

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2006

N°49

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES
SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury interrégional

Le 18 Octobre 2006

Par M. Thomas DEJOIE

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 23 janvier 2003 tient lieu de

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

<p>EXPRESSION DE TIMP-3 DANS LE CANCER COLORECTAL A PROPOS D'UNE SERIE DE 39 CAS</p>
--

Président : M. Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie - Pharmacie

Membres : M. Christian LABOISSE, Professeur d'Anatomopathologie - Médecine

Mr Marc DENIS, Professeur de Biochimie - Médecine

Mme Kalyane BACH-NGOHOU, MCU-PH en Biochimie - Médecine

Mr Damien MASSON MCU-PH en Biochimie – Médecine (Directeur de Thèse)

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	2
LISTE DES ABREVIATIONS	6
TABLES DES ILLUSTRATIONS	7
INTRODUCTION	9
I - LE CANCER COLORECTAL	10
A – généralités.....	10
1 - Epidémiologie	10
a – Données de l’OMS	10
b - En France	10
2 - Terrains et facteurs de risque du cancer colorectal	11
a - Les niveaux de risques associés au développement du cancer colorectal.....	11
b – Les facteurs de risque	12
3 - Histoire naturelle de la maladie, diagnostic, pronostic et prise en charge	15
a - Séquence adénome cancer.....	15
b - Aspects anatomopathologiques.....	15
➤ Les polypes.....	15
➤ Du polype vers l’adénocarcinome.....	18
➤ L’adénocarcinome	19
c - Le diagnostic	20
d – Le pronostic.....	21
e –La prise en charge.....	22
B - Aspects génétiques et moléculaires du cancer colorectal.....	23
1 – Le processus cancéreux	24
a - Chronologie.....	24
b - Les proto-oncogènes	25
c - Les gènes suppresseurs de tumeurs.....	25
d - Les gènes de réparation des erreurs de l’ADN	26
e – Mécanismes génétiques impliqués : voies LOH, MSI et CIMP.....	27
2 – Acteurs et voies de signalisation intracellulaires impliquées.....	29
a - Cancers colorectaux associés au mécanisme d’instabilités chromosomiques CIN	
"Chromosomal Instability" : voie LOH.....	29

➤ Gène <i>APC</i> "adenomatosis polyposis coli" et voie WNT	30
➤ K-Ras, B-Raf et voie des MAP kinases	34
➤ TP53 Transforming Protein 53 : le "gardien du génome"	38
b - Cancers colorectaux associés au phénotype d'instabilité microsatellitaire MSI	40
➤ Instabilité des microsatellites	40
➤ Voie de signalisation du TGFβ via TGFβRII (Figure 11)	42
➤ Altérations de la voie du TGFβ dans le cancer colorectal	43
3 - De la méthylation ou phénotype CIMP	44
a – Rôle physiologique de la méthylation	44
b - Méthylations et pathologies	45
c - L'hyperméthylation des îlots CpG	47
d - Mécanismes et conséquences de l'hyperméthylation	47
e - Hyperméthylation et cancer du côlon	49
f - Hypométhylation et cancer du côlon	51
II - TIMP-3 : gène suppresseur de tumeur dans le cancer colorectal ?	52
A – Description du gène et de la protéine	52
B – Régulation de l'expression de TIMP-3	54
C - Rôles de TIMP-3	54
1- Inhibiteur de métalloprotéases	54
2 – Inhibiteur du VEGFR2	55
3 - Inhibiteur d'ADAM-17	55
D – TIMP-3 et pathologies	56
1 - "Sorsby's fundus dystrophy" SFD	56
2 - TIMP-3 et cancer	56
a - Effet sur la croissance tumorale	57
b - Propriété anti-angiogénique	57
c - Effet proapoptotique.....	58
3 - Diminution d'expression de TIMP-3 par altération épigénétique	58
4 - TIMP-3 et cancer colorectal.....	59
a –Modification de l'expression de TIMP-3	59
b – TIMP-3 et profil CIMP	60
OBJECTIFS	61
MATERIELS ET METHODES	62
A - Matériels	62
1 - Patients et prélèvements tissulaires.....	62
2 - Pucés tissulaires	62
B - Méthodes	62

1 - Etude de la méthylation du gène TIMP-3	62
a - Extraction de l'ADN génomique	62
b - Traitement de l'ADN génomique (ADNg)	63
c - Protocole	64
2 - Etude de l'expression des gènes TIMP-3 et ADAM-17	66
Expression au niveau transcriptionnel.....	66
a – Extraction	66
b - Rétrotranscription	67
c – PCR temps réel quantitative	67
➤ Technique SYBR Green.....	67
➤ Technique : sonde d'hydrolyse Taqman®	68
Etude de l'expression de la protéine TIMP-3.....	69
a - Microscopie confocale	69
➤ – Préparation	69
➤ -Lecture au microscope confocal	69
b – Immunohistochimie.....	70
RESULTATS	71
A - Etude de l'expression de TIMP-3 dans les tumeurs coliques.....	71
1 – Performances analytiques de la Gamme TIMP-3 par PCR quantitative.....	71
2 – Niveau d'expression transcriptionnel de TIMP-3 entre tumeur et tissu sain apparié	72
3- Localisation et niveau de l'expression protéique de TIMP-3	74
a - Evaluation par immunofluorescence et lecture en confocal	74
b – Expression protéique de TIMP-3 : étude sur puces tissulaires TMA.....	76
➤ Côlon normal.....	77
➤ Tumeurs coliques	78
c – Comparaisons des niveaux d'expression protéique et transcriptionnel.....	80
B - Exploration de l'hyperméthylation du promoteur de TIMP-3.....	81
C – Significations cliniques des variations d'expression de TIMP-3 dans le cancer	
colorectal	83
1 – Variations d'expression de TIMP-3 et localisation tumorale.....	83
2 – Variation du niveau d'expression de TIMP-3 en fonction du stade TNM observé ...	84
D - Variations d'expression des gènes <i>TIMP-3</i> et d'<i>ADAM-17</i> au niveau transcriptionnel	
.....	85
DISCUSSION	86
BIBLIOGRAPHIE	92
ANNEXES	98

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Desoxyribonucléique	LOH : Loss of heterozygotie
AINS : Anti inflammatoire non stéroïdien	MAPK :mitigen actvated Protein Kinase
APC : adenomatosis polyposis coli	MCR : Mutation cluster Region
BER : base excision repair	MICI : maladies inflammatoires chroniques intestinales
CA : cytosine-adenine	MMR : Mismatch repair gene
CIMP : CpG Island methylator phenotype	MSI : microsatellite instability
CIN : Chromosomal instability	MSS : Microsatellite stability
CpG : cytosine phosphate guanine	MYH : mutY human homologue
DCC : deleted in colon carcinoma	NES : nuclear export signal
EGF : Epidermal Growth Factor	OMS : Organisation mondiale de la santé
GAP : GTPase activating protein	PAF : Polypose Adenomateuse Familiale
GDP : guanosine diphosphate	pTNM : pathology Tumor Node Metastasis
GEF : guanine nucleotide exchange factor	RCH : Rectocolite hémorragique
GSK3b: glycogène synthase kinase 3 beta	RTK : Receptor tyrosine kinase
GTP : guanosine triphosphate	TCF4 : T-Cell-Factor 4
hDM2 : human double minute done 2	TMA : Tissue Micro Array
hMLH-1 : human mutL homologue-1	TGFb : transforming growth factor beta
hMSH-2 :human mutS homologue-2	TP 53 : transforming Protein 53
HNPCC : Hereditary non polyposis colorectal Cancer	VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
IRM : Imagerie par résonance magnétique	

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : Les différents groupes à risque de cancer colorectal	12
Figure 2 : Aspects histologiques dans la séquence adénome cancer	15
Figure 3 : Cliché endoscopique colique d'un patient atteint de	16
Figure 4 : Les différents polypes coliques	18
Figure 5 : Caractéristiques moléculaires des deux phénotypes de cancers colorectaux sporadiques, d'après Søreide et coll,2006	28
Figure 6 : Protéine APC et ses principaux domaines fonctionnels	30
Figure 7 a : Voie WNT / β -caténine au repos, d'après Fodde et coll, 2001	31
Figure 8 : Protéine K-ras et ses domaines fonctionnels	35
Figure 9 : Voie MAP kinase - Schéma de la voie Ras/Raf/MEK/ERK activée par l'EGFR	36
Figure 10 : Protéine p53 et ses domaines fonctionnels	38
Figure 11 : Voie de signalisation du TGF β	42
Figure 12 : Mécanismes épigénétiques et génétiques d'inactivation mono ou biallélique d'un gène suppresseur de tumeur d'après Costello et coll, 2001	46
Figure 13: Aspects de la chromatine au niveau de gènes suppresseurs de tumeur en situation normale et tumorale, d'après Deltour et coll, 2005	48
Figure 14 : Organisation du gène <i>TIMP-3</i> et structure de la protéine, d'après Wick et coll, 1995	53
Figure 15: Conversion chimique des cytosines non méthylées en uracil	63
Figure 16 : Gamme TIMP-3 sur ADNc de lignée colique Caco2	71
Figure 17: Niveau d'expression relatif de TIMP-3 pour chaque couple tumeur/tissu normal apparié, classé par rapport T/N croissant.	72
Figure 18: a-Clichés de microscopie confocale, marquage à l'Ac monoclonal anti TIMP-3 (TIMP- 3 en vert/ noyaux en rouge)...	75
Figure 19: Expression de TIMP-3 dans la muqueuse colique humaine normale en immunohistochimie (TIMP-3 en marron/ noyaux en bleu)..	77
Figure 20 : Expression de TIMP-3 dans la tumeur colique en immunohistochimie (TIMP-3 marron, noyaux bleus). T+++ ou ++...	78
Figure 21 : Expression de TIMP-3 dans la tumeur colique en immunohistochimie (TIMP-3 marron, noyaux bleus). T+ ou -....	78
Figure 22 : PCR M et UM des témoins réactionnels	81
Figure 23 : PCR M et UM des couples dont les tumeurs ne présentent pas d'ARNm de TIMP-3	82

Figure 24 : répartition des catégories de variation d'expression de TIMP-3 pour les différentes localisations cancéreuses coliques	83
Figure 25 : Niveaux transcriptionnels Tumeur/Normal des gènes <i>TIMP-3</i> et <i>ADAM-17</i> pour chaque patient	85

Liste des tableaux

Tableau 1 : Facteurs de risque associés aux différents types de cancers colorectaux d'après Weitz et coll, 2005	14
Tableau 2 : Classification TNM des tumeurs malignes	20
Tableau 3 : Cancer colorectal : Stades et Classifications (Dukes et TNM)	21
Tableau 4 : Profil d'inhibition de TIMP-3, d'après Mohammed et coll, 2003	56
Tableau 5 : Séquences des amorces de la MS PCR TIMP-3	65
Tableau 6 : Mélange réactionnel MS PCR	65
Tableau 7 : Cycle des PCR M et UM	66
Tableau 8 : Mélange réactionnel pour la synthèse d'ADNc	67
Tableau 9 : Séquences des amorces des PCR quantitatives : TIMP-3 et β -actine	67
Tableau 10 : Mélange réactionnel (V en μ L pour un échantillon de 10 μ L) pour les PCR quantitatives en SYBrGreen	67
Tableau 11 : Cycle des PCR quantitatives en SYBrGreen	68
Tableau 12: Pourcentages des niveaux de marquage au sein des tumeur et du stroma associé	79
Tableau 13 : Comparaison des niveaux d'expression transcriptionnel et protéique de TIMP-3 dans les tumeurs	80
Tableau 14 : Comparaison des niveaux d'expression transcriptionnel et protéique de TIMP-3 dans le stroma	81
Tableau 15 : Répartition des couples par niveau transcriptionnel T/N en TIMP-3	83
Tableau 16 : Variation d'expression de TIMP-3 et statut métastatique des 38 tumeurs.	84

INTRODUCTION

L'incidence annuelle du cancer colorectal est considérable puisque cette pathologie atteint près d'1 million de personnes à travers le monde. L'impact de cette maladie est majeur dans les pays développés où elle constitue la deuxième cause de mortalité par cancer. Cependant, le pronostic s'est nettement amélioré au cours des 20 dernières années avec une survie médiane passant de 18 mois en 1976 à 40 mois en 1995. Ce progrès est la traduction d'une part de l'amélioration des performances du dépistage et de la prise en charge chirurgicale et d'autre part, de l'introduction de chimiothérapies de consolidation efficaces.

Malgré ces progrès significatifs, les spécialistes constatent à l'heure actuelle une stabilisation de la survie médiane qui stagne aux alentours de 50 % à 5 ans, tous stades confondus et qui met en relief l'existence de formes agressives et résistantes aux traitements classiques.

Devant ces échecs, la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogénèse colorectale est devenue un enjeu majeur. Dans ce cadre, l'individualisation de nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques permettant d'expliquer puis d'anticiper les formes agressives constituent des objectifs prioritaires. Sur le plan thérapeutique, la description des voies de signalisation impliquées dans la transformation maligne a pour but de caractériser de nouvelles cibles pharmacologiques. Sur ce dernier point, la récente autorisation de mise sur le marché d'un anticorps chimérique dirigé contre le récepteur de l'EGF "Epidermal Growth Factor" (cetuximab) dans le traitement de première ligne du cancer colorectal métastatique, constitue un premier succès marquant l'avènement des biothérapies ciblées dans cette pathologie.

Dans ce contexte, les études systématiques de gènes d'intérêt susceptibles d'intervenir dans la carcinogénèse colorectale se sont multipliées. Parmi eux, le gène *TIMP-3* code pour un inhibiteur de métalloprotéase qui présente des fonctions suppressives de tumeur, démontrées essentiellement au niveau expérimental. Dans le cancer colorectal, le rôle de cette protéine n'est pas établi. Quelques travaux révèlent une hyperméthylation modeste du promoteur mais dont l'impact sur l'expression de la protéine n'a pas été éclairci.

Notre travail a pour but de caractériser les niveaux d'expression transcriptionnel et protéique de *TIMP-3* dans une série d'adénocarcinomes et de tissus sains appariés, puis de vérifier l'adéquation entre l'hyperméthylation du promoteur et une réduction voire une absence d'expression de la protéine *TIMP-3*. Nous avons ensuite évalué la signification clinique des modifications d'expression dans notre série. Enfin, nous avons confronté les niveaux d'expression transcriptionnels respectifs des gènes *TIMP-3* et *ADAM-17*, afin d'apprécier l'existence d'une co-régulation entre la métalloprotéase *ADAM-17* qui favoriserait la croissance tumorale et son inhibiteur physiologique *TIMP-3*.

I - LE CANCER COLORECTAL

A – GÉNÉRALITES

1 - Epidémiologie

a – Données de l'OMS

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 945 000 nouveaux cas de cancers colorectaux sont déclarés chaque année de part le monde. Troisième en terme de fréquence, il entraîne 492 000 décès par an, constituant ainsi la quatrième cause de décès par cancer (Russo, Wei et coll. 2004).

Il existe de grandes disparités au niveau mondial. On distingue trois niveaux d'incidence selon les régions du globe. Les plus élevés s'observent aux Etats-Unis et en Europe de l'Ouest, auxquels s'ajoute maintenant le Japon dont le mode de vie s'est occidentalisé. Dans les pays développés, le cancer colorectal est la seconde cause de décès par cancer tous sexes confondus, derrière le cancer du poumon. L'Europe centrale et les pays émergents constituent une zone d'incidence moyenne mais plus élevée comparativement aux pays en voie de développement. Dans ces derniers, le cancer colorectal a une incidence nettement plus faible car les populations sont plus jeunes, et non soumises aux mêmes facteurs de risque notamment alimentaires. Néanmoins, les faibles niveaux d'accès et de qualité des soins participent à une sous-estimation des cancers en général (Colorectal Cancer. In: BW Steward and P Kleihues 2003).

Par ailleurs, certaines études, menées sur le nouveau continent, ont mis en évidence des disparités significatives de l'incidence du cancer colorectal entre des populations d'origine différentes, mais soumises aux mêmes facteurs de risque notamment alimentaires, démontrant que celle-ci reste fortement liée au patrimoine génétique (Pickle, Greene et coll. 1984).

b - En France

Dans notre pays, le cancer colorectal est le plus fréquent pour l'ensemble de la population. Ainsi, un individu sur 25 développera cette pathologie au cours de sa vie. Avec une incidence standardisée de 39/100 000, le cancer colorectal se situe au 3^{ème} rang après ceux de la prostate et du poumon chez l'homme. Chez la femme, l'incidence est de 27/100 000 et le cancer colorectal se positionne au deuxième rang après le cancer mammaire. Tous sexes confondus, on note environ 36 000 nouveaux cas par an dont 65 % de localisation colique.

L'âge moyen au diagnostic est de 69,5 ans chez l'homme et 72,8 ans chez la femme, c'est donc un cancer rare avant 50 ans (6 % des cas). La proportion des cas diagnostiqués double chaque

décennie entre 40 et 70 ans tous sexes confondus. Le sexe masculin est défavorisé avec un sex-ratio de 1,5. Le cancer du côlon étant une maladie de la deuxième partie de la vie, le vieillissement de la population a entraîné une augmentation de 16 % des cas de cancer colorectal pour la période 1980-2000.

Actuellement, la prévalence de ce cancer est d'environ 3500/ 100 000 individus ce qui constitue une population d'environ 200 000 patients, dont 30 000 sont traités. Cependant la survie médiane brute est de seulement 50 % à 5 ans. Après une nette amélioration depuis les vingt dernières années, celle-ci semble maintenant stagner en attendant qu'un progrès thérapeutique majeur vienne de nouveau l'accroître. Enfin, le cancer colorectal entraîne environ 15 000 décès par an. Il se situe ainsi au deuxième rang après le cancer du poumon mais avant ceux de la prostate et du sein (Lievre et Laurent-Puig 2005).

2 - Terrains et facteurs de risque du cancer colorectal

a - Les niveaux de risques associés au développement du cancer colorectal

Dans la population générale, le risque de développer un cancer colorectal est variable, et on distingue trois groupes d'individus (Figure 1) (Weitz, Koch et coll. 2005).

Le plus important rassemble environ 75 % des sujets. Ces individus ont un risque moyen estimé à 3,5 %, de développer un cancer colorectal. Le facteur de risque principal est l'âge dès que celui-ci dépasse 50 ans. Par ailleurs, ces individus ne présentent pas d'antécédent personnel ou familial.

Pour le deuxième groupe évalué entre 15 et 20 %, le niveau de risque est élevé. Celui-ci est défini comme le risque des sujets ayant des antécédents personnels d'adénome ou de cancer colorectal ou celui des sujets ayant un ou plusieurs parents du premier degré atteint d'un cancer colorectal ou présentant un adénome de plus de 1 cm. Chez ces derniers, le risque net avant 74 ans varie de 6 à 10 % selon le nombre de parents atteints et l'âge minimum de découverte de la maladie chez les apparentés. Les sujets atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (rectocolite hémorragique (RCH), maladie de Crohn) sont aussi des sujets à risque élevé en cas de pancolite. Pour ces deux pathologies les niveaux de risque sont équivalents (Itzkowitz et Harpaz 2004).

Le troisième groupe correspond aux sujets à niveau de risque très élevé, 1 individu sur 2 développant un cancer colorectal. Pour eux, le facteur de risque essentiel est l'hérédité. Ces sujets déterminent des formes précoces de cancer colorectal car ils présentent des syndromes de prédisposition génétique majeure au cancer.

Il en existe deux principaux :

- la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) qui est à l'origine d'environ 1 % des cancers colorectaux et,
- Le syndrome HNPCC ("*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*"), cancer colique héréditaire sans polypose, anciennement nommé syndrome de Lynch, qui engendre selon les études entre 5 et 10 % des cancers colorectaux.

Pour ces deux entités, les critères cliniques de suspicion sont strictement définis. Néanmoins pour le syndrome HNPCC ils ont régulièrement été modifiés, ce qui explique les disparités constatées dans les mesures d'incidence de cette pathologie. Actuellement, c'est la conférence de consensus de Bethesda II (2002) qui est en vigueur. D'autres syndromes plus rares, comme la polypose juvénile et celle de Peutz-Jeghers, prédisposent également à l'apparition précoce d'un cancer colorectal.

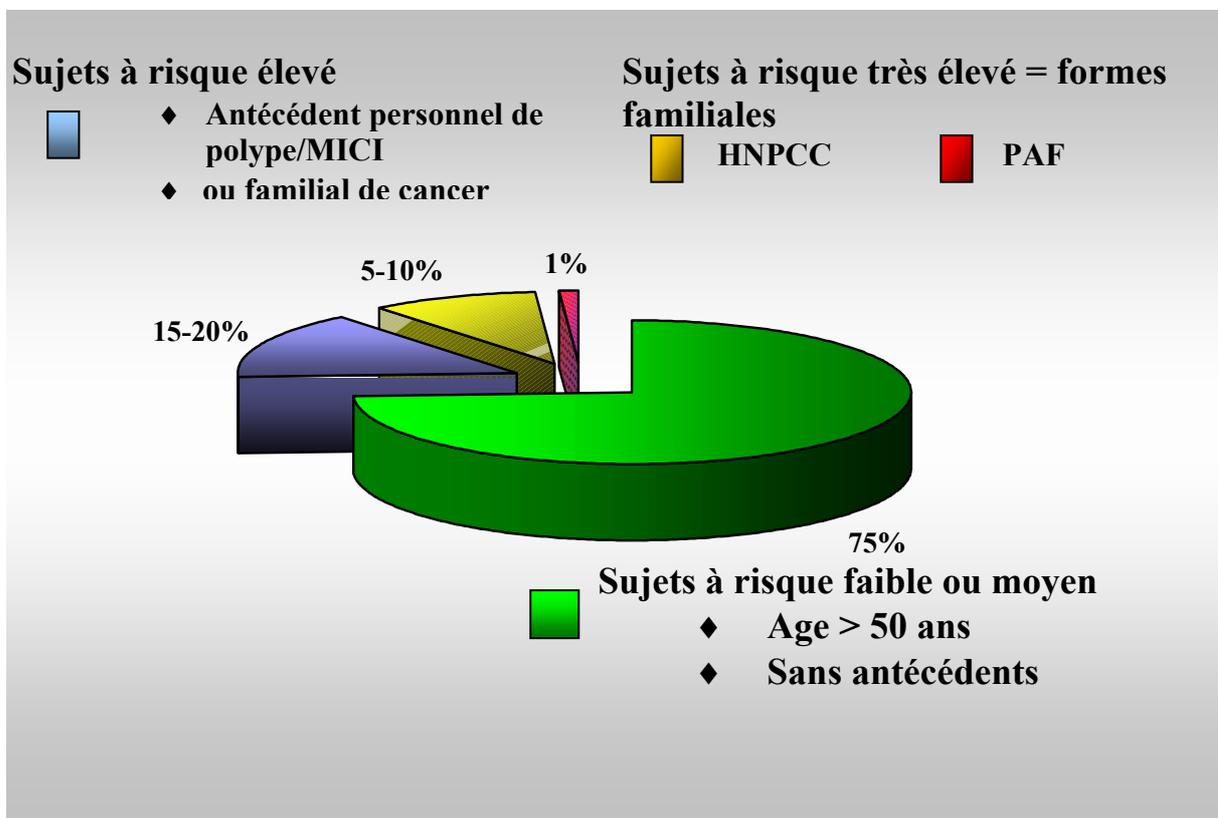


Figure 1 : Les différents groupes à risque de cancer colorectal

b – Les facteurs de risque

L'ensemble de la population est soumis à de nombreux facteurs de risques environnementaux (Tableau 1). Certains, comme la sédentarité, le surpoids et le tabagisme, sont maintenant bien corrélés à la survenue du cancer colorectal. Par contre, l'impact du régime

alimentaire n'est pas clair et fait donc l'objet d'une littérature aussi abondante que contradictoire. Néanmoins et à titre d'exemple, de grandes séries prospectives ont mis en évidence une augmentation d'1/3 du risque de cancer colorectal chez les individus consommant régulièrement au moins deux portions de viandes rouges ou de charcuterie par jour par rapport à ceux qui n'en consomment qu'une par semaine. L'impact de la consommation de volaille est nul alors que la consommation bi-hebdomadaire de poisson réduit le risque de 40 % par rapport à une seule consommation par semaine (Norat, Bingham et coll. 2005). La relation entre consommation de fibres et réduction du risque de cancer colorectal n'est pas statistiquement prouvée et, parallèlement à la réduction bien réelle du risque cardiovasculaire, seule une tendance à la diminution du risque de cancer colorectal est observée (Weitz, Koch et coll. 2005).

Au niveau préventif, le traitement au long cours par un AINS (Sulindac®) réduit le risque II après colectomie. L'aspirine est aussi utilisée mais l'effet ne devient significatif que pour des durées de traitement supérieures à 10 ans et à des doses supérieures à celles utilisées dans la prévention cardio-vasculaire. Or à ces doses, le risque d'hémorragie digestive devient bien réel (Chan, Giovannucci et coll. 2005).

En dehors des situations de risque élevé et très élevé, un dépistage de masse par la recherche, tous les 2 ans, d'un saignement occulte dans les selles et touchant au moins la moitié de la population âgée de 50 à 74 ans diminue de 15 à 20 % la mortalité par cancer colorectal. Ce dépistage en deux temps est basé sur un test de recherche rapide de sang dans les selles suivi d'une coloscopie quand le test est positif. La nécessité d'une amélioration de la spécificité de la première étape, pour réduire notamment l'impact économique des coloscopies inutiles, a conduit à rechercher de nouvelles méthodes de dépistage comme la mise en évidence d'ADN de cellules cancéreuses dans les selles (Imperiale, Ransohoff et coll. 2004).

En définitive, l'apparition d'un cancer colorectal chez un individu est la résultante d'interactions entre des facteurs génétiques et environnementaux. L'impact de ces facteurs génétiques est majeur chez les individus à risque très élevé (cancers familiaux) et modéré chez les individus à risque faible ou moyen (cancers sporadiques). La part réelle de l'hérédité reste souvent difficile à évaluer. Ainsi, dans certaines situations de forte probabilité de cancer familial, suspecté notamment sur le caractère précoce, les enquêtes familiales et génétiques restent parfois peu informatives ; illustrant par ailleurs le fait que de nombreux gènes de prédisposition restent encore inconnus à l'heure actuelle.

Cancer colorectal sporadique (88 à 94 %)

Facteurs généraux

- Age élevé
- Sexe masculin
- Cholécystectomie

Facteurs environnementaux

- Régime riche en viande et graisse, et pauvre en fibres, folates et calcium
- Sédentarité
- Obésité
- Diabète sucré
- Tabac
- Irradiation
- Alcoolisme important

Antécédents personnels de tumeurs sporadiques

- Antécédents de polype colorectal
- Antécédents de cancer colorectal
- Antécédents de cancer : grêle, endomètre, ovaire et sein

Cancer colorectal familial

Cas de cancer au premier ou deuxième degré, les critères des cancers colorectaux héréditaires n'étant pas satisfaits.

- Un cas au premier degré : risque augmenté de 2 à 3 fois,
- Deux cas ou plus au premier degré : risque augmenté de 4 à 25 fois,
- Cas index avec un âge < 45 ans : risque augmenté de 3 à 9 fois,
- Cas familiaux d'adénomes colorectaux : risque augmenté de 2 fois.

Cancer colorectal lié aux maladies inflammatoires chroniques intestinales (1 à 2 %)

- Rectocolite hémorragique
- Maladie de Crohn

Cancer colorectal héréditaire (5 à 10 %)

Syndromes polyposiques

- Polypose adénomateuse familiale (PAF)
- Syndrome de Gardner
- Syndrome de Turcot
- Polypose colique adénomateuse atténuée

Syndrome de Lynch ou **H.N.P.C.C.** : *Hereditary non polyposis colorectal cancer*

Syndromes des polyposes hamartomateuses

- Syndrome de Peutz-Jeghers
- Syndrome de Polypose juvénile
- Syndrome de Cowden

Tableau 1 : Facteurs de risque associés aux différents types de cancers colorectaux d'après Weitz et coll (Weitz, Koch et coll. 2005)

3 - Histoire naturelle de la maladie, diagnostic, pronostic et prise en charge

a - Séquence adénome cancer

Les cancers colorectaux sont dans l'immense majorité des cas des adénocarcinomes qui dérivent de cellules épithéliales appartenant aux glandes de Lieberkühn. Typiquement, le carcinome colorectal se développe à partir d'un adénome qui constitue ainsi une lésion pré-néoplasique (Jass 1988). Ces adénomes sont fréquents dans la population générale, mais la transformation maligne est heureusement un processus rare qui ne survient que dans 5 à 10 % des cas (Kronborg et Fenger 1999). La progression de l'adénome bénin vers le carcinome malin s'étale sur 10 à 15 ans et correspond à une succession de stades histologiques bien décrits (Muto, Bussey et coll. 1975). Cette progression tumorale a été dénommée "séquence adénome cancer" (Vogelstein, Fearon et coll. 1988). Les cryptes aberrants constituent les premières lésions se développant au dépend de l'épithélium colique. Puis, ces foyers cryptiques s'associent pour former un adénome sur lequel pourra se développer l'adénocarcinome (Figure 2).

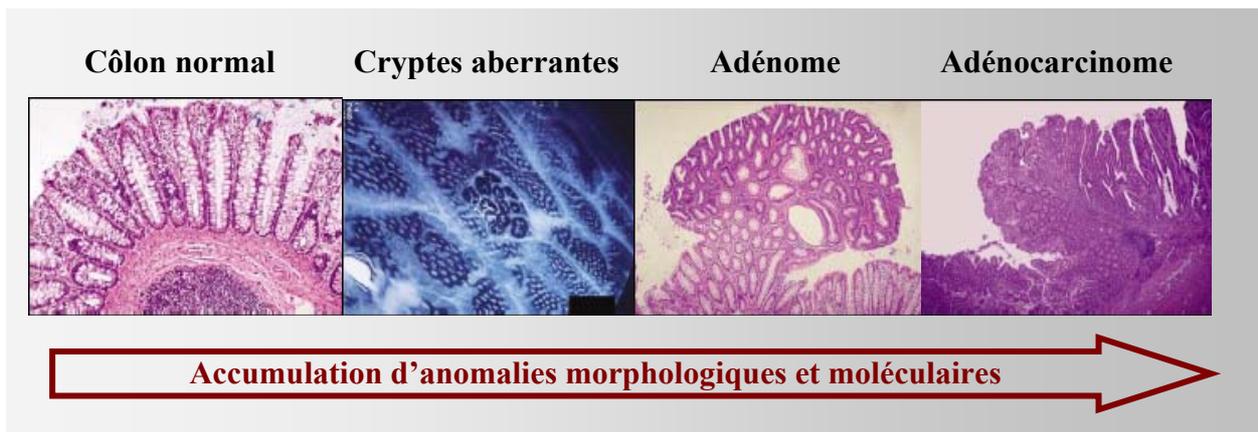


Figure 2 : Aspects histologiques dans la séquence adénome cancer

b - Aspects anatomopathologiques

➤ Les polypes

Le polype adénomateux est la lésion initiale de la séquence adénome cancer. Cependant, il existe de nombreux types histologiques de polypes qu'il est nécessaire de différencier afin d'en préciser le potentiel oncologique. Par définition, le polype est une masse tumorale bénigne qui se développe sur la muqueuse et fait protrusion dans la lumière du tube digestif. Au niveau architectural, il se présente initialement comme une lésion sessile et habituellement, du fait de la traction, le polype devient pédiculé. Toutefois, certains restent sessiles. L'observation d'un aspect plan est plus rare et sa visualisation endoscopique est ardue. D'autre part, une polypose se définit

par la présence d'un important contingent de polypes par opposition au polype solitaire. Les polyposes massives, en nombre supérieur à 100, évoquent le diagnostic de syndrome polyposique familial dont le plus fréquent est la polypose adénomateuse familiale (PAF) (Figure 3).

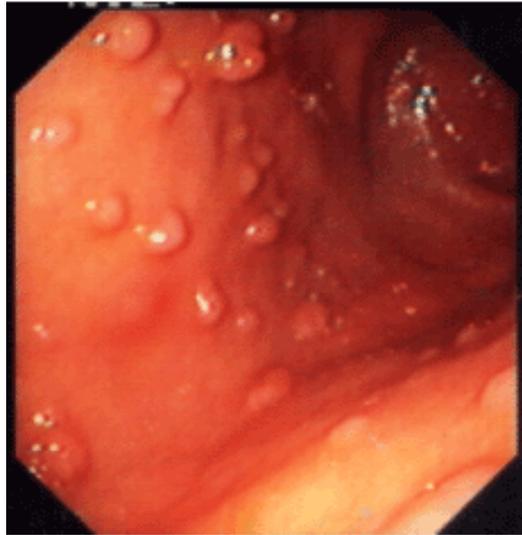


Figure 3 : Cliché endoscopique colique d'un patient atteint de polypose adénomateuse familiale

Le seul aspect endoscopique d'un polype ne permet pas de l'identifier, ni d'évaluer sa capacité à dégénérer. L'exérèse puis l'examen anatomopathologique qui suit, sont donc cruciaux pour différencier les lésions entre elles.

Les polypes peuvent être classés en deux groupes en fonction de leur potentiel de progression vers l'adénocarcinome. Le groupe le plus important (90 %) correspond aux polypes non néoplasiques réputés comme n'évoluant pas vers l'adénocarcinome. Le deuxième groupe est celui des polypes adénomateux qui constituent, à l'inverse, d'authentiques néoplasies susceptibles de dégénérer (Figure 4).

Le premier groupe, majoritaire et hétérogène, rassemble les lésions non néoplasiques sans potentiel évolutif. La plus fréquente est le polype hyperplasique, identifié dans 30 % des pièces d'exérèse. Il correspond à un allongement des cryptes glandulaires dont la lumière prend un aspect festonné (en étoile). Les colonocytes ne sont pas dysplasiques et la localisation est essentiellement recto-sigmoïdale. Si le polype hyperplasique solitaire ne dégénère pas, en revanche, au cours de la polypose hyperplasique (syndrome familial rare), le risque de développement tumoral est évalué à 50 % (Hyman, Anderson et coll. 2004).

Viennent ensuite, les rares polypes hamartomateux qui, lorsqu'ils sont isolés, restent bénins. Un hamartome est une structure anarchique histologiquement, constituée de cellules normales. Le plus fréquent est le polype juvénile formé de tubes kystiques développés dans un chorion souvent inflammatoire. Néanmoins ces hamartomes se rencontrent parfois dans le cadre de polyposes familiales rares pour lesquelles le risque de développement d'un adénocarcinome est alors élevé et non restreint au cadre colique (Benamouzig, Chaussade et coll. 2005). Enfin, le pseudopolype inflammatoire, formé de muqueuse et de tissu de granulation, représente un îlot résiduel isolé non néoplasique. Il apparaît après cicatrisation d'ulcérations de RCH (rectocolite hémorragique) ou de maladie de Crohn.

Le deuxième groupe rassemblant les lésions potentiellement dégénératives, est surtout représenté par le polype adénomateux ou adénome (Figure 4). La prévalence des adénomes est élevée, augmentant avec l'âge : de 10 % à 40 ans elle atteint 30 % à 65 ans.

La classification OMS distingue 3 variétés d'architecture glandulaire. Par ordre décroissant de fréquence, sont décrits :

- les adénomes tubuleux (90 à 95 %),
- les adénomes vilieux (5 à 10 %) et,
- les adénomes tubulo-vilieux (1 %).

La dysplasie ou anomalie de la différenciation des cellules s'installe avant le stade de l'adénocarcinome. Elle peut-être de bas ou de haut grade. Le degré de dysplasie est précisé sur les aspects architecturaux, cytologiques et nucléaires des colonocytes composant l'adénome.

Plus rares et de description récente, les adénomes branchés ou "serrated" constituent également des lésions précancéreuses Ils correspondent histologiquement à des polypes hyperplasiques présentant à la fois l'aspect festonné caractéristique du genre mais également des zones dysplasiques témoignant du caractère prénéoplasique de la lésion (Longacre et Fenoglio-Preiser 1990).

Ces dernières découvertes remettent en cause l'habituelle classification dichotomique des polypes (Figure 4), puisque sur des structures comme celle du polype hyperplasique, considérées comme bénignes, peuvent se greffer des foyers adénomateux capable d'évoluer vers l'adénocarcinome colique.

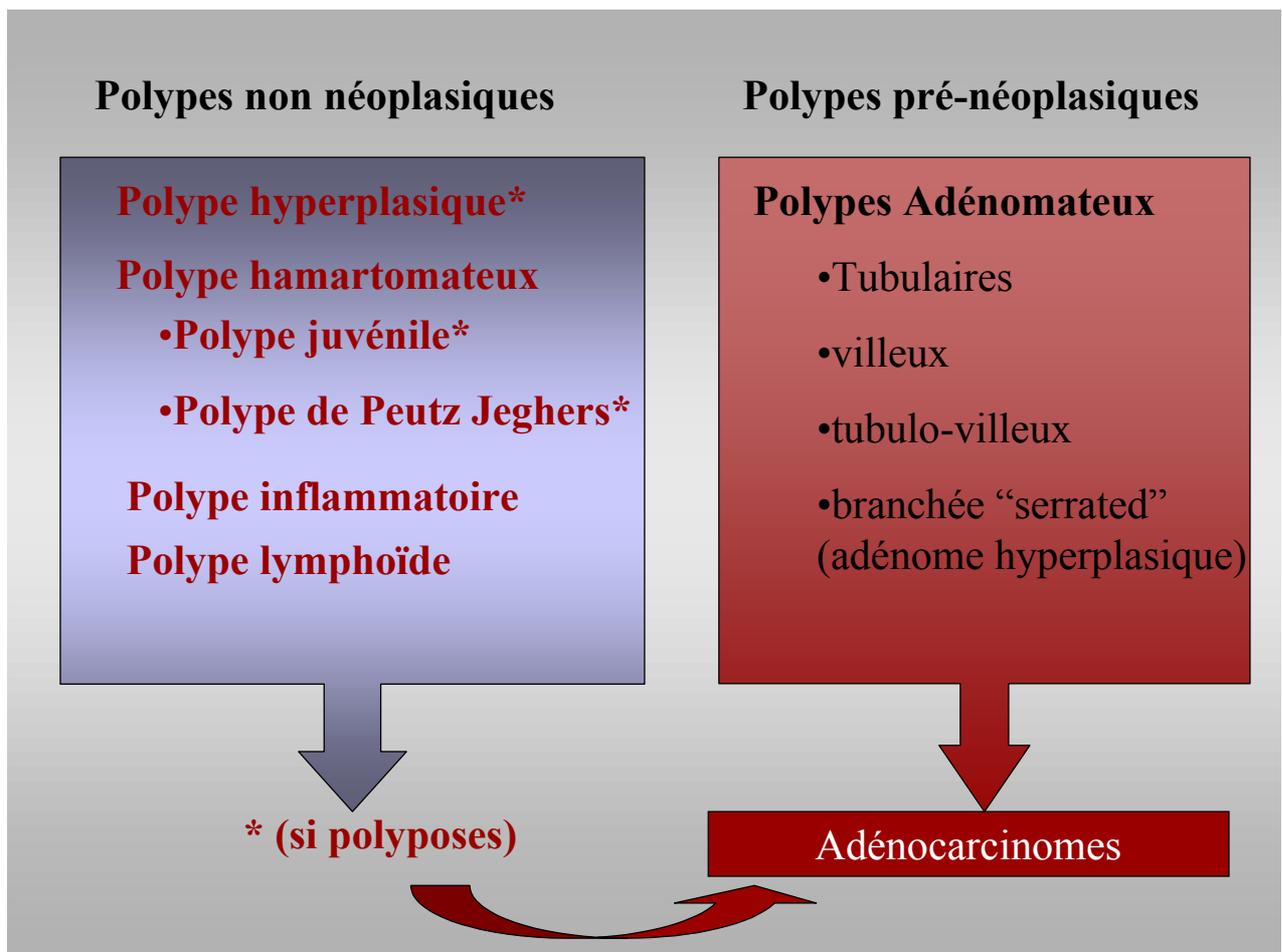


Figure 4 : Les différents polypes coliques

➤ **Du polype vers l'adénocarcinome**

Le potentiel de malignité d'un polype adénomateux est corrélé à trois facteurs indépendants : la taille du polype, la proportion du contingent vilieux et enfin le degré de dysplasie. C'est ainsi que la malignité est rarissime (0,3 %) dans un adénome de moins de 1 cm. Sur 1000 adénomes, 100 atteindront la taille de 1 cm et seulement 25 se transformeront, dans un délai de 10 à 20 ans, en cancer. La présence de foyers cancéreux dans un adénome est de l'ordre de 1 % dans les adénomes tubuleux, de 12 % dans les adénomes tubulo-villeux et de 15 % dans les adénomes vilieux. (Winawer, Zauber et coll. 1992).

Après le stade adénome se succèdent des phases de croissance et de progression vers le carcinome *in situ*. Une fois constituée, cette tumeur encore localisée mais à fort potentiel invasif, infiltre la paroi colique en pénétrant la membrane basale de l'épithélium, c'est le stade de carcinome intrapariétal.

➤ L'adénocarcinome

La plus fréquente des formes histologiques du cancer colorectal est l'adénocarcinome lieberkühnien plus ou moins différencié. Il est identifié dans près de 90 à 95 % des tumeurs. Ce stade est défini par la rupture de la membrane basale associée à une diffusion dans l'espace sous-jacent. La localisation est variable : caecum et côlon ascendant (38 % des cas), côlon transverse (18 %) et rectosigmoïdale (44 %). Une fois sur cent les lésions sont multiples (Lawrence, Menck et coll. 1995).

Le niveau de différenciation est variable. Les cellules des adénocarcinomes très différenciés peuvent se disposer en acinus ou en tubes glandulaires d'aspects très proches de ceux d'une glande normale. Dans les tumeurs modérément différenciées les cellules sont groupées en lobules creusés de multiples cavités. Dans les carcinomes peu différenciés les cellules sont isolées ou groupées en lobules pleins ou en travées. En dehors de cette différenciation morphologique, il peut exister une différenciation fonctionnelle. L'exemple le plus démonstratif est celui de la sécrétion de mucus. Cette différenciation mucineuse ou colloïdale représente environ 17 % des adénocarcinomes. Elle est définie, sur coupe, par la présence de mucus dans plus de 50 % du volume tumoral (classification OMS 2000). Ces différents niveaux de différenciation, morphologique et fonctionnelle, n'ont pas de lien entre eux. Ainsi, un adénocarcinome tubulaire bien différencié peut être non sécrétant. A l'inverse, un carcinome très peu différencié peut être constitué de cellules mucosécrétantes.

Après l'envahissement de la paroi, l'adénocarcinome colonise les tissus adjacents. Autour de la tumeur le tissu normal réagit en formant le stroma. Celui-ci est en remaniement permanent afin d'assurer le soutien et la nutrition tumorale. S'y associe le processus indispensable d'angiogénèse qui correspond à la formation de néovaisseaux à partir du réseau vasculaire existant. L'apparition de foyers de nécrose tumorale témoigne d'une réaction stromale inadaptée face à la rapidité de la croissance néoplasique.

A la phase de dissémination, la formation de métastases constitue le dernier stade de progression. Dans un premier temps les métastases sont localisées aux ganglions adjacents puis les cellules cancéreuses gagnent par voie sanguine ou lymphatique des ganglions ou des organes à distance. Les organes cibles sont le foie, les surrénales et les poumons.

c - Le diagnostic

L'exploration par coloscopie est l'étape clé du diagnostic. Elle permet de visualiser les lésions et de réaliser au besoin une ou plusieurs polypectomies. A l'analyse de la biopsie, la tumeur est identifiée et selon le résultat une résection colique peut être envisagée. Au stade de l'adénocarcinome, l'envahissement pariétal est évalué sur le fragment réséqué chirurgicalement. L'échographie, le scanner et l'IRM permettent d'apprécier d'une part l'extension tumorale locale au niveau des tissus péri-tumoraux et des ganglions, puis d'autre part de rechercher des métastases hépatiques et pulmonaires pour les deux localisations les plus fréquentes. Aujourd'hui, 30 à 40 % des tumeurs coliques sont diagnostiquées à ce stade ultime.

La classification histopathologique de l'OMS pT.N.M. « Pathology Tumor, Node, Metastasis » décrivant le stade d'extension anatomique au diagnostic est très utilisée en pratique clinique. Elle est déterminante pour orienter la conduite thérapeutique. Elle est basée sur l'association de 3 critères évalués semi-quantitativement : l'étendue de l'envahissement pariétal : T (*in situ* et de 0 à 4), l'évaluation de la colonisation des ganglions par l'adénocarcinome : N (0, 1 ou 2), la présence de métastases : M (0 ou 1) (Tableau 2). Notons que la classification anatomopathologique établie par Dukes dans les années 30 s'est révélée insuffisante en terme pronostique car ne distinguant que 4 stades (Tableau 3).

<p>T : Tumeur primitive</p> <ul style="list-style-type: none">➤ T0 : pas de signe de tumeur primitive➤ Tis : carcinome <i>in situ</i> intra-muqueux➤ T1 : atteinte sous-muqueuse➤ T2 : atteinte musculuse➤ T3 : atteinte sous-séreuse➤ T4 : séreuse ou organe de voisinage <p>N : Adénopathies régionales</p> <ul style="list-style-type: none">➤ N0 : pas de métastase ganglionnaire➤ N1 : 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux envahis➤ N2 : 4 ou plus ganglions lymphatiques régionaux envahis <p>M : Métastases à distance</p> <ul style="list-style-type: none">➤ M0 : pas de métastase à distance➤ M1 : Présence de métastase(s) à distance
--

Tableau 2 : Classification TNM des tumeurs malignes d'après Sobin et coll (Sobin 2003)

d – Le pronostic

Pour les cancers localisés à l'organe, après résection à visée curative, le taux de survie à 5 ans est essentiellement fonction du stade TNM observé au diagnostic. Aux stades localisés à l'épithélium, la survie varie entre 85 et 90 % (stade I). Selon l'absence (stade II) ou la présence (stade III) d'un envahissement ganglionnaire, la survie à 5 ans chute de 70 à 40-50 % (Tableau 3).

Les cancers colorectaux métastatiques (stade IV) sont de pronostic très péjoratif, la survie médiane spontanée est de 6 mois. Après traitement, elle passe à 15-20 mois, mais la survie à 5 ans est statistiquement nulle.

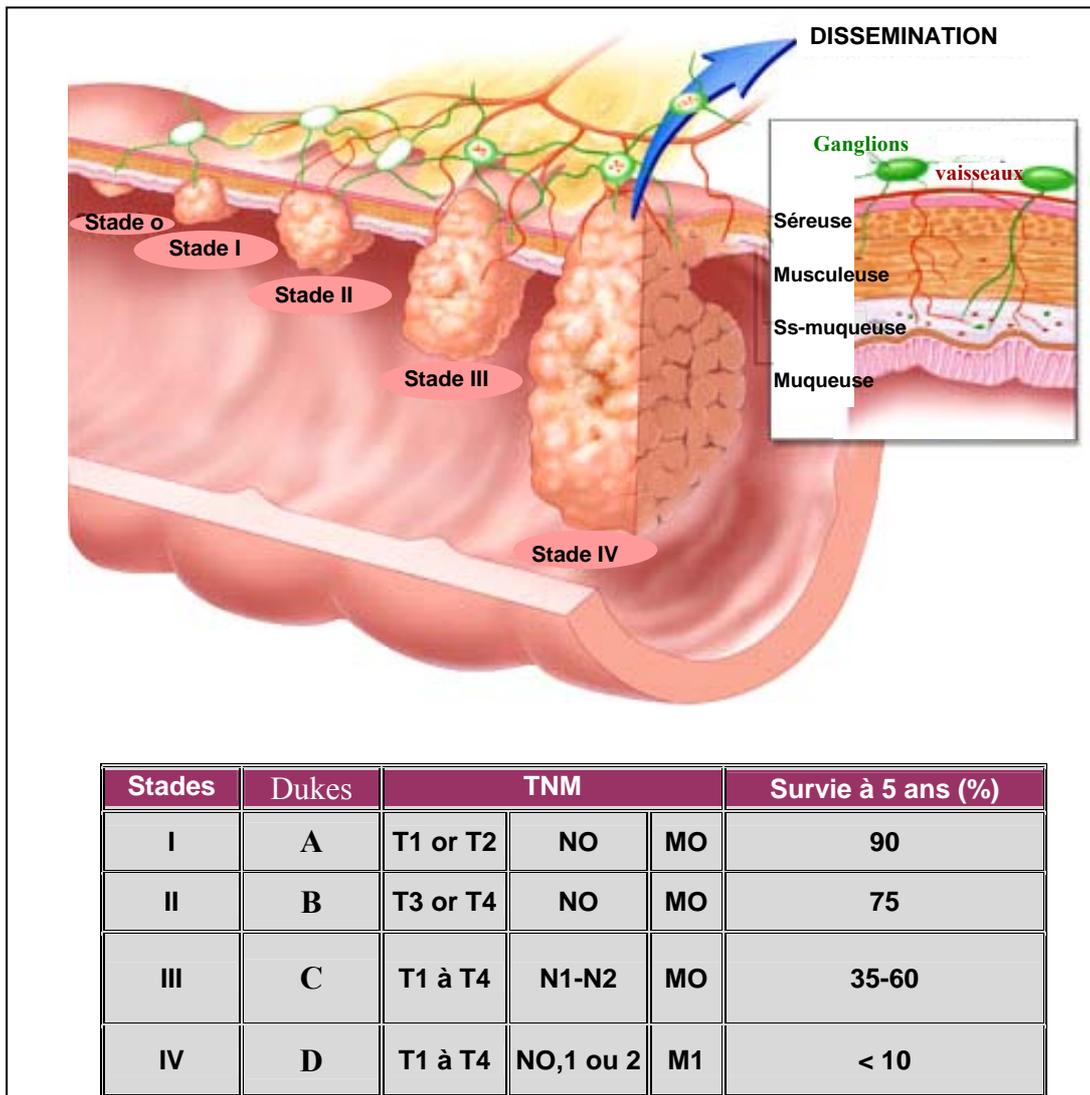


Tableau 3 : Cancer colorectal : Stades et Classifications (Dukes et TNM)

D'après Jemal et coll (Jemal, Thomas et coll. 2002)

e –La prise en charge

Le choix du traitement dépend du stade observé au diagnostic. Les tumeurs bénignes ou en voie de transformation subissent une simple exérèse par voie endoscopique. Au stade d'envahissement pariétal limité à l'organe, la colectomie curative est pratiquée. Elle est accompagnée ou non d'une chimiothérapie adjuvante selon le statut ganglionnaire observé sur la pièce de résection (Stade II ou III). Par contre, la présence de métastase requiert d'emblée une chimiothérapie.

Le traitement classique de première ligne est l'association 5-fluorouracile (5FU) + acide folinique auquel on ajoute l'oxaliplatine (Eloxatine®) ou l'irinotecan (campto®), pour une amélioration de la réponse. Depuis peu, l'anti-EGFR cetuximab (Erbitux®) et l'anti-VEGF bevacizumab (Avastin®), anticorps chimériques produits de la biothérapie, ont leur AMM pour le traitement en première intention des tumeurs métastatiques. Dans 25 % des cas, ils permettent de rendre à nouveau sensibles à la chimiothérapie classique ces formes agressives (Cunningham, Humblet et coll. 2004; Hurwitz, Fehrenbacher et coll. 2004). La radiothérapie peropératoire est systématiquement utilisée dans les cancers à localisation rectale (environ 40 % des cas), où l'abord chirurgical plus complexe rend le geste souvent moins efficace.

Cependant le pronostic du cancer colorectal est parfois mis en défaut. Ainsi, certains patients atteints de métastases ganglionnaires au diagnostic (stade III) répondent bien au traitement et guérissent. A l'inverse, certains cancers découverts en stade II présentent un profil particulièrement redoutable avec récurrence précoce et résistance au traitement (Watanabe, Wu et coll. 2001).

Dans ces conditions, les seuls critères histopathologiques apparaissent insuffisants. La recherche de nouveaux critères pronostiques est donc devenue incontournable. L'amélioration des connaissances sur la génétique et les aspects moléculaires des cancers colorectaux, *via* la description des voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse, s'inscrit dans cette volonté. L'intérêt essentiel étant de déterminer des facteurs de bon ou de mauvais pronostiques afin d'améliorer la prise en charge des patients (Zhou, Goodman et coll. 2002).

B - ASPECTS GÉNÉTIQUES ET MOLECULAIRES DU CANCER COLORECTAL

Le cancer est une maladie du fonctionnement des cellules qui perdent progressivement le contrôle de leur prolifération, deviennent immortelles et se développent de manière anarchique dans l'organisme. Le point de départ est l'altération du matériel génétique d'une cellule. Toutes les mutations ne sont toutefois pas susceptibles d'engendrer la formation d'un cancer. Un des gènes qui régulent les processus vitaux de la cellule doit être altéré : division, apoptose, différenciation ou réparation. De plus, une seule mutation n'est pas suffisante pour transformer une cellule saine en cellule cancéreuse. Le cancer résulte donc d'une succession d'accidents génétiques. Selon le type de cancer, la nature des altérations et l'ordre de leur survenue varient. Pour le cancer du côlon notamment, plusieurs voies de carcinogenèse sont décrites.

Dans le cancer colorectal, la majorité des altérations moléculaires sont acquises et l'anomalie génétique initiale apparaît dans une seule cellule qui ne la transmet qu'à ses descendantes. Ce processus génétique est sporadique et donne naissance à plus de 75 % des cancers colorectaux.

Dans les cas de transmission familiale, les mutations sont présentes au niveau de la lignée germinale. L'anomalie est transmise des parents aux enfants par les gamètes et le cancer se développe précocement puisque le *quota* de mutations nécessaire à la transformation est atteint plus rapidement. 5 à 10 % des cancers colorectaux sont diagnostiqués dans le cadre de prédispositions majeures. En dehors des mutations *de novo*, l'histoire familiale est typique avec un mode de transmission autosomique dominant et une pénétrance élevée. Les deux formes principales sont le syndrome HNPCC et la polypose adénomateuse familiale (PAF) (Lynch et de la Chapelle 2003).

Ces syndromes de prédisposition sont essentiels car ils constituent un matériel de choix pour mettre en lumière les déterminismes moléculaires de la cancérogenèse colorectale. Ainsi ont-ils permis de découvrir puis de comprendre les deux mécanismes principaux de la carcinogenèse colorectale sporadique : l'instabilité chromosomique et l'instabilité génétique dont les paradigmes respectifs sont la PAF et le syndrome HNPCC (Kinzler et Vogelstein 1996). Néanmoins, si les mécanismes de carcinogenèse diffèrent clairement, les voies de signalisation impliquées dans la transformation maligne des cellules épithéliales coliques semblent interagir pour parfois se confondre dans ces deux mécanismes de carcinogenèse (Lievre et Laurent-Puig 2004).

Enfin, dans 20 % des cas et en excluant les maladies inflammatoires intestinales, le cancer se développe sur un terrain pour lequel une prédisposition est évoquée devant la précocité et la multiplicité des lésions. Ces situations cliniques n'obéissent pas aux critères stricts des cancers

colorectaux héréditaires et constituent un groupe à part dont les contours sont flous. En effet, dans ces cas, l'épidémiologie génétique suggère plutôt des modes de transmission au moins récessifs, sinon oligogéniques, voire multigéniques, de prédispositions encore méconnues au plan moléculaire. On pourra d'ailleurs s'attendre à ce que ces gènes, une fois identifiés, ne soient individuellement associés qu'à une élévation modérée du risque tumoral. En outre, dans ces formes multigéniques, les interactions environnementales ne peuvent être négligées (Houlston et Peto 2004).

1 – Le processus cancéreux

a - Chronologie

Le processus cancéreux traduit une accumulation favorable d'altérations génétiques. Le développement d'un cancer colorectal, de l'adénome au carcinome, s'étend sur plusieurs dizaines d'années. C'est donc un phénomène lent. Toutefois, lorsque des altérations génétiques constitutionnelles sont présentes, un raccourcissement net du processus cumulatif est observé.

Ces accumulations sont heureusement le plus souvent délétères pour la cellule modifiée qui entre alors en apoptose et meurt. Rarement, à la faveur d'événements génétiques conférant un avantage sélectif, la cellule néoplasique prolifère et constitue sur plusieurs générations quelques clones. Puis un clone tumoral est sélectionné, devient majoritaire, et développe alors un phénotype caractérisé par une autonomisation progressive de la croissance cellulaire, une résistance à l'apoptose, une prolifération illimitée, une stimulation de l'angiogénèse et enfin des propriétés invasives et métastatiques (Hahn et Weinberg 2002).

La carcinogénèse colorectale peut emprunter deux voies principales dont les mécanismes sont bien caractérisés :

- ❖ **la voie LOH associée au mécanisme d'instabilité chromosomique CIN ("Chromosomal INstability")** qui est la plus fréquente (85 %) et,
- ❖ la voie alternative (15 %) qui est caractérisée par une **instabilité microsatellitaire ou MSI ("MicroSatellite Instability")** objectivant le mécanisme d'instabilité génétique nucléotidique sous-jacent.

Par définition, les tumeurs stables du point de vue microsatellitaire peuvent être dénommées MSS ("MicroSatellite Stability"), les tumeurs CIN sont donc des tumeurs MSS.

De nombreuses altérations génétiques sont mises en évidence dans chacune des deux voies. Cependant de manière générale, les gènes altérés au cours des processus aboutissant au cancer colorectal sont de trois types : les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes impliqués dans la stabilité de l'ADN.

b - Les proto-oncogènes

Les proto-oncogènes sont des gènes dont les produits interviennent dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Ce sont des gènes qui codent essentiellement pour des facteurs de croissance ou leurs récepteurs, des transducteurs du signal ou des régulateurs du cycle cellulaire. Ainsi, de l'activation aberrante de ces gènes résulte une prolifération cellulaire incontrôlée. L'activation d'un proto-oncogène est générée par une mutation ponctuelle ou par une amplification génique ou bien encore par une translocation chromosomique (Hahn et Weinberg 2002).

L'expression des proto-oncogènes est dominante. De fait, un seul événement moléculaire sur un allèle est suffisant pour induire la transformation du proto-oncogène en oncogène entraînant une prolifération cellulaire intense. Environ cent proto-oncogènes ont été décrits : *K-ras*, *c-myc*, *c-src*... Dans les cancers colorectaux, c'est l'oncogène *K-ras* qui est le plus fréquemment muté (Fearon et Vogelstein 1990).

c - Les gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs régulent négativement la prolifération cellulaire et sont dénommés "gatekeepers genes" (Weinberg 1991). Leurs produits sont des facteurs de transcription ou des inhibiteurs de certaines voies d'activation cellulaire. Ce sont parfois des acteurs clé de l'apoptose comme la protéine p53.

Il est couramment admis que le développement d'un processus cancéreux nécessite l'inactivation d'un ou de plusieurs gènes suppresseurs de tumeur. Selon le modèle de Knudson, cette inactivation résulte de deux événements moléculaires touchant respectivement l'un puis l'autre allèle, l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs étant récessive. De nombreux gènes suppresseurs de tumeurs sont impliqués dans des cancers héréditaires. Dans les cancers coliques sporadiques, le gène *APC* est le gène le plus fréquemment altéré. Généralement, il subit une mutation inactivatrice sur un premier allèle tandis que le deuxième est inactivé par délétion entraînant une perte d'hétérozygotie.

d - Les gènes de réparation des erreurs de l'ADN

Les erreurs commises par l'ADN polymérase lors de la réplication doivent être identifiées puis réparées afin de conserver l'intégrité du génome. Il existe plusieurs systèmes de réparation de l'ADN. Les produits des gènes MMR ("mismatch repair gene") corrigent spécifiquement les mésappariements en reconnaissant puis en réparant l'ADN endommagé. Ils sont dénommés "caretakers genes". L'inactivation d'un, et *a fortiori*, des deux allèles d'un gène MMR conduit à une augmentation du taux de mutation équivalente à une importante exposition à des agents mutagènes. Ces mutations secondaires sont particulièrement fréquentes au niveau des séquences répétées, difficiles à répliquer par l'ADN polymérase. Les doublets CA sont les habituelles cibles de ce phénomène. Or ces répétitions, appelées microsatellites, sont retrouvées à plusieurs milliers d'exemplaires réparties sur l'ensemble du génome (Thibodeau, Bren et coll. 1993). Donc, lorsque ces mutations touchent des gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, un processus néoplasique peut s'initier. Ces gènes MMR sont parfois considérés comme suppresseurs de tumeurs puisqu'ils peuvent déterminer un processus de cancérogenèse par perte de fonction.

Les altérations des gènes MMR sont intimement associées à la voie de carcinogenèse colorectale d'instabilité génétique ou voie MSI. Dans les cancers colorectaux sporadiques développant le phénotype MSI, c'est l'expression du gène MMR *hMLH-1* (human mutL homologue 1) qui est déficiente. Cette inactivation résulte le plus souvent de l'hyperméthylation du promoteur (Kinzler et Vogelstein 1996). Dans le syndrome HNPCC, cancer colorectal héréditaire sans polypose, au moins une mutation germinale est retrouvée dans la séquence d'au moins un gène MMR. Dans ce contexte, *hMSH-2* (human mutS homologue 2) et *hMLH-1* sont les deux gènes MMR les plus fréquemment altérés (Soreide, Janssen et coll. 2006).

Par ailleurs, le gène *MYH* (mutY human homologue) code aussi pour une protéine impliquée dans un mécanisme particulier de réparation de l'ADN. Celui-ci permet de corriger les mutations ponctuelles, liées à des agressions oxydatives, par un dispositif d'excision de base (BER). Son inactivation bi-allélique est responsable d'un phénotype LOH pour le moins paradoxal compte tenu de la fonction de réparation du gène MYH pour laquelle on attend plutôt le développement d'un phénotype MSI. Ceci nous démontre que l'inactivation de gènes possédant la même fonction peut induire des phénotypes cancéreux aussi éloignés l'un de l'autre que ceux des voies MSI et LOH.

e – Mécanismes génétiques impliqués : voies LOH, MSI et CIMP

Kinzler et Vogelstein ont démontré que l'initiation puis la progression tumorale nécessitent au moins 7 événements génétiques somatiques avant le stade du carcinome. Les analyses cytogénétiques révèlent que les cellules tumorales subissent des pertes ou des gains de fragments chromosomiques. Les pertes sont plus fréquentes avec des délétions des bras chromosomiques 1p et 8p et des pertes d'hétérozygotie touchant les régions 17p et 18q (Vogelstein, Fearon et coll. 1988). On retrouve dans ces régions des gènes suppresseurs de tumeurs, comme *APC* et *p53*. Des caractérisations moléculaires réalisées aux différentes étapes de la séquence adénome carcinome, indiquent que certaines des modifications génétiques sont associées à des stades histopathologiques précis. Cette observation suggère que l'ordre dans lequel s'accumule les anomalies est essentiel. L'ensemble de ces données anatomopathologiques et génétiques a permis à ces auteurs de proposer un modèle génétique au développement du cancer colorectal (Fearon et Vogelstein 1990) (Kinzler et Vogelstein 1996).

D'autre part, l'étude précise de cette séquence a mis en lumière deux mécanismes moléculaires principaux de carcinogénèse. Les anomalies génétiques décrites sont communes aux cancers sporadiques et aux cancers colorectaux à prédispositions héréditaires (cancers familiaux). Dans le mécanisme d'instabilité chromosomique CIN associé au phénotype LOH, les délétions sont les altérations les plus fréquentes et sont responsables de perte d'hétérozygotie. Le mécanisme d'instabilité génétique associé au phénotype d'instabilité microsatellitaire MSI engendre essentiellement des altérations localisées aux microsatellites, induisant par exemple des mutations décalant le cadre de lecture.

La dynamique moléculaire de la séquence adénome-cancer diffère en fonction du type de voie empruntée, LOH ou MSI (Figure 5). L'anomalie génétique la plus précoce est une mutation du gène suppresseur de tumeur *APC* pour LOH, ou une mutation stabilisatrice de la β caténine pour MSI. L'altération du gène *K-ras* (50 % des cancers sporadiques) est contemporaine de la croissance adénomateuse dans la voie LOH. Les pertes d'hétérozygotie, concernant le chromosome 18 (comprenant notamment le gène *DCC* ("Deleted in Colorectal Carcinoma"), surviennent plus tardivement lors de la transformation de l'adénome en carcinome. Les mutations du gène *p53* (50 % des cancers colorectaux sporadiques) marquent la transition de l'adénome vers le cancer, et sont clairement impliquées dans les dernières étapes de la carcinogénèse colorectale de la voie LOH. Dans le phénotype MSI, alors que les mutations de *p53* et de *K-ras* sont rares, la fréquence des altérations du gène codant pour le TGF β -RII est particulièrement élevée aux stades tardifs.

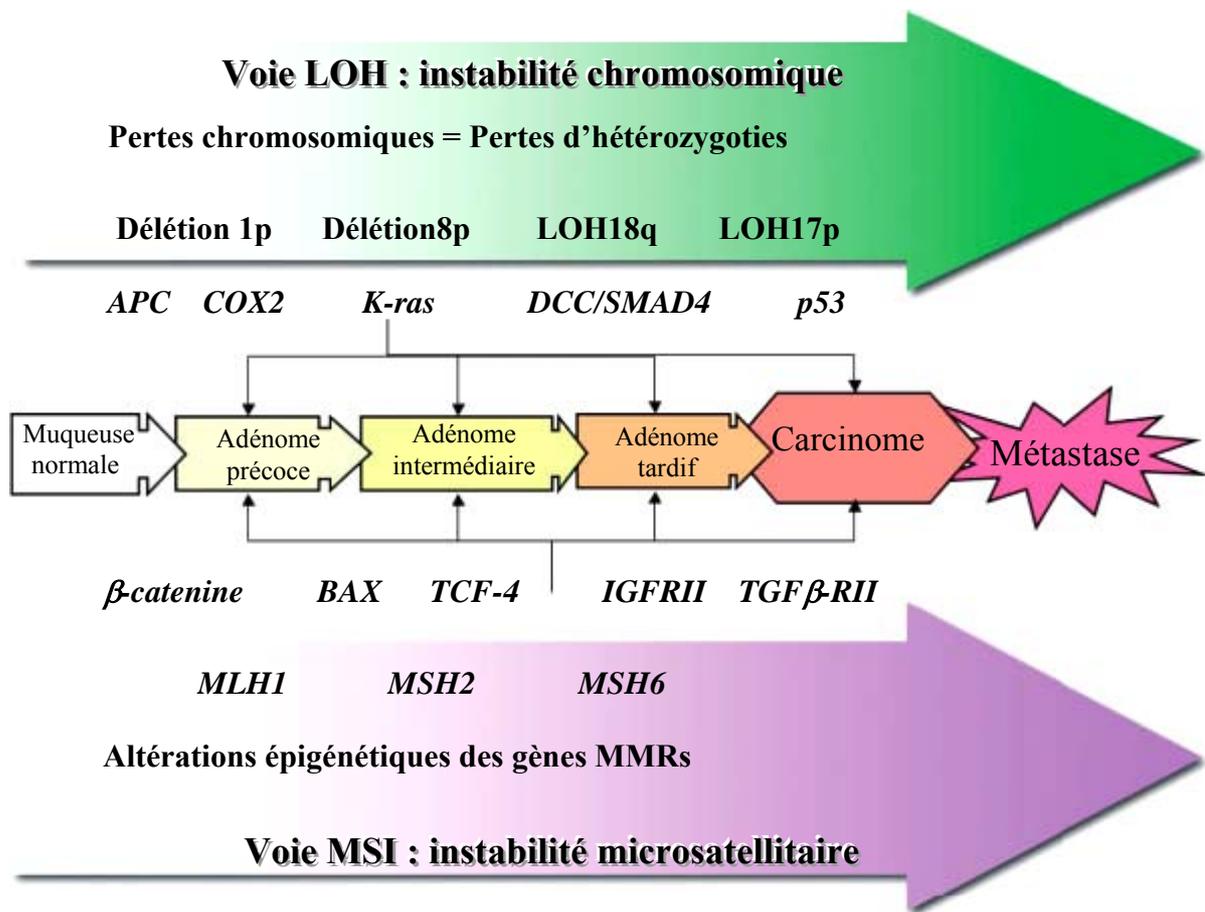


Figure 5 : Caractéristiques moléculaires des deux phénotypes de cancers colorectaux sporadiques d'après Søreide et coll (Soreide, Janssen et coll. 2006)

Un troisième mécanisme a récemment été décrit. Il correspond à des tumeurs présentant un profil d'hyperméthylation aberrante qui touche de nombreux gènes déterminant un phénotype particulier dénommé CIMP pour "CpG Island Methylator Phenotype". Les caractéristiques cliniques et épidémiologiques de cette entité sont particulières : âge avancé, sexe féminin, localisation proximale, mutations fréquentes de *Braf*, rares altérations de *p53*, lésions spécifiques à type d'adénome festonné et fréquence importante de tumeurs mucineuses peu différenciées (Samowitz, Albertsen et coll. 2005).

Par la suite, la description séparée de ces mécanismes répond plus à un souci de clarté didactique qu'à la réalité complexe de la carcinogenèse colorectale. En effet d'une part, ces mécanismes pathogéniques sont souvent intriqués (exemple de l'instabilité génétique et de l'hyperméthylation) et d'autre part, les voies de signalisation altérées sont au moins connectées sinon identiques dans les deux voies canoniques de la carcinogenèse colorectale qui sont associées aux phénotypes LOH et MSI.

2 – Acteurs et voies de signalisation intracellulaires impliquées

a - Cancers colorectaux associés au mécanisme d'instabilités chromosomiques CIN

"Chromosomal Instability" : voie LOH

Environ 80 à 85 % des cancers colorectaux sporadiques présentent une instabilité chromosomique qui se caractérise par des gains ou des pertes de tout ou partie de chromosome au cours de la division cellulaire. Ce mécanisme est à l'origine d'une augmentation de fréquence du phénomène de perte d'hétérozygotie LOH, mécanisme impliqué dans l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Les altérations les plus fréquentes sont des pertes alléliques récurrentes localisées sur les bras courts des chromosomes 1,8 et 17 et sur les bras longs des chromosomes 5, 18, et 22. D'autre part, l'hyperploïdie est une autre caractéristique des adénocarcinomes CIN. Cette augmentation paradoxale de matériel génétique est une réponse aux pertes d'ADN que subissent les cellules anormales et c'est le mécanisme d'endomitose qui permet à la cellule d'augmenter son ADN. Ces cellules cancéreuses possèdent donc plus de 2n chromosomes.

Les pertes d'hétérozygotie qui caractérisent le phénotype LOH peuvent porter sur un ou plusieurs locus. Si la perte allélique concerne un gène suppresseur de tumeur, l'altération de l'allèle résiduel conduit à une situation d'invalidation génique délétère. Effectivement, dans le phénotype LOH, ces pertes alléliques sont associées à des mutations de l'allèle résiduel de gènes suppresseurs de tumeur.

Les mutations les plus fréquentes touchent les gènes *APC* et *P53*, localisés respectivement sur les chromosomes 5 et 17. Pour les autres chromosomes cités : 8,18 et 22, aucun gène suppresseur *stricto sensu* n'a encore été caractérisé, mais certains gènes candidats ont été décrits *Smad2/Smad4* ou encore *TIMP3* localisé sur le bras court du chromosome 22.

L'acquisition des altérations génétiques de la voie LOH obéit à une cinétique relativement constante et bien décrite (Figure 5). L'étape initiale de la voie LOH semble être la perte de la région 5q qui engendre l'inactivation du gène *APC* et l'apparition d'un adénome. Secondairement, des mutations activatrices du gène *K-Ras* apparaissent et favorisent la croissance tumorale. Enfin, la perte de fonction de *p53* est l'évènement qui fait évoluer la tumeur vers les stades invasifs et *in fine* métastatiques.

➤ **Gène APC "adenomatosis polyposis coli" et voie WNT**

○ **Gène et structure de la protéine**

APC est un des acteurs principaux de la carcinogenèse colorectale, puisqu'environ 80 % des tumeurs sporadiques présentent un gène APC altéré. Par ailleurs, des mutations germinales d'APC sont à l'origine de la polypose adénomateuse familiale.

Le gène est localisé sur le bras long du chromosome 5 (5q21). Formé de 15 exons, il occupe environ 150 kb, le dernier exon représente plus de 75 % de la séquence codante. Les transcrits font 9 kb et il existe un épissage alternatif.

La protéine multidomaines APC de 312 kDa a une double localisation cytoplasmique et nucléaire. La région N terminale renferme le domaine d'oligomérisation et une région conservée "armadillo". Au milieu, des répétitions de 15 et 20 acides aminés constituent respectivement des sites de liaison et de régulation de la β -caténine, son principal partenaire. Trois autres séquences répétées (SAMP), enchâssées dans les précédentes, régulent la liaison d'APC à l'axine-2/conductine. La région C terminale possède des sites de liaison aux microtubules et à d'autres protéines (Figure 6) (Fearnhead, Britton et coll. 2001).

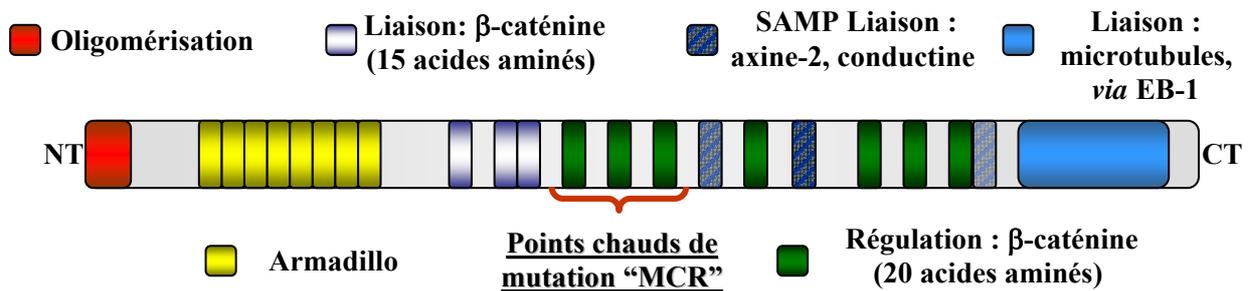


Figure 6: Protéine APC et ses principaux domaines fonctionnels d'après (Fearnhead, Britton et coll. 2001)

○ **Fonctions et régulation de la protéine APC**

Les partenaires de la protéine APC sont nombreux, révélant le large spectre fonctionnel de cette protéine. APC joue un rôle aussi bien dans l'adhésion, la migration cellulaire et l'apoptose que dans le contrôle de la voie WNT et la ségrégation des chromosomes pendant la mitose (Fodde, Smits et coll. 2001).

Le rôle majeur d'APC est de participer au contrôle de la voie WNT/ β -caténine (Figure 7a). La β -caténine, protéine intracytoplasmique, est d'une part un composant essentiel des jonctions adhérentes des épithéliums car elle relie l' α -actine et la E-cadhérine et d'autre part, un co-facteur de transcription de gènes impliqués dans l'activation du cycle cellulaire (*c-MYC* et *cyclineD1*).

Cette voie de signalisation est régulée de la manière suivante :

- ❖ Dans les cellules non stimulées, le pool cytoplasmique de β -caténine est régulé négativement par un complexe multiprotéique formé par l'APC, la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) et l'Axine-2/conductine. Une fois captée par ce complexe, la β -caténine subit une série de quatre phosphorylations catalysées par la GSK3 β , indispensable à sa protéolyse ubiquitine dépendante (Figure 7a).

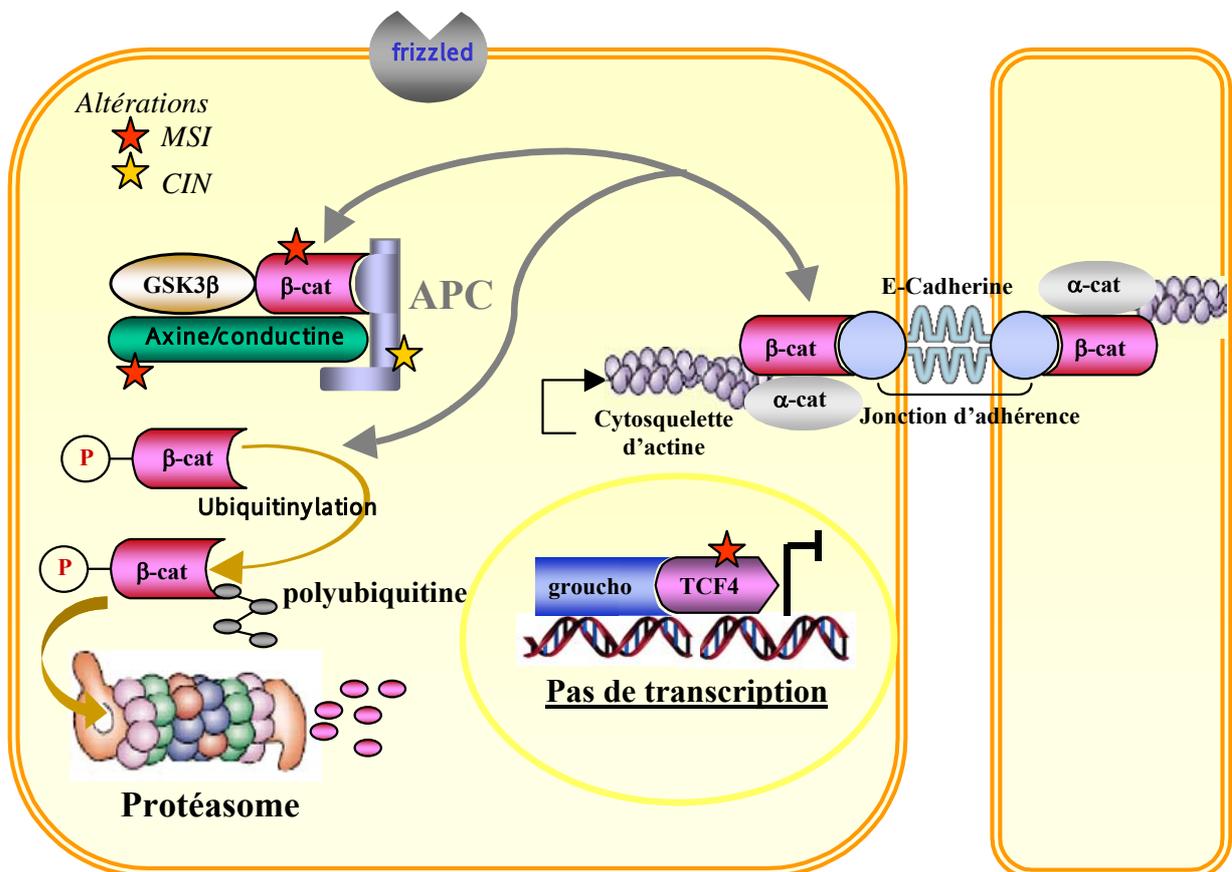


Figure 7 a : Voie WNT / β -caténine au repos d'après Fodde et coll (Fodde, Smits et coll. 2001)

- ❖ A l'inverse, la stimulation du récepteur "frizzled" par les ligands de la famille WNT, aboutit à l'inhibition de l'activité enzymatique de la GSK3 β . La β -caténine stabilisée, s'associe alors au TCF4 (T-Cell-Factor4) et ce complexe subit une translocation nucléaire, probablement dépendante d'APC. TCF4 est un facteur de transcription spécifique des cellules épithéliales intestinales, qui en présence d'APC active la transcription de certains gènes cibles favorisant la prolifération cellulaire (Figure 7b).

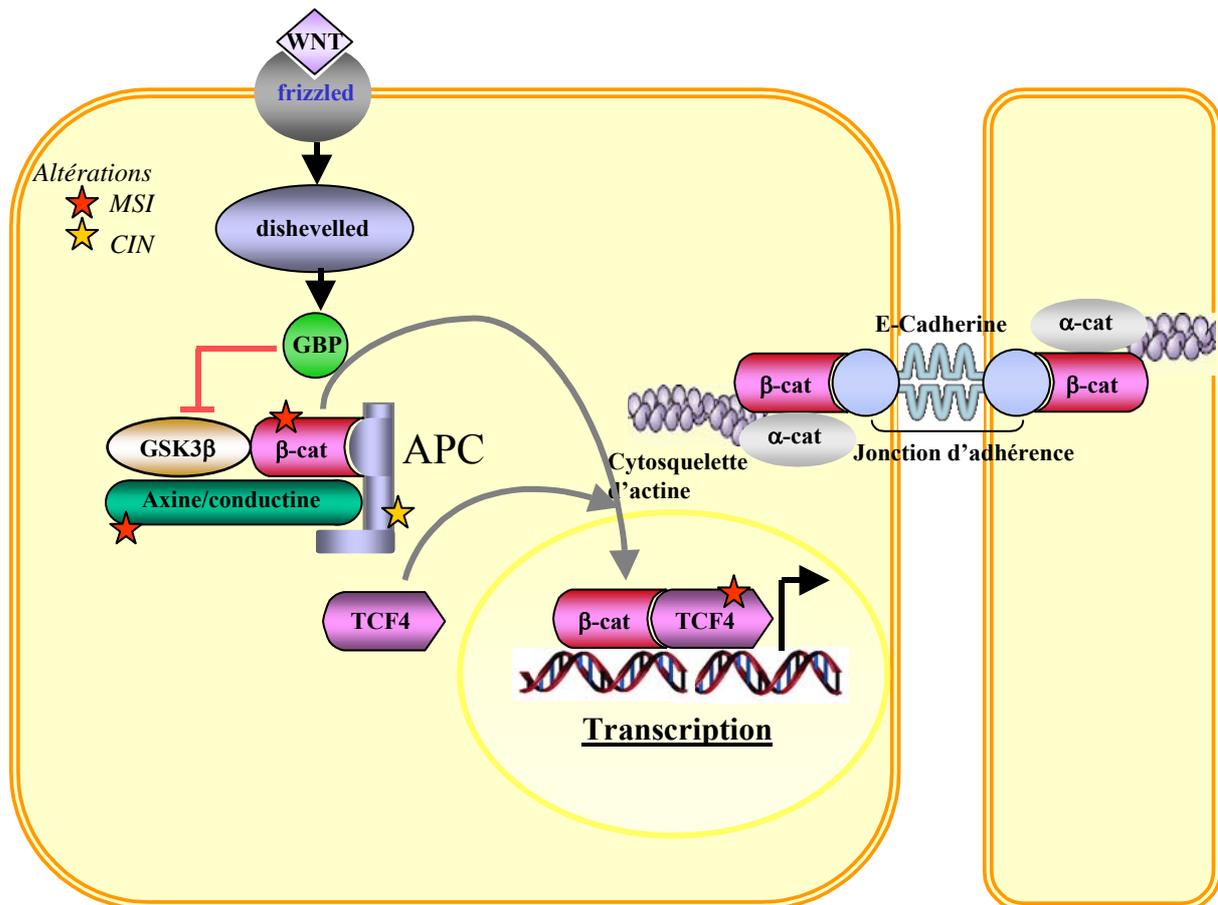


Figure 7 b: Voie WNT activée - signalisation et régulation par le récepteur “Frizzled” d’après Fodde et coll (Fodde, Smits et coll. 2001)

La deuxième fonction importante d’APC intervient au cours de la mitose. La protéine APC stabilise les microtubules du fuseau mitotique et interagit, *via* la protéine EB-1 (End Binding-1), avec les kinétochores des chromosomes métaphasiques. La région C terminale d’APC renferme le site de fixation de la protéine EB-1. De fait, la synthèse d’une protéine APC mutante tronquée, entraîne des anomalies de ségrégation des chromosomes, participant probablement au phénotype d’instabilité chromosomique (Thiagalingam, Laken et coll. 2001). Il semble néanmoins que la fonction suppressive de tumeur d’APC ne soit pas portée par la région C terminale (Smits, Kielman et coll. 1999).

○ Expression d’APC dans l’épithélium intestinal

APC est un élément central de la régulation de la voie WNT, contrôlant d’une part l’activité co-transcriptionnelle de la β-caténine et d’autre part, l’adhésion cellulaire en régulant la stabilité et la localisation de la β-caténine. En outre la balance β-caténine/APC semble déterminer le stade prolifératif de la cellule. Ainsi, au niveau intestinal, le compartiment prolifératif du fond

des cryptes présente une activation importante de la voie WNT, avec accumulation de β -caténine et une expression faible d'APC. A l'inverse, dans le compartiment différencié, la voie WNT est contrôlée par une protéine APC fortement exprimée. Il existe donc un gradient croissant d'expression d'APC le long de l'axe crypto-villositaire, qui est inversé par rapport à celui de β -caténine (Fodde, Smits et coll. 2001). Ce gradient d'expression d'APC facilite probablement la migration cellulaire vers les villosités, en désorganisant les jonctions adhérentes privées de β -caténine intracellulaire.

○ APC dans la carcinogenèse colorectale sporadique

Le gène *APC* peut-être considéré comme un des gènes sinon le gène suppresseur de tumeur de la carcinogenèse colorectale, car une altération des 2 copies du gène *APC* est mise en évidence dans 80 % des cancers sporadiques. Ces mutations sont intimement associées au phénotype d'instabilité chromosomique et sont précoces au cours de la séquence adénome cancer. L'inactivation bi-allélique s'effectue en deux temps et il existe une interdépendance entre les deux altérations, puisque la localisation de la première mutation somatique détermine la nature de la deuxième altération (perte d'hétérozygotie par délétion ou bien deuxième mutation somatique). Dans la séquence d'*APC*, la région MCR "mutation cluster region" regroupe 60 % de l'ensemble des mutations (Figure). Farnhead et coll ont démontré sur de nombreuses lignées cancéreuses coliques, que les mutations MCR sont systématiquement associées à une perte d'hétérozygotie sur le locus *APC*. D'autre part, ces altérations induisent la synthèse d'une protéine tronquée, amputée de ses sites de liaison à l'axine-2 et d'une ou 2 séquences de régulation de la β -caténine. D'autre part, l'hyperméthylation du promoteur a été proposée comme un mécanisme alternatif d'inactivation quant une seule mutation d'*APC* est mise en évidence. Cependant, la prépondérance des mutations et des pertes d'hétérozygoties ciblant le locus d'*APC* empêche probablement ce phénomène épigénétique de jouer un rôle majeur dans la carcinogenèse colorectale de la voie LOH (Fearnhead, Britton et coll. 2001).

La protéine *APC* tronquée est incapable non pas de fixer mais de réguler la β -caténine, *via* l'activation de la GSK β 3. La voie WNT est donc activée de manière constitutive par augmentation du pool intracellulaire de β -caténine sans activation de "Frizzled". Cette autonomisation de la voie WNT entraîne l'augmentation de l'expression de gènes favorisant la prolifération cellulaire. Au niveau intestinal, elle se traduit par une augmentation du compartiment prolifératif et une migration des cellules épithéliales cryptiques vers la haut des villosités, générant l'apparition des cryptes aberrantes, premières lésions pré-néoplasiques visibles au plan histologique (Lievre et Laurent-Puig 2004).

D'autre part, dans les cancers présentant une instabilité microsatellitaire, le gène *APC* n'est habituellement pas délété mais la voie WNT peut quand même être dérégulée par des mutations activatrices de la β -caténine qui devient résistante à l'inhibition par APC ou encore par des altérations des gènes de *l'axine-2/conductine* ou de *TCF4* (étoiles sur les Figure)(Soreide, Janssen et coll. 2006).

En conclusion, la voie WNT est activée dans 90 % des cancers colorectaux toutes voies confondues. Cette activation est précoce et permet l'expansion clonale de la cellule épithéliale mutée puis le développement d'un adénome. Dans les cancers LOH, on retrouve principalement une inactivation bi-allélique du gène *APC* et dans les cancers présentant un phénotype d'instabilité microsatellitaire, des mutations touchant d'autres acteurs de la voie WNT (Liu, Dong et coll. 2000).

➤ **K-Ras, B-Raf et voie des MAP kinases**

○ **Les protéines Ras**

Les protéines G monomériques H-Ras, N-Ras et K-Ras sont les 3 membres de la famille RAS. Elles jouent le rôle "d'interrupteur" moléculaire en reliant les récepteurs stimulés par les signaux extracellulaires aux voies de signalisation intracellulaire. Les protéines Ras passent alternativement de la forme désactivée, liée à une molécule de GDP, à la forme activée dans laquelle le GDP est phosphorylé en GTP. Cette activation répond à la fixation de ligands sur des récepteurs tyrosines kinases qui sont couplés aux protéines Ras, comme par exemple, le récepteur de l'EGF ("Epidermal Growth Factor").

Des mutations activatrices des protéines Ras induisent une stimulation continue de ces voies effectrices. Ces anomalies génétiques sont très fréquentes dans de nombreuses tumeurs humaines. Les gènes de la famille ras sont des proto-oncogènes. Historiquement, K-Ras et H-Ras sont des analogues humains de protéines transformantes codées par des oncovirus murins "Kirsten and Harvey sarcoma viruses" et N-Ras est le produit d'un oncogène isolé d'un neuroblastome.

Les produits des gènes *RAS* sont des protéines dont le degré d'homologie de séquence est d'environ 85 %. Constituées de 188 acides aminés pour N-Ras, H-Ras et K-Ras4A et de 189 pour K-Ras4B qui est un variant d'épissage, ces protéines possèdent une extrémité C-terminale de 25 acides aminés où se concentrent les polymorphismes. Le reste de la séquence est relativement conservé. Elle présente un domaine conformationnel de fixation du GTP formé de 4 régions autour

desquelles interagissent deux effecteurs : le GEF (“Guanine nucléotide Exchange Factor”) et le GAP (“GTPase Activating Protein”)(Figure 8).

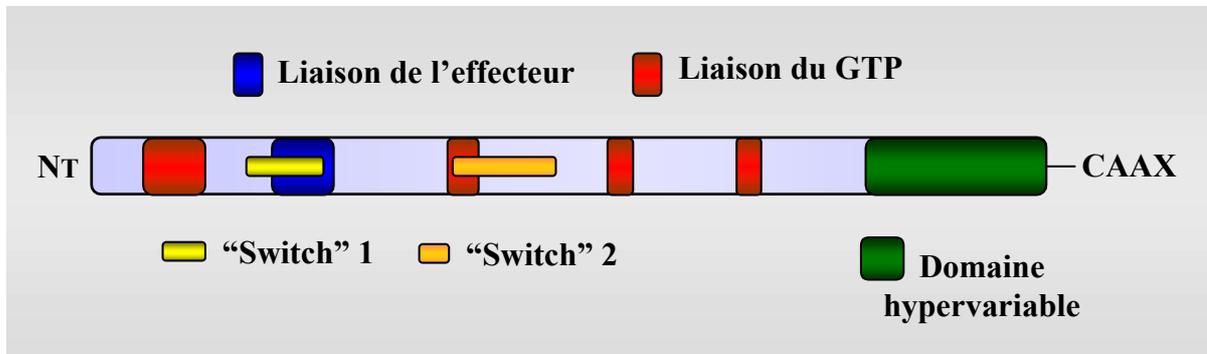


Figure 8 : Protéine K-ras et ses domaines fonctionnels

La région variable se termine par le motif peptidique CAAX siège de modifications post-transcriptionnelles à type de prénylations. C’est la nature de l’acide aminé X qui contrôle l’addition ou non d’un groupement farnésyl ou géranyl et, dirige l’ancrage à la face interne de la membrane cytoplasmique de Ras puis son association à un récepteur de type tyrosine kinase (RTK).

○ Voie de signalisation Ras/Raf.MEK/ERK

De nombreuses voies effectrices sont reliées aux protéines Ras. Celles incluant les Raf kinases et les PI3-Kinases sont les mieux décrites. Elles jouent un rôle pivot en régulant les fonctions de croissance, de survie, de différenciation cellulaire et interviennent également dans l’angiogénèse.

La voie médiée par les protéines Raf (famille de sérine/thréonine kinases comprenant Raf-1, a-Raf et b-Raf) conduit à l’activation d’une des cascades de signalisation des MAPKinases (“Mitogen-Activated Protein Kinase”), la cascade complète de signalisation intracellulaire est donc Ras/Raf/MEK/ERK.

La fixation d’un facteur de croissance sur le récepteur correspondant entraîne le recrutement des molécules accessoires comme GRB2 et SOS sous la membrane plasmique. Par phosphorylation, la protéine Ras passe de l’état inactif à l’état actif sous forme de Ras GTP. Elle est alors capable de recruter puis d’activer la protéine cytoplasmique Raf qui est une kinase de MAPKK. L’activation en cascade d’une MAPKK (MEK 1 et 2), puis d’une MAPK comme ERK1

et 2, se termine par l'activation de facteurs de transcription intranucléaire après translocation de la MAPK (Figure 6).

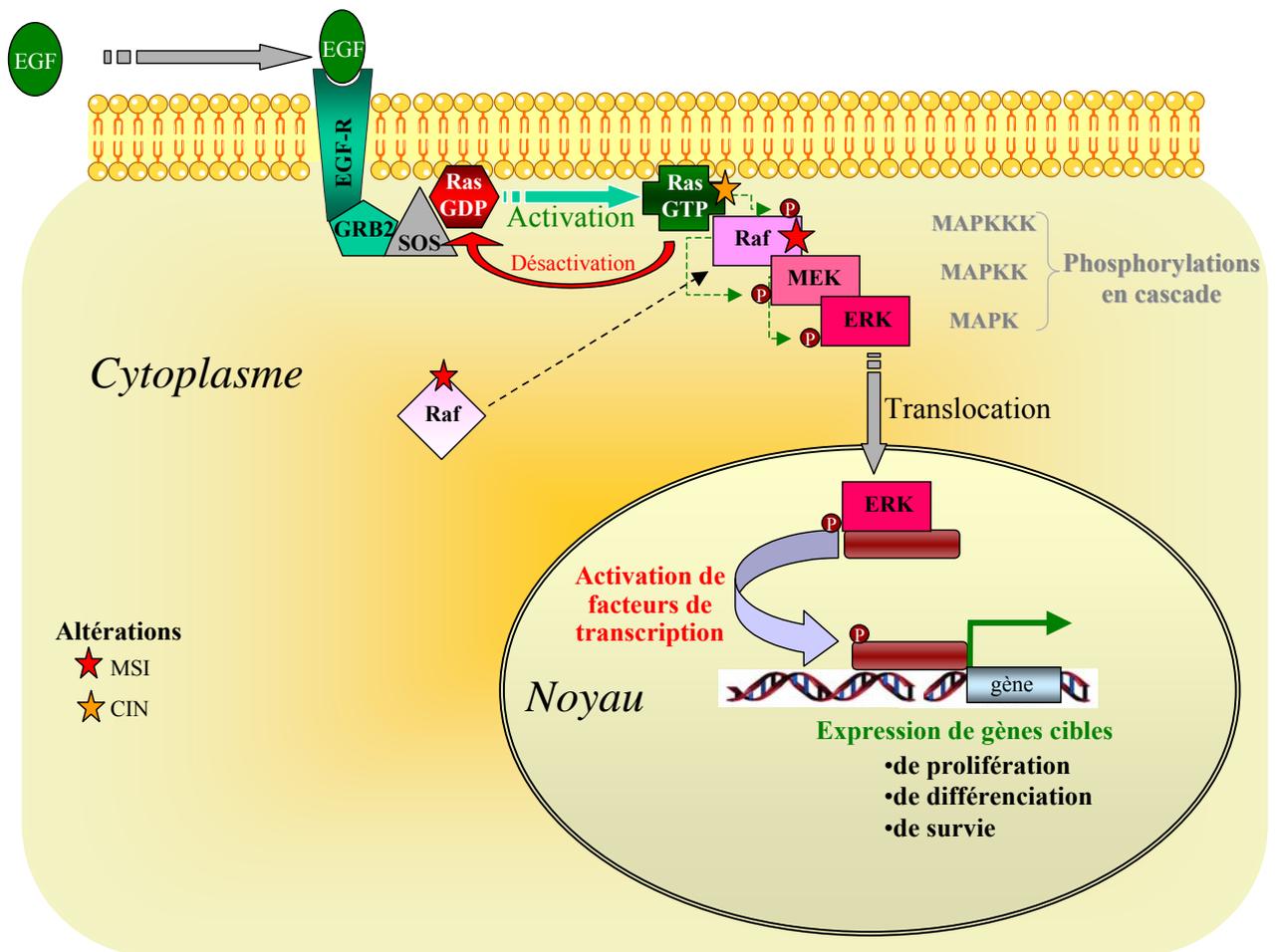


Figure 6 : Voie MAP kinase - Schéma de la voie Ras/Raf/MEK/ERK activée par l'EGFR

○ **Protéines K-Ras et B-Raf dans le cancer colorectal**

En cancérologie, approximativement 30 % des tumeurs humaines présentent des mutations de gène *Ras*, et en particulier de *K-Ras*. Ces mutations sont activatrices et localisées autour du domaine de régulation de la phosphorylation du GDP. Elles rendent les protéines ras insensibles à l'activité GTPasique du facteur GAP, ce qui les bloquent dans leur conformation active : l'interrupteur est activé en continu (Friday, 2005 #8).

La protéine K-Ras semble jouer un rôle plus important que les autres membres de la famille puisqu'on observe une mortalité précoce des embryons murins invalidés pour le gène *K-Ras* et une survie des souris invalidées pour le gène *H* ou *N-Ras* (Reuther et Der 2000). De plus, même sauvage, *K-Ras*, peut tout de même jouer un rôle dans l'oncogénèse par différents

mécanismes indépendants allant de l'amplification génique à l'hyperactivation des voies de signalisation par des ligands endogènes. Ce dernier mécanisme pourrait expliquer l'efficacité des thérapeutiques visant l'inhibition des récepteurs tyrosines kinases comme l'Ac monoclonal anti-Her-2 dans le cancer du sein et l'anti-EGFR (cetuximab-Erbitux®), anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'“epidermal Growth factor”, utilisé dans les cancers colorectaux. En théorie, le traitement du cancer colorectal par anti-EGFR n'est efficace que si la voie effectrice de l'EGFR *via* K-Ras est intacte, c'est-à-dire en l'absence de mutation activatrice de *K-Ras* qui déconnecte le récepteur de sa voie effectrice correspondante (Tabernero, Salazar et coll. 2004). Néanmoins, au cours de la carcinogenèse colorectale sporadique, les mutations de *K-Ras* font leur apparition dès le stade polype. Puis, le taux de mutation augmente proportionnellement à la taille des lésions. Au stade du carcinome, la prévalence des mutations de *K-Ras* est ainsi évaluée selon les séries entre 32 et 57 % (Kressner, Bjorheim et coll. 1998).

D'autre part, des mutations activatrices de *B-Raf* sont observées à plus ou moins grande fréquence dans certaines tumeurs humaines. Dans les cancers colorectaux, elles sont retrouvées dans 12 % des cas et plutôt associées au phénotype MSI. La plus fréquente des mutations de *B-Raf* observées au cours de la carcinogenèse colique sporadique est une substitution ponctuelle localisée à l'exon 15 (T1796A) (Davies, Bignell et coll. 2002). Au niveau protéique, le remplacement d'une valine par un acide glutamique, au niveau du domaine d'activation (V600E), entraîne l'activation constitutionnelle de B-Raf et par conséquent l'autonomisation de la voie Ras/Raf/MEK/ERK.

Le cumul des deux évènements étant probablement délétère, les mutations activatrices *K-ras* et V600E de *B-Raf* sont mutuellement exclusives dans les cancers colorectaux sporadiques (Rajagopalan, Bardelli et coll. 2002) (Jarry, Masson et coll. 2004).

En résumé, l'activation permanente et incontrôlée de la voie Ras/Raf/MEK/ERK MAPkinases confère aux cellules mutées un avantage sélectif qui favorise d'une part la progression des cellules dans le cycle cellulaire se traduisant par une augmentation de taille de l'adénome et d'autre part, une survie prolongée grâce à l'effet antiapoptotique de B-Raf (Ikehara, Semba et coll. 2005).

➤ TP53 Transforming Protein 53 : le “gardien du génome”

TP 53 ou p53 est codée par le gène *P53* situé sur le bras court du chromosome 17 (17p13). Cette phosphoprotéine de 53 kDa est formée de 393 acides aminés qui déterminent cinq domaines fonctionnels (Figure 10). L'interaction entre le domaine transactivateur de p53 et son régulateur négatif principal l'oncoprotéine hDM2 (“human double minute clone 2”) induit une protéolyse ubiquitine dépendante qui maintient un taux faible de p53 dans les cellules normales.

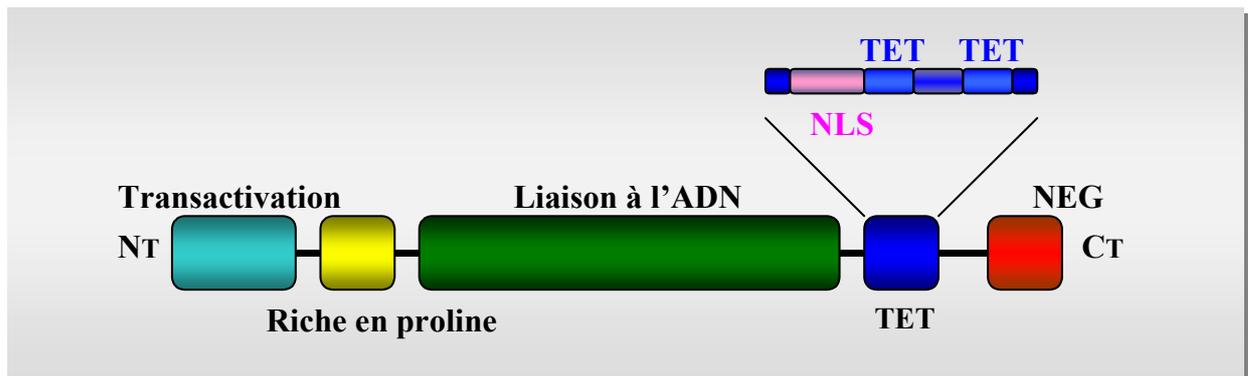


Figure 10 : Protéine p53 et ses domaines fonctionnels

○ Régulation et propriétés de p53

Un certain nombre de stimuli extracellulaires induisent une stabilisation post-traductionnelle de p53. Ainsi, les altérations de l'ADN, l'activation d'oncogènes, l'hypoxie, la déplétion nucléotidique, l'infection virale et l'érosion télomérique augmentent les taux intracellulaires de p53. Lorsque sa concentration augmente, elle s'oligomérisse sous forme d'homotétramères par l'intermédiaire de ses domaines TET, puis subit une translocation nucléaire médiée par sa séquence NES (“nuclear export signal”). Les interactions spécifiques entre certaines séquences d'ADN et p53 sont médiées par le domaine de liaison à l'ADN qui par ailleurs est le siège de 90 % des mutations répertoriées. Les autres domaines fonctionnels sont : un domaine proapoptotique riche en proline et la région C terminale NEG qui interagit sans spécificité avec l'ADN dégradé (Roger, Gadea et coll. 2006).

La protéine p53 contrôle un nombre considérable de gènes et donc un large spectre de réponses cellulaires. Lorsque la cellule est endommagée, cette protéine joue un rôle majeur en déterminant si l'ADN doit être réparé ou si la cellule doit entrer en processus de mort cellulaire programmée. p53 est de ce fait capable d'activer aussi bien des gènes de réparation de l'ADN que

ceux responsables de l'induction du programme de mort cellulaire. Ce gène, surnommé le “gardien du génome”, prévenant par ces deux voies le processus cancéreux est donc considéré comme gène suppresseur de tumeur. p53 est par ailleurs impliquée dans les phénomènes d'angiogenèse et de sénescence.

○ P53 dans le cancer colorectal

En cancérologie, *P53* est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté, environ 50 % des néoplasies sporadiques humaines présentent un gène altéré (Levine 1997). Le modèle de Knudson, implique une inactivation séquentielle des deux allèles d'un gène suppresseur de tumeur. Le premier allèle est inactivé par une mutation ponctuelle et le second par une délétion ou une insertion. L'altération de la fonction du gène *P53* ne répond cependant pas systématiquement à ce modèle. En effet, la protéine sauvage peut être inactivée, notamment par un effet de dominance négative des p53 mutées. Ce phénomène s'explique par la capacité que possèdent les monomères mutés de lier et inactiver les monomères p53 sauvages. Cet effet constitue sans doute l'un des principaux phénomènes participant à l'inactivation totale de p53, présent dans les cellules tumorales ne présentant par ailleurs l'altération que d'une seule copie du gène. Ainsi, les mutations aboutissent-elles à la synthèse d'une protéine non-fonctionnelle dans 90 % des cas et à une inactivation génique dans les 10 % restants (Pietsch, Humbey et coll. 2006).

Au cours de la séquence adénome-cancer colorectal, les anomalies moléculaires touchant *P53* sont très fréquentes (70 %) et toujours tardives. L'altération de ce gène semble être l'étape permettant le passage à la malignité, du stade d'adénome tardif vers celui d'adénocarcinome invasif.

Dans la voie LOH, c'est typiquement l'association d'une mutation ponctuelle sur l'allèle résiduel et de la perte d'hétérozygotie sur le bras court du chromosome 17 qui est décrite. Cependant, un effet délétère peut être évoqué dès la première altération par le phénomène de dominance négative. Par ailleurs, aucune inhibition de l'expression de p53 par hyperméthylation du promoteur n'a été mise en évidence pour l'instant. Ce fait renforce l'idée d'un rôle effectif de la protéine p53 mutante comme dominant négatif (Soussi 2005). Par contre, la méthylation des CpG localisés dans la région de liaison à l'ADN, pourrait avoir un effet mutagène en facilitant une réaction de déamination spontanée endogène pouvant conduire à la substitution d'une Cytosine par une Thymine. Un lien entre épigénétique et zones de mutation est alors suggéré dans le cas du gène *P53* ((Laird et Jaenisch 1996).

b - Cancers colorectaux associés au phénotype d'instabilité microsatellitaire MSI

Ce phénotype est observé dans environ 15 % des cancers colorectaux. Cliniquement, ces tumeurs sont plus fréquemment retrouvées chez des patients âgés et sont plutôt localisées au niveau du côlon proximal. Sur le plan génétique, les mutations des gènes suppresseurs de tumeurs *P53* et *APC* sont rares alors que celles du gène *B-Raf* sont particulièrement fréquentes. A la différence du phénotype LOH, les tumeurs présentant le phénotype MSI sont diploïdes (Olschwang, Hamelin et coll. 1997).

➤ Instabilité des microsatellites

Ces tumeurs présentent essentiellement deux types de mutation : des substitutions et des décalages du cadre de lecture. Ces altérations sont principalement localisées au niveau de courtes séquences répétitives dénommées microsatellites.

Les microsatellites sont des zones hautement répétitives de l'ADN constituées de motifs comportant de 1 à 5 nucléotides répétés 10 à 20 fois en moyenne, les plus fréquents étant les dinucléotides CA. Leur polymorphisme résulte des variations du nombre de répétitions.

Ce caractère répétitif entraîne de fréquentes erreurs lors de la réplication par l'ADN Polymérase. Si certains gènes de réparation des erreurs de l'ADN, notamment les gènes MMR ("mismatch repair") sont défectueux, les microsatellites se voient amputés (ou plus rarement rallongés) d'une répétition. Après plusieurs cycles de division, les erreurs s'accumulent et la taille du microsatellite se réduit d'autant. Les microsatellites sont donc plus courts dans les adénocarcinomes évolués que dans les adénomes précoces (Duval et Hamelin 2003).

L'altération de l'expression d'un ou de plusieurs gènes MMR constitue donc l'évènement moléculaire initial indispensable au développement tumoral dans la voie d'instabilité microsatellitaire.

Les mécanismes d'altérations de l'expression de ces gènes MMR sont de deux types.

Le premier correspond à des modifications épigénétiques ciblant le promoteur d'un gène MMR. Dans le cas d'hMLH-1, gène MMR le plus fréquemment altéré, les tumeurs présentent une perte d'expression somatique de la protéine, provoquée par une hyperméthylation du promoteur du gène en relation avec un mécanisme de sénescence de l'épithélium colique. (Wheeler, Loukola et coll. 2000). En effet, l'hyperméthylation des îlots CpG, localisés au niveau de la séquence promotrice de ce gène, inhibe l'initiation de la transcription et conduit ainsi à l'inactivation génique. Une hyperméthylation homozygote conduit à l'absence de la protéine hMLH1. Néanmoins, une hyperméthylation monoallélique n'entraînant qu'une réduction de la

concentration de la protéine hMLH1 semble suffisante pour initier la carcinogenèse (Miyakura, Sugano et coll. 2004).

Le deuxième mécanisme d'inactivation met en jeu des processus de mutations- délétions. Ces anomalies sont peu fréquentes et sont essentiellement associées au syndrome prédisposant au cancer colique héréditaire sans polypose ou "HNPCC".

Dans celui-ci, l'apparition précoce du phénotype MSI s'explique dans 90 % des cas par la présence de mutations germinales dans la séquence des principaux gènes de réparation des mésappariements de l'ADN comme *hMSH2*, *hMLH1* et *hMSH6*. Secondairement, la survenue d'une mutation somatique ou d'une perte allélique sur l'allèle sain entraîne une perte totale d'expression. Ce syndrome est associé à un risque de développement de cancer colorectal très élevé de l'ordre de 80 % comparé aux 5 % de la population générale. Il est également associé à un risque majeur de cancer de l'endomètre (50 % contre 2 % dans la population générale) et à un risque moyen de cancers de l'estomac et de l'ovaire évalué à 12 % (Chung et Rustgi 2003).

Quel que soit le mécanisme, l'altération de l'expression des gènes de réparation de l'ADN n'est pas directement responsable de la transformation cellulaire. Ce sont les mutations secondaires non corrigées par les gènes de réparation défectueux qui constituent les événements moléculaires nécessaires au développement du processus tumoral.

De ce fait, les gènes présentant des répétitions ou des microsatellites aux niveaux de leurs séquences codantes ou régulatrices constituent les cibles de ces anomalies secondaires. Les tumeurs de la voie MSI ne présentent pas ou peu d'altérations des séquences des gènes *APC* et *P53*, pauvres en microsatellites. Les mutations associées au phénotype MSI sont localisées au niveau de gènes cibles spécifiques. Un des gènes dont l'expression est fréquemment altérée dans la voie MSI code pour le TGF β RII ("transforming growth factor β receptor II") impliqué dans la transduction de la voie de signalisation du TGF β (Figure). La particularité de cette voie est qu'elle présente selon les tissus considérés : soit des propriétés anti-prolifératives physiologiques ou soit, prolifératives pour certains types de cellules tumorales qui utilise le TGF β comme facteur de croissance (Bachman et Park 2005).

D'autres altérations sont également fréquemment associées au phénotype MSI. Dans 35 % des tumeurs, des mutations (décalage du cadre de lecture) de BAX (Bcl-2 associated X protein) entraînent une inhibition de l'apoptose dépendante de Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) (Trojan, Brieger et coll. 2004). D'autre part, la séquence de certains gènes, codant pour des molécules intervenant dans la voie WNT, comporte des microsatellites qui peuvent également être altérés : β

caténine, *axine-2/conductine* et *TCF4* (Figure 7). Enfin, d'autres mutations dont les conséquences cellulaires restent floues sont mises en évidence et peuvent être utilisées comme simple marqueur d'instabilité microsatellitaire.

➤ **Voie de signalisation du TGFβ via TGFβRII (Figure 11)**

Le TGFβ et les membres de sa famille sont des facteurs de croissance dont l'effet biologique principal est de moduler la prolifération cellulaire. Deux protéines SMAD2/3 et SMAD4 participent à la transduction du signal entre le récepteur du TGFβ et le noyau cellulaire. Le TGFβ activé se lie à son récepteur I qui forme un complexe hétérotétramérique avec le récepteur II. Ce récepteur activé possède une activité sérine/thréonine kinase qui favorise tout d'abord son autophosphorylation, puis la phosphorylation des protéines SMAD2 et 3, qui peut alors s'associer à SMAD4. Ce complexe protéique gagne le noyau et y induit l'activation de facteurs de transcription régulant l'expression de gènes.

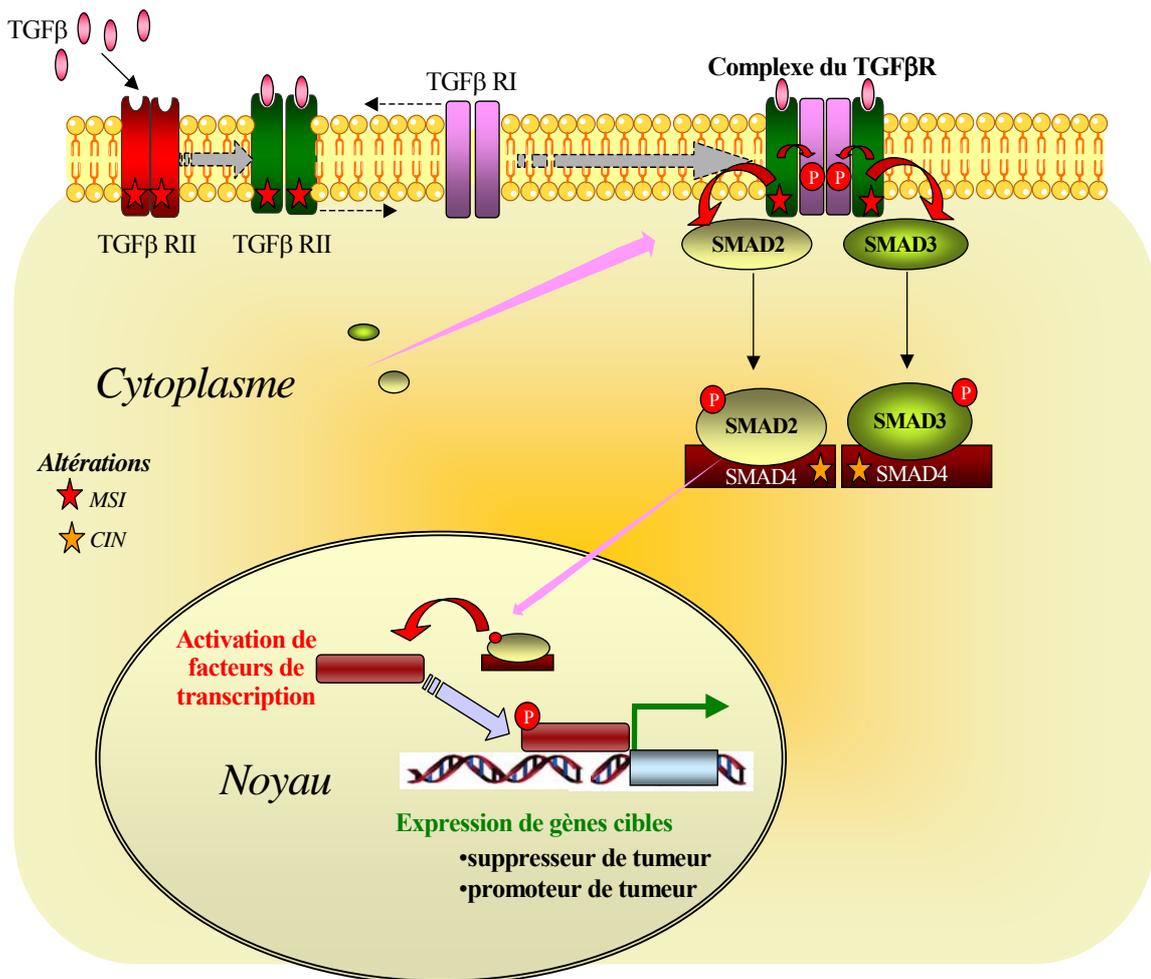


Figure 11 : Voie de signalisation du TGFβ

➤ **Altérations de la voie du TGFβ dans le cancer colorectal**

Dans les cancers colo-rectaux de type MSI, le récepteur II du TGFβ subit une invalidation bi-allélique dans 60 à 80 % des cas selon les séries. Ce phénomène trouve son origine dans la présence d'une répétition microsatellitaire de 10 adénines au niveau de sa séquence codante, siège d'erreurs de réplication non réparées par le système MMR déficient. En conséquence de quoi, un décalage du cadre de lecture induit la synthèse d'un récepteur tronqué inactif.

En amont de cette voie, un autre gène cible peut lui aussi être inactivé dans la voie MSI et participé à la carcinogenèse colorectale, il s'agit du récepteur insulinaire IGFII-R ("Insulin Growth Factor II Receptor"). En effet, ce gène possède également une répétition de 8 guanines sujette à instabilité. Or ce récepteur semble jouer un rôle dans l'activation du TGFβ, lui permettant d'interagir avec son récepteur (Souza, Appel et coll. 1996).

L'altération de la voie de signalisation du TGFβ est principalement décrite dans les cancers du côlon de type MSI, mais elle peut aussi s'observer avec une moindre fréquence dans les cancers de type LOH. Elle est alors déterminée par des pertes alléliques ciblant les séquences codantes des gènes *SMAD2* et/ou *SMAD4* (anciennement appelé gène *DPC4*).

La carcinogenèse est un phénomène dynamique qui nécessite l'accumulation d'altérations ciblant les processus cellulaires essentiels dont le fonctionnement est assuré par l'intégrité de quelques voies de signalisation. Deux mécanismes différents peuvent induire le développement d'un cancer colorectal. Pour l'instabilité chromosomique, mécanisme le plus fréquent, l'altération la plus précoce cible le gène *APC*, mais sa responsabilité dans l'initiation du mécanisme d'instabilité est encore discutée. A l'inverse, l'anomalie fondatrice du mécanisme d'instabilité génétique est maintenant bien connue et correspond à l'altération épigénétique ou génétique d'un gène de réparation de l'ADN.

L'acquisition des altérations suivantes par le phénomène de mutation sélection permet le développement tumoral. Les voies de signalisation altérées dans la carcinogenèse colorectale sont finalement peu nombreuses. En fait les mécanismes d'instabilités ciblent les mêmes voies de signalisation mais à des niveaux différents.

3 - De la méthylation ou phénotype CIMP

a – Rôle physiologique de la méthylation

En situation normale, la méthylation est la seule modification chimique que peut subir l'ADN chez les mammifères. Elle correspond à une réaction d'addition d'un groupement méthyle sur le noyau de la cytosine en position 5, catalysée par des enzymes. Les cytosines méthylées appartiennent majoritairement à des dinucléotides 5'-CpG-3'. Les méthylations d'autres dinucléotides 5'-CpX-3' sont moins fréquentes.

Les dinucléotides CpG ne sont pas répartis uniformément. Ainsi dans 98 % du génome, on ne trouve un dinucléotide CpG que tous les 150 pdb. A l'inverse, dans les régions riches en CpG, dénommées îlots CpG, la fréquence de ces dinucléotides est environ 5 fois plus élevée que dans le reste du génome. La longueur de ces régions varie d'environ 200 à quelques milliers de pdb. C'est ainsi qu'approximativement 50 à 60 % des gènes présentent des îlots CpG.

A l'exception notable des gènes de l'empreinte génomique et de nombreux autres situés sur le chromosome X inactivé chez la femme, les dinucléotides CpG des îlots ne sont normalement pas méthylés, à l'inverse des CpG hors îlot qui le sont fréquemment (Bird 1992). Il a été suggéré que ces profils de méthylation soient responsables d'une séparation des zones actives et inactives sur le plan transcriptionnel.

La méthylation constitue une modification épigénétique essentielle au cours du développement. De ce fait, l'inactivation d'au moins un des gènes codant pour les méthyltransférases (DNMT-1, -3A,-3B), enzymes catalysant la méthylation de l'ADN, est létale chez la souris (Okano, Bell et coll. 1999). Chez l'homme les profils de méthylation sont tissus dépendants et le niveau de méthylation semble être un phénomène qui augmente avec l'âge (Nakagawa, Nuovo et coll. 2001).

La principale fonction reconnue de la méthylation est d'induire une répression transcriptionnelle. En dehors des zones codantes, comme dans les régions péri-centromériques, la méthylation participe également au maintien de l'intégrité et de la conformation du chromosome. Certains auteurs suggèrent en plus une activité de défense du génome contre les éléments génétiques mobiles.

La répression transcriptionnelle s'explique par le défaut de liaison des facteurs de transcription sur les régions cibles lorsqu'elles sont méthylées. Cette inhibition peut être directe ou bien médiée par des protéines (MeCP1 ou 2) se fixant spécifiquement au niveau des régions méthylées, générant ainsi des contraintes stériques au niveau des régions régulatrices.

Physiologiquement, l'inactivation génique par méthylation est un phénomène rare bien que crucial. Ainsi, au cours du développement, l'inactivation d'un des chromosomes X dans l'embryon de sexe féminin relève d'un processus dépendant de la méthylation. Probablement pour assurer les mêmes taux de transcription entre les deux sexes, les gènes d'un des deux chromosomes X sont donc maintenus inactifs par méthylation.

La méthylation est également importante pour l'expression des gènes de l'empreinte génomique. Tandis que la majorité des gènes s'exprime indifféremment à partir des allèles maternel et paternel, un nombre restreint de gènes s'exprime toujours à partir du même allèle paternel ou maternel. Pour ces gènes de l'empreinte, l'inactivation allélique est liée à un processus de méthylation encore mal décrypté (Tycko 1997).

b - Méthylations et pathologies

Des profils de méthylation aberrants sont observés dans de nombreuses situations physiopathologiques. En dehors des maladies héréditaires comme le syndrome du X fragile, et les anomalies de l'empreinte génomique à l'origine des premières observations, d'autres processus dégénératifs sont également associés à des anomalies de méthylation. Ainsi, une hyperméthylation est retrouvée dans de nombreuses situations pathologiques présentant un risque d'évolution vers le cancer : la colite ulcéraire, l'hépatite virale chronique, l'œsophagite de Barrett et le poumon de fumeurs (Kondo et Issa 2004).

Le concept de l'étiologie épigénétique du cancer est apparue à la fin des années 90 (Baylin, Herman et coll. 1998). Cette hypothèse précisait qu'une partie des variations des profils d'expression génétique devait être occasionnée par des modifications de la structure de la chromatine et non pas de la séquence d'ADN, ces altérations étant liées à deux phénomènes : la méthylation des cytosines et les modifications post-traductionnelles des histones (Jones et Baylin 2002).

Les premières descriptions de modifications épigénétiques liées à la méthylation dans les cancers primitifs datent de plus d'une vingtaine d'années. Depuis, il a été mis en évidence qu'environ la moitié des gènes suppresseurs de tumeurs, altérés généralement par mutation, pouvait aussi l'être par un mécanisme d'hyperméthylation. Les deux exemples les plus connus sont les gènes *BRCA1* dans les cancers du sein et *hMLH1* pour les cancers coliques (Jones 1996).

En théorie, la méthylation peut entraîner l'inactivation d'un ou de deux allèles d'un gène suppresseur de tumeur dans les cancers sporadiques et intervenir comme deuxième événement au cours du développement d'un cancer héréditaire. L'inactivation génique par hyperméthylation est maintenant bien intégrée au modèle classique de tumorigénèse obéissant à la fois à la théorie de la

sélection clonale et au modèle d'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur en deux temps développé par Knudson. La figure 12 reprend les différentes combinaisons possibles de mécanismes d'inactivation des deux allèles d'un gène suppresseur de tumeur en incluant l'hyperméthylation.

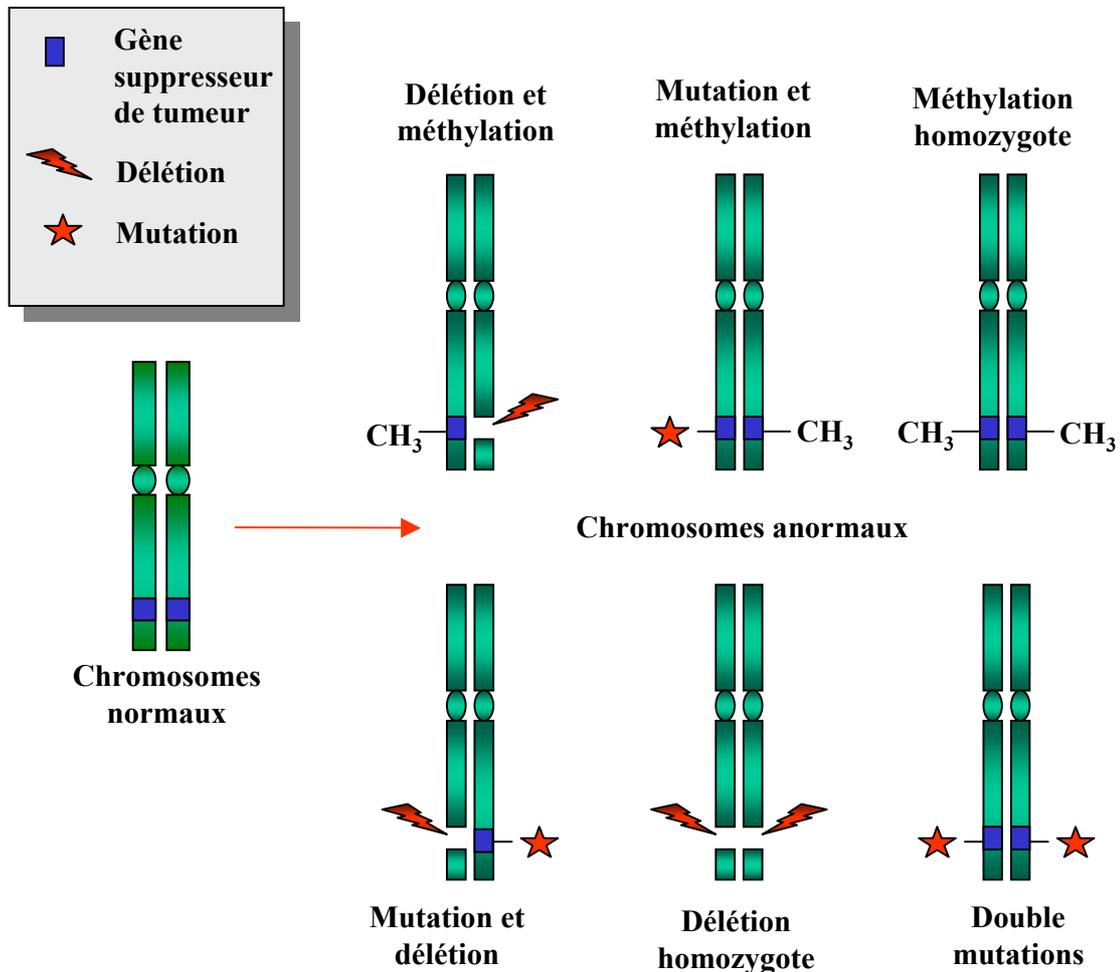


Figure 12 : Mécanismes épigénétiques et génétiques d'inactivation mono ou bi-allelique d'un gène suppresseur de tumeur d'après Costello et coll (Costello et Plass 2001)

En général, les cellules cancéreuses présentent à la fois une hypométhylation globale du génome et une hyperméthylation restreinte aux îlots CpG. Pour l'heure, aucun lien n'a été établi entre ces deux phénomènes, et il se peut qu'il relève de deux processus indépendants car intervenant à des niveaux différents du génome. Il est intéressant de constater que l'apparition de ces anomalies précède souvent le passage à la malignité. Cette observation plaide pour un rôle actif des modifications épigénétiques dès l'initiation du processus néoplasique.

c - L'hyperméthylation des îlots CpG

Une des caractéristiques majeures de cette anomalie est sa réversibilité. Comme l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs est typiquement restreinte aux allèles sauvages, des agents "déméthylants" sont capables de restaurer la fonction anti-tumorale de ces gènes. La « déméthylation » thérapeutique est devenue une réalité puisqu'à la suite de nombreux essais cliniques notamment en hématologie, la 5-azacytidine (Vidaza®) est devenue le premier agent déméthylant agréé par la FDA dans le traitement des myélodysplasies (Kaminskas, Farrell et coll. 2005).

L'intérêt grandissant pour cette voie thérapeutique a permis, par des approches de type gène candidat, de mettre à jour l'hyperméthylation de très nombreux gènes. Il s'agit soit de gènes déjà caractérisés comme gène suppresseur de tumeur altérés classiquement par mutation, soit de gènes, par ailleurs non-mutés, suspectés d'être suppresseurs de tumeurs. Le nombre pléthorique de gènes modifiés, la diversité des fonctions ainsi altérées et la variété des types de cancers présentant ces anomalies sont des arguments forts en faveur d'une contribution directe de ce phénomène au processus malin (Robertson 2005).

d - Mécanismes et conséquences de l'hyperméthylation

Deux mécanismes semblent intervenir dans l'hyperméthylation. Le premier évoqué est la perte de facteurs liés à l'ADN qui jouent un rôle d'inhibiteur compétitif vis-à-vis des méthylases au niveau des îlots CpG. Le deuxième serait lié à une hyperactivité de l'enzyme DNMT1. La surexpression de DNMT1 *in vitro* et *in vivo* conduit à une hyperméthylation délétère et à l'inverse l'usage d'ARN antisens de DNMT1 induit une réduction de l'agressivité de certaines cellules cancéreuses chez la souris (MacLeod et Szyf 1995). Cependant, l'observation sur certains modèles de lignée cancéreuse colique humaine du maintien d'un profil de méthylation aberrant malgré la délétion homozygote de DNMT1 laisse à penser que les mécanismes sont multiples (Rhee, Jair et coll. 2000).

Certes une faible augmentation d'activité ADN-méthyltransférase est parfois observée dans certaines cellules transformées, mais elle ne peut expliquer les méthylation aberrantes d'une part, et surtout le ciblage de certains îlots et donc de certains promoteurs d'autre part. Certains auteurs évoquent donc la synthèse par la cellule cancéreuse de facteurs de transcription qui recruterait les méthylases au niveau du promoteur des gènes cibles (Claus et Lubbert 2003).

Les CpG méthylés sont reconnus par un profil protéique conservé, d'environ 70 acides aminés : MBD (Méthyl-CpG binding domain). Ce motif est présent chez une famille de protéines

dont les principaux membres, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 et MBD4, ne se lient pas tous aux CpG méthylés. Par contre la propriété commune de ces protéines est de pouvoir recruter, au niveau des CpG méthylés, des complexes ayant des activités de modifications post-traductionnelles des histones, entraînant une extinction transcriptionnelle (Filion et Defossez 2004). La modification des histones et la méthylation, deux des principaux mécanismes épigénétiques, interviennent de concert dans ce mécanisme d'extinction transcriptionnelle.

La figure suivante décrit les aspects de la chromatine au niveau de gènes suppresseurs de tumeur, dans les situations normale et tumorale (Figure 13).

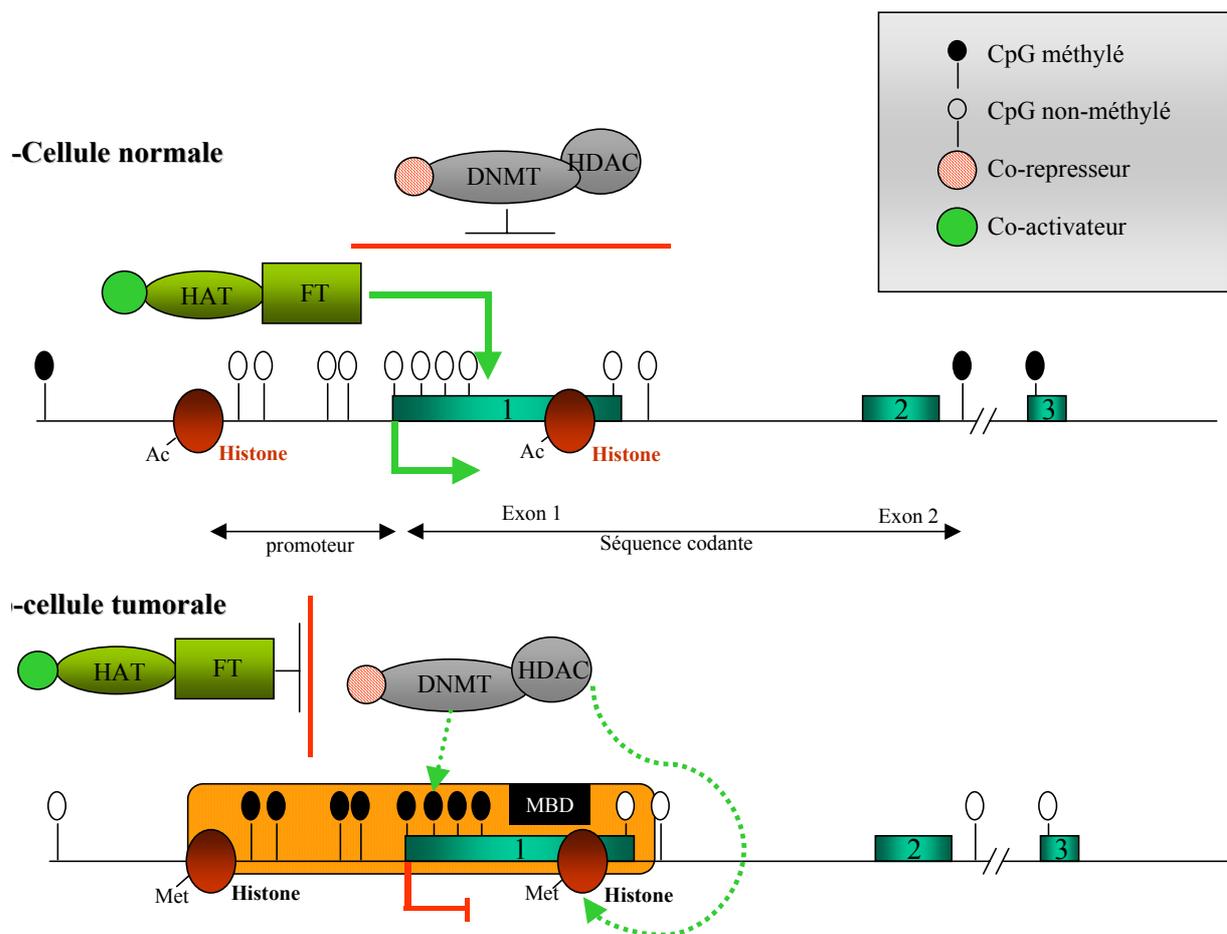


Figure 13: Aspects de la chromatine au niveau de gènes suppresseurs de tumeur en situation normale et tumorale d'après Deltour et coll (Deltour, Chopin et coll. 2005))

La plupart des gènes présentent, au niveau de leur promoteur et/ou de leur premier exon, un nombre élevé de CpG, regroupés au sein d'îlots. Dans une situation normale, la majorité des CpG en dehors des îlots sont méthylés (cercle noir), tandis que les CpG des îlots ne sont pas méthylés (cercles blancs). L'acétylation des histones dans la région promotrice permet de maintenir la

chromatine dans un état relâché, accessible aux complexes de transcription constitués de facteur de transcription (FT), de protéines acétylant les histones (HAT) et de co-activateurs transcriptionnels. Dans une cellule cancéreuse, les profils de méthylation sont inversés, avec une hypométhylation des CpG répartis le long du génome et dans les régions codantes, et une hyperméthylation des îlots CpG au niveau des promoteurs. Ces CpG méthylés sont reconnus par des protéines à domaine MBD (methyl CpG binding domain), responsables du recrutement des enzymes modifiant les histones (désacétylation (Claus et Lubbert) et méthylation), des protéines responsables de la méthylation de l'ADN (DNMT) et des co-represseurs transcriptionnels. Cette zone devient alors inaccessible aux complexes de transcription : le gène ne peut être exprimé.

Dans les cellules cancéreuses, l'hyperméthylation entraîne une extinction transcriptionnelle, par modification épigénétique de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans certaines fonctions essentielles pour la cellule, comme le contrôle du cycle cellulaire, la réparation des dommages de l'ADN et l'apoptose. Ces modifications sont nécessairement génétiquement déterminées puisque le phénotype de méthylation d'une cellule tumorale est transmis à ses cellules filles. L'inactivation de l'expression semble liée à l'inhibition des interactions entre les promoteurs méthylés et les facteurs de transcription. Certains facteurs comme AP-2, E2F, NFκB et c-MYC sont ainsi incapables de se lier à leurs séquences cibles si celles-ci sont méthylées. Parfois cette inhibition sera médiée, par la fixation de protéines MBD liant l'ADN méthylé qui entraîne une inhibition de la transcription. L'hypométhylation globale, quant à elle, favoriserait les instabilités chromosomiques, et l'expression d'oncogènes et de rétrotransposons normalement inactifs. Le mécanisme du maintien de la méthylation aberrante est maintenant bien établi, mais les raisons pour lesquelles certains promoteurs sont ciblés et quels facteurs interviennent dans l'initiation des premières méthylations restent à découvrir.

e - Hyperméthylation et cancer du côlon

Dans le cancer du côlon, l'hyperméthylation des îlots et l'hypométhylation globale sont deux modifications épigénétiques observées simultanément, cependant elles paraissent ne pas dépendre l'une de l'autre (Toyota, Ahuja et coll. 1999).

L'hyperméthylation des îlots CpG est associée à une altération de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs incluant *P16(INK4A)* et *hMLH1* notamment (Merlo, Herman et coll. 1995) (Kane, Loda et coll. 1997). Il faut rappeler que l'inactivation épigénétique d'*hMLH1* constitue l'évènement initial dans le processus tumoral sporadique associé au phénotype d'instabilité microsatellitaire MSI.

Selon leur statut de méthylation, les cancers colorectaux semblent se séparer en deux catégories, un groupe montrant de rares anomalies de la méthylation et un autre présentant des profils de méthylation aberrant pour de nombreux gènes simultanément.

Le terme “phénotype méthylé des îlots CpG” CIMP+ (“CpG Island Methylator Phenotype”) a été proposé il y a quelques années, notamment par Toyota et Issa, pour décrire ces tumeurs qui présentaient une hyperméthylation fréquente et simultanée de plusieurs îlots CpG. Ce phénotype a depuis été confirmé au niveau colique puis étendu à de multiples autres localisations tumorales (van Rijnsoever, Grieu et coll. 2002) (Toyota, Kopecky et coll. 2001). Les cancers colorectaux CIMP+ sont associés à des caractéristiques morphologiques, cliniques et moléculaires particulières : une localisation préférentielle au côlon proximal, une fréquence plus élevée chez la femme, un aspect peu différencié avec production de mucines et des mutations fréquentes du gène *B-Raf*.

Sur le plan génétique, les cancers colorectaux CIMP+ se dissocient en deux groupes, le premier présentant un profil de haut niveau d’instabilité microsatellitaire MSI-H (MSI-High) et le deuxième, associé à une forte incidence des mutations de *K-Ras* et une faible incidence d’altérations ciblant le gène *P53*, dénommé MSI-L (MSI Low). Comme on peut l’imaginer, les cancers CIMP+ MSI-H sont liés à l’hyperméthylation du promoteur du gène MMR *hMLH1*. En outre, les cancers CIMP+ MSI-L (ou MSI-) peuvent en partie être rattachés à l’inactivation d’un gène de réparation de l’ADN différent de *hMLH1*, appelé *MGMT* qui favorise l’apparition de mutations faux sens G→A ciblant *K-Ras* (Esteller, Risques et coll. 2001). L’intérêt clinique de cette distinction a été démontré, ainsi l’entité mineure CIMP+/MSI- est associée à un pronostic péjoratif, alors que dans leur ensemble les tumeurs CIMP+ semblent mieux répondre à la chimiothérapie à base de 5-FU (Van Rijnsoever, Elsaleh et coll. 2003).

La méthylation de certains gènes augmente dans les colonocytes de la muqueuse normale en fonction de l’âge. Cette observation a permis à Toyota et coll de développer l’hypothèse de l’existence d’une catégorie de gène dont la méthylation ne dépend que de l’âge et d’une autre pour laquelle la méthylation des gènes n’apparaît qu’au travers du processus cancéreux. Dans la première catégorie ont été décrits les gènes *MYOD* et *ERα* (estrogen receptor α), et dans la deuxième, les gènes *hMLH1*, *P16(INK4A)* et *TIMP3* (Toyota, Ahuja et coll. 1999). Cependant, cette catégorisation est discutée car l’évaluation quantitative de la méthylation a supplanté l’évaluation qualitative et mis ainsi en lumière la relation quantitative qu’il existe entre le niveau de méthylation (nombre de CpG méthylés) et l’expression génique. C’est ainsi qu’une méthylation partielle de gènes, pour *hMLH1* par exemple, a été démontrée sur des cellules saines de côlon de sujet âgé, caractérisant une situation où certes l’expression est maintenue mais dans laquelle le

gène est déjà épigénétiquement altéré (Kawakami, Ruzkiewicz et coll. 2006). Enfin, des données récentes suggèrent que la séparation entre les phénotypes CIMP+ et CIMP- interviendrait très précocement au cours de la carcinogenèse colorectale, probablement avant le stade des cryptes aberrantes (Jass 2001). Au niveau histologique, le profil CIMP semble plus fréquemment présent au niveau de lésions associées à la voie de l'adénome festonné qui représente de 0,6 à 1,3 % des néoplasies colorectales (Dong, Lee et coll. 2005).

f - Hypométhylation et cancer du côlon

Une déméthylation progressive globale en relation avec la progression tumorale est observée dans la majorité des tumeurs (Soares, Pinto et coll. 1999). Dans le processus cancéreux colique, le niveau d'hypométhylation est équivalent du stade polype jusqu'au stade carcinome. En fait, une hypométhylation semble déjà observable au niveau du tissu normal ou au niveau de lésions inflammatoires non tumorales (colite) (Gloria, Cravo et coll. 1996) (Feinberg, Gehrke et coll. 1988).

La baisse globale du niveau de méthylation peut avoir plusieurs conséquences directes sur le processus néoplasique : activation de l'expression d'oncogènes (exemple *C-MYC* et *H-ras*), activation de rétrotransposons et instabilité chromosomique. Mis à part l'activation de rétrotransposons au niveau du gène *APC* sur des tumeurs sporadiques, les autres mécanismes n'ont pas été mis en évidence dans les cancers coliques.

D'autre part, plusieurs observations et faits expérimentaux démontrent l'effet direct d'une carence en folate sur le niveau de méthylation puis sur l'apparition de tumeurs. La S-adénosylmethionine (SAM), est le principal donneur de groupement méthyle, ayant une synthèse dépendante des folates ainsi toute carence induit un déficit en SAM et donc une diminution du niveau de méthylation qui est réversible par apport d'acide folique. Cependant, compte-tenu des multiples rôles de la vitamine B9 dans le métabolisme cellulaire, le lien causal entre carence, hypométhylation et cancer n'a pas encore été élucidé (Costello et Plass 2001).

Cependant à ce jour, la carence en folate est le seul mécanisme connu qui puisse être responsable d'une hypométhylation. Les rôles d'enzymes déméthylantes et/ou d'une altération de l'activité des enzymes de méthylation ont été suggéré mais restent hypothétiques.

Les modifications épigénétiques observées dans les processus cancéreux sont des événements fréquents. De nombreuses équipes s'orientent maintenant dans l'étude systématique de ces profils de méthylation au décours des processus cancéreux pour en évaluer l'impact clinique. C'est dans ce cadre que le gène *TIMP-3*, présenté comme gène suppresseur de tumeur est étudié dans le cancer colorectal.

II - TIMP-3 : gène suppresseur de tumeur dans le cancer colorectal ?

La famille des métalloprotéases (MMP) regroupe 24 endoprotéases “à zinc”. Leur fonction essentielle est de dégrader la matrice extracellulaire, facilitant ainsi son remodelage. *In vivo*, cette activité protéasique est régulée par l’intermédiaire d’inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases : les TIMP (“Tissue Inhibitors of Metalloproteinases”).

Chez les vertébrés, 4 TIMP ont été mis en évidence : TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4. Ces inhibiteurs tissulaires sont spécifiques des métalloprotéases, chacun possédant un profil particulier d’inhibition de MMP (Tableau 4).

Les TIMP modulent la dégradation de la matrice extracellulaire pendant les processus de remaniements tissulaires. A l’instar de nombreux autres systèmes, la perte du contrôle de la balance MMP/TIMP joue, dans certaines tumeurs, un rôle clé dans la progression tumorale en favorisant la désorganisation du tissu sain environnant (Jiang, Goldberg et coll. 2002).

Concernant TIMP-3, l’accumulation de données expérimentales et cliniques a conduit à considérer le gène *TIMP-3* comme un probable gène suppresseur de tumeur.

A – DESCRIPTION DU GÈNE ET DE LA PROTEINE

Le gène codant pour TIMP3 nommé « Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory » est localisé sur le bras long du chromosome 22 (22q12-q13) et couvre environ 63 Kb (Wilde, Hawkins et coll. 1994). La région codante est située dans l’intron V du gène codant pour la synapsin III. La séquence comprend 5 exons et présente une forte homologie avec les séquences codantes des trois autres TIMP (Hammani, Henriet et coll. 1996). Trois ARNm distincts, mesurant 5, 2,6 et 2,4 Kb, ont été mis en évidence par Wilde et coll, variations probablement liées à des modifications dans la taille du signal de polyadénylation (Wilde, Hawkins et coll. 1994).

Les ARNm de TIMP-3 sont exprimés dans de nombreux tissus et le transcrit de 5 Kb prédomine. Le placenta, tissu le plus riche en ARNm de TIMP-3, synthétise préférentiellement le transcrit de 2,4 Kb.

La protéine est constituée de 188 acides aminés et présente un site de N-glycosylation au niveau de l’extrémité C-terminale, ce qui lui confère un PM de 24 kDa après maturation.

La protéine TIMP3 est organisée en deux domaines, le domaine C terminal de 64 aa et le domaine N terminal de 124 aa qui assure la fonction inhibitrice de la protéine. La présence de 12 résidus cystéines contribue au maintien structural et fonctionnel de TIMP-3 par la formation de 6 ponts disulfures (Figure 14).

B - RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE TIMP-3

La régulation de l'expression de TIMP3 a été caractérisée dans deux types cellulaires (chondrocytes et fibroblastes) où elle apparaît résulter de deux voies de signalisation dépendantes du TGF β .

Le TGF β exercerait un contrôle transcriptionnel sur le gène de *TIMP-3* en augmentant de manière dose dépendante la synthèse de ses ARNm, sans par ailleurs en modifier la stabilité. Au niveau moléculaire, ce facteur de croissance induit l'activation de la voie ERK-MAP kinase, aboutissant à la phosphorylation du facteur de transcription SP-1, pour lequel le promoteur de TIMP3 possède 4 sites de fixation (en aval de la position -112 par rapport au codon initiateur). La stimulation de cette voie induit donc l'expression de TIMP-3 (Garcia-Alvarez, Ramirez et coll. 2006) (Qureshi, Sylvester et coll. 2005).

D'autre part, la N-acétyl cystéine (NAC), réduit l'induction de l'expression de TIMP-3 par le TGF β dans les cellules cartilagineuses. Ce mécanisme découle d'une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par le TGF β , en présence de NAC. Le TGF β , par l'intermédiaire des ROS, étant capable d'activer la voie de signalisation des SMAD *via* SMAD-2, la régulation de l'expression de TIMP-3 dépendrait, dans ce modèle d'une voie de signalisation utilisant SMAD-2 (Li, Qureshi et coll. 2004).

Enfin, il existerait une régulation épigénétique de l'expression de TIMP-3 par hyperméthylation des îlots CpG du promoteur, qui a été mise en évidence sur un certain nombre de lignées tumorales et de tumeurs primaires. Par exemple, il a été démontré expérimentalement, la réexpression de TIMP-3 grâce au traitement par un agent déméthylant (5-aza 2'deoxyctidine) sur une lignée colique tumorale (SW48) n'exprimant plus ce gène (Bachman, Herman et coll. 1999).

C - RÔLES DE TIMP-3

1- Inhibiteur de métalloprotéases

Comme tous les membres de sa famille, TIMP-3 présente une activité inhibitrice de protéases portant sur l'ensemble des MMP, mais cependant plus marquée sur les enzymes suivantes : MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 et MMP-9 (Tableau 4).

2 – Inhibiteur du VEGFR2

Parallèlement, TIMP-3 constitue un inhibiteur compétitif du récepteur VEGFR2 (“Vascular Endothelial Growth Factor Receptor”). La fixation de TIMP-3 sur ce récepteur inhibe celle du facteur de croissance endothélial VEGF. L’activation de ce récepteur initiant le phénomène d’angiogénèse, TIMP-3 possède donc des propriétés anti-angiogéniques qui constituent une piste thérapeutique déjà en cours d’investigation (Qi, Ebrahim et coll. 2003).

3 - Inhibiteur d’ADAM-17

L’autre intérêt de TIMP-3 réside dans sa capacité à inhiber ADAM-17 (« A Disintegrin and Metalloprotease domains 17 »), une enzyme impliquée dans de nombreux processus inflammatoires et prolifératifs (Anand-Apte, Bao et coll. 1996).

En effet, cette métalloprotéase membranaire, appelée aussi TACE (« TNF α converting enzyme »), a initialement été décrite comme la principale enzyme responsable d’une part, de la libération de la forme active du TNF α soluble à partir du pro-TNF α membranaire et d’autre part, du clivage des récepteurs du TNF α impliqués dans des phénomènes inflammatoires et apoptotiques (Mannello et Gazzanelli 2001). De fait, TIMP-3 joue un rôle crucial dans la régulation de la cytokine pro-inflammatoire TNF α (Black 2004).

Par ailleurs, ADAM-17 assure l’activation par clivage protéolytique de facteurs de croissance épithéliaux comme le TGF α (« Transforming growth factor »), l’HB-EGF (« Heparin Binding Epidermal Growth Factor ») et l’amphiréguline qui sont des ligands du récepteur EGFR (« Epidermal Growth Factor Receptor »). L’activation de ce récepteur entraîne une augmentation de la division cellulaire, de l’angiogénèse, de la diffusion métastatique et une inhibition de l’apoptose (Woodburn 1999)

Sur des souris “nude” une équipe a récemment démontré le rôle pivot d’ADAM-17 dans l’activation de l’EGFR *via* le TGF α et le développement tumoral. Parallèlement chez l’homme, une hyperexpression majeure d’ADAM-17 a été retrouvée sur des séries de tumeurs mammaires (Borrell-Pages, Rojo et coll. 2003). Récemment, notre équipe a mis en évidence, sur une série d’adénocarcinomes coliques, une surexpression transcriptionnelle et protéique d’ADAM-17, localisée aux cellules tumorales et endothéliales, dans plus de 90 % des cas (Blanchot-Jossic, Jarry et coll. 2005). Ces données cliniques permettent d’évoquer un rôle important du système ADAM-17/EGF-R dans le processus tumoral. Par conséquent, l’inhibition d’ADAM-17 par TIMP-3 confère théoriquement à celui-ci des propriétés anti-prolifératives.

ENZYMES/ RECEPTEUR	SUBSTRATS/LIGAND
Collagènases MMP1, 8, 13	Collagène I, II, III,, IV, VII, X, protéoglycan
Stromélysines MMP3, 10, 11	Collagène II, IV, IX, X, XI, fibronectine, TGFβ
Gélatinases MMP2, 9	Gélatine, collagène IV, V, V, VII, XI, fibronectine, plasminogène, laminine, TGFβ
MT-MMP : MMP14, 15, 16, 17, 24, 25	ProMMP2, 13, collagène, fibronectine, TGFβ
Autres MMP MMP7, 12, 26, 28	Elastine, fibrine, collagène IV, protéoglycan, fibronectine
TACE / ADAM17	proTNFα, TGFα, HB-EGF, Amphiréguline, TNFRI, TNFRII
VEGFR* * Inhibition de l'interaction récepteur/ligand	VEGF

Tableau 4 : Profil d'inhibition de TIMP-3 d'après Mohammed et coll (Mohammed, Smookler et coll. 2003)

D – TIMP-3 ET PATHOLOGIES

1 - "Sorsby's fundus dystrophy" SFD

C'est par des études de ségrégation dans des familles atteintes de dystrophie rétinienne que le locus morbide de cette maladie a été localisé en 22q12-13. Puis secondairement, le clonage de cette région a permis la découverte du gène *TIMP-3* responsable de la maladie (Weber, Vogt et coll. 1994).

Des mutations ponctuelles faux-sens du gène *TIMP-3* sont responsables d'un syndrome héréditaire de dégénérescence maculaire (Sorsby's fundus dystrophy), entraînant une cécité vers l'âge de 40 ans. Ces mutations, dont la plus fréquente conduit à la substitution d'une sérine en position 181 par une cystéine (S181C), n'induisent pas de modification de l'activité inhibitrice. La mutation S181C entraîne la formation d'un pont disulfure supplémentaire et une dimérisation de *TIMP-3*. Ces formes sont probablement à l'origine de l'accumulation rétinienne de la protéine (Langton, Barker et coll. 1998).

2 - TIMP-3 et cancer

Un certain nombre d'études fonctionnelles ont montré que la surexpression de *TIMP-3* induisait une diminution de la croissance tumorale, de l'angiogénèse, de l'invasion et de la dissémination métastatique. En parallèle, l'analyse des conséquences de l'altération de l'expression de *TIMP-3* dans certains processus cancéreux a permis de confirmer ces premières

observations expérimentales. Aujourd'hui, ces arguments permettent de considérer TIMP-3 comme un gène suppresseur de tumeur potentiel.

a - Effet sur la croissance tumorale

In vivo, l'injection à des souris "nude", de cellules de lignée de mélanome ou de carcinome mammaire transfectées par TIMP-3, a permis d'observer un effet inhibiteur sur la croissance tumorale. A l'inverse, *in vitro*, la surexpression de TIMP-3 dans deux lignées cancéreuses n'avait pas montré d'effet sur la croissance tumorale. Devant l'absence d'effet *in vitro*, les auteurs ont donc conclu que les propriétés anti-tumorales de TIMP-3 ne devaient s'exercer qu'en présence du micro environnement tumoral sur lequel d'une part les propriétés inhibitrices de MMP de TIMP-3, prévenant la libération de facteurs de croissance tumoraux séquestrés par la matrice extracellulaire et d'autre part, ces propriétés anti-angiogéniques peuvent s'exprimer (Anand-Apte, Bao et coll. 1996).

Par ailleurs, TIMP-3 par son effet inhibiteur d'ADAM-17 pourrait réduire la prolifération liée à l'activation de l'EGFR par ses ligands (Hinkle, Sunnarborg et coll. 2004). A l'inverse, la diminution d'expression de TIMP-3 devrait faciliter le relargage de ces facteurs de croissance, et favoriser ainsi la croissance tumorale *via* la stimulation du récepteur de l'EGF.

b - Propriété anti-angiogénique

L'angiogénèse correspond au processus par lequel de nouveaux capillaires se développent à partir des vaisseaux préexistants. Physiologique pendant la croissance embryonnaire, ce mécanisme peut devenir pathologique et constituer par exemple un phénomène indispensable aux phases de croissance et d'invasion tumorale. Le VEGF (vascular endothelial growth factor), facteur de croissance de l'angiogénèse, se fixe à ses récepteurs spécifiques : le VEGFR1 et surtout le VEGFR2 (ou KDR), qui assurent la transduction du signal *via* leurs activités tyrosine kinase.

Une étude sur un modèle embryonnaire animal a montré que la propriété anti-angiogénique particulière de TIMP-3 passait par une inhibition compétitive de la fixation du VEGF sur le récepteur VEGFR2 (KDR). Par ailleurs, les auteurs ont parallèlement démontré que les effets inhibiteurs de TIMP-3 sur le VEGFR et sur les MMP étaient indépendants. L'hypothèse d'un effet antiangiogénique de TIMP-3 par inhibition de métalloprotéases, basée sur l'observation d'une forte activité métalloprotéasique aux premières étapes de l'angiogénèse, était ainsi exclue (Qi, Ebrahim et coll. 2003).

c - Effet proapoptotique

La surexpression de TIMP-3 dans certains modèles cellulaires est capable d'induire une apoptose de Type II, caspase dépendante, médiée par sa fonction inhibitrice. Cette voie apoptotique débute par l'activation de récepteurs transmembranaires possédant des domaines de mort comme TNFR1, FAS et TRAIL RI. TIMP-3 entraîne une stabilisation membranaire de ces récepteurs qui lorsqu'ils sont stimulés, peuvent engager la cellule dans un processus de mort cellulaire programmée (Bond, Murphy et coll. 2002) (Ahonen, Poukkula et coll. 2003). Or, certains auteurs ont démontré que le clivage du TNFR1 (p55) dépendant d'ADAM-17 pouvait être inhibé par TIMP-3 et que, le maintien de ce récepteur au niveau membranaire sensibilisait les cellules à l'effet pro-apoptotique du TNF α (Peiretti, Canault et coll. 2005).

Par ailleurs, l'étude de Lam et coll, a montré par l'utilisation de puces à ADN, que des cellules de gliomes transfectées et sur-exprimant TIMP-3 développaient *in vitro* un profil d'expression proapoptotique par synthèse de caspases. Par ailleurs un grand nombre de gènes impliqués dans les processus angiogéniques et prolifératif voyaient leur expression modulée par celle de TIMP-3 (Lam, Sian Lim et coll. 2005).

3 - Diminution d'expression de TIMP-3 par altération épigénétique

Depuis les premières observations sur lignée murine, d'absence d'expression de TIMP-3 attribuable à une altération épigénétique, l'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur de TIMP-3 a été caractérisée sur de nombreuses autres lignées et plusieurs types de cancers primitifs humains (Sun, Hegamyer et coll. 1995) (Bachman, Herman et coll. 1999) (Feng, Cheung et coll. 2004). Cependant peu d'études ont caractérisé simultanément la méthylation du promoteur de TIMP-3 et son niveau d'expression protéique.

Une série d'adénocarcinomes de l'œsophage montre que plus de 90 % des tumeurs, présentent une méthylation du promoteur de TIMP-3, corrélée à la fois à une diminution d'expression de TIMP-3 et à une réduction de la survie des patients (Darnton, Hardie et coll. 2005). Néanmoins, une autre étude réalisée sur des adénocarcinomes pancréatiques montre dans 50 % des cas une extinction ou une diminution forte de l'expression de TIMP-3 (ARN et protéine) qui n'est associée à une hyperméthylation du promoteur que dans 6 % des cas. Ce résultat suggère l'existence de mécanisme alternatif d'altération de l'expression de TIMP-3 dans ces tumeurs du pancréas (Fendrich, Slater et coll. 2005).

4 - TIMP-3 et cancer colorectal

Pour l'étude de TIMP-3 dans le cancer colorectal, il faut considérer deux niveaux d'exploration. Le premier concerne des travaux portant sur le niveau d'expression ou les mécanismes d'altérations de l'expression du gène. Le deuxième niveau correspond aux études génomiques réalisées dans le cadre de "screening" de gènes susceptibles d'être hyperméthylés notamment dans la voie CIMP.

a -Modification de l'expression de TIMP-3

L'induction par transfection, d'une hyperexpression de TIMP-3 dans une lignée de carcinome colique n'exprimant pas TIMP-3 (DLD-1), a permis d'obtenir une inhibition dose dépendante de la prolifération tumorale *in vitro* et *in vivo* mais également, l'induction d'une apoptose en milieu liquide non observée sur la lignée tumorale native (Bian, Wang et coll. 1996).

Dans le travail de Bachman et coll, l'hyperméthylation du promoteur de TIMP-3 a été évaluée dans un premier temps par PCR spécifique de méthylation (MSP) puis par séquençage, à la fois sur des lignées tumorales coliques et sur des tumeurs primaires. L'incidence de l'hyperméthylation a été évaluée à 63 % (5/8) dans les lignées et à 27 % (6/26) dans les tumeurs coliques primaires. Aucune méthylation n'a par ailleurs été observée sur des tissus sains (0/10). Sur les lignées, l'absence d'expression d'ARNm de TIMP-3, restaurée secondairement par un traitement à la 5-aza-dC, a confirmé le rôle direct de l'hyperméthylation dans l'altération de l'expression (Bachman, Herman et coll. 1999).

Les mécanismes d'altération de l'expression de TIMP-3 ont également été explorés par Brueckl et coll sur deux séries de tumeurs primitives, et les résultats confrontés au statut d'instabilité microsatellitaire. Sur une première série de 42 tumeurs, une diminution significative du niveau d'expression de TIMP-3 a été mise en évidence dans 29 % des cas (12/42) par rapport au tissu sain apparié. Par ailleurs, 37 % (7/19) des tumeurs instables (MSI) et 22 % (6/24) des tumeurs stables (MSS) étaient associées à une réduction d'expression de TIMP-3. Sur une deuxième série de 64 tumeurs, les auteurs ont exploré les mécanismes potentiels d'altération du gène *TIMP-3*. L'hyperméthylation évaluée par MSP, a été retrouvée dans 27 % (17/64) des carcinomes coliques, dont 28 % (11/40) avec instabilité associée et 25 % (6/24) sans instabilité. D'autre part, le phénotype MSI étant caractérisé par une fréquence élevée de mutations au niveau des séquences répétées, les auteurs se sont intéressés à un microsatellite composé de 7 cytidines, localisé à la fin de l'exon 5, région où se concentrent les altérations héréditaires associées à la

SFD. Des mutations induisant un décalage du cadre de lecture, ont alors été mises en évidence dans 8 % (3/40) des tumeurs MSI. A l'inverse, les tissus sains appariés, les tumeurs MSS et quelques lignées exprimant TIMP-3 (SW480) ne présentaient aucune altération de ce microsatellite. Et finalement, aucune des tumeurs MSI présentant une hyperméthylation du promoteur de TIMP-3 (11/40) n'était porteuse d'une mutation du microsatellite étudié. Cependant ces événements ne sont pas mutuellement exclusifs puisque la lignée SW48 n'exprimant pas TIMP-3, est à la fois mutée et hyperméthylée pour le gène *TIMP-3*

Selon ces auteurs, le gène TIMP-3 en accord avec les critères de définition du statut MSI, peut ainsi être considéré comme un gène cible potentiel dans la voie d'instabilité génétique de la carcinogenèse colorectale (Brueckl, Grombach et coll. 2005).

Enfin, les souris invalidées pour le gène TIMP-3 présentent un phénotype inflammatoire délétère restreint au foie sans aucun stigmate néoplasique rapporté. Dans ce modèle, la valence régulation de l'inflammation de TIMP-3 est prépondérante (Black 2004). Ces modèles murins invalidés ne permettent pas d'apporter d'éléments concluant quant au rôle de TIMP-3 dans la carcinogenèse.

b – TIMP-3 et profil CIMP

Ce niveau d'étude est très bien documenté, puisque le gène *TIMP-3* fait partie des gènes cibles dans l'exploration du phénotype CIMP. La fréquence d'hyperméthylation du promoteur de TIMP-3 varie en fonction de l'origine de la tumeur. Les tumeurs rénales présentent le taux d'hyperméthylation le plus important (78 %), pour les autres localisations (sein, cerveau et poumon), environ 1/4 des tumeurs montrent une hyperméthylation du promoteur de *TIMP-3*. Dans le cancer colorectal, les hyperméthylations des gènes *p16INK4A*, *p14* et *MGMT* semblent suffire pour caractériser le phénotype d'hyperméthylation. Cependant, compte tenu des rôles de TIMP-3 dans l'invasion et la progression métastatique, l'étude du statut de méthylation de *TIMP-3* pourrait fournir un critère d'évaluation du potentiel métastatique (Esteller, Risques et coll. 2001).

OBJECTIFS

TIMP-3 a acquis le statut de gène suppresseur de tumeur sur des bases essentiellement expérimentales notamment par modulation de son expression dans certains modèles tumoraux *in vitro*. Chez l'homme, plusieurs études ont montré de fréquentes altérations épigénétiques de son promoteur dans les pathologies cancéreuses, avec par exemple 77 % d'hyperméthylation dans le cancer du rein. L'association fréquente entre ce type d'altération et une sous-expression de la molécule a suggéré l'inactivation de TIMP-3 dans ces tumeurs.

Dans le cancer colique, l'altération épigénétique de TIMP-3 est peu fréquente (30 %). Par ailleurs, les travaux concernant cette pathologie ont peu confronté le niveau d'expression protéique de TIMP-3 à son niveau d'expression transcriptionnel, l'état de méthylation de son promoteur et les données cliniques du patient.

Le but de ce travail était :

- ❖ d'étudier les modifications du niveau d'expression du gène *TIMP-3* dans une série d'adénocarcinomes colorectaux à la fois au niveau transcriptionnel et protéique (PCR quantitative, immunofluorescence/confocal et immunohistochimie sur TMA),
- ❖ de déterminer dans les cas de diminution d'expression au niveau tumoral la part réelle du mécanisme d'hyperméthylation du promoteur de TIMP-3 (MS PCR),
- ❖ d'évaluer la signification clinique de ces modifications d'expression dans notre série d'adénocarcinomes colorectaux,
- ❖ de confronter les niveaux d'expression transcriptionnel d'ADAM-17 et de son inhibiteur TIMP-3 afin d'apprécier l'existence d'une co-régulation possible dans le cadre du cancer colorectal (PCR quantitative).

MATERIELS ET METHODES

A - MATÉRIELS

1 - Patients et prélèvements tissulaires

Les collections tissulaires cliniquement annotées, prélevées chez des patients opérés pour résection colique, sont collectées pour la tumorothèque du CHU de Nantes.

Pour notre étude, nous avons utilisé 39 prélèvements tumoraux accompagnés chacun d'un échantillon de tissu sain prélevé sur la partie macroscopiquement saine du fragment colique réséqué. Les prélèvements sont récupérés directement au bloc et confiés au laboratoire d'anatomopathologie pour analyse. Des fragments de chaque couple tumeur/tissu sain sont alors congelés rapidement dans l'azote liquide pour constituer les collections. D'autres fragments sont fixés et inclus en paraffine.

Les caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des patients sont répertoriés en annexe 1.

Les prélèvements sont tous des cancers coliques primitifs dont le stade TNM est renseigné.

2 - Puces tissulaires

La totalité des prélèvements collectés ont été inclus sur puces tissulaires ou "Tissue Micro Array". Des zones représentatives de la tumeur et du tissu sain apparié sont sélectionnées par le pathologiste sur les blocs en paraffine. Des carottes de 3 µm de diamètre sont confectionnées à l'aide d'un Tissue Arrayer (Alphélys®) puis incluses en paraffine. Dans chaque bloc de paraffine, plusieurs dizaines de carottes sont rassemblées. Des coupes de 5 µm sont réalisées au microtome, laissant apparaître autant de spots que de carottes incluses. Cette technique permet une analyse immunohistochimique à haut débit. Pour chaque patient, 3 spots tumoraux et 1 spot de tissu normal sont rassemblés sur la même puce.

B - MÉTHODES

1 - Etude de la méthylation du gène TIMP-3

a - Extraction de l'ADN génomique

Les échantillons sont prélevés au scalpel à partir des tissus congelés à -80°C en travaillant sur carboglace. Des échantillons pour extraction d'ARN sont réservés et conservés à -80°C.

Nous avons suivi le protocole du kit Quiamp® DNA Mini Kit d'extraction d'ADN génomique à partir de tissu. Les échantillons sont introduits dans des tubes de Fastprep disrupteur.

120 μL de tampon de lyse ATL du kit sont ajoutés avant dilacération mécanique au Fastprep (pendant 10 s à vitesse 4) précédée d'une dilacération manuelle à l'aide de ciseaux fins.

Une centrifugation courte de 2 min à 11000 tr/min est pratiquée pour réduire l'émulsion. Dans un tube Eppendorf de 1.5 mL, on introduit successivement l'ensemble du lysat puis 20 μL de solution de protéinase K du Kit. La digestion protéolytique est maintenue toute une nuit à 56°C. Après centrifugation brève, l'extrait, additionné de 200 μL de tampon AL, est vortexé 15 s puis incubé 10 min à 70°C. 200 μL d'éthanol sont alors ajoutés à l'extrait et après mélange au vortex de 15s, le mélange est introduit dans une mini colonne (Quiamp® DNA mini Kit). La colonne est centrifugée à 6000g pendant 1 min, puis elle est lavée successivement avec : 500 μL de AW1, 500 μL de AW2, l'éluat étant éliminé après chaque centrifugation (6000 g pendant 2 min). L'ADN purifié est élué par 200 μL de tampon AE après une incubation préalable d'1 min suivi d'une centrifugation à 6000g pendant 1 min.

L'ADN génomique purifié est stocké à -20°C dans les tubes de 1,5 mL

b - Traitement de l'ADN génomique (ADNg)

Le traitement d'un ADNg par le bisulfite de sodium entraîne la conversion de l'ensemble des cytosines en uraciles à l'exception des celles qui présentent un radical méthyle en position 5 (Figure 15).

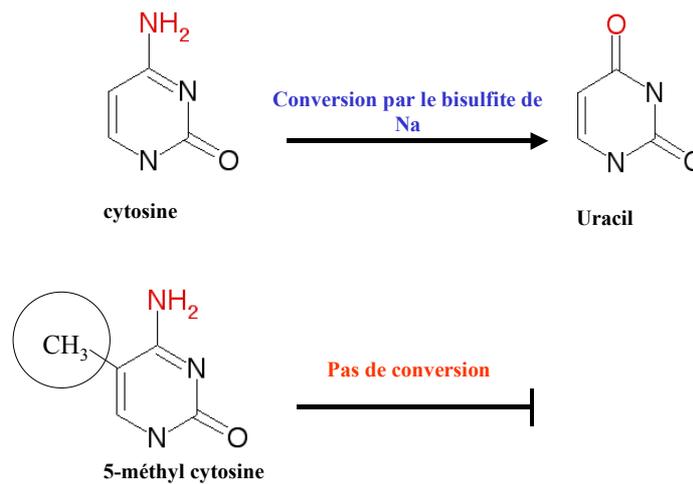


Figure 15: Conversion chimique des cytosines non méthylées en uracil

Le traitement est réalisé à l'aide du kit EZ DNA Methylation-Gold Kit® de chez ZYMO RESEARCH. Il utilise le traitement classique de l'ADNg par le bisulfite de sodium, suivie d'une étape de désulphonation sur mini-colonne.

c - Protocole

La quantité d'ADN génomique purifié que l'on peut traiter par cette technique s'étend de 500 pg à 2 µg par traitement. La quantité optimale étant comprise entre 200 et 500 ng.

Cette méthode réalise la dénaturation et la conversion des cytosines en une seule étape.

Le réactif de conversion (CT conversion reagent) est préparé extemporanément comme décrit dans le mode opératoire du kit. Un tube de réactif permet de réaliser 10 traitements. A 130 µL de CT « conversion reagent » on ajoute 20 µL d'ADNg dans un tube de PCR (0.5 mL). Compte tenu des fortes concentrations d'ADNg obtenues lors de l'extraction, la quantité d'ADNg est ajustée entre 200 et 500 ng, et le volume complété à 20 µL par ajout d'eau distillée.

Le traitement est réalisé dans un thermocycleur à bain d'huile dont le sabot est adapté aux volumes importants (150 µL) (Perkin Elmer® cetus 480). Après l'étape de dénaturation de 10 min à 98°C et une étape intermédiaire de 30 min à 53°C, la réaction se poursuit par 8 répétitions des 2 étapes suivantes : 6 min à 53°C et 30 min à 37°C. A la fin du traitement, les tubes sont refroidis à 4°C puis centrifugés.

L'ADNg traité est fixé sur une colonne Zymo-Spin IC Column fournie dans le kit. A chacune des étapes suivantes, le réactif est éliminé par une centrifugation de 30 s à la vitesse de 13 000 tr/min. 600 µL de M-Binding Buffer sont versés sur la colonne auxquels on ajoute la totalité de l'ADN traité. La colonne est agitée plusieurs fois par retournement puis centrifugée, le filtrat est jeté. Pour l'étape de désulphonation, 200 µL de M-Desulphonation Buffer sont introduits dans la colonne et après une incubation de 15 à 20 min, la colonne est centrifugée et le filtrat éliminé. Deux étapes de lavage sont requises : 200 µL de M-wash Buffer sont utilisés pour chaque lavage. La solution de lavage est éliminée par centrifugation. L'ADN est élué sous 10 µL de M-Elution Buffer et recueilli dans un tube Eppendorf (1.5 mL) par centrifugation.

L'ADNg traité est conservé à -20°C. Pour une utilisation en PCR classique le fabricant recommande l'utilisation de 2 à 4 µL d'ADNg traité.

d – Methyl Specific PCR

La PCR spécifique de méthylation ou MSPCR est une méthode qualitative qui permet de déterminer si l'ADNg natif est méthylé ou non. Le traitement transformant les cytosines en uracil, les amorces doivent être complémentaires de l'ADN traité. On utilise deux couples d'amorces, un pour mettre en évidence la méthylation (amorces M "methylated") et l'autre pour mettre en évidence l'absence de méthylation (amorces UM "unmethylated"). Ainsi les amorces UM doivent être capables de s'hybrider avec l'ADNg traité, en l'absence de méthylation au niveau de l'ADNg natif; et à l'inverse, les amorces M doivent s'hybrider avec l'ADNg traité, si les CpG de l'ADN natif sont méthylés. (Schémas en annexe 2).

Les séquences utilisées dans notre travail, ont été décrites dans la littérature ((Bachman, Herman et coll. 1999)). L'îlot CpG principal du promoteur de TIMP-3 est localisé entre les positions -200 et +300 autour du site de début de la transcription. Bachman et coll ont précisé que l'influence de la méthylation sur l'expression de TIMP-3 était restreinte à la zone -91 +25. Les amorces ont donc été conçues pour s'hybrider dans cette zone, en ciblant 3 dinucléotides CpG du promoteur de TIMP-3. Les séquences sont reprises dans le tableau 5.

Amorces M	5' (sens)	5' CGTTTCGTTATTTTTTGTTTTCGGTTTC 3'
	3' (antisens)	5' CCGAAAACCCCGCCTCG 3'
Amorces UM	5' (sens)	5' TTTTGTTTTGTTATTTTTTGTTTTGGTTTT 3'
	3' (antisens)	5' CCCCCAAAACCCACCTCA 3'

Tableau 5 : Séquences des amorces de la MS PCR TIMP-3

Les amorces sont reconstituées dans l'eau distillée. Les solutions filles à 10 pmol/μL sont stockées à -20°C.

La température optimale d'hybridation est déterminée pour chaque couple par des PCR réalisées en gradient de température sur thermocycleur Hybaid®. Les températures retenues sont 62 et 63°C respectivement pour les couples UM et M. Le mélange réactionnel utilisé est précisé dans le tableau 6 (volumes en μL pour 1 PCR).

H₂O	9,3
Tp10x	2
dNTPs	0,5
Amorce 5'	2
Amorce 3'	2
Taq polymerase	0,2

Tableau 6 : Mélange réactionnel MS PCR

Le mélange réactionnel est identique pour les deux PCR. Le volume d'ADNg traité utilisé est de 4 μ L pour chaque PCR. Compte tenu de ce volume la réaction est réalisée en simple. Le nombre de cycles est identique pour les deux PCR et fixé à 40. les différentes étapes de la réaction sont précisées dans le tableau :

Activation de l'enzyme (5 s à 95°C) puis 40 cycles de :

Dénaturation	Hybridation	Elongation
5 s à 95°C	10 s à 62/63°C	20 s à 72°C

Tableau 4 : Cycle des PCR M et UM

Par ailleurs, nous avons utilisé des témoins réactionnels traités de la même manière que nos échantillons.

- Un ADNgm génomique méthylé par une méthylase, employé comme contrôle positif de la PCR M "CpGenome Universal methylated DNA" (CHEMICON®).
- D'autre part l'ADN génomique de SW480, lignée colique productrice de TIMP-3, a par ailleurs été utilisé comme témoin positif de la PCR UM.

e - Révélation des produits de PCR

Nous avons utilisé des gels à 4 % (2/3 Nusieve® et 1/3 d'agarose) imprégné de bromure d'ethydidium. Les échantillons sont déposés dans le gel à raison de 5 μ L par puits additionné d'1 μ L de "loader". Après migration à 100 V constants pendant 40 min, les bandes d'intérêts sont révélées puis photographiées sous lumière UV.

2 - Etude de l'expression des gènes TIMP-3 et ADAM-17

Expression au niveau transcriptionnel

a - Extraction

Les ARN totaux sont extraits par technique Rneasy® de chez Quiagen® utilisant des mini-colonnes. Les échantillons de 10 à 20 mg conservés à - 80°C sont additionnés de 400 μ L de tampon β -ME RLT. Les échantillons sont broyés et vortexer à température ambiante. Après centrifugation, 400 μ L d'éthanol à 70 % sont ajoutés au surnageant du lysat. Après homogénéisation, le mélange est rapidement introduit dans une colonne puis centrifuger 15 s à 8000 g. Pour les lavages, on introduit successivement après chaque centrifugation (15 s 8000 g) et élimination de l'éluat : 700 μ L de RW1, 500 μ L de RPE et 500 μ L de RPE. L'élution de l'ARN purifié est réalisé dans 30 μ L d'eau Rnase-free par une centrifugation d'1 min à 8000 g.

b - Rétrotranscription

Après dosage de l'ARN à 260 nm (Nanodrop), 5 à 10 µg d'ARN sont dénaturés 3 minutes à 72°C puis rétrotranscrits 60 minutes à 42°C dans un volume réactionnel de 50 µL contenant :

Random Primers	Tampon 5X	dNTP	MMLV-RT	Rnasin	ARN dénaturé	H₂O
2 µL	10 µL	1 µL	0,6 µL	0,4 µL	5 à 10 µg	QS 50 µL

Tableau 5 : Mélange réactionnel pour la synthèse d'ADNc

Tous les réactifs sont fournis par la société Promega. La réaction se fait dans un thermocycleur Crocodile. Les ADNc obtenus sont congelés à -20°C.

c - PCR temps réel quantitative

➤ Technique SYBR Green

Cette technologie s'appuie sur l'utilisation du SYBR Green, agent intercalant qui après excitation, émet une fluorescence lorsqu'il est inséré dans l'ADN double brin. Chaque cycle d'amplification augmente la quantité d'ADN, et donc la fluorescence du SYBR Green intercalé, ce qui permet la quantification relative de l'ADNc cible par comparaison à une gamme d'étalonnage. La spécificité de cette méthode repose uniquement sur celle des amorces, car le SYBR Green s'intercale dans n'importe quel ADN double brin. L'automate utilisé est le Rotorgene® (Corbett Research). Pour notre étude, cette technique a été utilisée pour mesurer l'expression au niveau transcriptionnel des gènes TIMP-3 et β-actine. Les amorces, le mélange réactionnel et le protocole de la PCR Quantitative SYBR Green TIMP-3 et β-actine sont décrits dans les tableaux 9 et 10.

Gènes	Amorces sens	Amorces anti sens
TIMP-3	5'CCTTCGGCACGCTGGTCTCTACAC	5' ACCCAGGTGATACCGATAGTTCAGC
β-actine	5'CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG	5' GGAGCAATGATCTTGATCTTC

Tableau 6 : Séquences des amorces des PCR quantitatives : TIMP-3 et β-actine

H₂O	5,3
Tp10x	2
dNTPs	0,5
Amorce 5'	0,5
Amorce 3'	0,5
SYBR Green	1
Taq polymerase	0,2

Tableau 7 : Mélange réactionnel (V en µL pour un échantillon de 10 µL) pour les PCR quantitatives en SYBrGreen

Nombre de cycles	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Pré-acquisition
35	5 sec à 95°C	10 sec à 63°C	20 sec à 72°C	15 sec à 87°C

Tableau 8 : Cycle des PCR quantitatives en SYBrGreen

➤ **Technique : sonde d'hydrolyse Taqman®**

La technologie utilisée est celle des sondes d'hybridation, qui permet une détection à la fois très spécifique et d'une grande sensibilité. Chaque sonde est flanquée d'un fluorophore et d'un quencher qui empêche l'émission de fluorescence du fait de sa proximité lorsque la sonde n'est pas hybridée. Lors de l'hybridation, la sonde interagit spécifiquement avec sa séquence complémentaire sur l'ADNc dénaturé. Puis la Taq polymérase, grâce à son activité 5' exonucléasique, hydrolyse la sonde et libère ainsi le fluorophore de l'influence du quencher. Il y a alors émission de fluorescence, proportionnellement au nombre de sondes hydrolysées, et donc au nombre de copies d'ADNc. La quantification relative est déduite d'une gamme d'ADNc extrait d'une lignée cellulaire (HT29-CI.16E pour ADAM17) pour laquelle des dilutions successives connues sont testées dans la même expérience.

La PCR est réalisée sur une plaque 96 puits adaptée à l'automate AB7000 (Applied Biosystems®). Le protocole est le suivant : (pour un puits)

Taqman Universal PCR Master Mix	10 µL
Sonde et amorces spécifiques	1 µL
ADNc dilué au 1/10	9 µL

Chaque échantillon est testé en duplicate, la quantification se faisant sur la moyenne des résultats obtenus. Les paramètres du cycle réactionnel sont les suivants :

Après activation de la Taq 10 minutes à 95°C, 40 cycles de :

Dénaturation	15 s à 95°C
Hybridation, Elongation et mesure	1 min à 60°C

Ce protocole a été utilisé pour analyser l'expression au niveau transcriptionnel d'ADAM17. La séquence des sondes n'est pas communiquée par le fournisseur.

Etude de l'expression de la protéine TIMP-3

a - Microscopie confocale

La microscopie confocale permet la visualisation de l'intérieur des cellules observées sur différents plans. Son principe est basé sur l'utilisation d'un laser qui, en traversant l'échantillon marqué par des fluorochromes, entraîne l'émission de fluorescence provenant des différents plans de la préparation. Un diaphragme variable ("pinhole") permet la sélection des rayons émis par le seul plan focal et l'élimination du signal provenant d'autres plans. Ainsi, l'observation successive de ces coupes virtuelles dans l'objet permet d'analyser différents plans sans fluorescence parasite. Le système optique permet également l'analyse simultanée de différentes sondes fluorescentes. Cette technique a été utilisée pour apprécier semi-quantitativement la présence et la répartition de la protéine TIMP-3 dans les échantillons tumoraux et normaux.

➤ - Préparation

La préparation est effectuée 24 à 48 h avant la lecture au confocal. Des coupes de tissu congelé de 7 à 8 μm d'épaisseur sont confectionnées à l'aide d'un microtome à enceinte réfrigérée (cryostat). Les tissus sont fixés pendant 15 min à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde à 4 % réalisée dans du PBS Dulbecco (Invitrogen®) 1X à pH 7,2-7,4. Une pré-incubation de 30 min à température ambiante des coupes dans une solution A constituée de sérum de cheval à 4 % (PBS 1X) permet le blocage du non-spécifique. La dilution au 1/50 de l'anticorps monoclonal primaire anti-TIMP-3 (R&D®) est réalisée dans la solution A et un volume de 50 à 100 μl est déposé sur les coupes pendant 1h à température ambiante. La dilution de l'anticorps secondaire anti-souris marqué (Alexa Green 488 nm, Molecular Probes) est faite dans la solution A (1/200). Après 3 lavages de 5min dans du PBS 1X, les coupes sont incubées 30 min à l'obscurité dans cette solution. Puis toujours à l'obscurité, les noyaux sont contre-colorés au TOPRO3 (molécule fluorescente rouge-1 μM , Molecular Probes) pendant 30 min à température ambiante. Après un dernier lavage, le montage de la préparation est réalisé entre lame et lamelle à l'aide d'anti-fading/polymérisant. Après 24 h de polymérisation, les lames sont lutées et conservées à 4°C et à l'abri de la lumière. Un témoin négatif sans anticorps primaire est réalisé pour chaque marquage.

➤ -Lecture au microscope confocal

La lecture est réalisée sur le microscope confocal LEICA-TCS-SP équipé d'un laser argon-krypton. Le logiciel d'acquisition des images est le TCS-NT software (Leica). Le réglage des

paramètres est réalisé sur la lame témoin négatif, puis les images sont acquises aux différentes longueurs d'onde d'excitation des fluorochromes.

b – Immunohistochimie

La localisation et les niveaux d'expression de TIMP-3 ont été évalués également sur puces tissulaires.

Les coupes déparaffinées de puces tissulaires sont préalablement soumises à un démasquage antigénique par la chaleur avant blocage des peroxydases endogènes par H₂O₂ à 3 %. Les coupes sont incubées 30 min à température ambiante avec la dilution de l'anticorps primaire, puis rinçées avant incubation 30 min avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase. La révélation est réalisée grâce au kit EnVision de Dako®. L'activité enzymatique est révélée par incubation avec de la diaminobenzidine pendant 5 min. Puis après contre-coloration à l'hématoxyline de Harris conférant une teinte bleutée aux noyaux, les coupes sont deshydratées et montées en Eukitt®.

A - ETUDE DE L'EXPRESSION DE TIMP-3 DANS LES TUMEURS COLIQUES

L'expression des ARNm du gène *TIMP-3* a été évaluée par PCR quantitative sur 39 tumeurs colorectales et leurs tissus sains appariés. Son expression protéique a été évaluée sur 32 de ces couples tumeur/tissu sain.

1 – Performances analytiques de la Gamme TIMP-3 par PCR quantitative

Nous avons mis au point une gamme permettant d'évaluer les niveaux d'expression relatifs de TIMP-3. Pour cela nous avons utilisé des dilutions d'ADNc de CaCO2, lignée colique exprimant cette protéine. La gamme a été réalisée en utilisant des dilutions d'ADNc du 1/20^{ème} au 1/2500^{ème}(Figure 16).

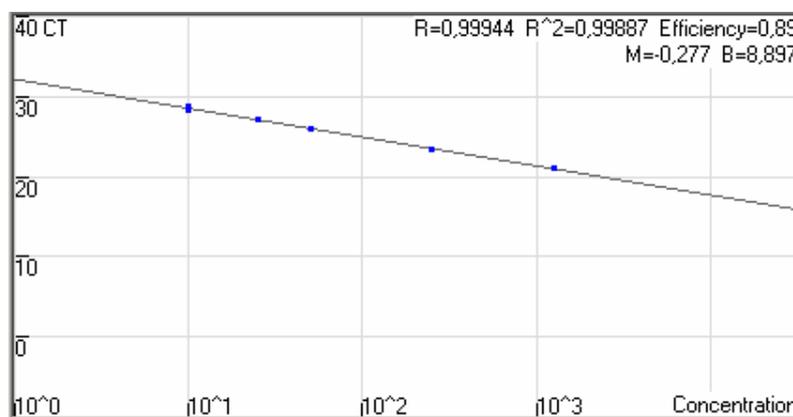
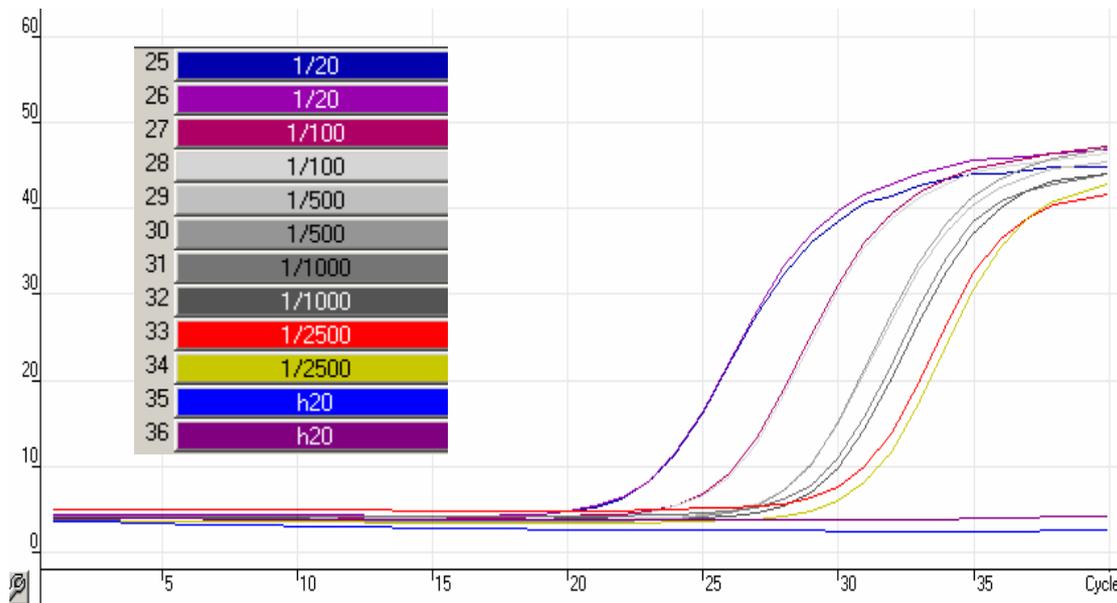


Figure 16 : Gamme TIMP-3 sur ADNc de lignée colique Caco2

Le domaine de linéarité de la technique est compris entre 1250 et 10 copies (unité arbitraire). La précision dans le domaine de mesure est excellente. De manière générale et par expérience, tous les échantillons présentant une valeur de Ct > à 35 cycles sont associés à un niveau d'expression transcriptionnel indétectable. Nous avons arbitrairement fixé la sensibilité analytique à 1 copie (unité arbitraire) correspondant à un Ct (Cycle Treshold) de 32. De plus, l'aspect des courbes de fusion nous permet de préciser que pour toutes les valeurs de CT \leq 32, les amplicons sont spécifiques.

2 – Niveau d'expression transcriptionnel de TIMP-3 entre tumeur et tissu sain apparié

Nous avons normalisé l'expression de *TIMP-3* par rapport au niveau d'expression du gène de β -actine, l'expression de ce gène de ménage étant constante et évaluée par la même technique pour l'ensemble des échantillons (résultats non figurés).

Nous avons représenté conjointement les niveaux d'expression relatifs de *TIMP-3* dans la tumeur et le tissu sain, la quantité d'ARNmessenger de *TIMP-3* est exprimée en nombre de copies/1000 copies d'ARNm de β -actine (Figure 17).

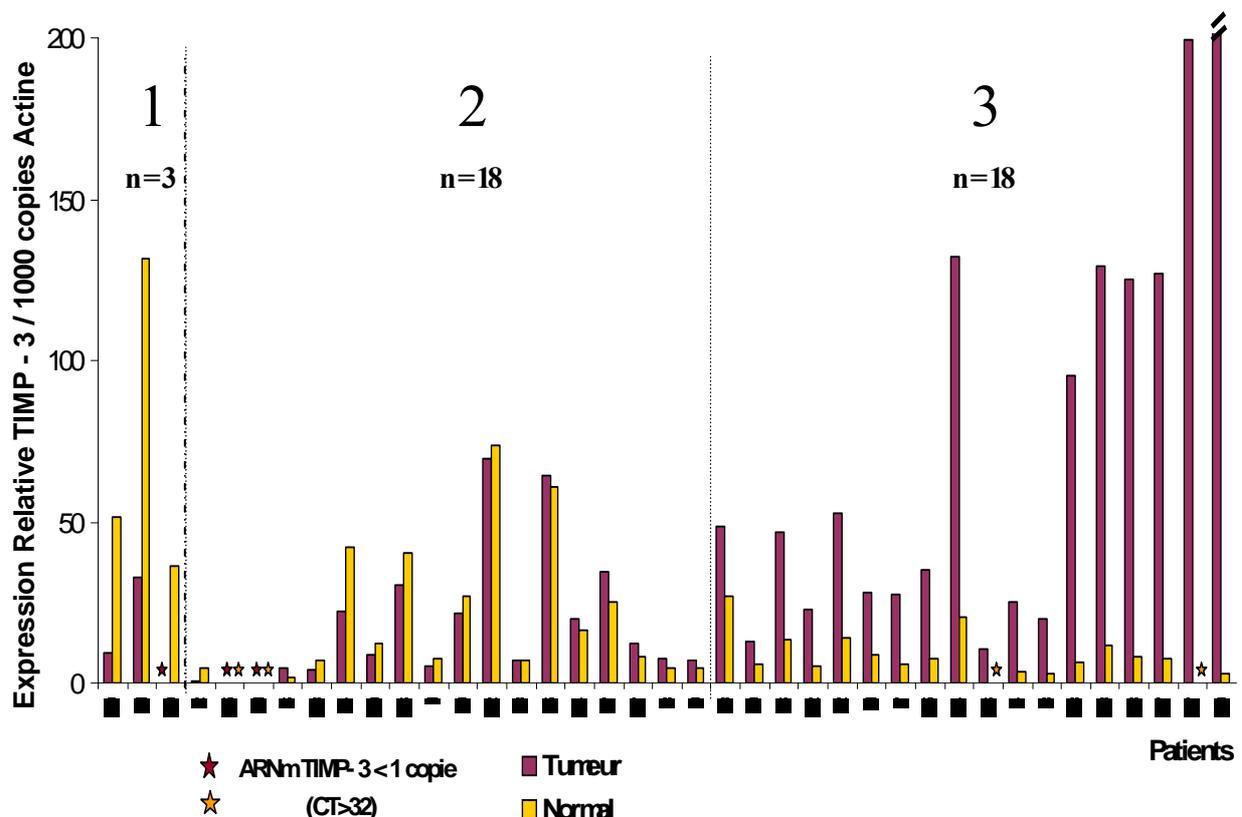


Figure 17 : Niveau d'expression relatif de TIMP-3 pour chaque couple tumeur/tissu normal apparié, classé par rapport T/N croissant.

Dans le tissu sain (histogramme jaune), le niveau d'expression moyen de TIMP-3 est faible et hétérogène [19 ± 25 copies/1000 copies d'actine]. Dans les tumeurs (histogramme grenat), les niveaux d'expression sont très variables cependant les valeurs sont en moyenne plus élevées [50 ± 80 copies/1000 copies d'actine]. Pour certains échantillons, tumoraux ou sains (★), nous avons retrouvé un niveau d'expression non significatif de *TIMP-3* ($Ct > 32$).

Nous avons comparé les niveaux d'expression de TIMP-3 entre tissu normal et tumoral. Nous avons mis en évidence 3 catégories en fonction du rapport Tumeur/Normal (T/N) :

- ❖ un premier groupe (1) formé de 3 couples (8 %, 3/39), présente une diminution d'expression du gène *TIMP-3* dans la tumeur par rapport au tissu sain ($T/N < 0,5$). En outre, ce groupe présente des taux d'expression de TIMP-3 assez importants au niveau du tissu sain (moyenne = 73 copies/1000). Pour un des couples, (patient 39), les ARNm de *TIMP-3* sont indétectables au niveau tumoral,
- ❖ le deuxième groupe (2) comprend les couples ne présentant pas de différence significative entre les niveaux d'expression du gène TIMP-3 de la tumeur et du tissu sain ($0,5 \leq T/N < 2$), et correspond à 46 % des couples (18/39). Ce groupe peut être subdivisé en deux catégories : absence de différences d'expression entre tissu normal et tumoral et niveau d'expression indétectable de TIMP-3 dans les deux tissus (échantillons 35 et 41),
- ❖ 18 autres couples soit 46 %, forment le troisième groupe (3). Pour ce dernier, le niveau d'expression de *TIMP-3* est augmenté dans la tumeur par rapport au tissu sain apparié ($T/N \geq 2$). Dans 50 % des cas (9/18), le niveau transcriptionnel de *TIMP-3* dans la tumeur est dix fois plus important que dans le tissu sain.

Cette répartition des couples en trois groupes a été utilisée pour étudier la signification clinique des variations d'expression de TIMP-3.

3- Localisation et niveau de l'expression protéique de TIMP-3

Afin d'une part de confirmer au niveau protéique les variations d'expression de TIMP-3 observées au niveau transcriptionnel et d'autre part, visualiser la localisation précise de la protéine aux niveaux tissulaires et subcellulaires, nous avons eu recours à deux techniques :

- ❖ Immunofluorescence et lecture par microscopie confocale et,
- ❖ Immunohistochimie sur "tissue micro array" de couple tumeur tissu normal.

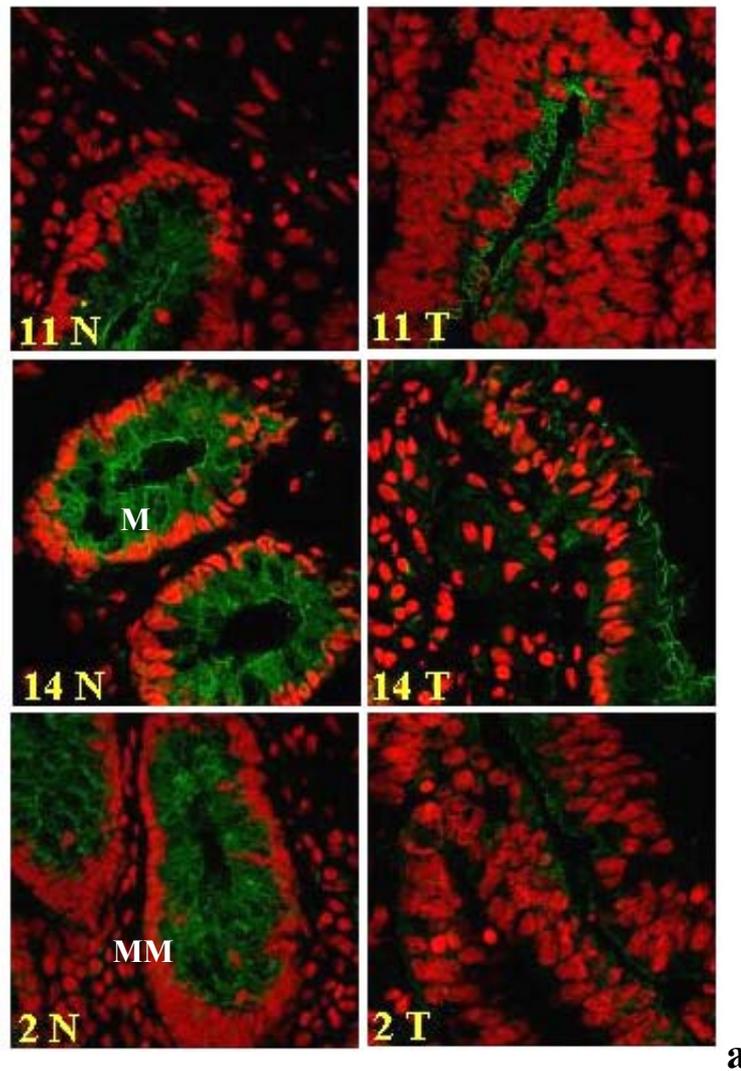
a - Evaluation par immunofluorescence et lecture en confocal

La lecture en microscopie confocale nous a permis à la fois de préciser la nature des cellules productrices de TIMP-3 et de comparer les niveaux d'expression au niveau des cellules épithéliales intestinales des tumeurs et des tissus normaux appariés.

Les clichés de 3 couples sont regroupés dans la Figure 7. Ils représentent les 3 catégories que nous avons observées en PCR quantitative.

- ❖ Patient 11 : Expression augmentée dans la tumeur *versus* tissu normal
- ❖ Patient 14 : Expression identique entre les deux membres du couple
- ❖ Patient 2 : Expression diminuée dans la tumeur par rapport au tissu sain

Les résultats sont exprimés semi-quantitativement (+, ++, +++) après observation de plusieurs champs microscopiques.



Patient	Normal	Tumeur
11	+	+++
14	+++	++
2	+++	+

b

Figure 7: a-Clichés de microscopie confocale, marquage à l'Ac monoclonal anti TIMP-3 (TIMP-3 en vert/ noyaux en rouge). N : normal ; T : Tumeur ; M : muqueuse ; MM : musculaire muqueuse.

b -Tableau d'évaluation semi-quantitative

Nous avons observé des variations d'expression protéique de TIMP-3 entre les 3 tumeurs mais également entre tissu normal et tumoral. La simple évaluation semi-quantitative des niveaux de fluorescence semble confirmer les différences observées en ARNm et l'existence de plusieurs

catégories de variations d'expression de TIMP-3 dans notre population. La quantification par logiciel (Metamorph®) pourrait confirmer ces tendances.

A noter que nous n'observons pas d'extinction complète de l'expression tumorale de TIMP-3 pour le patient 2, confirmant le niveau d'ARNm très faible relevé par PCR quantitative (Figure 17).

D'autre part, sur le plan morphologique l'analyse fine des clichés nous a permis de préciser les types cellulaires exprimant TIMP-3 et sa topographie d'expression.

Dans la muqueuse normale, TIMP-3 est exprimé au niveau des cellules épithéliales intestinales sans gradient cryptovillositaire apparent : marquages identiques en surface et au fond des cryptes. Au niveau subcellulaire, TIMP-3 est présente au niveau membranaire (apical et basolatéral). Le marquage cytoplasmique est plus discret. Les cellules immunitaires et les cellules musculaires de la musculaire muqueuse ne sont pas marquées. Au niveau inférieur de la paroi colique, les cellules musculaires lisses vasculaires de l'endothélium sont, avec les neurones des plexus sous-muqueux, les seuls types cellulaires de la sous-muqueuse présentant un marquage.

Pour les cellules tumorales, la localisation subcellulaire n'est pas modifiée. Mais le niveau d'expression est variable. Dans le stroma : les cellules endothéliales, et les myocytes ne semblent pas exprimer TIMP-3, à l'inverse de quelques cellules immunocompétentes.

b – Expression protéique de TIMP-3 : étude sur puces tissulaires TMA

La puce tissulaire ou "Tissue micro Array" (TMA) est un outil permettant en une seule expérience d'observer et d'évaluer l'expression d'une ou plusieurs protéines sur un grand nombre de tissus regroupés sur une seule lame. Le marquage a été réalisé à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-TIMP-3. 32 tumeurs et tissu normaux appariés ont été analysés par TMA.

L'appréciation chiffrée du marquage TIMP-3 est basée sur une méthode publiée qui a été utilisée pour d'autres protéines (Sinicrope, Ruan et coll. 1995)). L'évaluation semi-quantitative par indice, a été établie en multipliant, la somme des pourcentages (de 0 à 1, par pas de 0,1) de cellules positives des 3 spots par le niveau d'intensité de marquage [4 niveaux : 0 (-), 1 (+), 2 (++), ou 3 (+++)]. Les valeurs d'indices de cette échelle semi-quantitative s'étendaient donc de 0 à 9.

Exemple de calcul d'indice : 100 % de cellules marquées sur le 1^{er} spot + 75 % sur le 2^{ème} + 75 % sur le 3^{ème} = 250 ; multiplié par une intensité de marquage à 2 (++), soit 500 ; pour cet échantillon virtuel l'indice du niveau d'expression de TIMP-3 est évalué à 5.

➤ **Côlon normal**

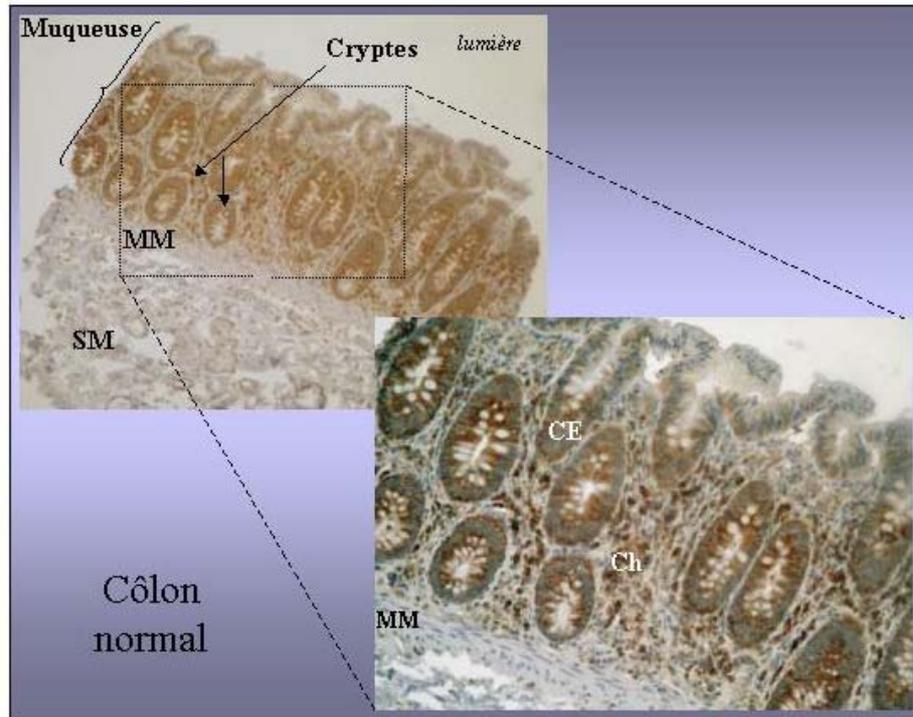


Figure 8: Expression de TIMP-3 dans la muqueuse colique humaine normale en immunohistochimie (TIMP-3 en marron/ noyaux en bleu). MM : musculaire muqueuse, SM : sous muqueuse, Ch : chorion, CE : cellules épithéliales

Pour le tissu normal, la topographie du marquage est conservée d'un échantillon à l'autre (Figure 8). Sur le cliché de paroi entière, on observe que le marquage est surtout localisé à la muqueuse. Les autres couches de la paroi sont soit non marquées (musculaire muqueuse) soit faiblement marquées (cellules endothéliales de la sous-muqueuse).

Au niveau de la muqueuse, les cellules épithéliales intestinales sont les éléments présentant l'intensité de marquage la plus importante (++), le niveau étant équivalent entre les cryptes et les villosités. Dans le tissu de soutien, les cellules mononuclées résidentes constituent les seuls éléments positifs du chorion. Dans les tissus normaux, nous observons un niveau d'expression de TIMP-3 relativement constant. En règle générale, 100 % des cellules épithéliales sont marquées à un niveau d'intensité fixé à 2. En considérant que le spot unique est représentatif, le niveau d'expression de TIMP-3 est donc évalué à : $100\% + 100\% + 100\% = 300 \times 2 =$ **indice à 6** sur notre échelle semi-quantitative.

➤ Tumeurs coliques

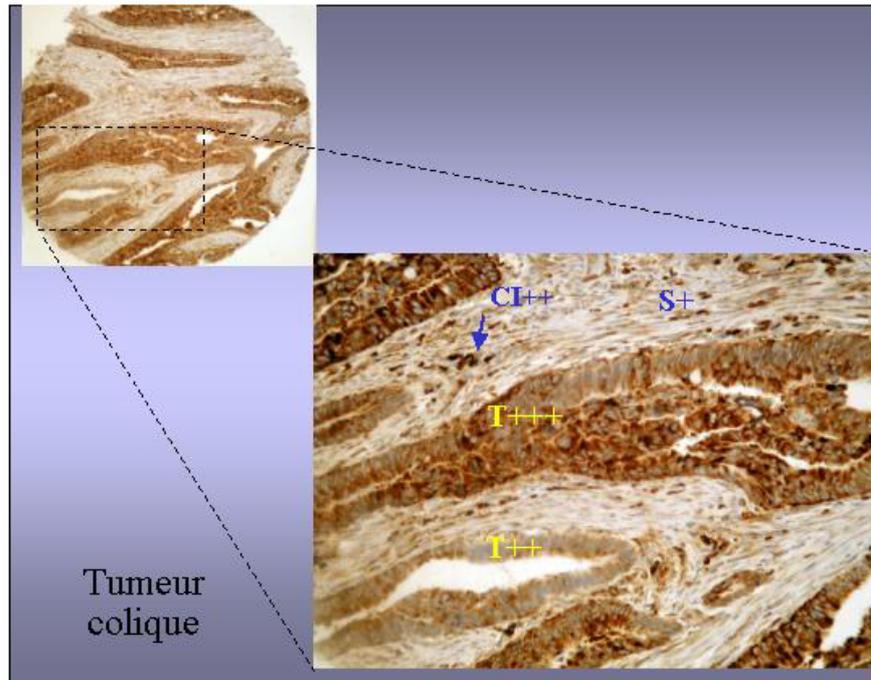


Figure 9 : Expression de TIMP-3 dans la tumeur colique en immunohistochimie (TIMP-3 marron, noyaux bleus). T+++ ou ++ : intensité de marquage au niveau des travées tumorales, S : stroma = cellules fibroblastiques (+) et CI : cellules inflammatoires (++) .

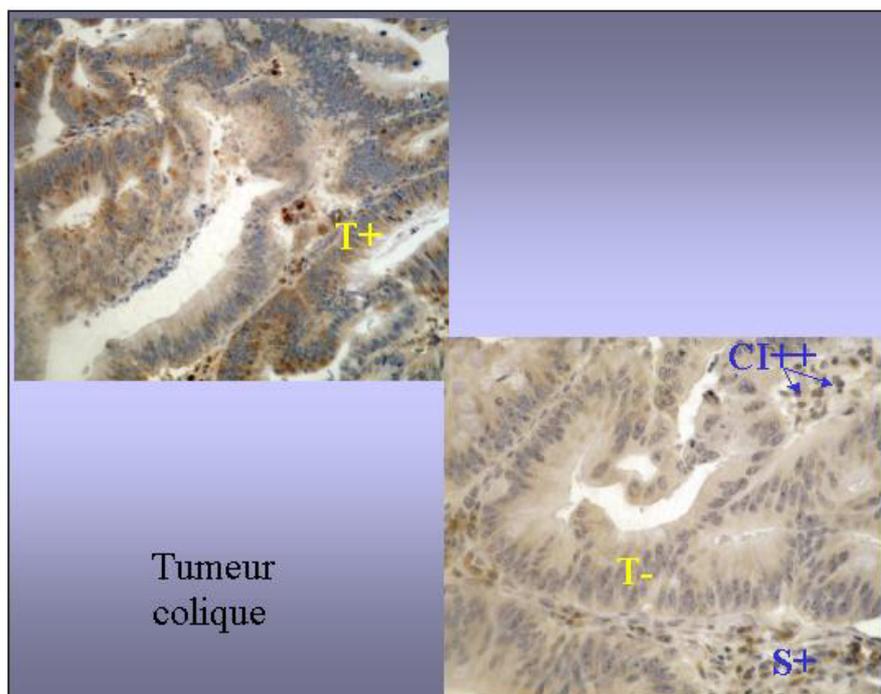


Figure 10 : Expression de TIMP-3 dans la tumeur colique en immunohistochimie (TIMP-3 marron, noyaux bleus). T+ ou - : intensité de marquage au niveau des travées tumorales, S+: stroma = cellules fibroblastiques (+) et (CI) cellules inflammatoires (++) .

Dans les tissus néoplasiques, nous observons le plus fréquemment un marquage intense (+++) au niveau des travées épithéliales tumorales. Sur certains échantillons, des zones moins marquées apparaissent illustrant l'hétérogénéité intratumorale du niveau d'expression de TIMP-3. Pour le tissu de soutien ou stroma, le marquage est différent selon le type cellulaire observé. Pour les cellules fibroblastiques qui constituent la population majoritaire, le marquage est soit faible ou absent mais toujours homogène ; par contre la présence inconstante de cellules inflammatoires témoignant d'une réaction stromale, engendre une hétérogénéité de marquage visualisable (Figure 9 et 21).

L'ensemble des résultats d'immunohistochimie sont rassemblées dans l'annexe 1. Pour chaque tumeur, nous avons pris en compte les marquages de différents types cellulaires: les travées tumorales, le stroma (cellules fibroblastiques) et les cellules inflammatoires. Seuls les deux premiers éléments ont été évalués semi-quantitativement avec nos indices rassemblés en classes (Tableau 9). Pour les cellules inflammatoires, seule l'intensité est rapportée (annexe 1).

- ❖ Pour les travées tumorales, 88 % des échantillons (28/32) montrent un indice de marquage à 9 qui est donc maximal. Pour les 4 autres, l'indice est évalué à 6. Nous ne constatons d'absence de marquage dans aucune des tumeurs.
- ❖ Pour les cellules fibroblastiques du stroma, 41 % des échantillons sont marqués à un indice de 6, 28 % à un indice compris entre 5 et 1 et 16 % (5/32) des échantillons ne présentent pas de marquage.
- ❖ Les cellules inflammatoires ne sont pas systématiquement présentes dans le stroma et leur marquage est hétérogène : 20 échantillons à (+), 6 à (++) et 1 à(+). Seules 5 tumeurs ne présentent pas de cellules immunocompétentes marquées.

Classes d'indices de niveau de marquage TIMP-3	9 à 7	6	5 à 1	0
Travées tumorales	88 (28/32)	12 (4/32)	0	0
stroma	0	41 (13/32)	28 (9/32)	16 (5/32)

Tableau 9: Pourcentages des niveaux de marquage au sein des tumeur et du stroma associé (seuls les niveaux de marquage dont l'effectif est > 2 sont présentés)

Ces résultats nous montrent une surexpression protéique systématique de TIMP-3 par les cellules tumorales coliques par rapport aux cellules normales du tissu sain apparié, et une hétérogénéité quant à l'expression protéique de TIMP-3 par le stroma associé à la tumeur.

D'autre part, sur les 5 tumeurs négatives en TIMP-3 au niveau du stroma, une seule (39) correspond à une des 3 tumeurs présentant un niveau transcriptionnel indétectable (Figure).

c – Comparaisons des niveaux d'expression protéique et transcriptionnel

Nous avons confronté pour 28 de nos tumeurs, les indices d'expression protéique de TIMP-3 obtenus en immunohistochimie avec le niveau d'expression transcriptionnel du gène (catégories 1,2 et 3 définies dans la figure 17). Les niveaux d'expression protéique ont été classés en 4 groupes. Nous avons effectué cette comparaison pour la tumeur (tableau 13) ainsi que pour le stroma (tableau 14).

Protéine Indice ARNm Rapport T/N	Surexpression 9 à 7	Expression non- modifiée 6	Sousexpression 5 à 1	Pas d'expression 0
Catégorie 3 : T/N ≥ 2	13	0	0	0
Catégorie 2 : 0,5 ≤ T/N < 2	10	3	0	0
Catégorie 1 : T/N < 0,5	2	0	0	0

Tableau 10 : Comparaison des niveaux d'expression transcriptionnel et protéique de TIMP-3 dans les tumeurs

Pour les tumeurs, nous observons que l'augmentation du niveau de transcription du gène *TIMP-3* (catégorie 3) est toujours associée à une surexpression protéique (13/13). Par ailleurs dans 3 tumeurs, l'absence de variation d'expression transcriptionnelle (catégorie 2) est confirmée au niveau protéique (indice à 6). Par contre, pour les tumeurs des catégories 2 et 1, pour lesquelles les niveaux transcriptionnels de TIMP-3 sont respectivement équivalents et abaissés par rapport à ceux des tissus normaux appariés, nous observons une discordance puisque dans 80 % des cas (12/15) nous mettons en évidence une surexpression protéique.

Protéine : Indice	Surexpression 9 à 7	Expression non modifiée 6	Sousexpression 5 à 1	Pas d'expression 0
ARNm : Rapport T/N				
Catégorie 3 : T/N ≥ 2	0	8	5	1
Catégorie 2 : 0,5 ≤ T/N < 2	0	3	6	3
Catégorie 1 : T/N < 0,5	0	0	1	1

Tableau 11 : Comparaison des niveaux d'expression transcriptionnel et protéique de TIMP-3 dans le stroma

Dans le stroma, les résultats sont discordants sauf dans les cas de diminution d'expression des ARNm de *TIMP-3* (catégorie 1), pour lesquels les taux de protéines sont abaissés (2/2).

Pour l'ensemble des tissus et notamment ceux qui ne présentent pas d'expression transcriptionnelle de *TIMP-3*, nous avons voulu vérifier l'importance du phénomène d'hyperméthylation du promoteur, rapporté dans la littérature comme le principal mécanisme d'inactivation.

B - EXPLORATION DE L'HYPERMÉTHYLATION DU PROMOTEUR DE TIMP-3

L'ensemble des 39 couples a été testé en MSPCR M et UM. Les produits de PCR sont mis en évidence après migration dans un gel à 4 % d'agarose Nusieve®, additionné de bromure d'ethyidium. Les produits d'amplification des deux PCR sont attendus à une taille de 120 pb.

Le premier gel, nous a permis de vérifier la spécificité des deux techniques : les produits des deux PCR de chaque échantillon sont déposés dans deux puits adjacents, UM puis M (Figure 11).

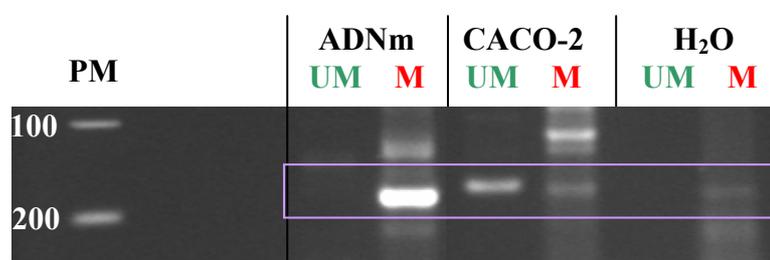


Figure 11 : PCR M et UM des témoins réactionnels

Notre contrôle positif de méthylation, l'ADNm est positif en PCR M et négatif en PCR UM. A l'inverse, l'ADNg de Caco2 est positif en PCR UM et négatif en PCR M. Ces témoins positifs et négatifs confirment la spécificité des deux méthodes. Nous observons un signal faible que nous avons considéré comme non spécifique dans les PCR M de l'eau et de la lignée Caco2.

Pour les échantillons, dans la majorité des cas la PCR UM est positive et la PCR M négative pour les deux membres du couple. Nous ne mettons donc pas en évidence de méthylation au niveau de la région étudiée.

Dans la Figure 12, nous avons rassemblé les échantillons présentant un niveau d'expression indétectable de TIMP-3 au niveau tumoral et/ou du tissu normal mis en évidence par PCR quantitative.

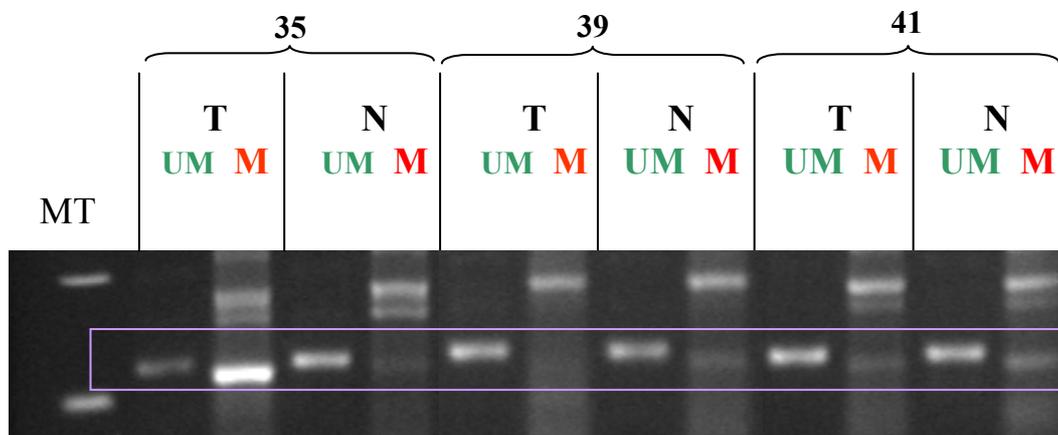


Figure 12 : PCR M et UM des couples dont les tumeurs ne présentent pas d'ARNm de TIMP-3

Pour chacun des 3 couples présentés, le tissu normal ne présente pas de méthylation au niveau des 3 îlots CG explorés puisque la PCR UM est positive et la PCR M est négative. Pour les tumeurs, la PCR UM est positive dans les 3 couples étudiés. Seule la tumeur 35 présente une PCR M positive, on observe en effet une bande spécifique à la taille attendue. Pour ce patient 35, les niveaux d'expression en ARNm de TIMP-3 sont indétectables dans les deux échantillons T et N du couple.

C – SIGNIFICATIONS CLINIQUES DES VARIATIONS D'EXPRESSION DE TIMP-3 DANS LE CANCER COLORECTAL

Nous avons confronté les différentes catégories de variation d'expression de TIMP-3 avec l'âge, le sexe, le niveau de différenciation, la localisation ainsi que le stade de progression tumoral (TNM). Aucun lien n'a été mis en évidence entre le niveau d'expression et les 3 premiers paramètres cliniques. Nous rapportons ici uniquement les résultats portant sur la localisation tumorale et les stades TNM observés. Le Tableau 12 reprend les trois catégories définies dans la première partie.

39 couples T/N		Catégories
Diminution de l'expression de TIMP-3 : N>T	8 % (3/39)	1
Pas de modification significative de l'expression de TIMP-3 : N=T	46 % (18/39)	2
Surexpression de TIMP-3 par la tumeur : T>N	46 % (18/39)	3

Tableau 12 : Répartition des couples par niveau transcriptionnel T/N en TIMP-3

1 – Variations d'expression de TIMP-3 et localisation tumorale

Pour cette étude, nous avons réparti les différentes localisations cancéreuses en deux groupes distincts, pour lesquels nous avons étudié les différents profils d'expression de TIMP-3. Ces groupes sont associés plus fréquemment au phénotype MSI (groupe 1) ou LOH (groupe 2) :

- ❖ Groupe 1 : **côlon droit** qui regroupe cæcum, côlons droit et transverse (n=21),
- ❖ Groupe 2 : **côlon gauche** qui regroupe côlon gauche, sigmoïde et rectum (n=18).

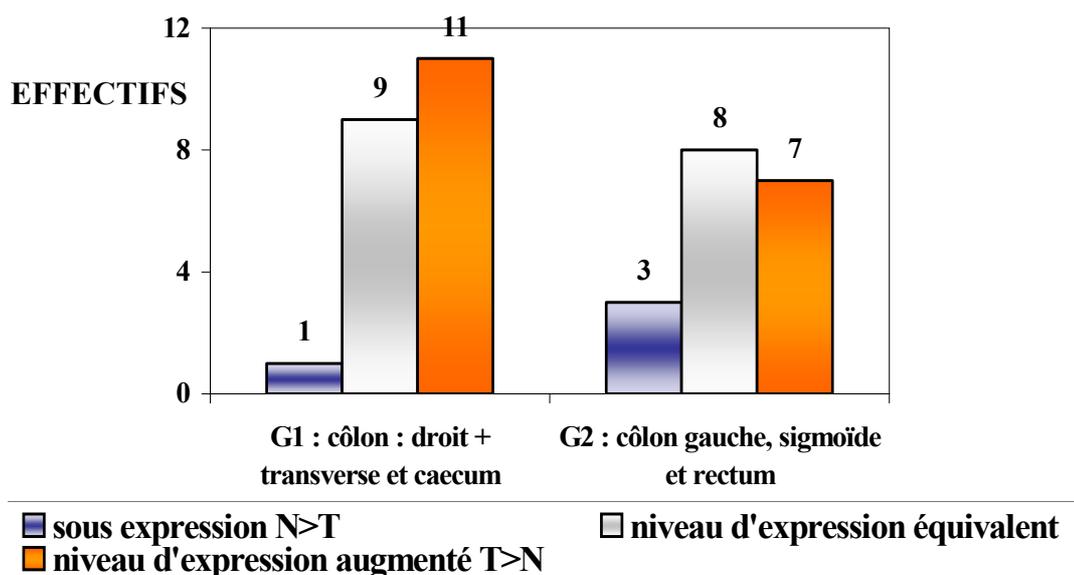


Figure 13 : répartition des catégories de variation d'expression de TIMP-3 pour les différentes localisations cancéreuses coliques

Il n'existe pas de différence de variations d'expression de TIMP-3 entre nos deux groupes (**Figure 13**). Les modifications du niveau d'expression s'observent donc indifféremment sur l'ensemble du cadre colique. La fréquence de l'augmentation du niveau transcriptionnel de *TIMP-3* n'est pas significativement différente entre les deux groupes : 11 surexpressions pour G1 *versus* 7 pour G2.

2 – Variation du niveau d'expression de TIMP-3 en fonction du stade TNM observé

La classification TNM du cancer colique permet de déterminer le niveau de progression de chaque tumeur en fonction de 3 paramètres : l'étendue de l'envahissement de la paroi colique, l'évaluation de la colonisation des ganglions par l'adénocarcinome et la présence de métastases, qui correspondent respectivement aux 3 lettres T,N et M.

Dans notre série, 38 cancers coliques ont été classés en TNM. Nous avons confronté le stade de progression de chaque tumeur avec sa catégorie de niveau d'expression relatif de TIMP-3. Le Tableau 13 rapporte les deux groupes de tumeurs établis selon la présence ou l'absence de métastases à distance, à la catégorie de niveau d'expression de TIMP-3.

	catégorie 1	catégorie 2	catégorie 3	Σ
M0	33% (1)	94% (16)	83% (15)	32
M1	66% (2)	6% (1)	17% (3)	6
Σ	3	17	18	38

Tableau 13 : Variation d'expression de TIMP-3 et statut métastatique des 38 tumeurs.

L'analyse des catégories 1 et 3 montre que : 83 % (15/18) des tumeurs qui présentent un niveau d'expression augmenté de TIMP-3 par rapport au tissu normal ne sont pas métastatiques (M0). Par ailleurs, l'effectif de la catégorie 1 est trop faible pour pouvoir relier la sous-expression de TIMP-3 au processus métastatique.

D - VARIATIONS D'EXPRESSION DES GENES *TIMP-3* ET D'*ADAM-17* AU NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL

Des travaux antérieurs ont montré qu'*ADAM-17* pouvait fréquemment être surexprimé dans les tumeurs colorectales évoquant un rôle clé dans la croissance tumorale lié à sa fonction de maturation de facteurs de croissance. Nous avons envisagé une relation entre la surexpression de *TIMP-3* et celle d'*ADAM-17*, en rappelant que *TIMP-3* est l'inhibiteur physiologique d'*ADAM-17*.

Les niveaux transcriptionnels respectifs des gènes *ADAM-17* et *TIMP-3* ont été évalués par PCR quantitative sur 38 des 39 couples de notre série Tumeur/Tissu normal apparié. Les niveaux d'expression sont tous deux normalisés par rapport à l'expression du gène de β -actine. Les niveaux d'expression d'*ADAM-17* sont associés aux valeurs croissantes de niveau d'expression de *TIMP-3* (Figure 14). Le seuil de surexpression T/N est fixé à 2.

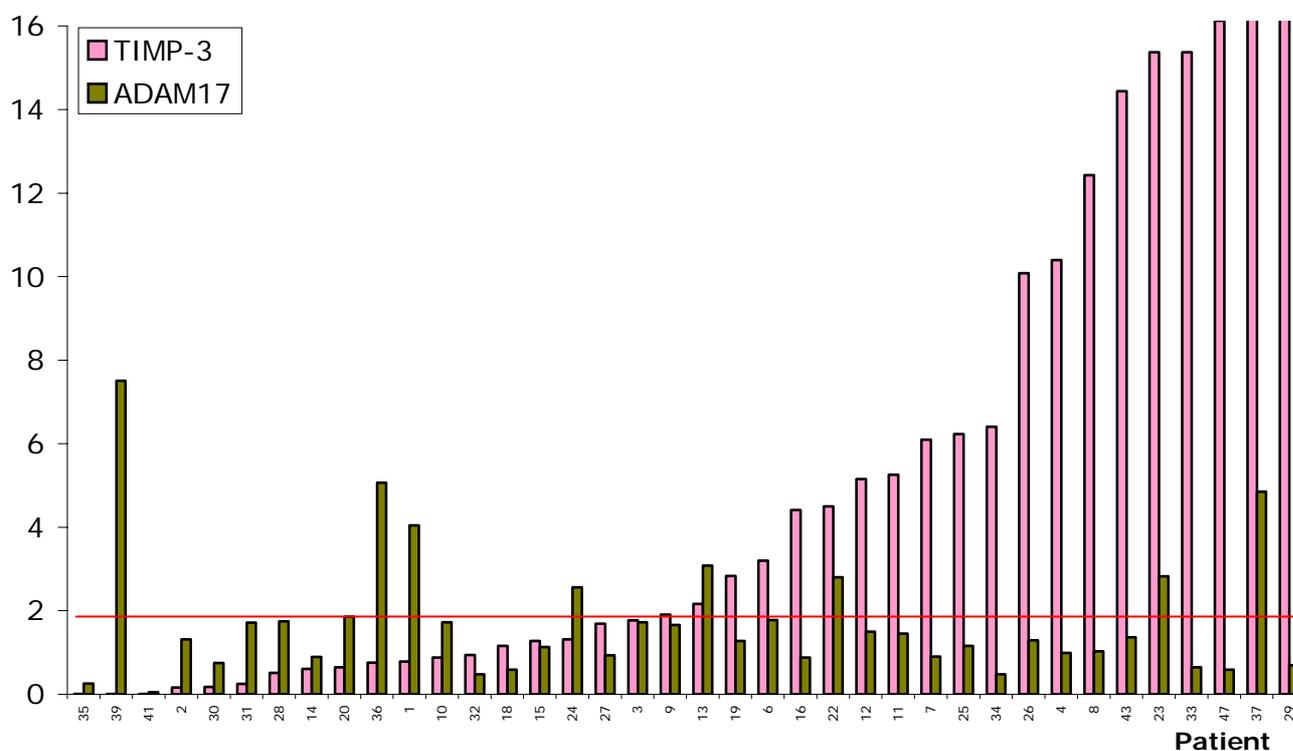


Figure 14 : Niveaux transcriptionnels Tumeur/Normal des gènes *TIMP-3* et *ADAM-17* pour chaque patient, seuil de surexpression à 2.

Il existe une grande hétérogénéité dans les niveaux d'expression des deux gènes. Dans notre cohorte nous avons observé une surexpression d'*ADAM-17* dans 21 % des couples (8/38) pour *ADAM-17*. Seuls 10 % des tumeurs présentent une surexpression concomitante des deux gènes (4/38). Il ne semble pas exister de relation entre les niveaux d'expression de ces deux gènes.

Nos travaux ont permis d'évaluer le niveau d'expression transcriptionnel et protéique de TIMP-3 dans une série documentée d'adénocarcinomes coliques et de confronter ces résultats d'une part au statut de méthylation du promoteur de TIMP-3 et d'autre part aux données cliniques. Enfin, nous avons posé la question de l'existence d'une co-régulation transcriptionnelle de TIMP-3 et d'une de ses cibles moléculaires ADAM-17, qui joue un rôle dans la croissance tumorale.

En préambule, il nous faut préciser que pour étudier certains aspects de la carcinogenèse colorectale il est nécessaire de disposer à la fois de tissus tumoraux et normaux appariés afin de procéder à des comparaisons rigoureuses. Dans le cancer colorectal, l'obtention de tissu normal apparié est aisée sur les pièces de colectomie. Les tissus tumoraux sont également accessibles, cependant la présence presque inévitable d'une certaine fraction de cellules non tumorales au sein de l'échantillon réclame de la prudence dans l'interprétation de certains résultats.

1- Augmentation du niveau d'expression de TIMP-3 dans le cancer colorectal

Cette augmentation est mise en évidence au niveau protéique de manière démonstrative, puisque 88 % des tumeurs présentent une surexpression par rapport au tissu sain apparié (Tableau 9).

Les données obtenues au niveau transcriptionnel ne confirme que partiellement ces résultats puisque seulement 50 % des couples présentent une surexpression tumorale de TIMP-3 par rapport au tissu normal. Compte tenu des résultats discordants qui apparaissent pour certains échantillons, entre les niveaux transcriptionnel et protéique d'expression de TIMP-3, il est tout à fait cohérent d'admettre un certain degré d'imprécision pour nos deux techniques au delà du fait inévitable, que les échantillons utilisés pour chacune d'entre elle sont différents.

Tout d'abord, l'évaluation par PCR quantitative du niveau transcriptionnel de TIMP-3 est tributaire de la qualité de l'ARN extrait. Pour les échantillons présentant un signal faible en ARNm du gène de ménage, il apparaît légitime de s'assurer de l'intégrité des ARNm. Pour cela, des techniques d'électrophorèse capillaire (Agilent®) permettent de contrôler assez rapidement la qualité des ARNm extraits.

La limite de notre technique est liée à l'échantillonnage des tumeurs et des tissus normaux appariés. Nous avons vu grâce aux techniques microscopiques que l'expression de la protéine TIMP-3 est essentiellement localisée dans la muqueuse. Ainsi le découpage des échantillons sans contrôle microscopique, entraîne une imprécision majeure sur l'identité des contingents cellulaires

explorés. En effet, un échantillon essentiellement constitué de sous-muqueuse ne saurait être représentatif de l'expression réelle de TIMP-3 dans la paroi colique. Le recours à la microdissection laser qui permet de sélectionner minutieusement les échantillons sur chaque tissu est une étape qui apparaît incontournable afin d'améliorer la précision et donc l'exploitation des données.

Pour l'appréciation du niveau d'expression protéique, l'immunohistochimie est bien adaptée puisqu'elle permet de rattacher les variations d'expression à des structures cellulaires bien définies. Une de ses limites reste cependant le mode de quantification qui induit un nivellement des variations de part la nature du calcul. Par exemple, un pourcentage de marquage à 150 % avec une intensité à 2 donnera le même indice qu'un pourcentage de marquage à 300 % d'intensité évaluée à 1. Deux observations différentes peuvent donc donner des scores identiques. Enfin, pour limiter la part de subjectivité, une lecture indépendante par deux pathologistes apparaît indispensable pour affiner les observations et améliorer la quantification.

Comme le montre l'étude par TMA, l'expression protéique de TIMP-3 dans le tissu normal est relativement constante et localisée essentiellement à la muqueuse. L'hétérogénéité des niveaux d'expression transcriptionnelle constatée dans ces mêmes tissus est probablement liée au fait suivant. Comme notre technique d'étude du niveau d'expression transcriptionnel de TIMP-3 ne permet pas de connaître précisément la nature et les proportions des contingents cellulaires composant nos prélèvements, il est envisageable que certaines situations d'expression faible ou nulle soient en fait le reflet d'un prélèvement riche en cellules n'exprimant pas TIMP-3.

Quoiqu'il en soit malgré ces limites techniques, notre étude montre sur une grande partie de notre cohorte une surexpression de TIMP-3 par les cellules épithéliales tumorales par rapport à leur équivalent sain.

Ce travail met en évidence pour la première fois une surexpression de TIMP-3 dans la littérature aucune étude ne faisant mention d'une surexpression pour ce gène réputé suppresseur de tumeur. Initialement des données expérimentales ont permis d'affecter à TIMP-3 un certain nombre de propriétés antitumorales : inhibition de la croissance tumorale, effets anti-angiogénique et pro-apoptotique (Anand-Apte, Bao et coll. 1996; Qi, Ebrahim et coll. 2003; Peiretti, Canault et coll. 2005). Puis chez l'homme, l'hyperméthylation du promoteur de TIMP-3 est apparue comme un mode d'altération génétique, plus ou moins fréquent, dans un certain nombre de cancers. Ainsi, Darnton et coll ont montré sur une série d'adénocarcinomes de l'œsophage un taux de méthylation d'environ 90 % associé à une diminution drastique d'expression protéique de TIMP-3 (Darnton, Hardie et coll. 2005). A l'inverse Fendrich et coll ont mis en évidence dans une série d'adénocarcinomes pancréatiques, une réduction fréquente de l'expression protéique de TIMP-3

contrastant avec une faible fréquence d'hyperméthylation de son promoteur (Fendrich, Slater et coll. 2005). D'autre part une étude utilisant l'hybridation d'ARN *in situ*, avait mis en évidence, une surexpression de TIMP-3 par les fibroblastes du stroma associés aux carcinomes mammaires (Byrne, Tomasetto et coll. 1995).

Pour le cancer colorectal les données sont fragmentaires. Un premier travail expérimental de Bian et coll a mis en évidence *in vitro* puis *in vivo*, des propriétés antitumorales de TIMP-3 sur une lignée cancéreuse colique (DLD-1) transfectée par ce gène (Bian, Wang et coll. 1996). De même, une autre étude portant sur l'incidence de l'hyperméthylation du promoteur a révélé sur 5 lignées coliques l'efficacité de l'hyperméthylation dans l'invalidation du gène *TIMP-3*, dont l'expression était restaurée par un traitement déméthylant. Néanmoins, sur les tumeurs coliques humaines, Bachman et coll ont mis en évidence une fréquence d'hyperméthylation modérée de 27 % (6/26) en utilisant une technique identique à la nôtre. Par ailleurs, les auteurs ont montré une absence de méthylation pour les tissus sains appariés. Cependant, cette équipe n'a pas exploré l'expression protéique de TIMP-3 dans sa série, notamment sur les 20 tumeurs dont le promoteur de TIMP-3 n'était pas épigénétiquement modifié pour la région étudiée (Bachman, Herman et coll. 1999). Brueckl et coll ont rapporté des résultats similaires sur deux séries distinctes de cancer colorectaux : une réduction dans 29 % des cas (12/42) du niveau d'expression de TIMP-3 dans la tumeur par rapport au tissu normal pour la première série et une hyperméthylation limitée à 27 % (17/64) pour la deuxième (Brueckl, Grombach et coll. 2005). Ainsi dans les deux seules études portant sur des séries de cancers colorectaux, on constate que l'hyperméthylation n'est pas reliée à une absence d'expression de TIMP-3, et d'autre part que l'expression de TIMP-3 n'a pas été explorée sur les tumeurs normométhylées. Ces résultats ne sont donc pas en contradiction avec les nôtres.

Néanmoins ces résultats font apparaître un paradoxe entre les fonctions antitumorales expérimentales de TIMP-3 et la surexpression protéique et transcriptionnelle caractérisée dans notre cohorte.

Un tel comportement a déjà été rapporté pour d'autres gènes. Initialement, le gène de la *Maspin* a montré une fonction de gène suppresseur de tumeur attribuable à l'inhibition d'un certain nombre de propriétés tumorales comme l'invasion et le pouvoir métastatique de lignées cancéreuses mammaires. De plus, la perte de l'expression de cette protéine a été corrélée à un pronostic péjoratif dans ces cancers. Or, il a également été rapporté une surexpression de ce gène dans les cancers pancréatiques et ovariens alors que le tissu normal ne produit pas de Maspin. Dans ces tumeurs, la maspin semble se comporter comme un oncogène. D'autre part, à la

différence des travaux sur TIMP-3, les auteurs ont montré que le niveau d'expression était dépendant du niveau de méthylation du promoteur du gène de la maspin. Du point de vue technique, l'isolement de crypte a été utilisé pour se soustraire des cellules du stroma, et la stratégie d'exploration de la méthylation basée sur du clonage et du séquençage leur a permis d'étudier 19 CpG dans le promoteur de la Maspin. On peut admettre que cette procédure est adaptée à l'analyse de l'expression de ce type de gène de comportement équivalent à TIMP-3.

2- Mécanismes de la surexpression

Nous savons que TIMP-3 est un gène dont l'expression est uprégulée par des systèmes pro-inflammatoires. Une des hypothèses que nous avons envisagée est le rôle régulateur des cellules inflammatoires apportées par la réaction stromale. L'appréciation semi-quantitative de l'intensité de marquage de TIMP-3 dans ces cellules inflammatoires n'est pas corrélée à la modulation du niveau d'expression de TIMP-3 dans les cellules tumorales ou les cellules fibroblastiques du stroma. Le mécanisme de survenue de la surexpression de TIMP-3 reste donc inconnu. Cependant compte tenu du rôle joué par les phénomènes épigénétiques dans l'expression de ce gène, on peut évoquer un phénomène de diminution du taux de méthylation entre le tissu normal et la tumeur engendrant une surexpression. Akiyama et coll ont démontré l'existence de ce mécanisme pour le gène de la Maspin. En effet, dans les cellules gastriques normales, les deux allèles sont hyperméthylés alors que dans les cellules cancéreuses on observe une déméthylation haploïde voire diploïde responsable d'une surexpression de la maspin. L'exploration de la méthylation mono ou biallélique est complexe et nécessite l'utilisation de technique adaptée (Akiyama, Maesawa et coll. 2003).

3 – Hyperméthylation du promoteur de TIMP-3

Dans notre série, nous ne mettons en évidence qu'une seule méthylation du promoteur de TIMP-3 pour les 39 tumeurs, soit un taux de méthylation inférieur à 3 % (1/39), contradictoire avec les deux seules données de la littérature concernant le cancer colorectal obtenues par la même technique: 29 % pour Brueckl et coll et 27 % pour Bachman et coll. Cette discordance peut être expliquée par un déficit de sensibilité lié en partie à la quantité réduite d'ADN génomique récupérée à partir de nos échantillons congelés et en conséquence à la faible quantité d'ADN génomique obtenue après traitement par le bisulfite de sodium.

L'étude de l'hyperméthylation d'un gène nécessite au préalable de déterminer quels sont les sites de méthylation du promoteur qui sont liés à une modulation d'expression. Une approche basée sur des techniques de séquençage permet dans un premier temps de localiser les îlots CpG d'intérêts puis, de dessiner des amorces capables de s'hybrider ou non en présence de cytosines méthylées, c'est la technique de méthylation spécifique "MS PCR". L'inconvénient de cette méthode est qu'elle n'explore qu'une partie restreinte de l'îlot, 3 CpG pour notre méthode, réduisant les informations portant sur la relation régulation d'expression et niveau de méthylation et n'abordant pas l'aspect quantitatif de la méthylation. En effet, il semble qu'un certain degré de méthylation soit nécessaire pour induire une réduction d'expression génétique.

D'autres approches ont récemment été développées, elles utilisent par exemple la technique de pyroséquençage qui permet d'avoir une vue d'ensemble sur la méthylation du promoteur et notamment sur les variations de profils de méthylation au sein d'un échantillon. L'ADN est préalablement traité par le bisulfite de sodium afin de transformer toute modification épigénétique en un polymorphisme C ou T au niveau de chaque doublet CpG. Après une étape de PCR réalisée sur l'ADN traité à partir d'amorces délimitant la zone des îlots CpG à analyser, la réaction de pyroséquençage est ensuite réalisée avec une amorce de séquence spécifique. La quantité de bases C et T qui composent chaque groupement CG est alors quantifiée avec précision. L'inconvénient concerne la taille des séquences analysées qui sont courtes limitées à 100 pb. Cependant pour des régions bien sélectionnées cette technique permet d'appréhender jusqu'à 10 CpG par séquence.

L'approche par PCR quantitative est séduisante, mais elle se heurtait encore récemment à des écueils de sensibilité liés aux faibles rendements d'extraction de l'ADN génomique à partir de tissu. Cependant avec l'avènement des sondes d'hydrolyse Taqman® ou la technique FRET, cette méthode est devenue suffisamment précise et sensible pour permettre d'une part l'étude de tous les groupements CG présents dans la région étudiée, et d'opérer une quantification de la méthylation d'une région d'un gène. Cependant pour cette technique, l'absence de renseignements sur la répartition des groupements sur chaque allèle et la nécessité de disposer de plusieurs couples pour analyser plusieurs CpG, constituent deux limites importantes.

Quoiqu'il en soit, toutes ces techniques, mêmes celles permettant de déterminer un profil quantitatif de méthylation, réclame malgré tout une corrélation avec le profil d'expression du gène cible dans le tissu étudié.

Nous avons également exploré les niveaux d'expressions de TIMP-3 et d'ADAM-17 dans notre série. Entre autres fonctions, ADAM-17 participe à la libération et à l'activation de facteurs

de croissance, ligands de l'EGFR. Notre équipe avait montré au préalable une surexpression transcriptionnelle et protéique d'ADAM-17 d'environ 90 % sur une série de 39 adénocarcinomes coliques (Blanchot-Jossic, Jarry et coll. 2005). Nous avons alors formulé l'hypothèse d'une possible régulation de l'activité d'ADAM-17 par son inhibiteur physiologique TIMP-3, en faveur d'une activité anti-tumorale de ce dernier. Nos résultats infirment cette supposition d'une régulation de l'activité métalloprotéasique d'ADAM-17 par TIMP-3, puisque les résultats sont d'une part hétérogènes et que d'autre part seuls 10 % des tumeurs présentent une co-surexpression d'ADAM-17 et de TIMP-3, excluant un phénomène prépondérant. Ces résultats sont conformes à ceux d'une étude conduite par Karan et coll sur des lignées d'adénocarcinomes prostatiques. En effet, ces auteurs avaient montré une surexpression protéique importante d'ADAM-17 sur lignée associée à l'absence d'expression de TIMP-3 (Karan, Lin et coll. 2003).

D'autre part, compte tenu des propriétés anti-métastatiques, anti-angiogéniques et d'inhibition de la croissance tumorale démontrées expérimentalement, nous avons confronté le niveau d'expression de TIMP-3 avec certains paramètres pouvant traduire les effets antitumoraux de TIMP-3. Pour la fonction anti-métastatique, 83 % (15/18) des tumeurs qui présentent un niveau d'expression augmenté de TIMP-3 par rapport au tissu normal ne sont pas métastatiques (stade M0). Cependant la faiblesse de l'effectif en tumeurs métastasées empêche d'observer la réciproque à savoir si la présence de métastase peut être reliée à un défaut d'expression de TIMP-3. D'autre part en ce qui concerne la croissance tumorale, les variations d'expression ne sont pas corrélées aux stades cliniques TNM. Cependant cette exploration confronte un niveau d'expression et un stade de croissance seulement à un temps T. L'idéal serait de suivre l'évolution du patient sur plusieurs années. Dans cette optique, nous aurions la possibilité grâce à l'étude immunohistochimique d'une puce tissulaire associant tumeurs primaires et métastases et/ou cancers métachrones d'observer des variations dynamiques de l'expression de TIMP-3 prenant en compte l'évolution à long terme.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahonen, M., M. Poukkula, et coll. (2003). "Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors." *Oncogene* **22**(14): 2121-34.
- Akiyama, Y., C. Maesawa, et coll. (2003). "Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells." *Am J Pathol* **163**(5): 1911-9.
- Anand-Apte, B., L. Bao, et coll. (1996). "A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth." *Biochem Cell Biol* **74**(6): 853-62.
- Bachman, K. E., J. G. Herman, et coll. (1999). "Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers." *Cancer Res* **59**(4): 798-802.
- Bachman, K. E. et B. H. Park (2005). "Duel nature of TGF-beta signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter." *Curr Opin Oncol* **17**(1): 49-54.
- Baylin, S. B., J. G. Herman, et coll. (1998). "Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia." *Adv Cancer Res* **72**: 141-96.
- Benamouzig, R., S. Chaussade, et coll. (2005). [Polyposis coli: a practical approach].
- Bian, J., Y. Wang, et coll. (1996). "Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3." *Carcinogenesis* **17**(9): 1805-11.
- Bird, A. (1992). "The essentials of DNA methylation." *Cell* **70**(1): 5-8.
- Black, R. A. (2004). "TIMP3 checks inflammation." *Nat Genet* **36**(9): 934-5.
- Blanchot-Jossic, F., A. Jarry, et coll. (2005). "Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells." *J Pathol* **207**(2): 156-63.
- Bond, M., G. Murphy, et coll. (2002). "Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway." *J Biol Chem* **277**(16): 13787-95.
- Borrell-Pages, M., F. Rojo, et coll. (2003). "TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors." *Embo J* **22**(5): 1114-24.
- BruECKl, W. M., J. Grombach, et coll. (2005). "Alterations in the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) are found frequently in human colorectal tumours displaying either microsatellite stability (MSS) or instability (MSI)." *Cancer Lett* **223**(1): 137-42.
- Byrne, J. A., C. Tomasetto, et coll. (1995). "The tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene in breast carcinoma: identification of multiple polyadenylation sites and a stromal pattern of expression." *Mol Med* **1**(4): 418-27.
- Chan, A. T., E. L. Giovannucci, et coll. (2005). "Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer." *Jama* **294**(8): 914-23.
- Chung, D. C. et A. K. Rustgi (2003). "The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications." *Ann Intern Med* **138**(7): 560-70.
- Claus, R. et M. Lubbert (2003). "Epigenetic targets in hematopoietic malignancies." *Oncogene* **22**(42): 6489-96.
- Colorectal Cancer. In: BW Steward and P Kleihues, E., World Cancer Report, IARC Press, Lyon (2003), pp. 198–202. (2003). Colorectal cancer. *World cancer report*. Editors. Lyon, IARC Press: 198-202.
- Costello, J. F. et C. Plass (2001). "Methylation matters." *J Med Genet* **38**(5): 285-303.

- Cunningham, D., Y. Humblet, et coll. (2004). "Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer." *N Engl J Med* **351**(4): 337-45.
- Darnton, S. J., L. J. Hardie, et coll. (2005). "Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) gene is methylated in the development of esophageal adenocarcinoma: loss of expression correlates with poor prognosis." *Int J Cancer* **115**(3): 351-8.
- Davies, H., G. R. Bignell, et coll. (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature* **417**(6892): 949-54.
- Deltour, S., V. Chopin, et coll. (2005). "[Epigenetics and cancer]." *Med Sci (Paris)* **21**(4): 405-11.
- Dong, S. M., E. J. Lee, et coll. (2005). "Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum." *Mod Pathol* **18**(2): 170-8.
- Duval, A. et R. Hamelin (2003). "[Replication error repair, microsatellites, and cancer]." *Med Sci (Paris)* **19**(1): 55-62.
- Esteller, M., R. A. Risques, et coll. (2001). "Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis." *Cancer Res* **61**(12): 4689-92.
- Fearnhead, N. S., M. P. Britton, et coll. (2001). "The ABC of APC." *Hum Mol Genet* **10**(7): 721-33.
- Fearon, E. R. et B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-67.
- Feinberg, A. P., C. W. Gehrke, et coll. (1988). "Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia." *Cancer Res* **48**(5): 1159-61.
- Fendrich, V., E. P. Slater, et coll. (2005). "Alterations of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) gene in pancreatic adenocarcinomas." *Pancreas* **30**(2): e40-5.
- Feng, H., A. N. Cheung, et coll. (2004). "Down-regulation and promoter methylation of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in choriocarcinoma." *Gynecol Oncol* **94**(2): 375-82.
- Filion, G. et P. A. Defossez (2004). "[Proteins binding to methylated DNA: interpreters of the epigenetic code]." *Med Sci (Paris)* **20**(1): 7-8.
- Fodde, R., R. Smits, et coll. (2001). "APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer." *Nat Rev Cancer* **1**(1): 55-67.
- Garcia-Alvarez, J., R. Ramirez, et coll. (2006). "TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE-3 IS UP-REGULATED BY TRANSFORMING GROWTH FACTOR-beta1 IN VITRO AND EXPRESSED IN FIBROBLASTIC FOCI IN VIVO IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS." *Exp Lung Res* **32**(5): 201-14.
- Gloria, L., M. Cravo, et coll. (1996). "DNA hypomethylation and proliferative activity are increased in the rectal mucosa of patients with long-standing ulcerative colitis." *Cancer* **78**(11): 2300-6.
- Hahn, W. C. et R. A. Weinberg (2002). "Modelling the molecular circuitry of cancer." *Nat Rev Cancer* **2**(5): 331-41.
- Hahn, W. C. et R. A. Weinberg (2002). "Rules for making human tumor cells." *N Engl J Med* **347**(20): 1593-603.
- Hammani, K., P. Henriot, et coll. (1996). "Cloning and partial structure of the gene encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3." *Gene* **170**(2): 287-8.
- Hinkle, C. L., S. W. Sunnarborg, et coll. (2004). "Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency." *J Biol Chem* **279**(23): 24179-88.
- Houlston, R. S. et J. Peto (2004). "The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles." *Oncogene* **23**(38): 6471-6.

- Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, et coll. (2004). "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **350**(23): 2335-42.
- Hyman, N. H., P. Anderson, et coll. (2004). "Hyperplastic polyposis and the risk of colorectal cancer." Dis Colon Rectum **47**(12): 2101-4.
- Ikehara, N., S. Semba, et coll. (2005). "BRAF mutation associated with dysregulation of apoptosis in human colorectal neoplasms." Int J Cancer **115**(6): 943-50.
- Imperiale, T. F., D. F. Ransohoff, et coll. (2004). "Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population." N Engl J Med **351**(26): 2704-14.
- Itzkowitz, S. H. etN. Harpaz (2004). "Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **126**(6): 1634-48.
- Jarry, A., D. Masson, et coll. (2004). "Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E." Mol Cell Probes **18**(5): 349-52.
- Jass, J. R. (1988). "The pathological grading and staging of rectal cancer." Scand J Gastroenterol Suppl **149**: 21-38.
- Jass, J. R. (2001). "Serrated route to colorectal cancer: back street or super highway?" J Pathol **193**(3): 283-5.
- Jemal, A., A. Thomas, et coll. (2002). "Cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **52**(1): 23-47.
- Jiang, Y., I. D. Goldberg, et coll. (2002). "Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer." Oncogene **21**(14): 2245-52.
- Jones, P. A. (1996). "DNA methylation errors and cancer." Cancer Res **56**(11): 2463-7.
- Jones, P. A. etS. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet **3**(6): 415-28.
- Kaminskas, E., A. Farrell, et coll. (2005). "Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes." Clin Cancer Res **11**(10): 3604-8.
- Kane, M. F., M. Loda, et coll. (1997). "Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines." Cancer Res **57**(5): 808-11.
- Karan, D., F. C. Lin, et coll. (2003). "Expression of ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) and TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) in human prostatic adenocarcinomas." Int J Oncol **23**(5): 1365-71.
- Kawakami, K., A. Ruzskiewicz, et coll. (2006). "DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer." Br J Cancer **94**(4): 593-8.
- Kinzler, K. W. etB. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-70.
- Kondo, Y. etJ. P. Issa (2004). "Epigenetic changes in colorectal cancer." Cancer Metastasis Rev **23**(1-2): 29-39.
- Kressner, U., J. Bjorheim, et coll. (1998). "Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer." Eur J Cancer **34**(4): 518-21.
- Kronborg, O. etC. Fenger (1999). "Clinical evidence for the adenoma-carcinoma sequence." Eur J Cancer Prev **8 Suppl 1**: S73-86.
- Laird, P. W. etR. Jaenisch (1996). "The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics." Annu Rev Genet **30**: 441-64.
- Lam, P., K. Sian Lim, et coll. (2005). "A microarray study to characterize the molecular mechanism of TIMP-3-mediated tumor rejection." Mol Ther **12**(1): 144-52.
- Langton, K. P., M. D. Barker, et coll. (1998). "Localization of the functional domains of human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and the effects of a Sorsby's fundus dystrophy mutation." J Biol Chem **273**(27): 16778-81.
- Lawrence, W., Jr., H. R. Menck, et coll. (1995). "The National Cancer Data Base report on gastric cancer." Cancer **75**(7): 1734-44.
- Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." Cell **88**(3): 323-31.

- Li, W. Q., H. Y. Qureshi, et coll. (2004). "Transforming growth factor Beta1 induction of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 in articular chondrocytes is mediated by reactive oxygen species." Free Radic Biol Med **37**(2): 196-207.
- Lievre, A. etP. Laurent-Puig (2004). "[Colorectal carcinogenesis: update]." Rev Prat **54**(2): 143-50.
- Lievre, A. etP. Laurent-Puig (2005). "[Molecular biology in clinical cancer research: the example of digestive cancers]." Rev Epidemiol Sante Publique **53**(3): 267-82.
- Liu, W., X. Dong, et coll. (2000). "Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling." Nat Genet **26**(2): 146-7.
- Longacre, T. A. etC. M. Fenoglio-Preiser (1990). "Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia." Am J Surg Pathol **14**(6): 524-37.
- Lynch, H. T. etA. de la Chapelle (2003). "Hereditary colorectal cancer." N Engl J Med **348**(10): 919-32.
- MacLeod, A. R. etM. Szyf (1995). "Expression of antisense to DNA methyltransferase mRNA induces DNA demethylation and inhibits tumorigenesis." J Biol Chem **270**(14): 8037-43.
- Mannello, F. etG. Gazzanelli (2001). "Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications." Apoptosis **6**(6): 479-82.
- Merlo, A., J. G. Herman, et coll. (1995). "5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers." Nat Med **1**(7): 686-92.
- Miyakura, Y., K. Sugano, et coll. (2004). "Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability." Clin Gastroenterol Hepatol **2**(2): 147-56.
- Mohammed, F. F., D. S. Smookler, et coll. (2003). "Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **62** Suppl 2: ii43-7.
- Muto, T., H. J. Bussey, et coll. (1975). "The evolution of cancer of the colon and rectum." Cancer **36**(6): 2251-70.
- Nakagawa, H., G. J. Nuovo, et coll. (2001). "Age-related hypermethylation of the 5' region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development." Cancer Res **61**(19): 6991-5.
- Norat, T., S. Bingham, et coll. (2005). "Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition." J Natl Cancer Inst **97**(12): 906-16.
- Okano, M., D. W. Bell, et coll. (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." Cell **99**(3): 247-57.
- Olschwang, S., R. Hamelin, et coll. (1997). "Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(22): 12122-7.
- Peiretti, F., M. Canault, et coll. (2005). "Proteasome inhibition activates the transport and the ectodomain shedding of TNF-alpha receptors in human endothelial cells." J Cell Sci **118**(Pt 5): 1061-70.
- Pickle, L. W., M. H. Greene, et coll. (1984). "Colorectal cancer in rural Nebraska." Cancer Res **44**(1): 363-9.
- Pietsch, E. C., O. Humbey, et coll. (2006). "Polymorphisms in the p53 pathway." Oncogene **25**(11): 1602-11.
- Qi, J. H., Q. Ebrahim, et coll. (2003). "A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2." Nat Med **9**(4): 407-15.
- Qureshi, H. Y., J. Sylvester, et coll. (2005). "TGF-beta-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene in chondrocytes is mediated by extracellular signal-regulated kinase pathway and Sp1 transcription factor." J Cell Physiol **203**(2): 345-52.

- Rajagopalan, H., A. Bardelli, et coll. (2002). "Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status." *Nature* **418**(6901): 934.
- Reuther, G. W. et C. J. Der (2000). "The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree." *Curr Opin Cell Biol* **12**(2): 157-65.
- Rhee, I., K. W. Jair, et coll. (2000). "CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1." *Nature* **404**(6781): 1003-7.
- Robertson, K. D. (2005). "DNA methylation and human disease." *Nat Rev Genet* **6**(8): 597-610.
- Roger, L., G. Gadea, et coll. (2006). "Control of cell migration: a tumour suppressor p53?" *Biol Cell* **98**(3): 141-52.
- Russo, M. W., J. T. Wei, et coll. (2004). "Digestive and liver diseases statistics, 2004." *Gastroenterology* **126**(5): 1448-53.
- Samowitz, W. S., H. Albertsen, et coll. (2005). "Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer." *Gastroenterology* **129**(3): 837-45.
- Sinicrope, F. A., S. B. Ruan, et coll. (1995). "bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis." *Cancer Res* **55**(2): 237-41.
- Smits, R., M. F. Kielman, et coll. (1999). "Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development." *Genes Dev* **13**(10): 1309-21.
- Soares, J., A. E. Pinto, et coll. (1999). "Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression." *Cancer* **85**(1): 112-8.
- Sobin, L. (2003). *Tumeurs du système digestif*. Paris.
- Soreide, K., E. A. Janssen, et coll. (2006). "Microsatellite instability in colorectal cancer." *Br J Surg* **93**(4): 395-406.
- Soussi, T. (2005). "The p53 pathway and human cancer." *Br J Surg* **92**(11): 1331-2.
- Souza, R. F., R. Appel, et coll. (1996). "Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours." *Nat Genet* **14**(3): 255-7.
- Sun, Y., G. Hegamyer, et coll. (1995). "Molecular cloning of mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and its promoter. Specific lack of expression in neoplastic JB6 cells may reflect altered gene methylation." *J Biol Chem* **270**(33): 19312-9.
- Tabernero, J., R. Salazar, et coll. (2004). "Targeted therapy in advanced colon cancer: the role of new therapies." *Ann Oncol* **15 Suppl 4**: iv55-62.
- Thiagalingam, S., S. Laken, et coll. (2001). "Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2698-702.
- Thibodeau, S. N., G. Bren, et coll. (1993). "Microsatellite instability in cancer of the proximal colon." *Science* **260**(5109): 816-9.
- Toyota, M., N. Ahuja, et coll. (1999). "CpG island methylator phenotype in colorectal cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8681-6.
- Toyota, M., K. J. Kopecky, et coll. (2001). "Methylation profiling in acute myeloid leukemia." *Blood* **97**(9): 2823-9.
- Trojan, J., A. Brieger, et coll. (2004). "BAX and caspase-5 frameshift mutations and spontaneous apoptosis in colorectal cancer with microsatellite instability." *Int J Colorectal Dis* **19**(6): 538-44.
- Tycko, B. (1997). "DNA methylation in genomic imprinting." *Mutat Res* **386**(2): 131-40.
- Van Rijnsoever, M., H. Elsaleh, et coll. (2003). "CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer." *Clin Cancer Res* **9**(8): 2898-903.
- van Rijnsoever, M., F. Grieu, et coll. (2002). "Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands." *Gut* **51**(6): 797-802.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, et coll. (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *N Engl J Med* **319**(9): 525-32.

- Watanabe, T., T. T. Wu, et coll. (2001). "Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer." N Engl J Med **344**(16): 1196-206.
- Weber, B. H., G. Vogt, et coll. (1994). "Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy." Nat Genet **8**(4): 352-6.
- Weinberg, R. A. (1991). "Tumor suppressor genes." Science **254**(5035): 1138-46.
- Weitz, J., M. Koch, et coll. (2005). "Colorectal cancer." Lancet **365**(9454): 153-65.
- Wheeler, J. M., A. Loukola, et coll. (2000). "The role of hypermethylation of the hMLH1 promoter region in HNPCC versus MSI+ sporadic colorectal cancers." J Med Genet **37**(8): 588-92.
- Wick, M., R. Haronen, et coll. (1995). "Structure of the human TIMP-3 gene and its cell cycle-regulated promoter." Biochem J **311** (Pt 2): 549-54.
- Wilde, C. G., P. R. Hawkins, et coll. (1994). "Cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinases-3." DNA Cell Biol **13**(7): 711-8.
- Winawer, S. J., A. G. Zauber, et coll. (1992). "The National Polyp Study. Design, methods, and characteristics of patients with newly diagnosed polyps. The National Polyp Study Workgroup." Cancer **70**(5 Suppl): 1236-45.
- Woodburn, J. R. (1999). "The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy." Pharmacol Ther **82**(2-3): 241-50.
- Zhou, W., S. N. Goodman, et coll. (2002). "Counting alleles to predict recurrence of early-stage colorectal cancers." Lancet **359**(9302): 219-25.

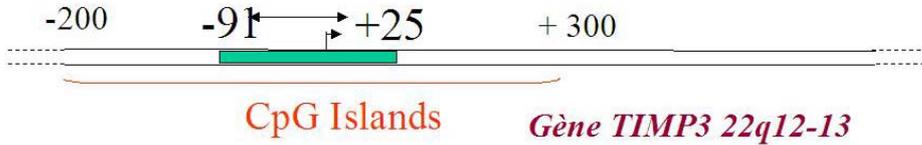
ANNEXES

ANNEXE 1 : tableau récapitulatif des résultats et données cliniques (tableaux pages suivantes)

									QPCR T/N	QPCR T/N	TMA TIMP-3			
Patients	sexe	âge	grade TNM	localisation	stade différenciat°	comp. Colloïde	Timp3/Act T	Timp3/Act N	TIMP-3	ADAM- 17	tumeur	stroma	inflam	Normal
1	H	62	T3N0	Colon droit	colloïde	60%	0,00536	0,00757	0,78	4,04	6	3	1	6
2	H	65	T3N0	Colon gauche	moyt ≠cié	10%	0,00069	0,00495	0,16	0,32	NR	NR	NR	NR
3	F	81	T3N0	Colon droit	colloïde	80%	0,00737	0,00452	1,77	1,72	9	3	1	6
4	H	77	T3N0	Colon droit	peu ≠cié	40%	0,02488	0,00330	10,39	0,99	9	6	0	6
6	H	75	T3N2M1	Colon droit	moyt ≠cié	0%	0,00460	0,00202	3,2	1,78	NR	NR	NR	NR
7	M	65	T4N0	Colon droit	bien-moyt ≠cié	0%	0,02750	0,00603	6,09	0,9	9	6	1	6
8	F	69	T3N0	Colon droit	moyt ≠cié	20%	0,01972	0,00270	12,43	1,03	9	6	2	6
9	F	76	T3N0	Sigmoïde	moyt ≠cié	0%	0,00684	0,00447	1,91	1,66	9	6	0	6
10	M	73	T3N1	Colon gauche	moyt ≠cié	0%	0,02185	0,02683	0,88	1,72	6	6	1	6
11	M	77	T3N0	Colon droit	moyt ≠cié	0%	0,02809	0,00883	5,26	1,45	9	3	1	6
12	M	83	T3N0	Colon gauche	bien-moyt ≠cié	0%	0,05280	0,01422	5,15	1,5	9	3	1	6
13	M	78	T2N0	Sigmoïde	bien-moyt ≠cié	0%	0,04874	0,02683	2,16	3,08	9	6	1	6
14	F	68	*TisN0	colon transverse	bien à moyt ≠cié	0%	0,02236	0,04198	0,61	0,89	9	0	2	6
15	H	59	T4N0	Sigmoïde	moyt ≠cié	0%	0,06446	0,06091	1,28	1,13	NR	NR	NR	NR
16	F	67	T3N0	Colon droit	moyt ≠cié	0%	0,04656	0,01358	4,41	0,88	9	6	0	6
17	F	65	T3N0	Colon droit	bien à moyt ≠cié	< 10%	0,03426	0,02542	1,69	NR	NR	NR	NR	NR
18	H	77	T3N1	Colon droit	moyt ≠cié	30%	0,00673	0,00708	1,16	0,59	9	3	1	6
19	H	77	T3N1M1	Colon droit	moyt ≠cié	0%	0,01309	0,00564	2,83	1,28	9	6	1	6
20	F	79	*TisN0	Sigmoïde	moyt ≠cié	0%	0,00864	0,01214	0,65	1,86	9	0	3	6
21	H	70	T3N1	Colon droit	bien à moyt ≠cié	0%	NR	NR	NR	NR	9	6	1	6
22	F	75	T3N1	Colon droit	bien à moyt ≠cié	0%	0,02287	0,00522	4,5	2,8	9	6	1	6
23	F	78	T3N0	Colon droit	moyt-peu ≠cié	0%	0,12952	0,01176	15,37	2,82	NR	NR	NR	NR
24	H	66	T4N0	Colon droit	bien-moyt ≠cié	0%	0,01960	0,01643	1,32	2,56	6	3	1	6
25	F	83	T3N2	Colon droit	bien-moyt ≠cié	0%	0,03531	0,00735	6,23	1,16	NR	NR	NR	NR
26	H	62	T4N2	Colon droit	colloïde	60%	0,01080	0,00155	10,08	1,29	NR	NR	NR	NR

Patients	sexe	âge	grade TNM	localisation	stade différenciat°	comp. Colloide	Timp3/Act T	Timp3/Act N	TIMP-3	ADAM-17	tumeur	stroma	inflam	Normal
27	H	61	T3N0	Colon gauche	moyt ≠cié	0%	0,01222	0,00801	1,69	0,93	NR	NR	NR	NR
28	H	73	NR	Colon droit	NR	NR	0,00397	0,00697	0,51	1,75	NR	NR	NR	NR
29	H	65	T4N2M1	Colon gauche	moy	0	0,4619	0,0029	161	0,693	6	0	2	6
30	F	84	T4N2M1	Sigmoide	moy	0	0,0091	0,0514	0,177	0,752	NR	NR	NR	NR
31	H	52	T3N1M1	Colon droit	moy	0%	0,0330	0,1319	0,25	1,713	9	3	1	6
32	F	71	T3N0M0	Colon gauche	moy	0%	0,0695	0,0738	0,942	0,476	9	3	1	6
33	H	62	T3N2M1	Colon gauche	moy	5%	0,1250	0,0081	15,371	0,645	9	5	1	6
34	H	54	T3N2	sigmoide	moy	10%	0,1324	0,0207	6,405	0,482	9	3	1	6
35	F	78	T3N1M0	transverse	peu diff	0%	0,0011	0,0070	0,152	0,256	9	4	2	6
36	H	80	TisNOM O	Colon gauche	bien diff	0%	0,0306	0,0402	0,76	5,061	9	0	1	6
37	H	81	T3NO	Colon gauche	moy	0%	0,1994	0,0014	141,68	4,849	9	2	1	6
38	H	72	T3N0	sigmoide et rectum	moy	0%	NR	NR	NR	NR	9	4	1	6
39	F	63	T4N2M1	sigmoide	peu diff/ colloide	60%	0,0112	0,0362	0,309	7,502	9	0	0	6
41	H	71	T3N1	Colon gauche	bien diff	0%	0,0034	0,0020	1,759	0,01	9	6	2	6
43	F	86	T3N0	caecum	bien diff	10%	0,0951	0,0066	14,439	1,365	9	6	2	6
46	H	87	T4N0	Colon gauche	moy	0%	NR	NR	NR	NR	9	6	1	6
47	F	60	T3N2	rectum	moy	0%	0,1266	0,0079	16,126	0,593	NR	NR	NR	NR
49	H	67	T4N2M1	Colon droit	moy	0%	NR	NR	NR	NR	9	5	0	6

MS PCR sur gène TIMP3



- Zone “CpG Islands” -200 et +300 sur l’ADNg
- Influence de la méthylation sur l’expression limitée à la zone : -91 +25pb (Bachman 1999)

MS PCR sur gène *TIMP3*

Traitement (5h) au Bisulfite de Na : Conversion C en U

5’ — CG — CG — C — CG — ADNg non méthylé

5’ — UG — UG — U — UG — ADNg traité

— [AC] — [AC] — A — [AC] — 5’
Séquence complémentaire de l’ADN traité → AMORCES UM

5’ — mCG — mCG — C — mCG — ADNg méthylé

5’ — mCG — mCG — U — mCG — ADNg méthylé traité

— [GC] — [GC] — A — [GC] — 5’
Séquence complémentaire de l’ADN méthylé traité → AMORCES M

DEJOIE, Thomas, Marie, Dominique, Lionel

Titre : EXPRESSION DE TIMP-3 DANS LE CANCER COLORECTAL : A PROPOS D'UNE
SERIE DE 39 CAS

L'inhibiteur de métalloprotéases TIMP-3 présente des propriétés antiprolifératives, antiangiogéniques et anti-apoptotiques mises en évidence expérimentalement. Ce comportement de gène suppresseur de tumeur n'a pas été rapporté dans le cancer colorectal. Nous avons étudié l'expression de TIMP-3 au niveau transcriptionnel et protéique, respectivement par PCR quantitative et immunohistochimie en tissu Micro Array, sur une série d'adénocarcinomes colorectaux et leurs tissus sains appariés (n = 39). Nous mettons en évidence à la fois au niveau transcriptionnel (50 %) et protéique (88 %) une surexpression de TIMP-3 par les cellules tumorales par rapport au tissu sain. D'autre part, la fréquence très faible de l'hyperméthylation du promoteur de TIMP-3 retrouvée dans notre série de tumeurs, confirme ces résultats. Dans notre série, la surexpression de TIMP-3 n'est liée ni au stade TNM, ni à la présence de métastases. Enfin, l'hypothèse d'une surexpression de TIMP-3 associée à celle d'une de ces enzymes cibles ADAM-17, n'est pas confirmée dans notre cohorte.

MOTS-CLES :

ADENOCARCINOME – COLORECTAL – TIMP-3- SUREXPRESSION –GENE
SUPPRESSEUR

JURY

Président : M. Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie
UFR de Pharmacie de Nantes

Asseseurs : M. Christian LABOISSE, Professeur d'Anatomopathologie
UFR de Médecine de Nantes

Mr Marc DENIS, Professeur de Biochimie
UFR de Médecine de Rennes

Mme Kalyane BACH-NGOHOU, Maître de conférence – Praticien hospitalier –
UFR de Médecine de Nantes et Service de Biochimie, CHU de Nantes

Mr Damien MASSON, Maître de conférence – Praticien hospitalier UFR de
Médecine de Nantes et Service de Biochimie, CHU de Nantes

Adresse de l'auteur : 13, Avenue de Beauséjour 44800 SAINT HERBLAIN