced dissociation (CID) tandem MS analyses, multiple charged ions were fragmented using nitrogen as collision gas (5.3×10^{-5} Torr), the collision energy varying between

-40 and -90 eV to obtain optimal fragmentation. The CID spectra were recorded on the orthogonal TOF analyzer over a range of m/z 80–2,000. Data acquisition was optimized to supply the highest possible resolution and the best signal-to-noise ratio even in the case of low-abundance signals. Typically, the full width at half maximum was 7,000 in the measured mass ranges. External calibration was performed prior to each measure using a 4-pmol/ μ L solution of taurocholic acid in acetonitrile/water (50:50, v/v) containing 2 mM of ammonium acetate.

Statistical Analysis

Student's t -test was used for statistical analysis; P -values of < 0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS; Unité mixte de Recherche CNRS/USTL 8576) and the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

References

- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* (2013) **49**:1374–403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* (1990) **61**:759–67. doi:10.1016/0092-8674(90)90186-I
- Lieberman DA. Clinical practice. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* (2009) **361**:1179–87. doi:10.1056/NEJMc0902176
- Hakomori S-I. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res* (1985) **45**:2405–14.
- Kannagi R, Yin J, Miyazaki K, Izawa M. Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants – Hakomori's concepts revisited. *Biochim Biophys Acta* (2008) **1780**:525–31. doi:10.1016/j.bbagen.2007.10.007
- Hakomori S-I. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipids metabolism. *Cancer Res* (1996) **56**:5309–18.
- Kim YJ, Varki A. Perspective on the significance of altered glycosylation in cancer. *Glycoconj J* (1997) **14**:569–76. doi:10.1002/pmhc.201100519
- Itzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, Kjeldsen T, Takahashi HK, Bigbee WL, et al. Expression of Tn, Sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res* (1989) **49**:197–204.
- Itzkowitz SH, Bloom EJ, Lau TS, Kim YS. Mucin associated Tn and sialosyl-Tn antigen expression in colorectal polyps. *Gut* (1992) **33**:518–23. doi:10.1136/gut.33.4.518
- Itai S, Nishikata J, Yoneda T, Ohmori K, Yamabe H, Arii S, et al. Tissue distribution of 2-3 and 2-6 sialyl Lewis A antigens and significance of the ratio of two antigens for the differential diagnosis of malignant and benign disorders of the digestive tract. *Cancer* (1991) **67**:1576–87. doi:10.1002/1097-0142(19910315)67:6<1576::AID-CNCR2820670620>3.0.CO;2-2
- Yuan M, Itzkowitz SH, Palekar A, Shamsuddin AM, Phelps PC, Trump BF, et al. Distribution of blood group antigens A, B, H Lewisia, and Lewisb in human normal, fetal, and malignant colonic tissue. *Cancer Res* (1991) **45**:4499–511.
- Jass JR, Allison LJ, Edgar SG. Distribution of sialosyl-Tn and Tn antigens within normal and malignant colorectal epithelium. *J Pathol* (1995) **176**:143–9. doi:10.1002/path.1711760207
- Brockhausen I. Glycodynamics of mucin biosynthesis in gastrointestinal tumor cells. *Adv Exp Med Biol* (2003) **535**:163–88. doi:10.1007/978-1-4615-0065-0_11
- Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer* (2009) **9**:874–85. doi:10.1038/nrc2761
- Vavasseur F, Dole K, Yang J, Matta KL, Myerscough N, Corfield A, et al. O-glycan biosynthesis in human colorectal adenoma cells during progression to cancer. *Eur J Biochem* (1994) **222**:415–24. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb18880.x
- Brockhausen I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep* (2006) **7**:599–604. doi:10.1038/sj.embor.7400705
- Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* (1999) **1473**:67–95. doi:10.1016/S0304-4165(99)00170-1
- Brockhausen I. Sulphotransferases acting on mucin-type oligosaccharides. *Biochem Soc Trans* (2003) **31**:318–25. doi:10.1042/bst0310318
- Robbe-Masselot C, Herrmann A, Maes E, Carlstedt I, Michalski JC, Capon C. Expression of a core 3 disialyl-Le(x) hexasaccharide in human colorectal cancers: a potential marker of malignant transformation in colon. *J Proteome Res* (2009) **8**:702–11. doi:10.1021/pr800740j
- Yang JM, Byrd JC, Siddiki BB, Chung YS, Okuno M, Sowa M, et al. Alterations of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues. *Glycobiology* (1994) **4**:873–84. doi:10.1093/glycob/4.6.873
- Huang MC, Chen HY, Huang HC, Huang J, Liang JT, Shen TL, et al. C2GnT-M is downregulated in colorectal cancer and its re-expression causes growth inhibition of colon cancer cells. *Oncogene* (2006) **25**:3267–76. doi:10.1038/sj.onc.1209350
- Hung JS, Huang J, Lin YC, Huang MJ, Lee PH, Lai HS, et al. C1GALT1 overexpression promotes the invasive behavior of colon cancer cells through modifying O-glycosylation of FGFR2. *Oncotarget* (2014) **5**:2096–106. doi:10.18632/oncotarget.1815
- Komori T, Takemasa I, Higuchi H, Yamasaki M, Ikeda M, Yamamoto H, et al. Identification of differentially expressed genes involved in colorectal carcinogenesis using a cDNA microarray. *J Exp Clin Cancer Res* (2004) **23**:521–7.
- Iwai T, Kudo T, Kawamoto R, Kubota T, Togayachi A, Hiruma T, et al. Core 3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) **102**:4572–7. doi:10.1073/pnas.0407983102
- González-Vallinas M, Vargas T, Moreno-Rubio J, Molina S, Herranz J, Cejas P, et al. Clinical relevance of the differential expression of the glycosyltransferase gene GCNT3 in colon cancer. *Eur J Cancer* (2015) **51**:1–8. doi:10.1016/j.ejca.2014.10.021
- Kannagi R. Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj J* (1997) **14**:577–84. doi:10.1023/A:1018532409041
- Robbe C, Capon C, Coddeville B, Michalski JC. Diagnostic ions for the rapid analysis by nano-electrospray ionization quadrupole time-of-flight

- mass spectrometry of O-glycans from human mucins. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2004) **18**:412–20. doi:10.1002/rcm.1352
28. Da Silva S, Robbe-Masselot C, Ait-Belgnaoui A, Mancuso A, Mercade-Loubière M, Salvador-Cartier C, et al. Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2014) **307**:G420–9. doi:10.1152/ajpgi.00290.2013
 29. Joncquel Chevalier Curt M, Lecoite K, Mihalache A, Rossez Y, Gosset P, Léonard R, et al. Alteration or adaptation, the two roads for human gastric mucin glycosylation infected by *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* (2015) **25**:617–31. doi:10.1093/glycob/cwv004
 30. Robbe C, Capon C, Coddeville B, Michalski JC. Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochem J* (2004) **384**:307–16. doi:10.1042/BJ20040605
 31. Larsson JM, Karlsson H, Crespo JG, Johansson ME, Eklund L, Sjövall H, et al. Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation. *Inflamm Bowel Dis* (2011) **17**:2299–307. doi:10.1002/ibd.21625
 32. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* (2011) **61**:69–90. doi:10.3322/caac.20107
 33. Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* (2004) **23**:77–99. doi:10.1023/A:1025815113599
 34. Kudelka MR, Ju T, Heimburg-Molinari J, Cummings RD. Simple sugars to complex disease. Mucin-type O-glycans in cancer. *Adv Cancer Res* (2015) **126**:53–135. doi:10.1016/bs.acr.2014.11.002
 35. Hanski C, Riede E, Gratchev A, Foss HD, Böhm C, Klusmann E, et al. MUC2 gene suppression in human colorectal carcinomas and their metastases: in vitro evidence of the modulatory role of DNA methylation. *Lab Invest* (1997) **77**:685–95.
 36. Myerscough N, Sylvester PA, Warren BF, Biddolph S, Durdey P, Thomas MG, et al. Abnormal subcellular distribution of mature MUC2 and de novo MUC5AC mucins in adenomas of the rectum: immunohistochemical detection using non-VNTR antibodies to MUC2 and MUC5AC peptide. *Glycoconj J* (2001) **18**:907–14. doi:10.1023/A:1022204626604
 37. Losi L, Scarselli A, Benatti P, Ponz de Leon M, Roncucci L, Pedroni M, et al. Relationship between MUC5AC and altered expression of MLH1 protein in mucinous and non-mucinous colorectal carcinomas. *Pathol Res Pract* (2004) **200**:371–7. doi:10.1016/j.prp.2004.01.008
 38. Arai T, Kasahara I, Sawabe M, Kanazawa N, Kuroiwa K, Honma N, et al. Microsatellite-unstable mucinous colorectal carcinoma occurring in the elderly: comparison with medullary type poorly differentiated adenocarcinoma. *Pathol Int* (2007) **57**:205–12. doi:10.1111/j.1440-1827.2007.02082.x
 39. Park ET, Gum JR, Kakar S, Kwon SW, Deng G, Kim YS. Aberrant expression of SOX2 upregulates MUC5AC gastric foveolar mucin in mucinous cancers of the colorectum and related lesions. *Int J Cancer* (2008) **122**:1253–60. doi:10.1002/ijc.23225
 40. Bartman AE, Sanderson SJ, Ewing SL, Niehans GA, Wiehr CL, Evans MK, et al. Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps. *Int J Cancer* (1999) **80**:210–8. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19990118)80:2<210::AID-IJC9>3.3.CO;2-L
 41. Farhat MH, Barada KA, Tawil AN, Itani DM, Hatoum HA, Shamseddine AI. Effect of mucin production on survival in colorectal cancer: a case-control study. *World J Gastroenterol* (2008) **14**:6981–5. doi:10.3748/wjg.14.6981
 42. Holst S, Wührer M, Rombouts Y. Glycosylation characteristics of colorectal cancer. *Adv Cancer Res* (2015) **126**:203–56. doi:10.1016/bs.acr.2014.11.004
 43. Giuffrè G, Vitarelli E, Tuccari G, Ponz de Leon M, Barresi G. Detection of Tn, sialosyl-Tn and T antigens in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Virchows Arch* (1996) **429**:345–52. doi:10.1007/BF00198438
 44. Chik JH, Zhou J, Moh ESX, Christopherson R, Clarke SJ, Molloy MP, et al. Comprehensive glycomics comparison between colon cancer cell cultures and tumours: implications for biomarker studies. *J Proteomics* (2014) **108**:146–62. doi:10.1016/j.jprot.2014.05.002
 45. Schneider F, Kemmer W, Haensch W, Franke G, Gretsches S, Karsten U, et al. Overexpression of sialyltransferase CMP-sialic acid:Galbeta1,3GalNAc-R alpha6-Sialyltransferase is related to poor patient survival in human colorectal carcinomas. *Cancer Res* (2001) **61**:4605–11.
 46. Vavasseur F, Yang JM, Dole K, Paulsen H, Brockhausen I. Synthesis of O-glycan core 3: characterization of UDP-GlcNAc: GalNAc-R beta3-N-acetyl-glucosaminyltransferase activity from colonic mucosal tissues and lack of the activity in human cancer cell lines. *Glycobiology* (1995) **5**:351–7. doi:10.1093/glycob/5.3.351
 47. Ju T, Cummings RD. Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome. *Nature* (2005) **437**:1252. doi:10.1038/4371252a
 48. Schietinger A, Philip M, Yoshida BA, Azadi P, Liu H, Meredith SC, et al. A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumor-specific antigen. *Science* (2006) **314**:304–8. doi:10.1126/science.1129200
 49. Kannagi R. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression – the Warburg effect revisited. *Glycoconj J* (2004) **20**:353–64. doi:10.1023/B:GLYC.0000033631.35357.41
 50. Malagolini N, Santini D, Chiricolo M, Dall'Olivo F. Biosynthesis and expression of the Sda and sialyl Lewis x antigens in normal and cancer colon. *Glycobiology* (2007) **17**:688–97. doi:10.1093/glycob/cwm040
 51. Dohi T, Kawamura YI. Incomplete synthesis of the Sda/Cad blood group carbohydrate in gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta* (2008) **1780**:467–71. doi:10.1016/j.bbagen.2007.08.019
 52. Groux-Degroote S, Wavelet C, Krzewinski-Recchi MA, Portier L, Mortuaire M, Mihalache A, et al. B4GALNT2 gene expression controls the biosynthesis of Sda and sialyl Lewis X antigens in healthy and cancer human gastrointestinal tract. *Int J Biochem Cell Biol* (2014) **53**:442–9. doi:10.1016/j.biocel.2014.06.009
 53. Robbe C, Capon C, Maes E, Rousset M, Zweibaum A, Zanetta JP, et al. Evidence of regio-specific glycosylation in human intestinal mucins: presence of an acidic gradient along the intestinal tract. *J Biol Chem* (2003) **278**:46337–48. doi:10.1074/jbc.M302529200
 54. Barrow H, Tam B, Duckworth CA, Rhodes JM, Yu LG. Suppression of core 1 Gal-transferase is associated with reduction of TF and reciprocal increase of Tn, sialyl-Tn and core 3 glycans in human colon cancer cells. *PLoS One* (2013) **8**:e59792. doi:10.1371/journal.pone.0059792
 55. Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res* (1984) **131**:209–17. doi:10.1016/0008-6215(84)85242-8
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2015 Mihalache, Delplanque, Ringot-Destrez, Wavelet, Gosset, Nunes, Groux-Degroote, Léonard and Robbe-Masselot. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.