

Nouveaux facteurs histopronostiques du cancer colorectal

MODULE 2

Françoise PIARD (1), Laurent MARTIN (1), Caroline CHAPUSOT (1), Tibor PONNELLE (1), Geneviève MONGES (2)

(1) Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Faculté de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon Cedex ; (2) Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Institut Paoli Calmettes, 13273 Marseille.
E-mail: francoise.piard@u-bourgogne.fr

TABLE DES MATIÈRES

FACTEURS HISTOPRONOSTIQUES VALIDÉS PAR LA LITTÉRATURE

- Classification
- Evaluation de la maladie résiduelle

FACTEURS HISTOPRONOSTIQUES TRÈS PROMETTEURS

- Les deux groupes de carcinomes colorectaux
- Outils techniques dans la détermination du phénotype MSI
- Intérêt dans l'indication thérapeutique

FACTEURS HISTOPRONOSTIQUES NON ENCORE VALIDÉS

- Mutation stabilisatrice du gène p53 et accumulation de la protéine p53
- Contenu en ADN
- Protéines codées en 18q21
- Thymidilate synthase

FACTEURS HISTOPRONOSTIQUES ENCORE INSUFFISAMMENT ÉTUDIÉS

- Ganglions sentinelles et micro-métastases
- L'angiogenèse tumorale
- Prolifération cellulaire

CONTENTS

New prognostic factors in colorectal cancer

FACTORS WELL SUPPORTED BY THE LITERATURE

- Classification
- Evaluation of radial margins

FACTORS SHOWN TO BE PROMISING IN MULTIPLE STUDIES

- The two groups of colorectal carcinomas
- Technologies for the determination of microsatellite instability
- Interest in patient management

FACTORS REMAINING TO BE VALIDATED

- P53
- DNA content
- 18q/DCC
- Thymidilate synthase

FACTORS NOT YET SUFFICIENTLY STUDIED

- Sentinel lymph nodes and micrometastases
- Angiogenesis
- Cell proliferation.

La conférence de consensus qui s'est tenue en janvier 1998 [1, 2] sur la prévention, le dépistage et la prise en charge des cancers du côlon a mis en exergue le rôle fondamental de l'anatomopathologiste dans le diagnostic et la reconnaissance des critères histopronostiques, indispensables pour l'indication de traitements adjuvants et la mise en place d'une surveillance adaptée. En marge de ces données classiques sont venus s'ajouter, ces dernières années, d'autres facteurs dont certains sont issus des recherches en biologie moléculaire. Certains très prometteurs ouvrent déjà de nouvelles perspectives thérapeutiques alors que d'autres méritent encore confirmation.

Facteurs histopronostiques validés par la littérature

Classification

Plusieurs classifications ont été proposées dans la littérature. A l'heure actuelle, la classification TNM, classification internationale de référence [3, 4], doit être utilisée. C'est indiscutablement la meilleure classification histopronostique. Elle a été retenue par

la conférence de consensus. Elle distingue de façon indépendante cinq niveaux d'envahissement pariétal (T) et trois degrés d'extension ganglionnaire (N). En fonction de la présence ou non de métastases (M), un stade TNM est attribué pour chaque cas. Quatre stades sont ainsi individualisés. Cette classification, par définition, décrit l'extension anatomique des cancers qui n'ont pas été traités préalablement et la valeur pronostique des stades d'extension est fondée sur les résultats d'études avec résection chirurgicale complète de la tumeur [5, 6].

Evaluation de la maladie résiduelle

L'évaluation de la maladie résiduelle (R) établit le statut de la maladie après traitement (curatif ou palliatif) quel que soit son type (chirurgie seule, radiothérapie seule, chimiothérapie seule ou traitements combinés). La qualité de l'exérèse est évaluée selon le schéma de Hermanek [7] : absence de résidu tumoral microscopique (R0), présence d'un résidu tumoral microscopique (R1), présence d'un résidu tumoral macroscopique (R2). Les limites d'exérèse considérées sont les limites longitudinales (proximale et distale) mesurées le long du tube digestif et la limite circonférentielle. La limite circonférentielle (ou latérale, ou radiaire ou clearance pour les anglo-saxons) se définit comme la

mesure en millimètres de la distance existant entre la zone d'extension maximum de la tumeur et la section chirurgicale. La notion de limite (ou marge) circonférencielle découle directement des travaux de Heald et al. [8, 9] sur l'ablation complète du mésorectum, en cas de cancer du rectum, en raison de l'intérêt pronostique de sa résection totale. Pour les cancers du rectum, en effet, la fréquence des récidives locorégionales apparaît directement liée à la qualité de la résection locale [8, 9] et à la présence ou non de résidus tumoraux après exérèse du mésorectum. Avec cette technique, Heald et al. [8, 9] ont rapporté un taux de récurrence locorégionale de 4 % à 5 ans chez des malades opérés d'un cancer du rectum n'ayant, de plus, pas reçu de radiothérapie pré- ou post-opératoire. Ce taux de récurrence est, à ce jour, le plus bas rapporté dans la littérature [8-10].

Pour les cancers du côlon, le problème est plus complexe. D'après Shepherd et al. [11], le risque de récurrence intrapéritonéale des adénocarcinomes coliques serait directement lié à l'extension tumorale par rapport à la surface péritonéale. Les auteurs distinguent 4 groupes : 1) les tumeurs à distance du revêtement péritonéal, 2) les tumeurs proches, 3) les tumeurs atteignant ce revêtement, 4) les tumeurs le dépassant. Dans cette série, Shepherd a lui-même disséqué toutes les pièces et reconnaît que l'échantillonnage des prélèvements est délicat. La notion de tumeur proche du revêtement péritonéal paraît difficilement reproductible. Faut-il, par analogie avec le cancer du rectum, proposer une mesure en millimètres de la marge circonférencielle ? Celle-ci se définirait alors comme la mesure en millimètres de la distance existant entre la zone d'extension maximum de la tumeur et la surface péritonéale. Par ailleurs, le groupe 4 pourrait être individualisé par analyse cytologique du liquide de lavage de la cavité péritonéale [12]. Il a été démontré que l'examen cytologique du liquide de lavage de la cavité péritonéale révélait des cellules malignes dans 26 % des cancers classés T3 sur le seul examen histologique [11, 12].

La marge circonférencielle doit donc faire l'objet d'un contrôle histologique et il paraît essentiel que les pathologistes précisent son état dans leurs compte-rendus. Cette limite est considérée comme saine si la distance mesurée est supérieure ou égale à 1 mm.

Facteurs histopronostiques très prometteurs

Les deux groupes de carcinomes colorectaux

Ces dernières années, de grands progrès ont été faits dans la connaissance de la biologie des cellules cancéreuses intestinales et deux mécanismes d'instabilité apparemment indépendants ont été identifiés dans le cancer colorectal : l'instabilité chromosomique et l'instabilité génomique permettant ainsi d'individualiser deux groupes de carcinomes colorectaux : les carcinomes avec perte d'hétérozygotie (LOH pour *loss of heterozygosity*) et les carcinomes avec instabilité des microsatellites (MSI pour *microsatellite instability*). Cependant, 5 % des cancers colorectaux restent non classés.

Le premier groupe est caractérisé par une aneuploïdie et par des pertes alléliques. Dans ce groupe, 20 % des chromosomes en moyenne ont subi une délétion allélique [13]. Les sites de délétion les plus fréquents sont situés sur le bras court du chromosome 17 (17p), et le bras long du chromosome 18 (18q) où les délétions surviennent dans 75 % des cas. Le bras long du chromosome 5 présente des délétions dans 50 % des cas, alors que le bras court du chromosome 8 et le bras long du chromosome 22 sont délétés dans 35 % des cas [13, 14]. Ces régions renferment des gènes

majeurs comme le gène p53 sur le chromosome 17p, les gènes DCC et SMAD4/DPC4 et SMAD2 sur le chromosome 18q et les gènes APC et MCC sur le chromosome 5q. Par ailleurs, ces pertes alléliques au niveau des gènes APC et p53 sont fréquemment associées à des mutations somatiques (70 % des cas) conduisant une inactivation bi-allélique de ces gènes. Ces cancers appelés LOH (pour *loss of heterozygosity*) représentent 80 % des carcinomes colorectaux. Plus des 2/3 sont situés sur le côlon distal.

Le second groupe comprend des cancers diploïdes montrant peu de pertes alléliques [15, 16]. Ce groupe est caractérisé par une instabilité des séquences microsatellites (séquences mono, di, tri ou tétranucléotidiques répétées) conférant aux tumeurs un phénotype MSI (MSI pour *Microsatellite Instability*), anciennement appelé RER (pour *Replicative ERror*). L'instabilité des microsatellites (MSI) est due à une anomalie d'un des gènes hMSH2, hMLH1, hPMS2, hMLH3, hMSH6 impliqués dans la réparation des mésappariements de bases de l'ADN [17-19]. Les protéines codées par ces gènes assurent la réparation des mésappariements de bases de l'ADN survenus durant la réplication [20]. En l'absence de fonctions de réparation efficaces, ces anomalies persistent et se transmettent lors de la réplication suivante conduisant à la fixation d'allèles de taille différente. Seulement 10 à 15 % des cancers colorectaux sporadiques sont de phénotype MSI [15] par inactivation somatique bi-allélique d'un gène de réparation des mésappariements de bases de l'ADN [21-24]. En revanche, 50 à 70 % des cancers survenant dans le cadre d'un syndrome HNPCC (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*) présentent une mutation germinale dominante de hMLH1 ou hMSH2 [25, 26]. La seconde copie du gène est inactivée par perte allélique, hyperméthylation de la région promotrice ou mutation ponctuelle d'un des gènes du système de réparation [18, 27-29]. L'inactivation somatique de hMSH2 est un événement rare dans les cancers sporadiques MSI [23], alors que dans les familles HNPCC plus de 90 % des mutations détectables affectent les gènes hMLH1 ou hMSH2 [30]. L'inactivation du système de réparation des mésappariements de bases est à l'origine de mutations secondaires (« phénotype mutateur ») [31] de certains des gènes qui comportent dans leur séquence codante (exonique) un microsatellite [32]. Ces mutations de type insertion/délétion situées dans des séquences codantes entraînent un décalage du cadre de lecture et la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle. Elles définissent un phénotype appelé IG-MSI (pour *intragenic MSI*). L'inactivation du gène du récepteur de type II du TGFβ [33], dont la séquence codante comporte une répétition poly-A10, est observée dans 70 à 90 % des cancers colorectaux MSI, empêchant ainsi le TGFβ de jouer son rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de la progression tumorale [34, 35]. Le gène Bax, impliqué dans l'induction de l'apoptose comporte une séquence intragénique poly-G8. Il est muté dans 50 % des cancers colorectaux [36, 37]. Les gènes hMSH3, hMSH6 qui comportent respectivement dans leurs séquences codantes des répétitions poly-A8 et poly-C6 sont mutés dans environ un tiers des cancers colorectaux MSI [38]. Les autres gènes concernés codent pour le récepteur de l'IGF II, gène suppresseur de tumeur régulant négativement la croissance cellulaire, [39] le CDX-2 [40], la caspase 5 [41] et le régulateur du cycle cellulaire E2F4 [42].

Les cancers MSI sont associés à une localisation particulière au niveau du côlon proximal qu'ils soient familiaux ou sporadiques [15]. Sur le plan histologique, ces cancers sont souvent peu différenciés, avec une mucosécrétion abondante, et un stroma riche en lymphocytes volontiers disposés en follicules. Ils sont fréquemment multiples et, en dépit de leur multiplicité et de leur indifférenciation, ont un pronostic meilleur que les tumeurs sans instabilité génomique [15, 43, 44].

Outils techniques dans la détermination du phénotype MSI

L'analyse des séquences microsatellites est le test le plus utilisé à l'heure actuelle pour la détermination du phénotype MSI. En 1998, une conférence de consensus [45] a défini un ensemble de 5 loci (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250) à analyser pour caractériser cette instabilité dans les cancers colorectaux. L'utilisation de ce panel de référence a permis de distinguer les tumeurs MSI-High (MSI-H) montrant une instabilité de deux marqueurs au moins et les tumeurs MSI-Low (MSI-L) présentant une instabilité au niveau d'un seul marqueur. Le groupe des tumeurs stables (MSS) comprend les tumeurs sans instabilité MSS et les tumeurs MSI-Low [45]. La détermination du phénotype MSI par analyse des séquences microsatellites par PCR est une méthode fiable, mais elle est longue et nécessite des techniques de biologie moléculaire. Elle ne permet pas, par ailleurs, de préciser le gène de réparation altéré (ce que permet l'immunohistochimie). De récentes études [46-49] ont montré que l'immunohistochimie pourrait constituer une méthode alternative à la biologie moléculaire pour la détermination de ce phénotype. Les altérations les plus fréquentes des gènes codant pour les enzymes de réparation des mésappariements des bases de l'ADN sont des mutations inactivatrices (décalage du cadre de lecture par délétion ou insertion de bases ou mutations faux sens). Il est donc possible par immunohistochimie de démontrer une perte d'expression de ces protéines au sein des cellules tumorales par comparaison avec les cellules normales de voisinage. Trois protéines peuvent être actuellement détectées : hMLH1, hMSH2, MSH6. Les anticorps disponibles dans le commerce peuvent être appliqués sur des coupes de tissu fixé dans le formol. La muqueuse normale sert de témoin positif : le marquage est nucléaire, dans les cellules épithéliales de la partie basse des cryptes ou dans les lymphocytes des centres germinatifs des follicules lymphoïdes. Dans les cancers MSI, il existe une extinction du signal immunohistochimique alors que dans les cancers sans instabilité le marquage nucléaire est présent sur l'ensemble des cellules tumorales.

Intérêt dans l'indication thérapeutique

Le phénotype d'instabilité microsatellite pourrait influencer la réponse à la chimiothérapie. Il a été prouvé *in vitro* que certaines lignées cellulaires présentant un phénotype instable étaient plus résistantes à des agents alkylants comme le cisplatine [50]. Les cellules sélectionnées pour leur résistance au cisplatine présentent une résistance croisée pour d'autres agents cytotoxiques comme l'étoposide et le carboplatine. Aebi et al. [51, 52] ont d'autre part montré que le phénotype instable n'était associé à aucune résistance des lignées cellulaires tumorales au 5-fluorouracile. Or depuis 1991, une chimiothérapie par 5-fluorouracile a été reconnue comme le traitement post-opératoire standard des cancers colorectaux au stade C de Dukes. Cette chimiothérapie a permis d'augmenter la survie globale, mais seulement 20 % des cancers sont sensibles au 5-fluorouracile même en association avec l'acide folinique. L'introduction de ce traitement étant relativement récente, seuls quelques travaux se sont intéressés à la valeur pronostique de l'instabilité des microsatellites. A ce jour, quatre études concernant la valeur pronostique prédictive de l'instabilité des microsatellites ont été publiées. Dans une série de 508 tumeurs, de stade II ou III, Halling et al. [53] n'ont pas pu montrer d'association entre l'existence d'une instabilité des microsatellites et la survie des malades ayant reçu une chimiothérapie. Ces résultats ont cependant été affectés par la faible puissance de l'étude visant à détecter les bénéfices de la chimiothérapie en particulier pour les malades au stade II. La deuxième étude [54] a montré l'effet pronostique, mais pas la valeur prédictive de l'instabilité des microsatellites. Mais l'étude

était biaisée car les stades de la maladie ont été mélangés et le statut vis à vis de la chimiothérapie était inconnu dans 35 % des cas (215 sur 607 malades). Dans la troisième étude, sur une série de 656 cas de cancers colorectaux au stade III, Elsaleh et al. [55, 56] ont montré que globalement les malades porteurs d'une tumeur MSI avaient un pourcentage de survie à 5 ans meilleur que ceux sans cette altération génétique (58 % vs 33 %). Cette différence de survie était majorée chez les malades ayant reçu une chimiothérapie (90 % vs 35 %). En effet à la fin de l'étude, seul un des 23 malades porteurs d'une instabilité des microsatellites ayant reçu une chimiothérapie était décédé alors que 100 décès (40 %) étaient rapportés parmi les 249 cas sans instabilité. Dans ce travail, le bénéfice en terme de survie n'était pas expliqué par l'âge ou l'histologie de la tumeur mais semblait être associé à la mise en place d'une chimiothérapie. Il reste cependant difficile de savoir si l'amélioration de la survie n'est pas liée au phénotype lui-même car d'autres auteurs [54, 57, 58] ont montré que l'instabilité des microsatellites avait une valeur pronostique indépendante dans les cancers colorectaux. La dernière étude [59], récemment publiée, a porté sur 460 malades stade III traités par une chimiothérapie à base de fluorouracile. Elle a montré que le taux de survie à 5 ans des malades atteints d'un cancer présentant une instabilité des microsatellites était significativement meilleur que celui des malades avec un cancer stable (64 % vs 49 %). Par ailleurs, pour les malades avec un cancer instable, le taux de survie à 5 ans était de 74 % en présence d'une mutation du gène du récepteur de type II du TGF β (qui est un indicateur spécifique d'un haut niveau d'instabilité) et de 46 % en son absence. D'autres travaux prospectifs sont indispensables sur des populations non sélectionnées et avec de nouveaux agents chimiothérapeutiques comme l'irinotecan [60, 61] et l'oxaliplatine pour mieux cerner la relation entre instabilité des microsatellites et réponse à la chimiothérapie.

Facteurs histopronostiques non encore validés

Mutations stabilisatrices du gène p53 et accumulation de la protéine p53

Le gène p53 localisé en 17p13 est un des gènes les plus explorés en oncologie. Considérée comme « gardien du génome », la protéine p53 joue un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la différenciation, de la réparation des lésions de l'ADN et dans l'apoptose. P53 influence donc la phase d'initiation, puis de progression du processus néoplasique dans les tumeurs solides et en particulier dans les cancers colorectaux.

Bien que de nombreuses études aient montré que le gène p53 était fréquemment muté dans les cancers colorectaux (50 à 70 % des cas), la signification pronostique du statut p53 demeure un sujet très controversé. Certains auteurs lui reconnaissent une valeur pronostique péjorative indépendante [62-74], alors que d'autres en font un critère évolutif péjoratif dépendant du stade [75, 76]. D'autres publications font état de résultats opposés [77-82]. Il apparaît cependant difficile de comparer les résultats des innombrables publications parues qui utilisent, pour des malades n'ayant pas reçu le même traitement (chirurgie seule, associée à une radiothérapie ou une chimiothérapie variée), des classifications différentes et des méthodes d'études différentes du statut p53.

Certaines emploient l'immunohistochimie [70, 79, 83-88] car la détection de la protéine devient possible par augmentation de sa demi-vie lors de la mutation du gène. Mais un résultat positif peut aussi être lié à l'hyperexpression d'un gène sauvage, à la stabilisation de la protéine p53 normale par liaison avec la

protéine mdm2 ou d'autres protéines [78, 89] ou encore à une fluctuation normale du taux de la protéine en rapport avec une lésion de l'ADN [90, 91]. Les anticorps utilisés sont dirigés contre des épitopes différents de la protéine [74], les dilutions et les temps d'incubation sont différents. Il existe par ailleurs une subjectivité dans l'évaluation du score et il n'y a pas de valeur unique pour la définition du seuil de positivité. Faut-il par ailleurs prendre en compte un marquage nucléaire ou cytoplasmique [92-94] ?

D'autres travaux font appel à l'analyse de l'ADN par PCR-SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*). Les régions étudiées sont généralement les régions centrales de la molécule ce qui, par définition, ne permet pas la détection des mutations qui siègent aux extrémités. Les mutations les plus fréquentes sont décrites dans les exons 5 à 8 mais des études ont montré des mutations dans plus de 100 codons différents [95-96]. Par ailleurs, la présence d'un allèle mutant par PCR-SSCP ne prouve pas la perte de production de la protéine.

Les séries, qui ont comparé les résultats obtenus en immunohistochimie et par analyse de l'ADN [81, 97-102] montrent qu'il n'existe pas de parallélisme strict entre la présence et l'absence d'une mutation sur le gène et la présence ou l'absence d'immuno-réactivité p53 des cellules tumorales avec des taux de concordance entre les deux méthodes variant entre 53 % et 74 %. Cependant, l'immunohisto-chimie a l'avantage d'être rapide, facilement utilisable en routine et la combinaison des deux techniques représente un outil intéressant car c'est le seul moyen de prouver que la mutation de p53 décelée par le séquençage de l'ADN affecte le taux de protéine.

Petersen et al. [103] ont étudié ces différences sur une méta-analyse réalisée à partir de 28 articles (utilisant l'immunohistochimie pour détecter une surexpression de p53 et/ou le séquençage du gène p53) et un total de 4 416 malades. Les résultats de l'ensemble des études immunohistochimiques montrent pour les malades traités par chirurgie seule une influence significative du statut de p53 sur la survie sans récurrence et une influence sur la survie globale à la limite de significativité. Dans les études utilisant le séquençage de l'ADN, en revanche, il y avait une influence significative de l'existence des mutations de p53 sur la survie globale mais pas sur la survie sans récurrence. Pour les malades traités par chirurgie et radiothérapie, l'influence du statut de p53 était soit non significatif soit à la limite de significativité, en fonction du test utilisé. Il n'y avait pas d'influence sur la survie globale. Cette analyse de synthèse montre donc qu'actuellement le statut de p53 ne peut être appliqué en routine à côté de facteurs tels que le stade tumoral, le statut ganglionnaire, et la maladie résiduelle dont la valeur pronostique est beaucoup plus forte. Les conclusions de la conférence de consensus de l'*American Joint Committee on Cancer* [10] vont d'ailleurs dans ce sens : le statut p53 y est assigné dans la catégorie IIB c'est-à-dire dans la catégorie des marqueurs dont la valeur pronostique n'est pas suffisamment établie et pour lesquels des investigations supplémentaires sont requises.

A l'heure actuelle, il n'y a donc pas de preuve assez forte pour considérer le statut de p53 comme un facteur prédictif de réponse à un traitement adjuvant et de nouveaux essais cliniques assortis d'une standardisation des méthodes d'évaluation des altérations de p53 s'avèrent indispensables.

Contenu en ADN

L'analyse par cytométrie en flux du contenu nucléaire en ADN a été effectuée par un grand nombre d'auteurs afin de rechercher une valeur pronostique péjorative à la présence d'un contenu anormal en ADN des cellules tumorales par rapport au contenu des cellules normales.

Elle permet de distinguer les populations cellulaires diploïdes, qui ont un contenu normal en ADN (ayant par définition un index d'ADN égal à 1), des populations cellulaires aneuploïdes qui ont un contenu anormal en ADN, soit hyperdiploïde avec un index supérieur à 1, soit hypodiploïde avec un index inférieur à 1.

L'analyse de la ploïdie a fait l'objet de très nombreux travaux plus ou moins concordants qui ont permis de rassembler plus de 2 000 cas de cancers colorectaux pour lesquels un index d'ADN a pu être déterminé. Ainsi, environ 50 à 60 % des cancers colorectaux sont aneuploïdes [104, 105]. En règle générale, une tumeur aneuploïde a un plus mauvais pronostic qu'une tumeur diploïde [106]. Cependant, l'analyse de grandes séries montre qu'il ne s'agit pas d'un facteur pronostique indépendant, mais que la ploïdie est liée au grade [107, 108] ou au stade de la tumeur [109]. L'étude de la ploïdie conserverait cependant son intérêt pour les cancers au stade II pour lesquels l'aneuploïdie est corrélée au risque de récurrence et de métastase [110, 111]. Dans un article récent, Lanza et al. [112] ont souligné la valeur pronostique indépendante de la ploïdie pour la survie globale et la survie sans récurrence pour les cancers au stade II.

La cytométrie en flux n'a donc pas atteint le degré de standardisation technique nécessaire permettant d'utiliser actuellement en routine l'analyse de la ploïdie comme facteur pronostique prédictif dans le cancer du côlon [113].

Protéines codées en 18q21

PROTÉINE DCC (DELETED IN COLON CANCER)

Les pertes alléliques sur le bras long du chromosome 18 sont fréquemment notées dans le cancer colorectal. Cette région contient plusieurs gènes candidats suppresseurs de tumeurs dont le plus connu est DCC.

Le gène suppresseur de tumeur DCC est localisé en 18q21 [114]. Il code pour une protéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines. Cette protéine est un composant du récepteur de la nétrine-1 axonale et est impliquée dans l'adhésion entre les cellules et la matrice extracellulaire. L'absence ou l'inactivation de DCC par mutation ou délétion induirait une perte des propriétés adhésives des cellules tumorales favorisant ainsi leur croissance et leur dissémination.

Les pertes alléliques en 18q et la perte d'expression de la protéine DCC ont été considérées par certains auteurs comme un facteur de mauvais pronostic dans le cancer colorectal stade II. Jen et al. [115] ont montré sur 145 malades opérés que la présence de pertes alléliques sur le bras long du chromosome 18 était un facteur pronostique indépendant : la survie des malades au stade II sans perte allélique sur le chromosome 18 était de 93 %, alors qu'elle était de 54 % pour les malades ayant des pertes alléliques sur le bras long du chromosome 18 et pour le stade III de 52 % et 38 % respectivement. Les malades au stade II avec perte allélique sur 18q avaient un pronostic similaire à celui des patients ayant une tumeur au stade III sans perte allélique et pouvaient donc bénéficier d'un traitement adjuvant. A l'opposé, les malades au stade II sans perte allélique 18q avaient une survie similaire aux malades du stade I et ne requerraient pas de traitement supplémentaire. Le travail de Jernvall et al. [85] va dans le même sens : ces auteurs ont en effet mis en évidence une augmentation significative des récurrences et un faible taux de survie chez les malades porteurs de pertes alléliques sur le bras long du chromosome 18. Les résultats de ces travaux ont été infirmés par ceux de Carethers et al. [116] qui n'ont pas trouvé de lien entre perte d'hétérozygotie en 18q21 et pronostic.

La première étude de l'expression de la protéine DCC en immunohistochimie a été réalisée par Shibata et al. en 1996 [117] sur une série de 132 adénocarcinomes colorectaux. Cette

étude a montré que les malades atteints d'un cancer de stade II n'exprimant pas DCC présentaient une survie à 5 ans comparable à celle des malades atteints d'un cancer stade III exprimant DCC (61,6 % et 59,3 % respectivement). La perte d'expression de DCC au niveau des cellules cancéreuses constituait un élément péjoratif de survie des malades quelque soit le stade du cancer. L'étude de Raymond et al. [118], effectuée sur 85 malades atteints d'un cancer rectal et ayant développé des métastases à distance mais sans récurrence locale, a confirmé que la perte de l'expression de DCC était un marqueur de mauvais pronostic. Cependant, la perte d'expression de DCC ne semblait pas suffisante pour prédire la survenue de métastases métachrones et ne constituait donc pas un élément suffisant pour justifier une thérapie adjuvante pour les malades porteurs d'un cancer du rectum de stade II. La valeur pronostique péjorative de la perte d'expression de DCC a également été soulignée par le travail de Saito et al. [119]. Parmi les 146 cancers colorectaux analysés, 55,5 % n'exprimaient pas DCC. La perte de la protéine était significativement plus souvent observée dans les cancers avec invasion veineuse (65,2 % contre 47,5 %) et avec métastases hépatiques (91,7 % contre 48,2 %). Le taux de survie à 5 ans était de 58,8 % pour les malades dont le cancer avait perdu le signal DCC et de 91 % pour ces malades dont le cancer exprimait DCC. Le taux de récurrence était également lié à la perte d'expression de la protéine DCC : la survie sans récurrence était de 61,4 % pour le groupe DCC négatif et de 75,3 % pour le groupe DCC positif. En analyse multivariée, l'expression de la protéine DCC émergeait comme un facteur de pronostic indépendant. Enfin, une autre étude immunohistochimique, réalisée par Sun et al. en 1999 sur 195 cancers colorectaux [120], a également montré que l'absence d'expression de la protéine DCC était un facteur de mauvais pronostic dans un groupe particulier de malades dont le cancer était diploïde avec une faible phase S.

AUTRES PROTÉINES CODÉES EN 18q :

FAMILLE DES PROTÉINES SMAD

D'autres gènes candidats, suppresseurs de tumeur, sont localisés en 18q à côté de DCC. Il s'agit des gènes SMAD [121]. Ces gènes codent pour les protéines SMAD qui sont des homologues des protéines MAD (*Mothers Against Decapentaplegic*) de la drosophile impliquées dans la voie intracellulaire de transduction du signal du TGF β .

Des mutations inactivatrices des SMAD ont été rapportées en particulier pour SMAD 4 dans 15 % des cancers colorectaux [122, 123], mais également pour SMAD 2 et 3 [124-126]. Korchynski et al. [127] ont analysé toutes les protéines de la famille SMAD par immunohistochimie au niveau de cancers colorectaux. Cette étude a montré une augmentation de l'expression de SMAD 2, 3 et 5 dans une fraction seulement de cellules tumorales alors qu'aucun marquage n'était présent dans la muqueuse colique normale. Par ailleurs, SMAD 4 et TGF β 1 étaient surexprimés au sommet des cryptes, ce qui laisse présager de leur rôle dans la différenciation terminale et l'apoptose des cellules épithéliales coliques. L'auteur n'a fourni aucune indication sur la valeur pronostique de ses résultats.

De nouvelles études sur des populations bien caractérisées s'avèrent nécessaires pour déterminer l'utilité clinique des pertes alléliques en 18q. Ces travaux, s'ils sont confirmés, pourraient permettre de séparer les malades au stade II en deux groupes de bon et mauvais pronostic afin de distinguer différentes catégories thérapeutiques.

Thymidilate synthase

L'inhibition prononcée et prolongée de la synthèse de l'ADN par inhibition de la synthèse de la thymidilate synthase (TS)

représente l'un des principaux mécanismes de l'effet anti tumoral du 5FU. L'étude immunohistochimique de la TS peut être réalisée avec l'anticorps TS106 mis au point par Jonhston et al. [128].

Dans une première étude, Jonhston et al. [129] ont mis en évidence la valeur pronostique de l'expression de la TS sur une série de 294 cancers du rectum de stade II ayant bénéficié d'une chirurgie seule : une surexpression de cette enzyme était associée à un mauvais pronostic, avec une survie à 5 ans de 40 % pour les malades ayant des taux élevés vs 60 % pour les malades ayant des taux bas de TS. Lenz et al. [130] ont retrouvé des résultats superposables dans une série de cancers coliques à un stade de dissémination métastatique, qui avaient à la fois une surexpression de la protéine p53 et des taux élevés de TS. Edler et al. [131], dans une étude immunohistochimique utilisant l'anticorps monoclonal TS 106 effectuée sur 243 malades atteints d'un cancer colorectal, ont montré que les malades présentant une expression intratumorale basse de TS avaient une meilleure survie que les malades avec une expression intratumorale haute de TS. L'expression intratumorale de TS était un facteur pronostique indépendant quant à la récurrence locorégionale, l'existence de métastases à distance, de survie sans récurrence, et de survie globale. A l'inverse, pour Sanguedolce et al. [132] des taux bas de TS ont une valeur pronostique péjorative.

La TS serait par ailleurs un facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie. Jonhston et al. [129] ont montré pour un sous-groupe de malades avec un cancer rectal de stade III une meilleure réponse à la chimiothérapie pour des taux élevés de TS. D'autres séries, avec des approches méthodologiques différentes, ont rapporté des résultats divergents, avec toujours une valeur pronostique péjorative pour des taux élevés de TS, mais une non réponse aux traitements [133-136]. Sur de telles bases, Leichman [135] a proposé pour les malades ayant des taux élevés de TS de choisir une chimiothérapie à base d'irinotecan (CPT11) à la place du 5FU. Un article récent [137] a confirmé sur une série de 108 cancers colorectaux l'association significative entre une expression de TS mesurée sur lame par étude immunohistochimique et la résistance à un traitement associant methothrexate et 5FU. Ces auteurs ont en effet démontré que les tumeurs TS positives avaient seulement 15 % de chances de répondre à la thérapeutique alors que ce pourcentage était de 30 % pour les tumeurs TS négatives. D'autres auteurs [138-140] ont confirmé ces résultats. Sur une série rétrospective française de 146 malades atteints d'un cancer du côlon inclus dans le protocole FFCD 8802, Monges et al. [141] ont montré que l'immunoexpression de TS et de P53 était liée à la survie sans événement à 2 ans avec un odds-ratio de 4,51 (P = 0,0137) en cas de forte expression de TS et un odds-ratio de 3,84 (P = 0,0113) en cas de surexpression de p53. En revanche, dans cette série, TS et P53 n'avaient pas de valeur pronostique à 5 ans ou de valeur prédictive de réponse au traitement par 5FU. Dans un travail récent, Davies et al. [142] ont montré que les métastases hépatiques ayant une faible immunoexpression de TS répondaient mieux à une chimiothérapie intraartérielle par floxuridine que les métastases ayant une forte immunoexpression de TS.

L'étude de la thymidilate synthase reste une voie de recherche, l'obtention d'autres anticorps [143] ou des améliorations techniques [144] doivent inciter à poursuivre les travaux sur de grandes séries prospectives.

Facteurs histopronostiques encore insuffisamment étudiés

Ganglions sentinelles et micro-métastases

Le ganglion sentinelle est le premier ganglion envahi en cas de dissémination métastatique et correspond au premier drai-

nage lymphatique d'une tumeur. Il est sensé refléter le statut ganglionnaire du cancer. Les ganglions sentinelles sont repérés en début d'intervention par le chirurgien par injection péritumorale (dans la sous séreuse après ouverture de cavité abdominale pour les cancers coliques, dans la sous muqueuse par l'intermédiaire du rectoscope pour les cancers du rectum) d'un colorant bleu ou d'une solution marquée par un isotope radioactif. La substance injectée drainée par les voies lymphatiques se concentre rapidement (entre 30 secondes et 5 minutes) dans le ou les ganglions sentinelles [1 à 4] qui se colorent les premiers en bleu ou sont repérés par une sonde sensible aux émissions radioactives [145]. Le ou les ganglions sentinelles sont repérés par des sutures pour que le pathologiste puisse ensuite les identifier. L'identification des ganglions sentinelles est techniquement plus facile pour les cancers du côlon que pour les cancers du rectum [146]. L'exérèse tumorale est ensuite réalisée. Dans le service d'anatomie pathologique, les ganglions sentinelles sont prélevés dans leur totalité après avoir été sectionnés par moitié ou tous les 3 mm en fonction de leur taille et débités en coupes sériées (d'épaisseur 4 µm), dont le nombre varie entre 2 [146-148], 4 [149] et 10 [150, 151]. Ils font ensuite l'objet d'une coloration histologique standard, suivie d'une technique immunohistochimique à l'aide d'anticorps dirigés contre les antigènes exprimés par les cellules tumorales afin de détecter d'éventuelles cellules cancéreuses isolées (les anticorps utilisés sont généralement des anticorps anti-cytokératine).

Par analogie avec les résultats obtenus dans le cancer mammaire et le mélanome malin [152-154], cinq études [145, 147, 148, 155] se sont intéressées à la recherche de métastases dans le ou les ganglions sentinelles des cancers colorectaux : dans la première étude qui portait sur 50 malades [146], le taux de faux négatifs s'élevait à 60 % (12 métastases sur les 20 présentes lors de l'examen histologique classique n'étaient pas visibles sur les ganglions sentinelles examinés). Cette étude a été critiquée [156] car l'auteur n'a pas respecté la définition du ganglion sentinelle et a examiné tous les ganglions de teinte bleue et non les premiers ganglions qui prenaient la coloration. Dans la deuxième série de 130 malades [150, 151], l'examen du ganglion sentinelle a prédit, avec un haut niveau de certitude, l'existence ou non de métastase ganglionnaire dans les autres ganglions lymphatiques (sensibilité : 92 %, 47/51 malades et valeur prédictive négative : 95 %, 79/83 malades). Les résultats de la troisième étude portant sur 83 malades [149] ont confirmé ceux de l'étude précédente en montrant que 91 % des patients présentant une maladie métastatique peuvent être identifiés par examen d'un à quatre ganglions sentinelles. Dans la quatrième étude [148], l'examen du ganglion sentinelle a permis de reclasser 10 % des malades d'un stade B de Dukes à un stade C de Dukes, chiffre qui s'élevait à 3 % [146], 16 % [150, 151] et 50 % [149] des cas dans les précédentes études. Dans l'étude de Bilchik et al. [147] qui portait sur 40 malades, l'état du ganglion sentinelle a prédit dans tous les cas l'état des autres ganglions (100 % de concordance) : 14 malades (35 %) avaient des métastases ganglionnaires, toutes découvertes par examen du ganglion sentinelle.

Par ailleurs, chez 10 malades [147, 148, 150, 151], la recherche de ganglions sentinelles a découvert un drainage lymphatique aberrant, obligeant le chirurgien à modifier son geste chirurgical en élargissant le curage ganglionnaire.

Dans le cadre du cancer colorectal, l'étude du ganglion sentinelle n'en est qu'à ses débuts. Dans d'autres pathologies comme le cancer du sein ou le mélanome, elle a donné d'excellents résultats évitant au chirurgien de faire des lymphadénectomies radicales chez des malades dont les ganglions sentinelles sont négatifs. Le problème se pose ici en d'autres termes car la lymphadénectomie standard optimale est toujours de mise. En effet, dans 9 % des cas [149], 3 % des cas [150, 151], 4 % des cas [148] et 60 % des cas [146], les ganglions

sentinelles ne renfermaient pas de métastases alors que les autres ganglions du curage étaient envahis. Des faux négatifs peuvent en effet être observés quand le ganglion sentinelle est totalement détruit par la prolifération tumorale. La tumeur occlut les vaisseaux lymphatiques entraînant un drainage vers d'autres ganglions non sentinelles [157]. Le réel bénéfice de la méthode réside dans la possibilité pour le pathologiste de concentrer son attention sur 1 ou 4 ganglions et de réaliser leur examen de façon détaillée et minutieuse (coupes sériées, immunohistochimie, ...). Une telle démarche devrait augmenter la précision diagnostique et permettre de détecter une maladie ganglionnaire à un stade micro-métastatique. Il reste cependant à préciser quelle est la technique la plus sensible pour mettre en évidence ces micro-métastases : dans 55 % des cas [150, 11], 77,5 % des cas [149], 69,5 % des cas [148] et 71,5 % [147], les micro-métastases étaient visibles sur le niveau initial des coupes en coloration standard. Dans 5,5 % [148] des cas, 16 % des cas [149] et 32 % [150, 151] des cas, les micro-métastases avaient été diagnostiquées grâce à des niveaux de coupes successifs. Dans 25 % [148], 13 % [150, 151] 5,5 % [146] 6,5 % [149] et 28,5 % [147] des cas, les micro-métastases avaient été diagnostiquées grâce à l'étude immunohistochimique.

Le but est d'établir un *staging* plus précis par la mise en évidence de métastases de trop petite taille pour être accessibles à un examen histologique standard. Il a été montré qu'environ 20 % à 30 % des malades au stade I ou II développent rapidement des métastases après une exérèse chirurgicale considérée comme curative, ce qui laisse supposer qu'un certain pourcentage avait en fait des micro-métastases ganglionnaires qui n'ont pas été détectées par les méthodes anatomopathologiques classiques, leur interdisant ainsi de bénéficier d'une chimiothérapie adjuvante [158].

Il n'en demeure pas moins que la signification biologique des micro-métastases dans le cancer colorectal demeure controversée. Plusieurs études [159-168] ont évalué la valeur pronostique de la recherche de micro-métastases non décelables en histologie standard par des techniques immunohistochimiques ou de biologie moléculaire. Seules deux d'entre elles [163, 166] ont montré un intérêt pronostique à cette recherche. Néanmoins, tous ces travaux ont été publiés avant l'étude du statut du ganglion sentinelle. De nouvelles études sont donc indispensables pour savoir si les données fournies par la « cartographie lymphatique » peuvent avoir un impact sur la sélection des malades pouvant bénéficier d'une extension de la lymphadénectomie et si l'étude du ganglion sentinelle peut réellement identifier un sous groupe de malades porteurs de micro-métastases méconnues par les techniques histologiques standard et qui pourrait justifier de traitements systémiques plus agressifs.

L'angiogenèse tumorale

La croissance des tumeurs est étroitement liée au développement d'une vascularisation appropriée à partir de vaisseaux préexistants. Cette angiogenèse tumorale est sous l'influence de facteurs sécrétés directement par les cellules tumorales, par les cellules inflammatoires ou les cellules mésenchymateuses présentes dans le stroma. Ces facteurs stimulent directement les cellules endothéliales ou agissent indirectement en activant d'autres cellules.

La mesure de la densité vasculaire intra-tumorale est la méthode la plus couramment utilisée pour apprécier l'angiogenèse tumorale [169]. Certains auteurs ont montré qu'une forte densité vasculaire au sein des cancers colorectaux était associée au risque de métastases par voie hémotogène [170, 171]. Deux équipes ont considéré la densité vasculaire comme facteur pronostique en analyse univariée seulement [172, 173]. A notre connaissance, seules deux autres études ont montré, en analyse

multivariée, qu'une forte densité vasculaire intra-tumorale était un facteur indépendant de mauvais pronostic [72, 174]. D'autres travaux n'ont pas confirmé la valeur pronostique de ce paramètre [175, 176] ou ont donné des résultats opposés [177]. Les grandes disparités concernant le choix de l'anticorps, anti-facteur VIII [170], anti-CD34 [171, 178], anti-CD31 [179], le type de vaisseaux pris en compte, la zone sélectionnée et la valeur seuil utilisée pour apprécier la densité vasculaire peuvent être expliquées par ces disparités.

Le développement des techniques de biologie moléculaire et l'apparition de nouveaux anticorps pour l'immunohistochimie permettent maintenant d'apprécier l'expression de facteurs angiogéniques ou pro-angiogéniques ou des transcrits (ARNm) de leur gène.

Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) est un des facteurs angiogéniques les mieux caractérisés. Le VEGF est une glycoprotéine synthétisée et exprimée par un grand nombre de tissus normaux [180]. Il est actuellement admis que le VEGF est le chef d'orchestre du processus angiogénique [181] capable de stimuler à la fois la prolifération et la migration endothéliales. Son expression par les cellules tumorales de carcinomes colorectaux a pu être reliée à l'expression de la thymidine phosphorylase (TP également appelée *platelet-derived endothelial cell growth factor*) [140] et à celle de l'activateur du plasminogène U-PA [182]. Sa valeur pronostique indépendante n'a cependant pas été démontrée [182].

Un autre facteur angiogénique, l'angiogénine, a récemment été étudié par Etoh et al. [183]. Ces auteurs ont montré chez 65 malades que la forte expression de ARNm de l'angiogénine était significativement liée à un mauvais pronostic et que, sur le plan immunohistochimique l'angiogénine était essentiellement exprimée par les cellules cancéreuses. Son expression pourrait être induite par les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules présentes dans le stroma, notamment les macrophages, et les cytokines induiraient l'expression de ARNm de l'angiogénine par les cellules cancéreuses. Les auteurs suggèrent que l'angiogénine contribuerait au potentiel invasif des cancers coliques.

Malgré les efforts pour mesurer la densité vasculaire intra-tumorale de manière fiable et reproductible [184], il n'y a pas aujourd'hui de consensus sur les marqueurs endothéliaux à utiliser, sur la technique optimale la plus fiable de dénombrement vasculaire. D'autres problèmes méthodologiques s'ajoutent à ces difficultés proprement techniques. Il n'existe, à l'heure actuelle, pas de méthode automatique simple, observable indépendante, de dénombrement vasculaire. Dans ces conditions, les études de reproductibilité intra- et inter-observateurs sont particulièrement cruciales pour apprécier la fiabilité des résultats donnés [185]. Pourtant, elles sont rarement rapportées dans la plupart des travaux publiés. La valeur pronostique de la densité vasculaire n'a pas été totalement prouvée ni totalement infirmée. En l'absence de consensus sur les techniques à utiliser et d'études de reproductibilité satisfaisantes, ce paramètre n'a pas encore sa place dans l'évaluation histopronostique des cancers colorectaux [186].

Prolifération cellulaire

La cytométrie en flux permet pour une population cellulaire donnée, d'évaluer le nombre de cellules en voie de division ou en phase de synthèse d'ADN (phase S). La valeur de la phase S normale est variable selon les tissus (pour la muqueuse colique normale, environ 5 %). Une activité de synthèse très élevée est un facteur de mauvais pronostic. Pour les cancers colorectaux, une phase S supérieure à 15 % permettrait de subdiviser les tumeurs de stade II en deux classes de pronostic différent [187].

L'immunohistochimie rend aussi possible l'étude de l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Il s'agit soit de

PCNA (protéine liée à une DNA polymérase), soit de l'antigène Ki-67 (étudié sur coupes en congélation avec l'anticorps Ki-67 et sur coupes en paraffine avec l'anticorps MIB I). Les résultats s'expriment en pourcentage de noyaux marqués ou indice de marquage. Les travaux de Mayer et al. [188], de Al Shebener et al. [189] pour le PCNA, ceux de Porscher et al. [190] pour le Ki-67 ont montré que ces marqueurs avaient une valeur pronostique indépendante du stade, de la taille et de la différenciation tumorale. Les travaux de Choi [191] suggèrent par ailleurs que l'évaluation de l'indice de marquage avec le PCNA serait un facteur prédictif de la survenue de métastases et de rechute après exérèse chirurgicale. Les résultats de ces travaux doivent, néanmoins, être discutés quant on connaît l'absence de reproductibilité du signal obtenu avec l'anticorps anti-PCNA (PC10) et sa variabilité en fonction de la fixation, de sa concentration et de la restauration antigénique par micro-ondes [192]. Les résultats obtenus avec l'anticorps anti-MIB1 paraissent supérieurs [193], car témoins plus fidèles de la phase S, et reproductibles. Saleh et al., dans une étude récente [194], ont montré un lien significatif entre un indice de marquage au Ki-67 bas et des facteurs histopronostiques de bon pronostic.

La nécessaire standardisation des techniques d'évaluation de l'activité proliférative ont d'ailleurs conduit la conférence de consensus américaine à classer ce critère dans la catégorie III, c'est-à-dire dans la catégorie des facteurs encore insuffisamment évalués.

Conclusion

Certains marqueurs histopronostiques classiques du cancer colorectal, comme l'extension pariétale et ganglionnaire et l'évaluation de la maladie résiduelle sont reconnus pour avoir une valeur pronostique indépendante. D'autres marqueurs ont été récemment mis en exergue. Il est aujourd'hui clair que les malades porteurs d'un carcinome de type MSI constituent un groupe particulier dont le pronostic et la réponse à la chimiothérapie paraissent différents. La détermination du statut moléculaire de la tumeur devient donc une étape importante dans la prise en charge personnalisée des malades. L'utilisation de techniques immunohistochimiques fondées sur les résultats des travaux de biologie moléculaire devrait permettre au pathologiste d'effectuer ce typage en routine. Le projet PETACC4 de la FFCD (chimiothérapie adjuvante de type 5FU irinotécan vs absence de chimiothérapie) a d'ailleurs prévu de prendre en compte le statut MSI dans les critères de randomisation et de stratifier les cancers coliques selon leur phénotype. Les autres facteurs étudiés restent à l'heure actuelle du domaine de la recherche même, si pour certains d'entre eux (gènes P53, DCC, ganglions sentinelles) le passage de la recherche à la routine pourrait être proche.

REMERCIEMENTS - Ce travail est soutenu par le Programme Hospitalier de Recherche Clinique du CHU de Dijon 1996 et la Fondation de France.

RÉFÉRENCES

1. Piard F, Monges G. Quels sont les facteurs histopronostiques utiles à la décision thérapeutique dans les cancers du côlon ? *Gastroenterol Clin Biol* 1998;22:S115-25.
2. Monges G, Piard F. Recommandations pour la rédaction des comptes-rendus anatomo-pathologiques des cancers coliques. *Gastroenterol Clin Biol* 1998;22:S126-30.
3. TNM Atlas Illustrated Guide to the TNM/pTNM classification of malignant tumors. 4th ed. New York : Springer, 1997.

4. Sobin L, Wittekind C. International Union Against Cancer. TNM classification of malignant tumors. 5th edition. New York : John Wiley & Sons, 1997.
5. Bosman F. Prognostic value of pathological characteristics of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A:1216-21.
6. Deans G, Parks T, Rowlands B, Spence R. Prognostic factors in colorectal cancer. *Br J Surg* 1992;79:608-13.
7. Hermanek P, Henson D, Hutter R, Sobin L. TNM supplement 1993. A commentary on uniform use. Berlin : Springer, 1993.
8. Heald R, Husband E, Ryall R. The mesorectum in rectal cancer surgery. The clue to pelvic recurrence ? *Br J Surg* 1982;69:613-6.
9. Heald R, Ryall R. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 1986;1:1479-82.
10. Compton C, Fenoglio-Preiser C, Pettigrew N, Fielding L. American joint committee on cancer prognostic factors consensus conference : colorectal working group. *Cancer* 2000;88:1739-57.
11. Shepherd N, Baxter K, Love S. Prognostic importance of peritoneal involvement on colonic cancer : a prognostic evaluation. *Gastroenterology* 1997;112:1096-102.
12. Leather A, Kocjan G, Savage F, Hu W, Yiu C, Boulos P et al. Detection of free malignant cells in the peritoneal cavity before and after resection of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1994;38: 814-9.
13. Vogelstein B, Fearon E, Kern S, Hamilton S, Preisinger A, Nakamura Y et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:207-11.
14. Delattre O, Law D, Remvikos Y, Sastre X, Feinberg A, Olschwang S et al. Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* 1989;12:353-5.
15. Thibodeau S, Shaid G. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
16. Remvikos Y, Vogt N, Muleris M, Salmon R, Malfoy B, Dutrillaux B. DNA-repeat instability is associated with colorectal cancers presenting minimal chromosome rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12:272-6.
17. Nicolaides N, Papadopoulos N, Liu B, Wei Y, Carter K, Ruben S et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994;371:75-80.
18. Peltomaki P, Aaltonen L, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin J, Jarvinen H et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993;260:810-2.
19. Yin J, Kong D, Wang S, Zou T, Souza R, Smolinski K et al. Mutation of hMSH3 and hMSH6 mismatch repair genes in genetically unstable human colorectal and gastric carcinomas. *Human Mutation* 1997;10: 74-8.
20. Ilyas M, Straub J, Tomlinson I, Bodmer W. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* 1999;35:335-51.
21. Cunningham J, Chritensen E, Tester D, Kim C, Roche P, Burgart L et al. Hypermethylation of the hMHL1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998;58:3455-60.
22. Herman J, Umar A, Polyak K, Graff J, Ahuja N, Issa J et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6870-5.
23. Thibodeau S, French A, Roche P, Cunningham J, Tester D, Lindor N et al. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 1996;56:4836-40.
24. Veigl M, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma A, Lutterbaugh J, Periyasamy S et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8698-702.
25. Aaltonen L, Peltomaki P, Leach F, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin J et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6.
26. Scott R, McPhillips M, Meldrum C, Fitzgerald P, Adams K, Spigelman A et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in 95 families : differences and similarities between mutation-positive and mutation-negative kindreds. *Am J Hum Genet* 2001;68:118-27.
27. Bronner C, Baker S, Morrison P, Warren G, Smith L, Lescoe M et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258-61.
28. Fishel R, Lescoe M, Rao M, Copeland N, Jenkins N, Garber J et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-38.
29. Leach F, Nicolaides N, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75:1215-25.
30. Peltomaki P. DNA mismatch repair gene mutations in human cancer. *Environ Health Perspect* 1997;4:775-80.
31. Eshleman JR, Lang EZ, Bowerfing GK, Parsons R, Vogelstein B, Willson JK et al. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene* 1995;10:33-7.
32. Johannsdottir J, Jonasson J, Bergthorsson J, Amundadottir L, Magnusson J, Egilsson V et al. The effect of mismatch repair deficiency on tumorigenesis ; microsatellite instability affecting genes containing short repeated sequences. *Intern J Oncol* 1999;16: 133-9.
33. Parsons R, Myeroff L, Liu B, Willson J, Markowitz D, Kinzler K et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:5548-50.
34. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995;268:1336-8.
35. Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang W, Gentry L, Yang J et al. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 1995;270:22044-9.
36. Abdel-Rahman W, Georgiades I, Curtis L, Arends M, Wyllie A. Role of BAX mutations in mismatch repair-deficient colorectal carcinogenesis. *Oncogene* 1999;19:2139-42.
37. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed J et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997;275:967-9.
38. Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H, Perucho M. Frameshift mutator mutations. *Nature* 1996;382:499-500.
39. Souza R, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski K, Abraham J et al. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nature Genet* 1996;14:255-7.
40. Wicking C, Simms L, Evans T, Walsh M, Chawengsaksophak K, Beck F et al. CDX2, a human homologue of *Drosophila* caudal, is mutated in both alleles in a replication error positive colorectal cancer. *Oncogene* 1998;17:657-9.
41. Schwartz S Jr, Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M. Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 1999;59:2995-3002.
42. Souza R, Yin J, Smolinski K, Zou T, Wang S, Shi Y et al. Frequent mutation of the E2F-4 cell cycle in primary human gastrointestinal tumors. *Cancer Res* 1997;57:2350-3.
43. Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L et al. Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. Pathobiologic features, hMLH1 and hMSH2 expression, and clinical outcome. *Cancer* 2000;89:2025-37.
44. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton S. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994;145:148-56.

45. Boland C, Thibodeau S, Hamilton S, Sidransky D, Eshleman J, Burt R et al. 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* 1998;58:5248-57.
46. Cawkwell L, Gray S, Murgatroyd H, Sutherland F, Haine L, Longfellow M et al. Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair. *Gut* 1999;45:409-15.
47. Chiaravalli A, Furlan D, Faccio C, Tibiletti M, Dionigi A, Casati B et al. Immunohistochemical pattern of hMSH2/hMLH1 in familial and sporadic colorectal, gastric, endometrial and ovarian carcinomas with instability in microsatellite sequences. *Virchows Arch* 2001;438:39-48.
48. Marcus V, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMLH2 : a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1248-55.
49. Terdiman J, Gum J, Conrad P, Miller G, Weinberg V, Crawley S et al. Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology* 2001;120:21-30.
50. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehmé A et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 1996;56:4881-6.
51. Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* 1996;56:3087-90.
52. Aebi S, Fink D, Gordon R, Kim H, Zheng H, Fink J et al. Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* 1997;3:1763-7.
53. Halling K, French A, McDonnell S, Burgart L, Schaid D, Peterson B et al. Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1295-303.
54. Gryfe R, Kim H, Hsieh E, Aronson M, Holowaty E, Bull S et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;324:69-77.
55. Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Lacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000;355:1745-50.
56. Elsaleh H, Powel B, Soontrapornchai P, Joseph D, Gorla F, Spry N et al. p53 gene mutation, microsatellite instability and adjuvant chemotherapy : impact on survival of 388 patients with Dukes' C colon carcinoma. *Oncology* 2000;58:52-9.
57. Jernvall P, Mäkinen M, Karttunen T, Mäkela J, Vihko P. Microsatellite instability : impact on cancer progression in proximal and distal colorectal cancers. *Eur J Cancer* 1999;35:197-201.
58. Wright C, Dent O, Barker M, Newland R, Chapuis P, Bokey E et al. Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg* 2000;87:1197-202.
59. Watanabe T, Wu T, Catalano P, Ueki T, Satriano R, Haller D et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001;344:1196-206.
60. Fallik D, Sabourin J, Borrini F, Jacob S, Boige V, Praz F et al. Réponse des cancers colorectaux métastatiques au traitement par CPT11 (irinotécan) : implications du système de réparation des mésappariements de base. *Gastroenterol Clin Biol* 2000;24:917-22.
61. Saltz L, Cox J, Blanke C, Rosen L, Fehrenbacher L, Moore M et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N England J Med* 2000;343:905-14.
62. Auvinen A, Isola J, Visakorpi T, Koivula T, Virtanen S, Hakama M. Overexpression of p53 and long-term survival in colon carcinoma. *Br J Cancer* 1994;70:293-6.
63. Borresen D, Lothe R, Meling G, Hainaut P, Rognum T, Skovlund E. Tp53 and long-term prognosis in colorectal cancer : mutation in the L3 zinc binding domain predict poor survival. *Clin Cancer Res* 1998;4:203-10.
64. Gervaz P, Bouzourene H, Cerottini JP, Chaubert P, Benhattar J, Secic M et al. Distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location. *Dis Colon Rect* 2001;44:364-73.
65. Hak-Su G, Joy R, Cheng-Hock L, Duncan R. p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients : effect of disease dissemination and tumour location. *Int J Oncol* 1999;15:491-8.
66. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jeco N, Asselain B, Remvikos Y et al. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994;106:42-8.
67. Hardingham J, Butler W, Roder D, Dobrovic A, Dymock R, Sage R et al. Somatic mutations, acetylator status, and prognosis in colorectal cancer. *Gut* 1998;42:669-72.
68. Hirano K, Minamoto T. Altered expression of p53 and p27 proteins, alone or combined, as a predictor of metastatic potential in early invasive carcinoma of colon and rectum. A comparative clinicopathologic and molecular analysis. *Cancer Detection and Prevention* 2000;24:343-55.
69. Maeda K, Chung Y, Kang S, Ogawa M, Onoda N, Nakata B et al. Overexpression of cyclin D1 and p53 associated with disease recurrence in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1997;74:310-5.
70. Tomoda H, Kareji Y. Immunohistochemical analysis of p53 in colorectal cancer regarding clinicopathological correlation and prognostic significance. *J Surg Oncol* 1995;58:125-8.
71. Tortola S, Marcuello E, González I, Reyes G, Arribas R, Aiza G et al. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1375-81.
72. Vermeulen P, Van Den Eynden G, Huget P, Goovaerts G, Weyler J, Lardon F et al. Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999;79:316-22.
73. Yamaguchi A, Nakagawara G, Kurosaka Y, Nishimura G, Yonemura Y, Miyazaki I. p53 immunoreaction in endoscopic biopsy specimens of colorectal cancer, and its prognostic significance. *Br J Cancer* 1993;68:399-402.
74. Zhang H. Evaluation of four antibodies in detecting p53 protein for predicting clinicopathological and prognostic significance in colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:4126-32.
75. Gang O, Ahnen D, Fenoglio-Preiser C, Loll L, Bunn P, Feigl P. K-ras mutation and p53 overexpression but not ploidy status predict the clinical behavior of colon cancer. *Gastroenterology* 1996;110 : A516.
76. Grewal H, Guillem J, Klimstra D, Cohen A. p53 nuclear overexpression may not be an independent prognostic marker in early colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1995;38:1176-81.
77. Ahnen D, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato L, Bunn P et al. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer : a Southwest oncology group study. *Cancer Res* 1998;58:1149-58.
78. Bosari S, Viale G. The clinical significance of p53 aberrations in human tumours. *Virchow Arch* 1995;427:229-31.
79. Mulder J, Baas I, Polak M, Goodman S, Offerhaus G. Evaluation of p53 protein expression as a marker for long-term prognosis in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1995;71:1257-62.
80. Poller D, Baxter K, Shepherd N. p53 and Rb1 protein expression : are they prognostically useful in colorectal cancer ? *Br J cancer* 1997;75:87-93.
81. Soong R, Grieu F, Robbins P, Dix B, Chen D, Parsons R et al. p53 alterations are associated with improved prognosis in distal colonic carcinomas. *Clin Cancer Res* 1997;3:1405-11.

82. Tollemar R, van Krieken J, van Slooten H, Bruinvelds D, Nelemans K, van den Broek L et al. Immunohistochemical detection of p53 and Bcl-2 in colorectal carcinoma : no evidence for prognostic significance. *Br J Cancer* 1998;77:1842-7.
83. Auvinen A, Isola J, Visakorpi T, Koivula T, Virtanen S, Hakama M. Overexpression of p53 and long-term survival in colon carcinoma. *Br J Cancer* 1994;70:293-6.
84. Houbiers J, Van Der Burg S, Van Der Watering L, Tollenaar R, Brand A, Van Der Velde C et al. Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1995;72:637-41.
85. Jernvall P, Makinen M, Karttunen T, Makela J, Vihko P. Morphological and genetic abnormalities in prediction of recurrence in radically operated colorectal cancer. *Anticancer Res* 1999;19:1357-62.
86. Nathanson S, Linden M, Tender P, Zarbo R, Jacobsen G, Nelson L. Relationship among p53, stage, and prognosis of large bowel cancer. *Dis Colon Rectum* 1994;37:527-34.
87. Pereira H, Silva S, Julião R, Garcia P, Perpétua F. Prognostic markers for colorectal cancer : expression of p53 and BCL2. *World J Surg* 1997;21:210-3.
88. Starzynska T, Bromley M, Marlicz K, Roberts S, Ucinski M, Stern P. Accumulation of p53 in relation to long-term prognosis in colorectal carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:183-6.
89. Save W, Nylander K, Hall P. Why is p53 protein stabilized in neoplasia ? Some answers but many more questions ! *J Pathol* 1998;184:348-50.
90. Amundson S, Myers T, Fornace A. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis : putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 1998;17:3287-99.
91. Kirsch D, Kastan M. Tumor-suppressor p53 : implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998;16:3158-68.
92. Bosari S, Viale G, Bossi P, Maggioni M, Coggi G, Murray J et al. Cytoplasmic accumulation of p53 protein : an independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:681-7.
93. Flamini G, Curigliano G, Ratto C, Astone A, Ferretti G, Nucera P et al. Prognostic significance of cytoplasmic p53 overexpression in colorectal cancer. An immunohistochemical analysis. *Eur J Cancer* 1996;32A:802-6.
94. Jansson A, Gentile M, Sun XF. p53 mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation. *Int J Cancer* 2001;92:338-41.
95. Hartmann A, Blaszyk H, McGovern R, Schroeder J, Cunningham J, De Vries E et al. p53 gene mutations inside and outside of exons 5-8 : the patterns differ in breast and other cancers. *Oncogene* 1995;10:681-8.
96. Wallace-Brodeur R, Lowe S. Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:64-75.
97. Campo E, Calle-Martin O, Miquel R, Palacin A, Romero M, Fabregat V et al. Loss of heterozygosity of p53 gene and p53 protein expression in human colorectal carcinomas. *Cancer Res* 1991;51:4436-42.
98. Costa A, Marasca R, Valentini S, Savarino M, Faranda A, Silvestrini R et al. p53 gene point mutations in relation to p53 nuclear protein accumulation in colorectal cancers. *J Pathol* 1995;176:45-53.
99. Dix B, Robbins P, Carrello S, House A, Iacopetta B. Comparison of p53 gene mutation and protein overexpression in colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 1994;70:585-90.
100. Kressner U, Inganas M, Byding S, Blikstad I, Pahlman B, Grimelius B et al. Prognosis value of p53 genetic changes in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:593-9.
101. Leahy D, Salman R, Mulcahy H, Sheahan K, O'Donoghue D, Parfrey N. Prognostic significance of p53 abnormalities in colorectal carcinoma detected by PCR-SSCP and immunohistochemical analysis. *J Pathol* 1996;180:364-70.
102. Smith D, Ji C, Goh H. Prognostic significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 1996;74:216-23.
103. Petersen S, Thames H, Nieder C, Petersen C, Baumann M. The results of colorectal cancer treatment by p53 status. Treatment-specific overview. *Dis Colon Rectum* 2001;44:322-34.
104. Armitage N, Ballantyne K, Evans D, Clarke P, Sheffield J, Hardcastle J. The influence of tumour cell DNA content on survival in colorectal cancer : a detailed analysis. *Br J Cancer* 1990;62:852-6.
105. Dean P, Vernava A. Flow cytometric analysis of DNA content in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1992;35:95-102.
106. Bosari S, Lee A, Wiley B, Heatley G, Silverman M. Flow cytometry and image analyses of colorectal adenocarcinomas : a comparative study with clinical correlations. *Am J Clin Pathol* 1993;99:187-94.
107. Deans G, Williamson K, Hamilton P, Heatley M, Arthurs K, Patterson C et al. DNA densitometry of colorectal cancer. *Gut* 1993;34:1566-71.
108. Tomita T. DNA ploidy and proliferating cell nuclear antigen in colonic adenomas and adenocarcinomas. *Digest Dis Sci* 1995;40:996-1004.
109. Tonouchi H, Matsumoto K, Kinoshita T, Itoh H, Suzuki H. Prognostic value of DNA ploidy patterns of colorectal adenocarcinomas : univariate and multivariate analysis. *Dig Surg* 1998;15:687-92.
110. Chapman M, Hardcastle J, Armitage N. Five-year prospective study of DNA tumor ploidy and colorectal cancer survival. *Cancer* 1995;76:383-7.
111. Nori D, Merimsky O, Samala E, Saw D, Cortes E, Chen E et al. Tumor ploidy as a risk factor for disease recurrence and short survival in surgically-treated Dukes'B2 colon cancer patients. *J Surg Oncol* 1995;59:239-42.
112. Lanza G, Gafa R, Santani A, Maestrasi I, Dubini A, Gilli G et al. Prognostic significance of DNA ploidy in patients with stage II and stage III colon carcinoma. A prospective flow cytometric study. *Cancer* 1998;82:49-59.
113. Shankey T, Rabinovitch P, Bagwell C, Bauer K, Duque R, Hadley D et al. Guidelines for implementation of clinical cytometry. *Cytometry* 1993;14:472-7.
114. Fearon E, Cho K, Nogro J, Kern S, Simons J, Puppert J et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990;247:49-56.
115. Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu Z, Levitt R, Sistonen P et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994;331:213-21.
116. Carethers J, Hawn M, Greenon J, Hitchcock C, Boland C. Prognostic significance of allelic loss at chromosome 18q21 for stage II colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998;114:1188-95.
117. Shibata D, Reale M, Lavin P, Silverman M, Fearon E, Steele G Jr et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1996;335:1727-32.
118. Reymond M, Dworak O, Remke S, Hohenberger W, Kirchner T, Köckerling F. DCC protein as a predictor of distant metastases after curative surgery for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1998;41:755-60.
119. Saito M, Yamaguchi A, Goi T, Tsuchiyama T, Nakagawara G, Urano T et al. Expression of DCC protein in colorectal tumors and its relationship to tumor progression and metastasis. *Oncology* 1999;56:134-41.
120. Sun X, Rütten S, Zhang H, Nordenskjöld B. Expression of the deleted in colorectal cancer gene is related to prognosis in DNA diploid and low proliferative colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 1999;17:1745-50.
121. Riggins G, Thiagalingam S, Rozenblum E, Weistein C, Kern S, Hamilton S et al. Mad-related genes in the human. *Nature (Genet)* 1996;13:347-9.

122. Schwarte-Waldhoff I, Klein S, Blass-Kampmann S, Hintelmann A, Eiler C, Dreschers S et al. DPC4/SMAD4 mediated tumor suppression of colon carcinoma cells is associated with reduced urokinase expression. *Oncogene* 1999;18:3152-8.
123. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach F, Schutte M, Hahn S, Oveerhauser J et al. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nature Genet* 1996;13:342-6.
124. Derynck R, Feng X. TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1997;1333:F105-50.
125. Heldin C, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390:465-71.
126. Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Ann Rev Biochem* 1998;67:753-91.
127. Korchynski O, Landström M, Stoika R, Funa K, Heldin C, ten Dijke P et al. Expression of Smad proteins in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 1999;82:197-202.
128. Jonhston P, Liang C, Henry S, Chabner B, Allegra C. Production and characterization of monoclonal antibodies that localize human thymidilate synthase in the cytoplasm of human cells and tissue. *Cancer Res* 1991;51:6668-76.
129. Jonhston P, Fisher E, Rockette H, Fisher B, Wolmark N, Drake J et al. The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:2640-7.
130. Lenz H, Danenberg K, Leichman C, Florentine B, Johnston P, Groshen S et al. P53 and thymidylate synthase expression in untreated stage II colon cancer : associations with recurrence, survival, and site. *Clin Cancer Res* 1998;4:1227-34.
131. Edler D, Hallström M, Johnston P, Magnusson I, Ragnhammar P, Blomgren H. Thymidylate synthase expression : an independent prognostic factor for local recurrence, distant metastasis, disease-free and overall survival in rectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1378-84.
132. Sanguedolce R, Vultaggio G, Sanguedolce F, Modica G, Li Volsi F, Diana G et al. The role of thymidylate synthase levels in the prognosis and the treatment of patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 1998;18:1515-20.
133. Leichman L, Lenz H, Leichman C, Groshen S, Danenberg K, Baranda J et al. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for resistance to protracted infusion of 5-fluorouracil and weekly leucovorin in disseminated colorectal cancers : preliminary report from an ongoing trial. *Eur J Cancer* 1995;31:1306-10.
134. Leichman C, Lenz H, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S et al. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol* 1997;15:3223-9.
135. Leichman C. Thymidylate synthase as a predictor of response. *Oncology* 1998;12:43-7.
136. Peters G, van der Wilt C, van Groeningen C, Smid K, Meijer S, Pinedo H. Thymidilate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colon cancer patients : implication for treatment with fluorouracil. *J Clin Biol* 1994;12:2035-42.
137. Paradiso A, Simone G, Petroni S, Leone B, Vallejo C, Lacava J et al. Thymidilate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2000;82:560-7.
138. Aschele C, Debernardis D, Casazza S, Antonelli G, Tunesi G, Baldo C et al. Immuno-histochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999;17:1760-70.
139. Cascinu S, Aschele C, Barni S, Debernardis D, Baldo C, Tunesi G et al. Thymidylate synthase protein expression in advanced colon cancer : correlation with the site of metastasis and the clinical response to leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1999;5:1996-9.
140. Van Triest B, Pinedo H, Blaauwgeers J, van Diest P, Schoenmakers P, Voorn D. Prognostic role of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor, and proliferation markers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1063-72.
141. Monges G, Milan C, Croue A, Diebold MD, Fléjou JF, Piard F et al. Thymidylate synthase and P53 expression predict event free survival but not the response to adjuvant chemotherapy of patients with colonic carcinoma. *Gastroenterology* 1998;114:G2661.
142. Davies M, Johnston P, Kaur S, Allen-Mersh T. Colorectal liver metastasis thymidylate synthase staining correlates with response to hepatic arterial floxuridine. *Clin Cancer Res* 1999;5:325-8.
143. Behan K, Johnston P, Allegra C. Epitope mapping of a series of human thymidylate synthase monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1998;58:2606-11.
144. Edler D, Blomgren H, Allegra C, Johnston P, Lagerstedt U, Magnusson I et al. Immunohistochemical determination of thymidylate synthase in colorectal cancer-methodological studies. *Eur J Cancer* 1997;33:2278-81.
145. Thorn M. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy : is the method applicable to patients with colorectal and gastric cancer ? *Eur J Surg* 2000;166:755-8.
146. Joosten J, Strobbe L, Wauters C, Pruszczynski M, Wobbes T, Ruers T. Intraoperative lymphatic mapping and the sentinel node concept in colorectal carcinoma. *Br J Surg* 1999;86:482-6.
147. Bilchik A, Saha S, Wiese D, Stonecypher J, Wood T, Sostrin S et al. Molecular staging of early colon cancer on the basis of sentinel node analysis : a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* 2001;19:1128-36.
148. Tsioulis G, Wood T, Morton D, Bilchik A. Lymphatic mapping and focused analysis of sentinel lymph nodes upstage gastrointestinal neoplasms. *Arch Surg* 2000;135:926-32.
149. Wiese D, Saha S, Badin J, Ng P, Gauthier J, Ahsan A et al. Pathologic evaluation of sentinel lymph nodes in colorectal carcinoma. *Arch Path Lab Med* 2000;124:1759-63.
150. Saha S, Nora D, Wong JH, Weise D. Sentinel lymph node mapping in colorectal cancer. A review. *Surg Clin North Am* 2000;80:1811-9.
151. Saha S, Wiese D, Badin J, Beutler T, Nora D, Ganatra B et al. Technical details of sentinel lymph node mapping in colorectal cancer and its impact on staging. *Ann Surg Oncol* 2000;7:120-4.
152. Cochran A. Surgical pathology remains pivotal in the evaluation of "sentinel" lymph nodes. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1169-72.
153. Messina J, Glass F, Cruse C, Berman C, Ku N, Reintgen D. Pathologic examination of the sentinel lymph node in malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 1999;23:686-90.
154. Turner R, Ollila D, Stern S, Giuliano A. Optimal histopathologic examination of the sentinel lymph node for breast carcinoma staging. *Am J Surg Pathol* 1999;23:263-7.
155. Saha S, Wiese D, Beutler T, Ganatra B, Desai D, Bhagat J et al. Accuracy of diagnosis of micrometastases in colorectal cancer by sentinel lymph node mapping technique. 35e Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology. Atlanta. n° 905.
156. Keshtgar M, Amin A, Taylor I. Intraoperative lymphatic mapping and the sentinel node concept in colorectal carcinoma. *Br J Surg* 1999;86:1222-3.
157. Wood T, Tsioulis G, Morton D, Rangel D, Hutchinson W, Foshag L et al. Focused examination of sentinel lymph nodes upstages early colorectal carcinoma. *Am Surg* 2000;66:998-1003.
158. Cohen A, Kelsen D, Saltz L, Minsky B, Nelson H, Farouk R et al. Adjuvant therapy for colorectal cancer. *Curr Probl Surg* 1997;34:601-76.
159. Adell G, Boeryd B, Franlund B, Sjö Dahl R, Hakansson L. Occurrence and prognostic importance of micrometastases in regional lymph nodes in Dukes' B colorectal carcinoma : an immunohistochemical study. *Eur J Surg* 1996;162:637-42.

160. Broll R, Schauer V, Schimmelpenning H, Strik M, Woltmann A, Best R et al. Prognostic relevance of occult tumor cells in lymph nodes of colorectal carcinomas. An Immunohistochemical study. *Dis Colon Rectum* 1997;40:1465-71.
161. Calaluce R, Miedema B, Yesus Y. Micrometastasis in colorectal carcinoma : a review. *J Surg Oncol* 1998;67:194-202.
162. Cutait R, Alves V, Lopes L, Cutait D, Borges J, Singer J et al. Restaging of colorectal cancer based on the identification of lymph node micrometastases through immunoperoxidase staining of CEA and cytokeratins. *Dis Colon Rectum* 1991;34:917-20.
163. Greenson J, Isenhardt C, Rice R, Mojzisek C, Houchens D, Martin E. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Dukes' B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. *Cancer* 1994;73:563-9.
164. Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A, Kato Y, Nakamori S, Imaoka S et al. Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. *Lancet* 1995;345:1257-9.
165. Jeffers M, O'Dowd G, Mulcahy H, Stagg M, O'Donoghue D, Toner M. The prognostic significance of immunohistochemically detected lymph node micrometastases in colorectal carcinoma. *J Pathol* 1994;172:183-7.
166. Liefers G, Cleton-Jansen A, Van De Velde C, Hermans J, Van Krieken J, Cornelisse C et al. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998;339:223-8.
167. Nakanishi Y, Ochiai A, Yamauchi Y, Moriya Y, Yoshimura K, Hirohashi S. Clinical implications of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancers. A case control study. *Oncology* 1999;57:276-80.
168. Oberg A, Stenling R, Tavelin B, Lindmark G. Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Dukes stages A and B colorectal cancer ? *Dis Colon Rectum* 1998;41:1244-9.
169. Fox SB. Tumour angiogenesis and prognosis. *Histopathology* 1997;31:294-301.
170. Choi H, Hyun M, Jung G, Kim S, Hong S. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology* 1998;55:575-81.
171. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Lu C, Kitaoka A, Matsuyama K et al. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:1043-6.
172. Franck R, Saclarides T, Leurgans S, Speziale N, Drab E, Rubin D et al. Tumour angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg* 1995;222:695-9.
173. Takahashi Y, Tucker S, Kitadai Y, Koura A, Bucana D, Cleary K et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch Surg* 1997;132:541-6.
174. Takebayashi Y, Aklyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer* 1996;78:226-31.
175. Banner B, Whitehouse R, Baker S, Swanson R. Tumor angiogenesis in stage II colorectal carcinoma. Association with survival. *Am J Clin Pathol* 1998;109:733-7.
176. Bossi P, Viale G, Lee A, Alfano R, Coggi G, Bosari S. Angiogenesis in colorectal tumors : microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1995; 55:5049-53.
177. Abdalla S, Behzad F, Bsharah S, Kumar S, Amini S, O'Dwyer S et al. Prognostic relevance of microvessel density in colorectal tumours. *Oncol Rep* 1999;6:839-42.
178. Nanashima A, Ito M, Sekine I, Naito S, Yamaguchi H, Nakagoe T et al. Significance of angiogenic factors in liver metastatic tumors originating from colorectal cancers ? *Dig Dis Sci* 1998;43:2634-40.
179. Engel C, Bennett S, Chambers A, Doig G, Kerkvliet N, O'Malley F. Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for Dukes staging. *Am J Surg Pathol* 1996;20: 1260-5.
180. Berse B, Brown F, Van De Water L, Dvorak H, Senger D. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992;3:211-20.
181. Amoroso A, Del Porto F, Di Monaco C, Manfredini P, Afeltra A. Vascular endothelial growth factor : a key mediator of neoangiogenesis. A review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 1997;1:17-25.
182. Berney C, Fisher R, Yang J, Russell P, Crowe P. Protein markers in colorectal cancer. Predictors of liver metastasis. *Ann Surg* 1999;230: 179-84.
183. Etoh T, Shibuta K, Barnard G, Kitano S, Mori M. Angiogenin expression in human colorectal cancer : the role of focal macrophage infiltration. *Clin Cancer Res* 2000;6:3545-51.
184. Schor A, Pendleton N, Pazouki S, Smither R, Morris J, Lessan K et al. Assessment of vascularity in histological sections : effects of methodology and value as an index of angiogenesis in breast tumours. *Histochem J* 1998;30:849-56.
185. Vermeulen P, Libura M, Libura J, PJ O, van Dan P, van Marck E et al. Influence of investigator experience and microscopic field size on microvessel density in node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1997;42:165-72.
186. Scoazec JY. L'angiogenèse tumorale. *Ann Pathol* 2000;20:25-37.
187. Schutte B, Reyniers M, Wiggers T, Arends J, Volovics L, Bosman F et al. Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA content and proliferative activity in large bowel carcinomas. *Cancer Res* 1987;47:5494-6.
188. Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K. The prognostic significance of proliferating cell nuclear epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:2454-60.
189. Al Shebener I, Shibata H, Sampalis J, Jothy S. Prognosis significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:1954-9.
190. Porschen R, Kriegel A, Langen C, Classen S, Hilse M, Lohe B et al. Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int J Cancer* 1991;47: 686-91.
191. Choi H, Jung I, Kim S, Hong S. Proliferating cell nuclear antigen expression and its relationship to malignancy potential in invasive colorectal carcinomas. *Dis Colon Rectum* 1997;40:51-9.
192. Brombey M, Rew D, Becciolini A, Balzi M, Chadwick C, Hewitt D et al. A comparison of proliferation markers (BrdUrd, Ki-67, PCNA) determined at each cell position in the crypts of normal human colonic mucosa. *Eur J Histochem* 1996;40:89-100.
193. Holt P, Moss S, Kapetanakis A, Petrotos A, Wang S. Is Ki-67 a better proliferative marker in the colon than proliferating cell nuclear antigen ? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:131-5.
194. Saleh H, Jackson H, Banerjee M. Immunohistochemical expression of bcl-2 and p53 oncoproteins : correlation with Ki67 proliferation index and prognostic histopathologic parameters in colorectal neoplasia. *Appl Immunohistochem Molecul Morphol* 2000;8:175-82.