

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

**IMPLICATION DE DEUX EFFECTEURS MOLECULAIRES  
UBIQUITAIRES, CALRETICULINE ET ADAM15, DANS LA  
MORPHOGENESE ET LA DIFFERENCIATION DES  
NEOPLASIES COLIQUES : UNE APPROCHE FONDEE  
SUR DES BIOCOLLECTIONS**

**THESE DE DOCTORAT**

Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE  
Discipline .....Médecine  
Spécialité .....Anatomie et Cytologie Pathologiques

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**ETIENNE-TOQUET Claire**

**Le 29 septembre 2010**, devant le jury ci-dessous

***Président*** Pr MOSNIER Jean-François, Professeur des Universités,  
Praticien Hospitalier, Nantes

***Rapporteurs*** Dr BUISINE Marie-Pierre, Maître de Conférences des Universités,  
Praticien Hospitalier, Lille.  
Pr. TERRIS Benoît, Professeur des Universités,  
Praticien Hospitalier, Paris.

***Examineurs*** Pr. MOSNIER Jean-François, Professeur des Universités,  
Praticien Hospitalier, Nantes.

***Directeur de Thèse*** : Pr. LABOISSE Christian, Professeur des Universités,  
Praticien Hospitalier, Nantes.

# REMERCIEMENTS

---

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire EA4273 Biometadys,  
dirigé par le Pr Jean François Mosnier, à la faculté de Médecine de Nantes.

## LISTE DES PRINCIPALES ABRÉVIATIONS UTILISÉES.

---

AC I Amstersdam criteria I  
ADAM: a disintegrin and metalloproteinase  
AdC : adénome conventionnel  
ADN: acide désoxyribonucléïque  
ADNc: acide désoxyribonucléïque complémentaire  
APC: adenomatous polyposis coli  
ARNm: acide ribonucléïque messenger  
AP-1: activator protein 1  
ATOH1 : Atonal homolog 1  
BA: bleu alcian  
BIP: bactericidal/permeability-increasing protein  
CCR: cancer colorectal  
CD: cluster of differentiation  
Cdk: cyclin dependent kinase  
CHO: Chinese hamster ovary cell  
CIMP : CpG Island methylator phenotype  
CK1 $\alpha$ : casein kinase 1 alpha  
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité  
CPA: cellule présentatrice de l'antigène  
CpG Island : Cytosin promotor Guanine Island  
CRE: AMPc responsive element  
DCC: deleted in colorectal carcinoma  
DPC4: deleted in pancreatic carcinoma  
DSS: dextran sulfate sodium  
EGF: epidermal growth factor  
EGFR : epidermal growth factor receptor  
ERK : extracellular regulated kinase  
GATA6 : GATA-binding protein 6  
GMPc : guanosyl monophosphate cyclique  
GSK3 $\beta$  : glycogen synthase kinase 3 beta  
GTP : guanosyl tri-phosphate

HES : hématoxyline éosine safran  
Hath1 : human atonal homolog 1  
HID : high iron diamine  
HLA : human leucocyte antigen  
HNPCC : hereditary non polyposis colorectal cancer  
hMLH1 : human mutL homologue 1  
hMSH2 : human mutS homologue 2  
hMSH6 : human mutS homologue 6  
hPMS1 : human postmeiotic segregation increased 1  
hPMS2 : human postmeiotic segregation increased 2  
H-RAS : Harvey-ras  
HUVEC : human umbilical vein endothelial cell  
IFN $\gamma$  : interferon gamma  
Ig : immunoglobuline  
IL : interleukine  
IP : inositol phosphate  
KLF4 : Krüppel-like factor 4  
K-RAS : Kirsten-ras  
LEF : lymphoid enhancer factor  
LIE : lymphocyte intra-épithélial  
MAP : mitogen activated protein  
MATH1 : mouse atonal homolog 1  
MCR : mutation cluster region  
MDC - 15 : metalloprotease / disintegrin / cys-rich - 15  
MEC : matrice extracellulaire  
MEF2C : myocyte enhancer factor 2C  
Metargidine : metalloprotease – RGD- disintegrin  
MMP : metalloproteinase  
MMR : mismatch repair  
MSI- H : microsatellite instability – high  
MSI- L : microsatellite instability– low  
MSS : microsatellite stable  
NF-AT3 : nuclear factor of activated T cell  
NF $\kappa$ B : nuclear factor  $\kappa$ B

NK : natural killer  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PAS : périodic acid Schiff  
PH : polype hyperplasique  
PI3K : phosphoinositide kinase 3  
PP2A : phosphatase proteine 2A  
RER : Replication ERor  
RGD : arginine- glycine – acide aspartique  
RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction  
SCID : severe combined immunodeficiency  
siRNA : small interfering ribonucleotide acid  
SL : syndrome de Lynch  
SSA : sessile serrated adenoma  
SSAd : sessile serrated adenoma with dysplasia  
TACE : tumor necrosis factor converting enzyme  
TCF4/LEF : T-cell factor 4 / lymphocyte enhancer factor  
TCR : T-cell receptor  
TEM : transition épithélio-mésenchymateuse  
TGF : transforming growth factor  
Th : T-helper  
TIL : tumor infiltrating lymphocyte  
TNF : tumor necrosis factor  
TMA : tissue micro-arrays  
TSA : traditionnal serrated adenoma  
WIF1 : Wnt inhibitor factor 1  
Wnt : wint  
ZO-1, -2 : zonula occludens-1, -2

# SOMMAIRE

---

<b>I. INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>9</b>
<b>II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>15</b>
1. GENERALITES SUR LES CANCERS DU COLON.....	16
1.1. Introduction et position du problème.....	16
1.2. Anatomie pathologique.....	16
1.2.1. Classification OMS histologique : quelle est sa valeur pronostique ?.....	16
Classification histologique.....	16
Valeur pronostique de la classification des carcinomes colo-rectaux.....	19
1.2.2. Stade pTNM.....	20
1.3. Ce que traduit l'examen microscopique d'une tumeur.....	21
1.4. La morphogenèse et la différenciation ne se font pas au hasard.....	22
2. DEMONSTRATION D'UNE SUBORDINATION DE LA MORPHOGENÈSE ET DE LA DIFFÉRENCIATION TUMORALES À DES MÉCANISMES SPÉCIFIQUES.....	23
2.1. Introduction.....	23
2.2. Mécanismes génétiques.....	24
2.2.1. Le mode classique d'oncogénèse : adénome-cancer et bases génétiques (Vogelstein).....	24
L'exemple du gène APC dans la subordination de la morphogenèse à la génétique.....	24
Description du gène APC et de ses fonctions.....	27
Les limites d'un modèle.....	30
Vers d'autres voies de cancérogenèse colorectale.....	31
2.2.2. Le syndrome des cancers colorectaux héréditaires sans polypose (syndrome de Lynch) et la voie d'instabilité microsatellitaire (MSI).....	34
2.2.3. La voie festonnée et l'instabilité microsatellitaire.....	39
2.2.4. Le profil CIMP (CpG Island methylator phenotype) : vers une nouvelle classification des CCR ?.....	43
2.3. Physiopathologie moléculaire.....	45
2.3.1. Le contingent tumoral.....	45
La mucosécrétion.....	45
Introduction.....	45
Mucines de sécrétion.....	47
□ Détection (histochimie-immunohistochimie-RT-PCR).....	47
□ Synthèse et sécrétion des mucines.....	49
□ Régulation de la synthèse. Comment fonctionne MUC2 ?.....	50
Mucines en pathologie.....	51
□ Modèles de souris invalidées.....	51
□ Les données de la pathologie humaine.....	55
La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).....	61

Introduction.....	61
En quoi ce processus nous intéresse-t-il ?.....	62
La TEM : les arguments évocateurs pour le pathologiste ; TEM et cancer : est-ce une réalité ?.....	63
Les cancers coliques et la TEM.....	65
La modélisation de la TEM en cancérologie colique : à la recherche d'une subordination.....	67
□ Le modèle des « sphéroïdes ».....	67
□ La lignée colique SW480.....	69
□ Le modèle de « l'invasion des sphéroïdes » utilisé par Brabletz.....	71
Expression de la E-cadhérine.....	73
Généralités.....	73
Expression de E-cadhérine dans la muqueuse colique normale et dans les CCR.....	74
Signification de la perte de la E-cadhérine dans les CCR : les données apportées par l'examen des CCR... 75	75
□ Valeur pronostique de la E-cadhérine ?.....	75
□ E-cadhérine et différenciation tumorale – TEM.....	77
Les modèles d'études de la E-cadhérine.....	78
□ Modélisation chez l'animal de la E-cadhérine.....	78
□ Les lignées cellulaires.....	80
Est ce que la perte ou la diminution de la E-cadhérine est en relation avec/ou subordonnée à un statut particulier du gène CDH1?.....	81
2.3.2. Le contingent stromal.....	84
2.3.3. Un exemple d'effecteur moléculaire appartenant aux deux contingents : les intégrines.....	87
Description, fonction d'adhésion, lien entre la matrice extracellulaire et le milieu intracellulaire.....	87
L'expression des intégrines dans les tumeurs.....	90
Rôle des intégrines dans le contingent tumoral.....	91
Migration, invasion.....	91
Prolifération- survie - apoptose.....	92
Le cas d' $\alpha 5\beta 1$ dans les cancers coliques.....	93
Rôle des intégrines dans le contingent stromal.....	94
Angiogenèse.....	95
Réaction desmoplastique.....	95
Réaction immunitaire.....	95
<b>3. MOLECULES UBIQUITAIRES - LE COUPLE CALRETICULINE-CD91 ET LE COUPLE ADAM15-INTEGRINES : INTERVENANTS POTENTIELS DANS LA MORPHOGENÈSE, LA DIFFERENCIATION ET LA PROGRESSION TUMORALE.....</b>	<b>97</b>
<b>3.1. Calréticuline.....</b>	<b>97</b>
3.1.1. Introduction.....	97
3.1.2. Calréticuline : de la découverte à la « structure-fonction » et à des localisations multiples.....	97
La fonction chaperonne de calréticuline.....	100
Calréticuline et homéostasie calcique.....	103
La calréticuline extraréticulaire.....	104
3.1.3. Calréticuline : rôle à l'échelle des tissus et des organes.....	105
Calréticuline et immunité.....	106
Calréticuline et cicatrisation.....	107
Calréticuline et apoptose.....	107

Calréticuline, vasostatine et angiogenèse.....	108
Calréticuline et adhésion cellulaire.....	108
Néoplasies.....	109
3.2. <i>ADAM15</i> .....	109
3.2.1. Généralités.....	109
3.2.2. Athérosclérose.....	113
3.2.3. Angiogenèse.....	113
3.2.4. <i>ADAM15</i> et intestin.....	115
Expression d'ADAM15 dans la muqueuse colique normale.....	115
Expression d'ADAM15 dans l'inflammation intestinale.....	116
Expression d'ADAM15 dans les cancers.....	117
Expressions d'ADAM15 dans les cancers colorectaux.....	120
<b>III. RESULTATS.....</b>	<b>121</b>
1. ARTICLE N°1.....	122
1.1. <i>Introduction</i> .....	122
1.2. <i>Résumé de l'article N°1 : « Altered calreticulin expression in human colon cancer. Maintenance of calreticulin expression is associated with mucinous differentiation » (Toquet et al., Oncol. Rep. 2007).....</i>	<i>123</i>
1.3. <i>Discussion</i> .....	<i>125</i>
2. ARTICLE N°2.....	127
2.1. <i>Introduction</i> .....	<i>127</i>
2.2. <i>Résumé de l'article N°2 : « ADAM15 to <math>\alpha 5 \beta 1</math> integrin switch in colon carcinoma cells : a late event in cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis » (Toquet et al., Int J Cancer, en révision).....</i>	<i>129</i>
2.3. <i>Discussion</i> .....	<i>130</i>
<b>IV. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>132</b>
<b>V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>136</b>

## **I. INTRODUCTION GENERALE**

L'Anatomiste, l'Histo-embryologiste, le Pathologiste, tous ont en commun de s'intéresser à la morphologie, normale ou pathologique, des organes et tissus. Une question essentielle posée par l'étude des formes est celle de leur naissance, c'est-à-dire de la morphogénèse. Intuitivement on en vient à penser que toute morphogénèse est le résultat de contraintes, ou la réalisation d'un plan pré-établi.

Dès le début du XXème siècle, Stéphane Leduc (1853-1939), Professeur de chimie à l'Ecole de médecine de Nantes a proposé une modélisation simple de la morphogénèse des organismes et des cellules, fondée uniquement sur des contraintes chimio-osmotiques. Dans ses ouvrages, *la théorie physico-chimique de la vie et générations spontanées*, et *la biologie synthétique*, publiés en 1910 et en 1912, Stéphane Leduc montre des photographies de structures issues de la croissance osmotique produite par des mélanges de solutions de gélatine et de sels minéraux. Ces structures reproduisent assez fidèlement des formes vivantes plus ou moins complexes, notamment des cellules ou le processus de karyokinèse. Si l'œuvre de Stéphane Leduc a été largement diffusée dans les pays anglo-saxons, elle a suscité en France au mieux le scepticisme et au pire la dérision, car elle portait en elle un relent d'hétérogénéité inacceptable, alors même que les théories Pastoriennes triomphaient. En fait les travaux de Stéphane Leduc ne fournissaient pas un modèle des contraintes à l'œuvre dans la morphogénèse, mais seulement une simulation, de la même manière que la statue simule l'être humain. Cependant cette œuvre inaugurerait un champ d'investigations qui n'allait cesser de croître.

A la même époque, Walter Vogt, un embryologiste, s'intéressait aux premières étapes du développement en introduisant la technique des colorants vitaux pour étudier la morphogénèse et marquer les territoires « présumptifs » de l'organisme dès le stade de blastula. Ces travaux restaient cependant essentiellement descriptifs et ne renseignaient pas sur les forces et contraintes à l'œuvre dans le processus.

Le fait que la morphogénèse puisse être subordonnée à un « plan » a été très élégamment résumé par J. Huxley «*Dans chaque génération, l'ontogénèse est le mécanisme nécessaire à l'hérédité pour réaliser ses virtualités*». Par la suite, la métaphore du «code» et du «programme informatique» a été très fructueuse pour la compréhension des mécanismes génétiques gouvernant la morphogénèse des organismes. Les techniques de clonage des gènes, de transgénèse animale, de gènes rapporteurs développées durant les années 1990-2000 ont largement contribué à montrer que les mouvements morphogénétiques sont subordonnés à l'activation séquentielle de gènes, dont les gènes dits « architectes » ou homéogènes, très conservés au cours de l'évolution. A cette même époque, les travaux montrant l'identité des résultats morphogénétiques produits par une transgénèse interspécifique, un des meilleurs exemples étant celui du gène *eyeless*, ont définitivement établi dans l'esprit des chercheurs plusieurs concepts qui sont devenus de véritables paradigmes. Il s'agit de, 1) la prééminence de la métaphore du «programme» génétique dans la compréhension des processus morphogénétiques, et 2) la

modélisation animale par transgénèse ou invalidation comme clef de voûte de la «preuve du concept» dans la recherche de la subordination puisque les résultats étaient considérés comme complètement transposables entre espèces.

C'est dans ce contexte épistémologique que s'est développée la recherche en oncologie intestinale. L'adénome avait été reconnu dans une publication de Lockhart-Mummary en 1925 comme l'élément morphogénétique support de «la susceptibilité au cancer» dans certaines formes familiales de cancers coliques. En outre, dès 1925, la transition adénome-adénocarcinome était parfaitement décrite dans une «bible» de l'anatomie pathologique, le traité des tumeurs humaines de Masson.

Il fallut cependant attendre la publication de Herrera *et al.* en 1986 pour qu'on établisse pour la première fois une connexion entre une anomalie génétique et la formation des adénomes. Par la suite les évènements de sont précipités : en 1990, Fearon et Vogelstein (Fearon *et Vogelstein*, 1990) proposaient un modèle génétique de l'oncogénèse colique, ce modèle faisant intervenir une anomalie génétique précoce (délétion 5q ou mutation d'un gène en 5q non identifié alors), suffisante pour produire un adénome, suivie de l'intervention d'activation de proto-oncogènes (*K-RAS*) ou d'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (*p53*), tous ces éléments agissant de manière séquentielle et/ou cumulative pour entraîner la malignité.

Finalement, la démarche était très analogue à celle des embryologistes dans leur recherche des clefs du programme génétique séquentiellement activé, à l'œuvre au cours du développement. La recherche par la suite s'accélérait : identification du gène *APC* sur le chromosome 5q21, agissant comme un gène suppresseur de tumeur, présentant une mutation germinale dans les cas de polypose familiale, et somatique dans les cellules des cancers colorectaux sporadiques. Puis survint la démonstration de la précocité des mutations *APC* dans les adénomes sporadiques. Enfin, la découverte «heureuse» d'une mutation germinale affectant l'homologue murin d'*APC* dans une lignée de souris présentant des adénomes intestinaux de génération en génération (souris *Apc<sup>Min/+</sup>*) (Moser *et al.*, 1990), ouvrait la voie aux opérations de modélisation chez l'animal, notamment par knock out, de la subordination de la morphogénèse néoplasique à des évènements génétiques. Bref, dès le début des années 1990, les outils conceptuels (modèle génétique de Vogelstein) et les outils expérimentaux étayant la théorie, étaient disponibles pour étudier la morphogénèse des néoplasies coliques.

La suite est celle du passage du stade de la « sérendipité », c'est-à-dire de la révélation «heureuse» - la souris *Apc<sup>Min/+</sup>* en est un bon exemple - à une stratégie dite «à haut débit». Cette stratégie peut se résumer en quelques mots : 1) identification des gènes d'intérêt par séquençage du génome des cellules tumorales (projet de l'International Genome Consortium), et 2) vérification de la subordination du

processus néoplasique aux anomalies génomiques par étude du phénotype après invalidation ou sur-expression en culture cellulaire et injection des cellules chez la souris nude (projet du Dana Farber Cancer Center à Boston, et du Cold Spring Harbor à New York) et/ou invalidation chez la souris (en association avec les consortiums de séquençage).

Bref, un tel programme très ambitieux se propose de reconstituer l'histoire de la tumeur sur la base des éléments de subordination génétique, selon un plan déjà dessiné par les travaux de Vogelstein qu'il suffirait de compléter. En outre cette stratégie qui privilégie la recherche de cibles moléculaires s'inscrit dans une perspective « nouvelle » celle du « theranostic », néologisme désignant les biomarqueurs d'intérêt sur le plan diagnostique (d'où des propositions de reclassification des néoplasies sur leur seule signature génétique et/ou transcriptionnelle) et sur le plan thérapeutique (cibles moléculaires).

Cette vision de la recherche de la subordination des lésions tumorales nécessite évidemment quelques ajustements : tout d'abord, l'analogie entre la démarche qui aboutit à trouver la subordination du développement à la génétique et celle qui aboutit à établir la subordination de la morphogénèse tumorale à la génétique est assez lâche... dans le premier cas il s'agit de décrypter un phénomène dont le résultat est parfaitement reproductible de génération en génération et dont les formes sont parfaitement prédictibles. Dans le second cas, celui des néoplasies, le processus tumoral n'est jamais abouti, il se déroule selon un processus darwinien faisant intervenir deux éléments, la diversification phénotypique et l'adaptation à un environnement changeant. En d'autres termes la dépendance aux conditions initiales (génétiques) ne fait que s'amortir au cours de la progression du processus tumoral. Ce phénomène est bien illustré par l'évolution des adénomes chez la souris possédant une invalidation du gène *APC* dans l'épithélium intestinal: Au cours de l'évolution vers un adénocarcinome, contrairement à la prédiction du modèle de Vogelstein, on n'observe jamais de mutation *K-RAS* ou *P53*, mais une aneuploidie. En d'autres termes, le mode d'évolution « moléculaire » des lésions successives ne peut pas être prédit sur la base de l'anomalie initiale : il s'agit bien d'un phénomène d'affaiblissement de la dépendance aux conditions initiales. Ensuite, il existe des situations pour lesquelles la modélisation chez la souris ne rend compte qu'imparfaitement de la pathologie humaine. Par exemple, dans le modèle de souris *Apc<sup>Min/+</sup>*, les adénomes sont essentiellement au niveau du grêle et non du côlon, et l'évolution vers un adénocarcinome est très rare. Enfin, pour certains effecteurs d'intérêt, la modélisation animale est tout simplement impossible : c'est le cas de deux effecteurs potentiels de la tumorigénèse intestinale que nous étudions ici, la calréticuline et l'ADAM15.

En outre, le modèle dit « canonique » d'oncogénèse proposé par Vogelstein, a induit l'idée chez nombre de chercheurs que les néoplasies coliques forment un ensemble parfaitement homogène : une revue générale ne débutait-elle pas par « *The adenomatous polyposis coli (APC) gene can be regarded as **the***

*gene for colorectal cancer*» (Fodde *et al.*, 2001) ? Il y avait là un raccourci étonnant faisant de l'adénome un substitut du carcinome colorectal et une affirmation d'une voie univoque de carcinogénèse. Il est évident que les données histopathologiques que peut facilement recueillir le Pathologiste sont peu compatibles avec une vue aussi simpliste.

Dans une lettre adressée à Clinical Cancer Research, J. Jass (2004) écrivait «*It is often argued that the demonstration of particular genetic profiles within stages of the adenoma-carcinoma sequence provides absolute proof that this sequence serves as the evolutionary pathway for colorectal carcinoma in the «vast majority of cases». It is generally acknowledged that mutation of APC, K-ras, and p53 are the cornerstones of this pathway. In fact, only 7% of colorectal carcinomas have all the three mutations, an observation that forces us to question the existence of a dominant linear model of colorectal tumorigenesis and to accept that colorectal carcinoma is very much a multipathway disease*». La découverte de la voie d'oncogénèse par instabilité microsatellitaire a parfaitement démontré que les carcinomes colorectaux ne forment pas une entité homogène mais bien des entités diverses sur le plan oncogénétique, avec une correspondance phénotypique clairement identifiable dans un certain nombre de situations.

«Last but not least», les effecteurs moléculaires de la morphogénèse et de la progression tumorales ne sont pas tous subordonnés à des anomalies génétiques clairement identifiables. Certains processus de progression tumorale appartiennent à la classe des processus auto-organisés, dits aussi « émergents » ou « collectifs », issus notamment des interactions locales tumeur-stroma et peuvent avoir un impact thérapeutique.

La pathologie tumorale mammaire en fournit une très bonne illustration : ainsi il a été largement suggéré dès 2004 que la réponse au traitement néo-adjuvant par Trastuzumab chez des patientes surexprimant HER2 est dépendante de l'intensité de l'infiltrat lymphoïde de la tumeur initiale (Gennari *et al.*, 2004). En d'autres termes, une cible thérapeutique moléculaire, définie sur la base d'une altération génétique (surexpression de HER2) peut être modulée par son contexte tissulaire. Dans ce type de recherche, la sérendipité a, là encore, son rôle à jouer... L'étude bibliographique ci-après donne quelques exemples du rôle des processus émergents dans la progression des néoplasies colorectales.

Tous ces éléments, à savoir, affaiblissement de la dépendance aux anomalies génétiques initiales lors de la progression tumorale, diversification des anomalies génétiques et donc des effecteurs moléculaires, limitations de la modélisation animale, hétérogénéité des processus oncogénétiques, existence de processus émergents, plaident pour une approche « holiste » de la progression tumorale, à travers

l'exploitation des biocollections clinico-pathologiquement annotées.

Notre thèse est que l'exploitation des biocollections permet de tisser une toile entre d'une part les molécules candidates au rôle d'effecteurs moléculaires de morphogénèse, et d'autre part un ensemble de données, le mode d'oncogenèse – à travers par exemple le statut MSS/MSI –, les anomalies génétiques ou épigénétiques du gène codant pour l'effecteur concerné, la classification histopathologique, la morphogénèse tumorale, en cohérence avec les résultats de la modélisation in vitro/in vivo lorsqu'elle est disponible, et enfin le pronostic.

Nous rapportons ici deux exemples de cette approche, l'un concerne la calréticuline, et l'autre un membre d'une famille de protéines désignées sous l'acronyme d'ADAM (pour A Disintegrin And Metalloprotease), l'ADAM15. Dans les deux cas, il s'agit de protéines ubiquitaires, impliquées dans les phénomènes d'adhésion, de migration, voire de différenciation épithéliale. Dans les deux cas il s'agit de molécules candidates au rôle d'effecteur de la différenciation et/ou de la progression tumorales.

Nous expliciterons ici dans une approche bibliographique les notions de subordination de la morphogénèse à la génétique des tumeurs, la notion d'effecteurs moléculaires de la morphogénèse et de la différenciation tumorales, le rôle de la modélisation animale et de la modélisation in vitro dans le décryptage des fonctions des effecteurs moléculaires de la progression tumorale. Puis nous montrerons les résultats de notre approche, les difficultés rencontrées, et comment nous envisageons l'avenir de cette recherche.

## **II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

# **1. GENERALITES SUR LES CANCERS DU COLON**

---

## **1.1. Introduction et position du problème**

Le cancer du côlon est un problème de santé publique. Environ 1 million de nouveaux cas de cancers du côlon et du rectum ont été diagnostiqués en 2002 dans le monde (Parkin *et al.*, 2005). Dans les pays occidentaux, le cancer colorectal est, en terme de fréquence, le 3ème cancer chez l'homme après les cancers du poumon et de la prostate, et le 2ème cancer chez la femme après le cancer du sein. En France en 2000, il a été enregistré 36257 nouveaux cas, avec un taux d'incidence de 39,1 / 100000 (hommes) et de 24,6 / 100000 (femmes), soit une augmentation de 16% sur la période 1980-2000 (Melissa *et al.*, 2009). Actuellement le traitement est d'abord chirurgical. La tumeur est classée selon la classification TNM (UICC *et al.*, 1993), critère majeur pour poser les indications de chimiothérapie et/ou de radiothérapie.

A l'ère des thérapeutiques dites «ciblées», c'est à dire celles dirigées spécifiquement contre une cible moléculaire, il est important de pouvoir déterminer quelles sont les cibles d'intérêt thérapeutique. Cela revient à poser la question suivante : quels sont les éléments auxquels est subordonnée la progression tumorale ? Ces éléments sont le plus souvent considérés comme répondant à un programme génétique qui va déterminer des effecteurs moléculaires. Vus par le pathologiste, ces effecteurs moléculaires d'intérêt sont ceux qui vont être les forces motrices de la morphogenèse et de la différenciation tumorales et qui seront plus ou moins directement dépendants d'une anomalie génétique.

Comme nous le verrons dans ce travail de thèse, il s'agit pour nous de définir les termes de morphogenèse, de différenciation et de subordination, et de montrer comment le pathologiste a « en main » les approches pertinentes pour définir des cibles moléculaires d'intérêt, c'est à dire celles participant à la morphogenèse tumorale et/ou pouvant être ciblées par des thérapeutiques nouvelles.

## **1.2. Anatomie pathologique**

### *1.2.1. Classification OMS histologique : quelle est sa valeur pronostique ?*

#### **Classification histologique**

Afin d'établir un langage «universel» permettant notamment de constituer des cohortes de patients ou des inclusions en tumorotheque sur des bases histopathologiques bien standardisées, la classification

actuellement utilisée pour les carcinomes (tumeurs épithéliales malignes) du côlon est la classification de l’OMS. La dernière version de 2000 décrit 8 sous-types tumoraux en fonction de l’architecture et de la différenciation ; nous décrivons les principaux sous-types rapidement ici :

**- catégorie adénocarcinome “ordinaire” ou adénocarcinome Lieberkühnien**

Ils représentent 80 à 90% des tumeurs colorectales. Leur architecture est glandulaire. Les tumeurs colorectales ont une architecture tubuleuse, tubulopapillaire ou cribriforme. Par définition, un adénocarcinome «bien différencié» est constitué de plus de 95% de glandes (35% des tumeurs), «moyennement différencié» de 50 à 95 % de glandes (60%) et «peu différencié» de 5 à 50% de glandes (15%). La «différenciation» varie d’un territoire à l’autre et elle est évaluée par l’examen de l’ensemble des territoires du cancer. Dans la classification de l’OMS, la «différenciation tumorale» est fondée sur l’architecture tumorale et ne tient pas compte des fonctions cellulaires spécifiques (mucosécrétion, bordure en brosse apicale) (Figure 1A).

**- catégorie “adénocarcinome mucineux”**

Les plus fréquents après les adénocarcinomes Lieberkühniens (10 à 15%), les carcinomes mucineux ont macroscopiquement un aspect gélatineux. Ces adénocarcinomes sont parfois appelés «adénocarcinomes colloïdes» à cause de leur aspect macroscopique mais cet aspect est aussi observé dans la catégorie présentée dans le paragraphe suivant des «carcinomes à cellules en bague à chaton». Les adénocarcinomes mucineux se caractérisent par de larges plages de substance mucineuse pâle extracellulaire, contenant des cellules tumorales organisées en glandes, lobules ou cellules isolées (Figure 1D). Cet aspect doit représenter plus de 50% du volume tumoral. Contrairement aux carcinomes non mucineux, ils tendent à présenter une faible différenciation tubuleuse, un stroma comportant une réaction lymphocytaire peu abondante. Leur localisation préférentielle est en amont de l’angle colique droit. De nombreux adénocarcinomes présentent une composante mucineuse inférieure à 50% associée à la composante «ordinaire» et pour cette raison sont classés dans cette dernière catégorie.

**- catégorie “carcinome à cellules en bague à chaton” (à cellules indépendantes)**

Ils représentent 1,1% de l’ensemble des carcinomes colorectaux (Figure 1C). Ce type d’adénocarcinome est défini par l’OMS par la présence au sein de la tumeur de plus de 50 % de cellules en bague à chaton. Les cellules tumorales, indépendantes, se caractérisent par la présence de vacuole intracytoplasmique ; leur stroma fibreux est abondant.

**- catégorie “carcinome médullaire”**

Ils se caractérisent par des cordons de cellules malignes avec un noyau vésiculeux pourvu d'un nucléole proéminent et d'un abondant cytoplasme éosinophile (Figure 1B). Ils présentent une stroma réaction lymphoïde marquée. Leur pronostic serait plus favorable que celui des autres tumeurs colorectales (Jessurun *et al.*, 1999)

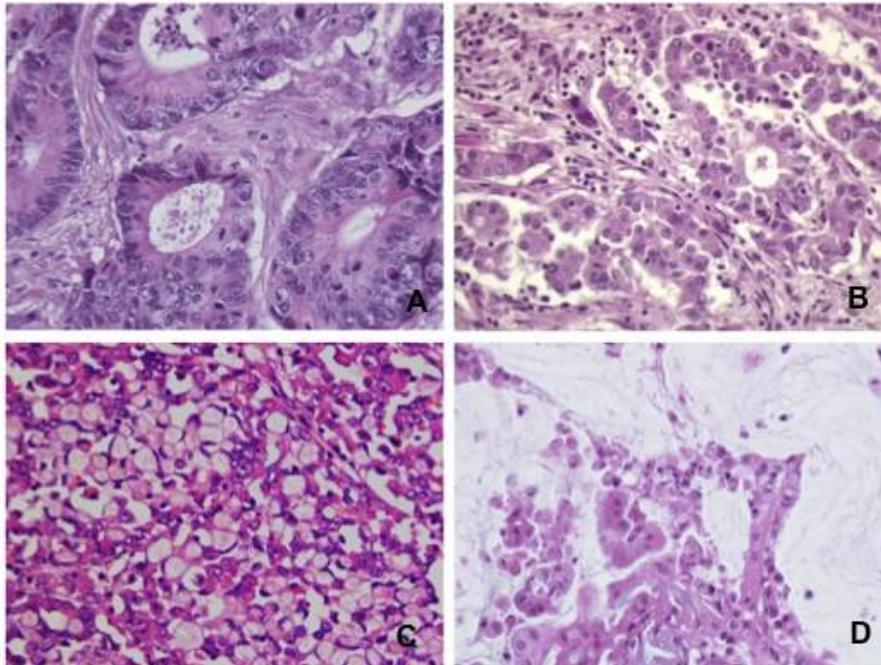
**- catégorie "carcinome indifférencié"**

Ces tumeurs rares n'expriment morphologiquement aucun caractère de différenciation. Elles expriment les marqueurs épithéliaux.

**- catégorie "mixte"**

Certains carcinomes colorectaux peuvent contenir plusieurs composantes sans qu'aucune n'atteigne les 50 % du volume tumoral nécessaire à leur classification dans une catégorie spécifique. Alexander les définit sous le terme de «carcinomes mixtes». Ces tumeurs sont souvent instables pour les microsatellites (MSI) (Alexander *et al.*, 2001).

Les CCR vus par l'OMS s'apparentent à un répertoire, ne soulignant pas que les différentes catégories histologiques décrites puissent correspondre à des maladies cancéreuses différentes.



**Figure 1 : Sous-types histologiques de CCR.** A : adénocarcinome lieberkühnien ; B : adénocarcinome médullaire ; C : adénocarcinome à cellules en bague à chaton ; D : adénocarcinome mucineux. Fort grossissement. Coloration HES.

### Valeur pronostique de la classification des carcinomes colo-rectaux

Une classification peut porter une signification plus profonde qu'une simple dénomination d'un type histologique : elle peut être le témoin d'une forme clinico-pathologique particulière, d'un mode d'oncogénèse spécifique...Le plus souvent le pathologiste s'attache à découvrir des caractéristiques dites histopronostiques. L'exemple type de classification histopronostique reconnue est celle décrite dans les cancers du sein, connue sous le nom de grade de Elston et Ellis. Cette classification est fondée sur la détermination de trois paramètres, l'architecture glandulaire, les atypies cytonucléaires et enfin le nombre de mitoses. Un index final est issu de ces trois déterminations, et est corrélé de façon statistiquement significative à la survie des patients dans les analyses multivariées (Rakha *et al.*, 2008).

Selon la classification de l'OMS, le grade des CCR tient compte uniquement de l'architecture de la tumeur. Ainsi, en fonction du pourcentage de glandes présentes dans la tumeur, 4 grades pronostiques sont définis, recoupant la notion de différenciation :

- le grade 1 : tumeurs bien différenciées comportant plus de 95% de glandes
- le grade 2 : tumeurs moyennement différenciées comportant 50-95 % de glandes
- le grade 3 : tumeurs peu différenciées comportant 5-50% de glandes
- le grade 4 : tumeurs indifférenciées comportant moins de 5% de glandes

Lorsqu'une tumeur est hétérogène, le grade est déterminé par la composante la moins différenciée en excluant le front d'invasion.

Par convention, les carcinomes mucineux et les carcinomes en bagues à chaton sont considérés comme des tumeurs peu différenciées en raison de leur pauvreté en structures glandulaires et sont regroupés dans le grade 3. Les carcinomes médullaires sont considérés comme des tumeurs indifférenciées et regroupés dans le grade 4.

Selon certaines publications, ce grade a bien une valeur pronostique (Jass *et al.*, 1986) mais elle reste inférieure à celle du stade (Chapuis *et al.*, 1985). Mais, d'autres études font état du caractère peu reproductible de cette classification et notamment de la difficulté de différencier les adénocarcinomes moyennement différenciés des adénocarcinomes peu différenciés (Chandler *et al.*, 2008).

De nombreuses questions demeurent en particulier pour les carcinomes «colloïdes». Est-ce pertinent de

classer les carcinomes mucosecrétants dans le grade 3 ? Les carcinomes mucineux sont parfois associés à un pronostic péjoratif (Akino *et al.*, 2002 ; Secco *et al.*, 1994) mais dans d'autres études, le pronostic de ces tumeurs est superposable à celui des adénocarcinomes non mucineux (Purdie *et al.*, 2000). Les carcinomes en bagues à chaton auraient un pronostic plus péjoratif par rapport aux carcinomes non mucineux (Secco *et al.*, 1994). Finalement, toutes ces données sont à prendre avec précaution dans la mesure où il existe un certain nombre de biais : l'identification de ces composantes, les seuils retenus pour ces composantes, l'association ou non à un phénotype MSI pour les adénocarcinomes mucineux (cf chapitre subordination à des évènements génétiques)...

Au total, dans le cadre de la classification des CCR, à notre connaissance, aucune publication ne montre que l'index histopronostique des CCR a une puissance statistique analogue à l'index histopronostique des adénocarcinomes du sein. Cependant, ces différents sous-types et grades tumoraux, traduisant une morphogenèse et une différenciation particulières, méritent d'être étudiés de façon spécifique, afin de déterminer les liens de subordination qui existent, tant génétiques que moléculaires.

### *1.2.2. Stade pTNM*

Au-delà de la classification histologique des CCR, en déterminant le stade pTNM sur pièce opératoire, le pathologiste apporte l'élément actuellement le plus puissant de valeur pronostique.

La détermination du stade pTNM, mise au point par l'UICC (Union Internationale Contre Le Cancer) (1993), repose sur la prise en compte de trois paramètres :

T (pT): tumeur primitive ; le T exprime la profondeur d'infiltration de la tumeur

N (pN) : définit l'existence ou non de métastases ganglionnaires régionales

M (pM), définit l'existence ou non de métastases à distance

La classification TNM permet un groupement des lésions en stades de I à IV.

Cette classification est actuellement le critère majeur de la prise en charge des patients pour poser les indications de chimiothérapie et/ ou de radiothérapie.

### 1.3. Ce que traduit l'examen microscopique d'une tumeur

L'examen microscopique d'une tumeur (lésion préneoplasique ou néoplasme infiltrant) traduit deux processus largement intriqués, un processus morphogénétique et un processus de différenciation cellulaire. La caractéristique principale des néoplasies ou tout au moins des néoplasies invasives est que ces processus ne sont jamais aboutis. En d'autres termes, ils répondent à un processus évolutif d'adaptation, comprenant deux composantes : une diversification phénotypique associée à une pression sélective anti-tumorale. C'est au début du processus néoplasique que cette morphogenèse – définie comme la formation de l'architecture de la néoplasie - est le plus facilement modélisable lorsqu'elle dépend d'un processus génétique bien identifiable et reproductible chez l'animal (exemple de l'adénome). C'est ce que nous verrons dans le chapitre 2.

Le terme de différenciation est un terme plus difficile à définir dans la mesure où sous ce terme «se cachent» plusieurs phénomènes. L'embryologiste parlera de différenciation au cours du développement. Le biologiste emploiera le même mot pour désigner le processus qui, au sein d'un tissu adulte, est à l'origine de l'homéostasie des cellules différenciées. Un exemple en est le renouvellement et la différenciation des cellules de la crypte intestinale. Le pathologiste utilisera ce même terme pour désigner l'architecture glandulaire d'une tumeur, par analogie avec le tissu normal dont elle est issue, mais aussi pour désigner des caractéristiques structurales cellulaires signant le maintien de fonctions spécialisées du tissu d'origine (cellules caliciformes par exemple, traduisant le maintien de la musosécrétion). Enfin, le chercheur spécialiste de la différenciation tumorale utilisera le terme de marqueur ou de biomarqueur de différenciation pour désigner toute protéine impliquée dans une fonction spécialisée de la cellule tumorale. Si cette protéine n'a pas son équivalent dans le tissu d'origine de la tumeur, on parlera alors de transdifférenciation (le pathologiste dirait carcinome métaplasique). Un exemple de transdifférenciation est l'expression de la protéine MUC5AC, protéine normalement restreinte à l'épithélium gastrique, mais qui est exprimée dans certains cancers coliques (Jass *et al.*, 2000).

Il est évident que l'utilisation d'un terme commun, appliqué à des champs d'investigation très différents qui vont du développement au cancer, peut aboutir à l'idée que les éléments de causalité de ces processus sont partout les mêmes. Il est évident que cette notion doit être prise avec beaucoup de précaution. La confusion est d'autant plus facile que la modélisation animale du rôle des gènes de différenciation est souvent liée à une approche dite de knock out. Lorsque l'animal survit à l'invalidation d'un gène et que cette invalidation s'accompagne d'un phénomène particulier, on ne sait pas si l'anomalie constatée provient d'un déficit spécifique au développement ou un problème lié à l'homéostasie du tissu adulte concerné.

## **1.4. La morphogenèse et la différenciation ne se font pas au hasard**

Le terme de morphogenèse renvoie principalement au développement embryonnaire, et représente des remodelages tissulaires majeurs, aboutissant à un organisme complètement défini et stable sur le plan structural.

D'après les travaux de génétique moléculaire du développement qui se sont produits depuis les années 1980-1990, le concept dominant est celui de la subordination de la morphogenèse à la réalisation génétique exprimée séquentiellement. La modélisation animale par knock-out et par transgénèse en association avec des études de gènes rapporteurs ont constitué des étapes majeures dans 1/ l'identification des gènes impliqués dans la réalisation du programme et 2/ la cartographie d'expression des protéines effectrices de la morphogenèse.

Par analogie, on a pu se demander si la morphogénèse tumorale, au moins dans ce qu'elle a de plus reproductible, c'est-à-dire l'adénome, n'est pas elle aussi le résultat d'expression d'un programme génétique particulier. Les travaux d'Herrera (1986), puis de Vogelstein (1988) et de Moser (1990) ont montré qu'il existe bien une subordination de la morphogenèse de l'adénome à un programme génétique. Cependant, ce qui est mis en jeu n'est pas un gène particulier mais c'est une délétion ou une mutation (gène APC) dont l'adénome ne sera qu'une répercussion indirecte (accumulation nucléaire de  $\beta$ -caténine). Il est donc essentiel pour comprendre le mécanisme de morphogenèse et de différenciation tumorale 1/ d'identifier les effecteurs moléculaires de cette morphogenèse, véritable « courroie de transmission » du programme génétique et 2/ d'établir la cartographie de ces protéines effectrices au cours du processus tumoral.

L'approche immunophénotypique des tumeurs permet une cartographie des effecteurs moléculaires eux-mêmes sélectionnés sur la base d'études génomiques et de transgénèse. Cette approche immunophénotypique est une étape essentielle dans l'étude de la progression tumorale. C'est ce que nous verrons au cours de ce travail de thèse.

## **2. DEMONSTRATION D'UNE SUBORDINATION DE LA MORPHOGENESE ET DE LA DIFFERENCIATION TUMORALES À DES MÉCANISMES SPÉCIFIQUES**

---

### **2.1. Introduction**

Historiquement, on peut attribuer à Hansemann le mérite d'avoir établi une classification des néoplasies épithéliales en fonction de leur degré de différenciation et d'avoir établi un rapport avec le statut chromosomique des tumeurs. En effet, Hansemann a proposé de classer les carcinomes en fonction de leur ressemblance avec le tissu normal d'origine et a proposé le terme d'anaplasie pour les carcinomes qui n'ont pratiquement plus de rapport morphologique avec le tissu normal (Hansemann *et al.*, 1890 ; Hansemann *et al.*, 1893) Cette dédifférenciation était selon lui en rapport avec l'existence de mitoses asymétriques aboutissant à une distribution anormale du matériel chromosomique. Cette théorie était contemporaine de celle de Boveri qui, le premier, a formulé la proposition selon laquelle les cellules cancéreuses proviendraient d'anomalies chromosomiques (Boveri *et al.*, 1902).

C'est en 1925 que Lockhart-Mummery établit le lien entre « prédisposition héréditaire au cancer colorectal » et la survenue d'une entité morphologique précurseur du cancer qui est l'adénome dans le cadre de polypose. L'histoire s'est largement accélérée depuis les années 1990 jusqu'à aboutir à une « loi » générale de la cancérologie colorectale connue sous le nom de modèle de Vogelstein (Vogelstein *et al.*, 1988). Comme on le verra ci-dessous, ce modèle établit de manière non équivoque une relation de causalité entre une anomalie génétique (décrite comme une délétion de 5q, puis comme une mutation d'un gène *APC*), et la formation de certains adénomes. L'implication d'autres anomalies génétiques dans la formation de lésions pré-néoplasiques a depuis été décrite, montrant que le modèle de Vogelstein ne peut pas être établi comme une loi générale. Quoiqu'il en soit, on pourrait conclure qu'il est tout-à-fait possible d'établir une relation génétique-phénotype bi-univoque. Cependant, une telle conclusion est trompeuse. En effet, on remarque que, quel que soit l'élément génétique initiateur de la morphogenèse des lésions préneoplasiques (mutation *APC* ou perte des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN, il y a introduction d'une instabilité génétique qui crée une diversification des mutations et multiplie donc les possibilités d'adaptation d'une tumeur donnée aux pressions sélectives de son environnement. Cela revient à dire, si on emploie la métaphore du jeu d'échecs, qu'on ne peut pas déduire la fin de la partie de la connaissance des règles du jeu et des tout premiers coups joués par chacun des adversaires, tellement les possibilités d'évolution sont nombreuses. Il est

nécessaire pour pronostiquer la fin de la partie, d'avoir une photographie de l'échiquier à différents temps.

Cette réflexion nous amène à imaginer une stratégie complémentaire de celle de la génétique pour étudier les éléments de la subordination de la morphogenèse tumorale. C'est celle de la modélisation en fonction de la topographie d'expression d'effecteurs «d'intérêt». On entend par « effecteurs » des molécules ou groupements moléculaires qui sont impliqués dans l'adhérence des cellules entre elles, dans l'expression de fonctions différenciées, dans l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire (MEC) et dans la migration cellulaire. Cette approche qui consiste à effectuer une modélisation *in situ* des tumeurs permet de dégager des profils d'expression moléculaire récurrents liés à une étape particulière de la morphogenèse et/ou de la progression tumorale, éventuellement associés avec le pronostic. Chaque approche ayant ses limites, cette modélisation par topographie moléculaire *in situ* ne permet pas à elle seule de distinguer ce qui est en relation avec une subordination génétique, de ce qui répond à un phénomène d'auto-organisation et de ce qui peut être un élément contingent. Il est donc évident, à la lumière des données de cette introduction, que les 2 approches qui sont celles de la génétique avec pour corollaire l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés et celle de la topographie moléculaire, sont parfaitement complémentaires.

## **2.2. Mécanismes génétiques**

### *2.2.1. Le mode classique d'oncogénèse : adénome-cancer et bases génétiques (Vogelstein)*

#### **L'exemple du gène APC dans la subordination de la morphogenèse à la génétique**

Actuellement, le seul exemple de subordination entre génétique et morphogenèse néoplasique dans le côlon respectant les critères de Koch nous est fourni par l'étude de formes familiales de polypose adénomateuse (Polypose Adénomateuse Familiale ou PAF) et de quelques polypes sporadiques (cf tableau I, ci dessous).

C'est en 1721 que Menzel décrit macroscopiquement la première forme de polypes multiples colorectaux (Menzel, 1721). En 1882, Cripps décrit cette polypose colorectale macroscopique chez des jumeaux. Cette présentation familiale fait évoquer un mode de transmission héréditaire (Cripps *et al.*, 1882). Parallèlement, en 1881, Skalifasowski publie la première description microscopique de cette polypose colorectale caractérisée par la présence de multiples adénomes (Skalifasowski *et al.*, 1881). Le mauvais pronostic de ces polyposes familiales est relié à la transformation maligne de ces adénomes

(Port *et al.*, 1896).

Le raisonnement s'affine au fil des années : en 1925, Lockhart-Mummery écrit que le facteur héréditaire n'est pas le cancer mais plutôt les multiples adénomes qui ont tendance à se transformer en cancers colorectaux. Ainsi, le concept de séquence adénome – carcinome, c'est à dire, qu'une polypose colorectale prédispose au cancer colorectal, est né. Il sera repris par Dukes qui publiera en 1947 une revue générale avec description détaillée de ces familles avec polypose adénomateuse colorectale et cancer colique. Une cause génétique avec transmission autosomique dominante est suggérée pour ces formes familiales de polypose adénomateuse (Polypose Adénomateuse Familiale ou PAF) (Dukes, 1947). Ces découvertes sont fondamentales dans la mesure où elles montrent que dans les cas de PAF, il existe une base génétique à l'initiation de certains CCR et au passage d'une lésion bénigne adénomateuse à une lésion maligne, le CCR.

Herrera décrit par des techniques de cytogénétique une délétion germinale du chromosome 5 (5q15-q22) chez un patient atteint de PAF et présentant des difficultés d'apprentissage, des traits dysmorphiques (Herrera *et al.*, 1986). A partir de cette observation, Bodmer *et al.* (1987) démontrent un lien entre PAF et la délétion chromosomique 5q.

C'est en 1988 que l'équipe de Vogelstein montre pour la première fois, à partir d'une large série d'adénomes et cancers colorectaux sporadiques, que la délétion chromosomique 5q est une anomalie récurrente observée dans les adénomes sporadiques (quel que soit leur stade) et dans les carcinomes (Vogelstein *et al.*, 1988). La découverte de cette anomalie récurrente établit un lien entre la carcinogenèse familiale et la carcinogenèse sporadique. Elle porte en germe l'idée d'une subordination de la séquence adénome–cancer par l'anomalie 5q.

Auteurs	Année	Découverte
Mensel <i>et al.</i>	1721	Première description macroscopique de polypes multiples colorectaux
Cripps <i>et al.</i>	1882	Description de cette polypose macroscopique chez des jumeaux (polypose familiale)
Skalifasovsky <i>et al.</i>	1881	Première description microscopique de cette polypose familiale caractérisée par des adénomes
Port <i>et al.</i>	1896	Transformation maligne des adénomes
Lockhart-Mummary <i>et al.</i>	1925	Naissance du concept d'une séquence adénome-cancer
Dukes	1947	Description détaillée de familles avec polypose adénomateuse familiale (PAF) associée à un cancer colique. Evocation d'une transmission autosomique dominante
Herrera <i>et al.</i>	1986	Description d'une délétion germinale du chromosome 5 (5q) chez un patient avec PAF
Bodmer <i>et al.</i>	1987	Confirmation du lien entre délétion 5q et PAF
Vogelstein <i>et al.</i>	1988	Mise en évidence d'une délétion 5q dans une large série d'adénomes et de cancers sporadiques
Kinzler <i>et al.</i>	1991	Identification du gène <i>APC</i>
Spirio <i>et al.</i>	1993	Première description d'une corrélation phénotype-génotype dans des PAF : PAF atténuée et mutation <i>APC</i> .
Lamlum <i>et al.</i>	1999	Description d'une corrélation phénotype-génotype dans des PAF. Mutations dans MCR (mutation cluster region).

**Tableau I : Histoire des polyposes adénomateuses familiales (PAF).** Tableau modifié d'après Frayling, 2005.

Cela suggère qu'il existerait un gène suppresseur de tumeur dans l'initiation des adénomes et la progression adénome-cancer. Ce gène étant identifié par Groden et Kinzler en 1991 comme le gène *APC* (adenomatous polyposis coli) (Groden *et al.*, 1991 ; Kinzler *et al.*, 1991). Par la suite, l'identification de mutations germinales sur l'un des allèles (mutations ponctuelles de type mutation non sens du gène *APC*) ou de délétions/insertions décalant le cadre de lecture a permis de montrer que ces anomalies étaient associées à la formation d'une protéine tronquée, non fonctionnelle (Miyaki *et al.*, 1994).

Des études plus fines ont montré une corrélation génotype-phénotype (Lamlum *et al.*, 1999). Ainsi, la recherche entre la position de la mutation et la sévérité de la polypose a montré que le meilleur avantage sélectif de la cellule tumorale est conféré par une mutation dans une région appelée MCR (mutation cluster region)

cluster region). Ainsi, les familles qui ont une mutation germinale dans cette région, ont le plus grand nombre d'adénomes car la seconde mutation qui elle est somatique peut prendre n'importe quelle forme y compris la perte d'hétérozygotie. Toutefois, tous ces travaux, s'ils montrent que le gène *APC* est bien associé aux formes familiales et sporadiques de la séquence adénome-cancer selon un modèle de gènes suppresseurs de tumeurs, n'apportent pas la preuve de son effet causal.

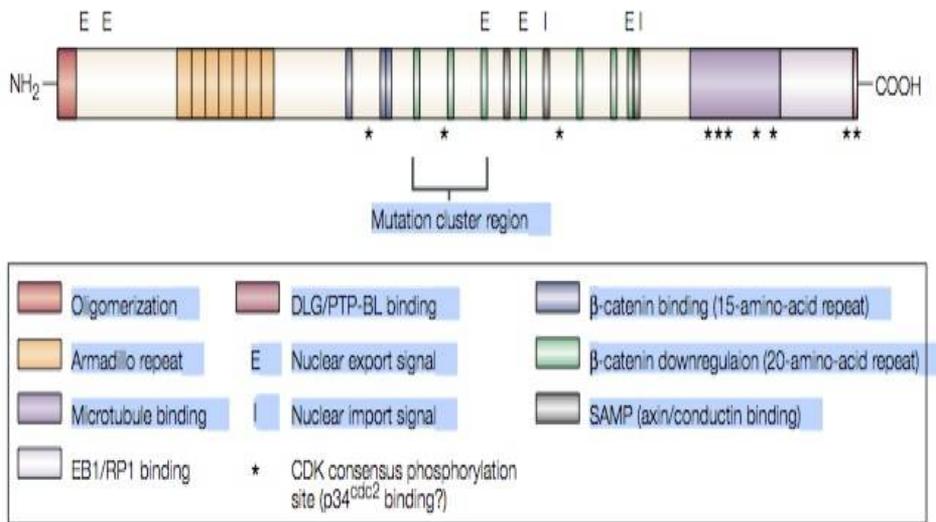
Cette preuve doit suivre les critères de Koch c'est à dire qu'une invalidation du gène *APC* chez l'animal aboutit à l'initiation d'adénomes et éventuellement à la séquence adénome-carcinome. Cette preuve a été apportée par une lignée de souris mutante établie à partir d'une souris mâle traitée par éthylnitrosourée (Moser *et al.*, 1990). Cet animal a été à la base d'une lignée caractérisée par de multiples néoplasies intestinales (Multiple intestinal neoplasia ou Min). Le phénotype Min est associé à une transmission autosomique dominante.

Les lésions intestinales de la souris *Apc*<sup>Min/+</sup> se décrivent comme ci-dessous. Cent quatre souris hétérozygotes *Apc*<sup>Min/+</sup> issues du 4ème au 8ème croisement sont analysées. Chaque souris développe en général cinq tumeurs du côlon et une trentaine de tumeurs du grêle (localisation préférentielle au niveau du duodénum et de l'iléon proximal). La taille de ces tumeurs est comprise entre 1 et 8 mm. L'analyse histologique de ces tumeurs montre que ce sont des adénomes polypoïdes, vilieux ou sessiles. Il n'y a pas de cryptes aberrantes. Les lésions dysplasiques ne sont pas observées à la surface de l'adénome. Très focalement, des lésions de carcinome *in situ* peuvent être observées. Chez les animaux plus âgés, des tumeurs focalement invasives peuvent être observées mais aucune tumeur métastatique n'est diagnostiquée lors de l'autopsie de l'animal. La survie moyenne est estimée à 119 +/- 7 jours. Le dépistage de ces animaux atteints de polypose est facilité par la mise en évidence d'une anémie.

C'est en 1992 dans un travail publié dans Nature que Su montre que le locus génétique Min est l'homologue murin du gène *APC* humain et la comparaison des séquences entre le gène *APC* murin des souris normales et celui des souris atteintes du phénotype Min identifiait une mutation non sens de ce gène qui co-ségrégait avec le phénotype Min. Cette mutation était tout à fait analogue à celles trouvées dans les familles de PAF ainsi que dans les adénomes et carcinomes sporadiques (Su *et al.*, 1992). Ainsi, ce travail de 1992 finalisait donc les critères de Koch en définissant définitivement un lien de causalité entre une mutation du gène *APC* et l'apparition d'adénomes.

### **Description du gène *APC* et de ses fonctions**

Ce gène code pour une protéine de 312 kDa, constituée de 2843 acides aminés.



**Figure 2 : Schéma illustrant les différents domaines de la protéine APC chez l'homme. D'après Fodde *et al.*, 2001**

Elle est organisée en 4 domaines : un domaine aminoterminal qui permet son oligomérisation, un domaine qui renferme des motifs armadillo (motifs trouvés dans la protéine armadillo de la drosophile, homologue de la β-caténine chez les vertébrés), une région centrale constituée de séquences répétées de 15 et 20 acides aminés, site de liaison à la β-caténine et de dégradation de cette protéine, et de sites de liaison à l'axine, et une partie carboxyterminale (Figure 2).

La protéine APC est observée au niveau nucléaire et cytoplasmique (Neufeld *et White*, 1997).

Les altérations génétiques, observées essentiellement dans la région MCR, génèrent l'expression d'une protéine tronquée, non fonctionnelle, généralement amputée de tous les sites de fixation à l'axine, et de la majorité de ses sites de fixation à la β-caténine (Miyoshi *et al.*, 1992 ; Miyaki *et al.*, 1994).

## Fonctions du gène *APC*

### *Gène APC et prolifération cellulaire*

La protéine APC a de multiples fonctions (voir revue générale de Fearnhead *et al.*, 2001). Dans la voie

Wnt, APC participe au mécanisme fondamental de régulation des différents niveaux de  $\beta$ -caténine cellulaire en la séquestrant, l'empêchant d'exercer son activité transcriptionnelle nucléaire (Rubinfeld *et al.*, 1997). En effet, APC est un composant d'un complexe multiprotéinique centré par l'Axine 1, où il est lié à la  $\beta$ -caténine, la glycogène synthétase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), la caséine kinase Ia (CK Ia), et la protéine phosphatase 2A (PP2A) via son domaine Armadillo (54 T) (voir Figure 16 p.90). Ce complexe est stabilisé par la phosphorylation de l'APC et de l'Axine ; à l'intérieur de ce complexe, la GSK3 $\beta$  fonctionne en phosphorylant l'extrémité N-terminale de la  $\beta$ -caténine (dont elle reconnaît un motif situé entre les acides aminés 33 et 45). Une fois phosphorylée, suivant un ordre séquentiel bien défini, la  $\beta$ -caténine est reconnue par le  $\beta$ TrCP pour être ubiquitinée. La dégradation par ubiquitinylation de la  $\beta$ -caténine a pour fonction la régulation du niveau cellulaire de la protéine. Lorsque du fait de mutations, APC perd son site de liaison à l'axine, la protéine tronquée qui en résulte, va avoir pour conséquence l'altération du complexe multiprotéinique de liaison, et ceci aboutira à la perte de la fonction de régulation de la  $\beta$ -caténine et donc à une accumulation cytoplasmique et nucléaire de la  $\beta$ -caténine. Sa translocation nucléaire lui permettra d'exercer son activité transcriptionnelle. En effet, au sein du noyau, la  $\beta$ -caténine s'associe aux membres de la famille du «T cell factor» (TCF) et de la famille du «lymphoid enhancer factor». Parmi les gènes cibles, les gènes *c-myc* et la *cycline D1*, sont deux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (He *et al.*, 1998; Tetsu *et McCormick*, 1999).

Dans l'épithélium intestinal normal, le marquage cytoplasmique d'APC est très important dans les cellules post-répliquatives de la portion supérieure des cryptes, tandis qu'il est pratiquement absent de la région où les cellules se divisent activement (Smith *et al.*, 1993). A l'inverse, il existe un gradient d'expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine, élevé dans le compartiment prolifératif et très abaissé dans les 2/3 supérieurs des cryptes. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est donc essentiel dans le maintien du compartiment des cellules souches et dans la différenciation intestinale.

### *Gène APC et adhésion cellulaire*

L'APC participe également à l'adhésion cellulaire via son interaction avec la  $\beta$ -caténine (protéine de la famille des caténines), elle même étroitement liée à la E-cadhérine au niveau des jonctions intercellulaires. Son rôle dans l'adhésion cellulaire est démontré par Faux *et al.* (2004). Ils utilisent des cellules issues de la lignée cancéreuse colique humaine, SW480, caractérisées par l'expression d'une protéine APC tronquée (1-1337 AA). Ces cellules présentent des taux élevés de  $\beta$ -caténine intracytoplasmique et une localisation cytoplasmique de la E-cadhérine. La transfection du gène APC sauvage dans ces cellules induit d'une translocation de la  $\beta$ -caténine du noyau et du cytoplasme vers la

membrane et une translocation membranaire de la E-cadhérine avec formation de jonctions adhérentes et renforcement de l'adhésion cellulaire. (Faux *et al.*, 2004).

### *Gène APC et apoptose*

Plusieurs résultats suggèrent qu'APC favorise l'apoptose des cellules qui atteignent le sommet de la crypte. En effet, la ré-expression d'APC dans des cellules tumorales induit l'apoptose de ces cellules (Morin *et al.*, 1996). Son rôle indirect dans l'adhésion cellulaire pourrait générer des stimuli pour l'apoptose.

### *Gène APC et ségrégation des chromosomes*

La protéine APC intervient également dans la ségrégation des chromosomes durant la mitose de part la fixation de son domaine C-terminal aux microtubules *via* la protéine EB1 (Munemitsu *et al.*, 1994). Durant la métaphase, la protéine APC est localisée au niveau du kinétochore des chromosomes. Des cellules souches embryonnaires de souris porteuses de la mutation APC1638T<sup>-/-</sup>, responsable d'une protéine tronquée dépourvue uniquement de son domaine carboxyterminal, sont incapables de séparer correctement leur chromosomes, et l'analyse de leur caryotype après une vingtaine de divisions mitotiques montre une importante aneuploïdie (tétraploïdie) et de nombreuses translocations chromosomiques (Fodde *et al.*, 2001 ; Mogensen *et al.*, 2002). Cette aneuploïdie serait la conséquence de la sortie prématurée de la phase M du cycle cellulaire de cellules présentant des altérations du fuseau mitotique induites par l'inactivation d'APC, suivie d'une réentrée en phase G1 de ces cellules possédant un ADN complet répliqué, au lieu d'une entrée en apoptose (Dikovskaya *et al.*, 2007). Cependant, EB1 ne semble pas avoir un rôle direct dans la tumorigenèse : aucune mutation somatique du gène *EB1* n'a été retrouvée dans les CCR (Jaïs *et al.*, 1998) et les souris transgéniques avec une version d'APC tronquée pour le site de EB1 n'ont pas un risque plus élevé de tumeurs gastrointestinales (Smits *et al.*, 1999).

### **Les limites d'un modèle**

Tous ces travaux examinés dans un contexte de subordination de la morphogenèse tumorale à des événements génétiques posent une question fondamentale : la perte de fonction d'APC est-elle impliquée seulement dans l'étape précoce de l'oncogenèse (formation précoce d'adénome) ou est-elle la force motrice indispensable à tout le processus d'oncogenèse ?

Les travaux récents montrent que la question n'est pas encore résolue. En effet, les premiers travaux décrivant la morphogénèse tumorale chez la souris *Apc*<sup>Min/+</sup> montrent des adénomes restreints à l'intestin grêle sans transformation carcinomateuse (Moser *et al.*, 1990). Il semblerait donc que la mutation du gène *APC* soit peut-être un élément initiateur de la morphogénèse adénomateuse mais que d'autres évènements génétiques soient indispensables pour générer la transition adénome–cancer ; on peut émettre aussi l'hypothèse d'une survie trop courte des souris *Apc*<sup>Min/+</sup> pour permettre le développement des lésions tumorales invasives. C'est cette hypothèse qui a été examinée par Halberg *et al.* (2009) dans un travail très récemment publié : brièvement, ces auteurs ont largement amélioré la survie des souris *Apc*<sup>Min/+</sup> en croisant un male C57BL/6 *Apc*<sup>Min/+</sup> avec une femelle C47BR/*cdcJ* ou avec une femelle SWR/J. Ces hybrides, qui vivaient largement plus d'un an, ont développé quelques tumeurs intestinales dont certaines étaient infiltrantes et qui même dans quelques cas ont métastasé dans les ganglions régionaux. Ces auteurs ont noté aussi que le développement de ces cancers n'était pas associé à des remaniements chromosomiques majeurs et à l'apparition d'une instabilité microsatellitaire. Cependant, ces auteurs ne pouvaient éliminer l'apparition de modifications génétiques ou épigénétiques qui auraient pu passer inaperçues dans l'analyse des lésions. Quoiqu'il en soit, ces auteurs pensent avoir apporté la preuve du concept selon lequel la perte de fonction *APC* est suffisante pour expliquer le développement de la totalité des lésions adénome–cancer.

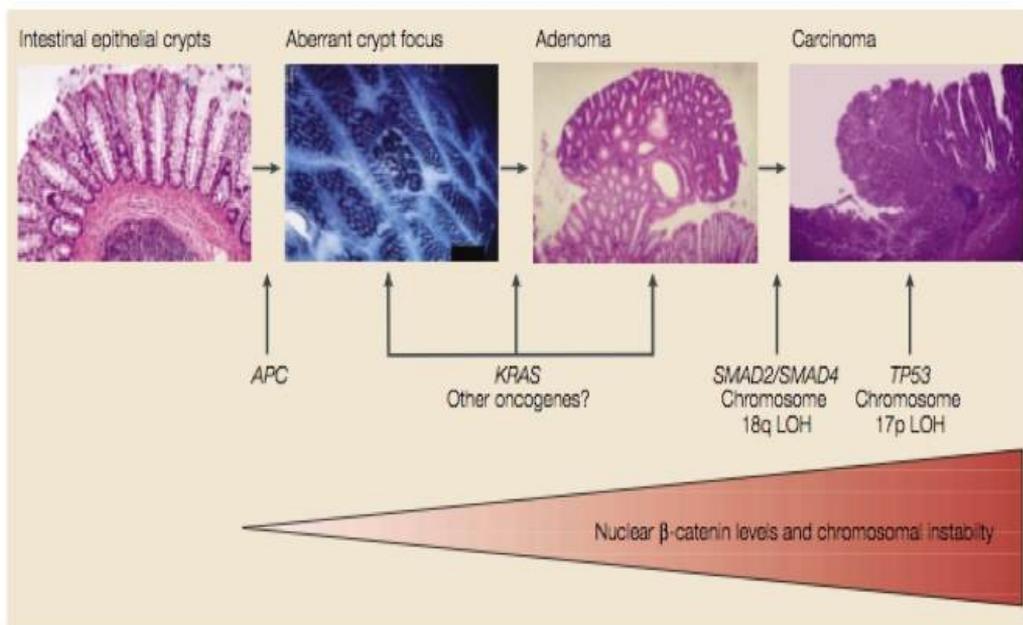
Toutefois ce modèle de carcinogénèse ne s'applique qu'à la subordination des lésions morphologiques aux mutations d'*APC* puisqu'il utilise un modèle restreint qui est celui de la souris *Apc*<sup>Min/+</sup>. Il est bien connu qu'il existe chez l'homme d'autres types de polypose de transmission héréditaire, telles la polypose de type juvénile (mutation germinale de *SMAD4* ou *BMPRIA*), le syndrome de Cowden (mutation germinale de *PTEN*). Ceci était déjà évoqué par Dukes en 1949 sans que la preuve génétique ne soit encore apportée (Van Diest *et al.*, 2000)

### Vers d'autres voies de cancérogenèse colorectale

Dans un travail publié dès 1988, et consacré aux altérations génétiques pendant le développement des tumeurs colorectales, Vogelstein *et al.* mettent l'accent sur l'hétérogénéité génétique associée aux toutes premières lésions adénomateuses. L'analyse a porté sur des adénomes de taille, de morphologie et de dysplasie différentes et de carcinomes issus de patients atteints ou non de PAF. La délétion chromosomique 5q est associée à d'autres délétions alléliques des chromosomes 18q, 17p et une mutation du gène *K-RAS*. En effet, la délétion 5q est observée dans 29% des adénomes en dysplasie moyenne, 30% des adénomes en dysplasie sévère. La délétion 18q est retrouvée dans 13% des adénomes en dysplasie légère, 11% des adénomes en dysplasie moyenne, 47% des adénomes en

dysplasie sévère. La délétion 17p est mise en évidence dans 6% des adénomes en dysplasie légère, 6% des adénomes en dysplasie moyenne, 17% des adénomes en dysplasie de haut grade. La mutation de *K-RAS* est observée dans 9% des adénomes de moins de 1 cm, dans 58% des adénomes de plus de 1 cm et 47% des CCR.

Dans cet article de référence, Vogelstein a rapporté des fréquences de délétions du chromosome 5q dans 58% des CCR, des mutations de *K-RAS* dans 47% des cancers, des délétions chromosomiques 18q dans 73% des cancers et des délétions 17p dans 60% des CCR. Ces anomalies génétiques chromosomiques étaient associées de façon variable entre elles et la délétion 5q n'était pas forcément associée aux autres anomalies chromosomiques. Dans la discussion de cet article, Vogelstein suggérait différentes voies de carcinogenèse colique.



**Figure 3 : Modèle de carcinogenèse colorectale sporadique avec acquisition successive d'anomalies génétiques associant l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur et l'activation de proto-oncogènes. D'après Fodde et al, 2001.**

La généralisation qui a été faite par la suite du schéma d'oncogenèse, issu de la souris *Apc<sup>Min/+</sup>*, caractérisé par des altérations génétiques successives (Figure 3), a probablement introduit une ambiguïté fondamentale dans la mesure où il efface l'hétérogénéité des voies d'oncogenèse colorectale.

Un travail récent, mené par Samowitz *et al.* (2007), étudie la fréquence respective des mutations *APC* (localisées dans la région MCR (Mutation cluster région) ou en dehors de cette région), des mutations *V600E B-RAF*, de *K-RAS*, de *p53*, le statut MSS/MSI et le phénotype CIMP dans une série de 90 CCR. Les mutations d'*APC* [(MCR (60%) ; non MCR (40%)] surviennent dans 60% des tumeurs. Elles sont inversement corrélées aux mutations de *B-RAF* ( $p=0.0003$ ) et au phénotype méthylé ( $p=0.02$ ), et directement corrélées aux mutations de *p53* et *K-RAS* ( $p=0.04$ ). Les mutations *APC*, qui peuvent survenir dans les tumeurs MSI, sont plus volontiers des mutations décalant le cadre de lecture situées dans de courtes répétitions de nucléotides. De plus, la survenue concomitante de mutations d'*APC*, de *K-RAS* et de *p53* est peu fréquente, observée simplement dans 11% des tumeurs. Cet article démontre l'hétérogénéité des voies d'oncogenèse colorectale qui peuvent être indépendantes de la voie APC. Le modèle de Vogelstein, caractérisé par l'association d'anomalies de la voie APC, de mutations de *K-RAS* et *p53*, apparaît très réducteur, ne pouvant s'appliquer qu'à une faible proportion de CCR. (Samowitz *et al.*, 2007).

Si des cancers coliques humains n'ont pas de mutation *APC*, existe-t-il des modèles animaux d'oncogenèse colorectale sans mutation d'*APC* ? La preuve est apportée par l'article de Trobridge *et al.* (2009) qui montre la survenue de tumeurs intestinales et de métastases chez des souris avec une mutation de *K-RAS* et une inactivation de *TGF $\beta$ 2* sans anomalie de la  $\beta$ -caténine. De façon intéressante, les tumeurs intestinales décrites présentent une différenciation mucoïde avec des aspects d'adénocarcinomes mucineux ou de cellules en bagues à chaton. Ce dernier exemple illustre la subordination possible de certaines tumeurs coliques à la génétique avec des voies d'oncogenèse indépendantes de la voie APC (Trobridge *et al.*, 2009).

En conclusion, les études de génétique les plus récentes ont été poussées jusqu'au séquençage complet du génome tumoral effectué dans le cadre de CCR humains. Ces études génétiques ont permis d'identifier des centaines de mutations qu'il est difficile de hiérarchiser en terme de progression tumorale (Sjoblom *et al.*, 2006 ; Wood *et al.*, 2007 ; Toyota *et al.*, 2008). Il est aussi difficile d'imaginer qu'il sera possible dans l'avenir de reconstituer la progression tumorale en effectuant toutes les combinaisons possibles de souris invalidées ou de souris transgéniques avec les gènes candidats identifiés sur la base de l'analyse génétique globale. C'est pourquoi il est important de déterminer une troisième approche dans la hiérarchisation des anomalies génétiques impliquées dans la compréhension de la progression des tumeurs. Cette approche fait appel à l'identification des systèmes de signalisation et des effecteurs moléculaires associés soit à un type tumoral donné, soit à un élément de la progression, et qui vont permettre une signature génétique particulière.

### 2.2.2. *Le syndrome des cancers colorectaux héréditaires sans polypose (syndrome de Lynch) et la voie d'instabilité microsatellitaire (MSI)*

Parallèlement à cette séquence génétique adénome-carcinome selon la voie APC classique, d'autres voies de carcinogenèse colique ont été décrites grâce à une démarche identique : mise en évidence d'une histoire familiale, puis secondairement décryptage morphologique et génétique.

Contrairement à la voie APC classique, l'histoire de ces voies est plus récente et encore très incomplète. Nous décrirons le syndrome de Lynch et la voie d'instabilité microsatellitaire.

En 1913, Warthin publie une grande famille présentant de nombreux cas de cancers colorectaux sans polypose, appelée «famille G» ayant la particularité supplémentaire d'être accompagnés parfois de cancers gastriques ou utérins (Warthin *et al.*, 1913). En 1966, Lynch et al. publient deux autres familles du Middle-West, les «familles N et M» présentant les mêmes caractéristiques que celles de la « famille G » (Lynch *et al.*, 1966). L'étude de ces familles permet d'isoler les caractéristiques du syndrome de Lynch ou syndrome des cancers colorectaux héréditaires sans polypose (acronyme HNPCC pour «Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer»), qui a été ainsi dénommé par opposition à la polypose adénomateuse familiale. Dans les HNPCC, les CCR naissent de rares polypes isolés, adénomateux conventionnels, festonnés ou mixtes. Lynch a défini son syndrome à partir des critères suivants :

- Transmission autosomique dominante
- Survenue plus précoce des CCR : 45 ans en moyenne contre 69 ans pour la population générale
- Atteinte prédominante du côlon droit (70% des tumeurs)
- Histoire familiale de cancer colorectal et/ ou de cancer endométrial
- Risque élevé de cancer endométrial, urétéral et rénal, intestinal, gastrique, et de tumeur cérébrale...
- Développement de multiples cancers chez des sujets jeunes
- Caractéristiques des adénomes colorectaux : > 1cm, prédominance côlon droit, carcinogenèse accélérée (2-3 ans dans le syndrome de Lynch vs 8-10 ans dans la population générale) responsable de l'apparition de carcinome dit «d'intervalle».
- Caractéristiques des CCR : tumeurs peu différenciées, avec une composante mucineuse ou en bague à chaton plus fréquente, une stroma-réaction de type Crohn, et un taux plus élevé de lymphocytes intra-épithéliaux.

En 1991, une réunion de consensus international a établi les critères diagnostiques des HNPCC chez les patients ayant une histoire familiale de cancer colorectal. Ces critères dit «d'Amstersdam I» (AC I)

(Vasen *et al.*, 1991) ont été secondairement étendus aux patients ayant une histoire familiale comportant des tumeurs extra-coliques, définissant les critères dits «d'Amsterdam II» (AC II) (Vasen *et al.*, 1999). Les malades «*propositus*» doivent présenter les critères suivants :

- Au moins 3 sujets de la famille du patient ont été atteints des cancers suivants décrits dans les HNPCC (côlon, rectum, endomètre, intestin grêle, voies urinaires) prouvés histologiquement. Au moins un des sujets atteint est parent au premier degré des deux autres
- Ces cas doivent appartenir à au moins 2 générations successives
- Au moins un des cas a été diagnostiqué avant l'âge de 50 ans
- Il ne s'agit pas de polypose adénomateuse familiale

Le premier lien entre le syndrome clinico-pathologique de Lynch et la génétique est apporté par Peltomäki *et al.* (1993). Ces auteurs ont identifié un locus de sensibilité au cancer sur le chromosome 2p dans des familles informatives (Peltomäki *et al.*, 1993). Peu après, un second locus a été identifié sur le chromosome 3p (Lindblom *et al.*, 1993).

Parallèlement, Ionov *et al.* en 1993, ont mis en évidence des micro-délétions somatiques étendues au niveau de répétitions de séquences identiques de nucléotides dans 12% des cancers colorectaux sporadiques inclus dans leur étude. Ce profil particulier était associé à des caractéristiques cliniques et génotypiques : 68% de ces cancers étaient localisés dans le cæcum ou le côlon droit, 86% étaient peu différenciés et ils n'étaient presque jamais associés à une mutation de *P53* ou de *K-RAS* (Ionov *et al.*, 1993). Ce profil génétique était de plus inversement corrélé avec la présence de métastases. Ionov *et al.* (1993) proposaient que ces micro-délétions résultaient d'anomalies de gènes impliqués dans la fidélité des réparations de ces séquences répétées d'où la dénomination de RER (Replication ERor). Cette mutation affecterait un gène de surveillance du génome, indépendante des fonctions de p53. Le cas d'un des patients atteints de plusieurs tumeurs synchrones portant les mêmes micro-délétions a suggéré l'existence d'une transmission potentiellement héréditaire du gène mutateur initiateur.

Aaltonen *et al.* (1993) ont montré la présence du phénotype RER+ («Replication ERor») dans des tumeurs survenant dans un contexte familial d'HNPCC mais aussi dans des tumeurs sporadiques. Ce profil RER+ était souvent observé dans des tumeurs diploïdes localisées dans le côlon droit.

La même année, Thibodeau *et al.* (1993) décrivaient des tumeurs (25/90) caractérisées par une instabilité des séquences répétées de l'ADN d'un ou plusieurs loci, à l'aide de 4 marqueurs microsatellites ciblant les chromosomes 5q, 17p, 18q et 15q. L'instabilité microsatellitaire était définie dans ce travail par l'apparition d'anomalies (gain ou perte de nucléotides) au niveau de courtes séquences répétées de quelques nucléotides situées le plus souvent dans des régions introniques non codantes du génome appelées «séquences microsatellites», dont le nombre est compris entre 50000 et

100000 dans le génome humain. Une nouvelle voie de carcinogenèse colique était ainsi définie, la voie d'instabilité microsatellitaire ou voie MSI (Microsatellite Instability). Les cancers associés à cette voie étaient plus volontiers localisés à droite et avaient un pronostic plus favorable (Thibodeau *et al.*, 1993). La compréhension que le génotype MSI était la conséquence d'une erreur de réparation au cours de la réplication de l'ADN a contribué à identifier 2 gènes impliqués dans l'HNPCC, localisés sur les chromosomes 2p et 3p, dénommés *MSH2* et *MLH1*. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans le dépistage et la réparation des mésappariements de l'ADN (MMR MisMatch Repair) (Fishel *et al.*, 1993 ; Leach *et al.*, 1993 ; Bronner *et al.*, 1994).

L'identification initiale des mutations germinales de *MLH1* et *MSH2* a été suivie de la découverte d'autres gènes codant pour des protéines impliquées dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN ou complexe MMR. Ces gènes sont outre *MLH1* et *MSH2*, *MSH6* et *PMS2* et possiblement *MLH3*.

*Existe-il des modèles animaux permettant de décrypter la voie MSI, à l'image de la souris  $Apc^{Min/+}$  pour la voie APC ?*

Les auteurs ayant tenté de répondre à cette question ont produit des modèles de souris invalidées pour les gènes impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN. Nous décrivons brièvement les conséquences de ces invalidations.

Les *souris invalidées pour MLH1* (*Mlh1*<sup>-/-</sup>) développent des tumeurs intestinales. La plupart des lésions surviennent dans le jéjunum et l'iléon et de rares lésions apparaissent dans le côlon. La plupart des souris ne développent que de rares lésions néoplasiques et carcinomes, qui apparaissent entre 4 et 12 mois. Toutefois, elles développent de nombreuses tumeurs extra-digestives (tumeurs cutanées et lymphomes) (Prolla *et al.*, 1998).

Les *souris invalidées pour MSH2* (*Msh2*<sup>-/-</sup>) développent des lymphomes, qui sont des tumeurs létales entre 2 et 6 mois chez 50% des souris. Chez les souris qui survivent plus de 6 mois, de nombreux adénomes apparaissent dans le duodénum et le jéjunum. Il s'agit d'adénomes plans d'aspect macroscopique différent des adénomes pédiculés typiques de l'oncogenèse APC des souris *Apc<sup>Min/+</sup>*. Cette observation est importante puisqu'elle montre expérimentalement la subordination de la morphogenèse à la génétique moléculaire. Ces adénomes sont caractérisés par un infiltrat inflammatoire important qui les distingue des autres modèles murins d'invalidation des gènes MMR. De plus, des foyers de cryptes aberrantes sont détectés dans le côlon des souris invalidées *Msh2*<sup>-/-</sup> (Reitmair *et al.*, 1996).

Les *souris invalidées pour MSH3* (*Msh3*<sup>-/-</sup>) ont une espérance de vie similaire aux souris contrôles. Des tumeurs à type adénome ou adénocarcinome surviennent chez seulement 10% de ces souris. Les

lésions polypeuses coliques ont des caractéristiques morphologiques particulières car elles sont souvent « de bas grade », faites de cryptes profondes, ectasiques, bordées de cellules caliciformes (Edelmann *et al.*, 2000)

Les souris invalidées pour *MSH6* (*Msh 6 -/-*) ont une espérance de vie de 11 mois. Trente-huit pour cent des souris développent des tumeurs du duodénum et du jéjunum. Le plus souvent, il s'agit d'adénocarcinomes. Les tumeurs présentent des différences phénotypiques selon le fond génétique des souris (Edelmann *et al.*, 1997).

Afin de rechercher un éventuel caractère redondant de ces gènes de prédisposition, des souris doubles mutantes ont été générées (*Msh 6 -/- x Msh3 -/-*) (Edelmann *et al.*, 2000). Le résultat a été l'augmentation de la proportion de souris atteintes ainsi que l'augmentation du nombre de tumeurs apparaissant dans chaque souris. La proportion adénome-carcinome restait cependant identique. Cette étude suggère le rôle protecteur du gène *MSH3* vis-à-vis des néoplasies dans un fond génétique invalidé pour *MSH6*.

### **Existe-t-il une signature histopathologique subordonnée à la génétique des cancers colorectaux MSI sporadiques ?**

Ces modèles sont surtout explicatifs des modifications germinales liées aux gènes de réparation de l'ADN dans les CCR et s'appliquent uniquement au syndrome de Lynch. Toutefois, 13 à 15% des cancers associés au phénotype MSI sont sporadiques et sont expliqués par des mécanismes différents d'inactivation des gènes de réparation de l'ADN. Dans les CCR sporadiques, il a été montré que le mécanisme épigénétique de mise sous silence par hyperméthylation des îlots CpG du promoteur du gène de réparation *hMLH1* était souvent en cause (Veigl *et al.*, 1998 ; Herman *et al.*, 1998).

De plus, 30 à 40 % des CCR sporadiques associés à une instabilité microsatellitaire présentent une mutation activatrice du gène *B-RAF* (Rajagopalan *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2003). L'utilisation de lignées de cellules humaines RKO et CO115, lignées issues de cancers colorectaux instables pour les microsatellites par hyperméthylation du promoteur de *hMLH1* avec une mutation de *B-RAF* V600E, a contribué à montrer le rôle important de *B-RAF* dans la carcinogenèse. Preto *et al.* (2008) ont en effet montré que dans ces lignées, l'inhibition par siRNA de *B-RAF* muté bloquait la prolifération cellulaire, associée à une inhibition de l'activation de ERK, une diminution de l'expression de cycline D1 et une augmentation de l'expression de p27. Cette inhibition de *B-RAF* muté induirait l'apoptose cellulaire via une diminution d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Preto *et al.*, 2008).

En pratique, le diagnostic des CCR de type MSI est important pour identifier les patients atteints d'HNPCC et la prise en charge des familles potentiellement à risque de cancers.

*Existe-t-il des critères morphologiques qui permettent au pathologiste de suspecter le caractère instable pour les microsatellites (MSI) des tumeurs colorectales ?*

Alexander *et al.* ont déterminé des critères discriminants en étudiant de nombreux critères morphologiques de 323 CCR sporadiques de statut MSS/MSI bien documenté. Certaines caractéristiques tumorales étaient souvent associées au phénotype RER ou MSI tels que la présence d'une composante carcinomateuse mucineuse, en bague à chaton, peu différenciée ou médullaire, une architecture «sponge – like», l'invasion de type expansif et un micro-environnement tumoral riche en lymphocytes (réaction inflammatoire péri-tumorale de type Crohn et infiltrat lymphoïde intra-tumoral). Les trois paramètres les plus discriminants des tumeurs MSI étaient le type médullaire, le type peu différencié et la présence d'une lymphocytose intra-épithéliale intra-tumorale. La présence d'une composante carcinomateuse mucineuse ou en bague à chaton est aussi un critère assez spécifique (95%) mais peu sensible (15%) (Alexander *et al.*, 2001).

Ainsi, en se basant sur des critères morphologiques, le pathologiste peut suspecter le génotype MSI d'une tumeur. Ces critères morphologiques de la tumeur ont donc été intégrés dans les **recommandations de Béthesda**. Ces recommandations ont été émises pour sélectionner les patients atteints de CCR nécessitant la recherche d'une instabilité microsatellitaire mais, avec comme but ultime, de pouvoir identifier les patients porteurs d'un cancer familial type HNPCC et de leur proposer un conseil génétique (Umar *et al.*, 2004).

Dans les **recommandation de Béthesda**, les malades concernés présentent l'un des critères suivants :

- Cancer colorectal diagnostiqué avant 50 ans
- Second cancer colorectal synchrone ou métachrone ou autre tumeur du spectre HNPCC élargi (endomètre, intestin grêle, voies urinaires, estomac, ovaires, pancréas, voies biliaires, cerveau en particulier glioblastome dans le cadre du syndrome de Turcot, adénome des glandes sébacées et kératoacanthome dans le cadre du syndrome de Muir-Torre)
- Cancer ayant des caractéristiques anatomo-pathologiques évocatrices d'un phénotype instable pour les microsatellites (MSI), diagnostiqué avant l'âge de 60 ans. Ces critères phénotypiques sont les suivants : lymphocytes infiltrants la tumeur ou TIL, stroma-réaction de type Crohn, carcinome à cellules indépendantes en bague à chaton, carcinome médullaire
- Cancer colorectal avec au moins un parent de premier degré présentant une tumeur du spectre HNPCC diagnostiquée avant l'âge de 50 ans
- Cancer colorectal avec au moins deux parents au premier ou au deuxième degré présentant une tumeur du spectre HNPCC indépendamment de l'âge de survenue

### 2.2.3. La voie festonnée et l'instabilité microsatellitaire

Avant 1996, la majorité des polypes colorectaux étaient divisés en 2 groupes : les adénomes et les polypes hyperplasiques (PH). Les adénomes de type conventionnel (AdC), caractérisés par une prolifération des glandes de Lieberkühn (plus ou moins bien différenciées), sont également divisés en sous-groupes différents en fonction de la composante vilieuse. Ces lésions, notamment celles avec un contingent vilieux, étaient considérées de manière consensuelle comme des lésions précurseurs des CCR. Les polypes hyperplasiques (PH) se présentent avec des glandes plus tortueuses (ou festonnées), des cellules et des calices de hauteur irrégulière, un chorion plus abondant avec souvent un épaissement de la membrane basale. Lane *et al.* pensaient en 1971 que le polype hyperplasique n'était pas tumoral. Ils n'avaient en effet jamais retrouvé d'intermédiaires entre polypes hyperplasiques et cancers (Lane *et al.*, 1971).

Cependant, cette dichotomie n'apparaît pas aussi simple. En 1984, Urbanski *et al.* décrivaient pour la première fois un «**polype mixte hyperplasique et adénomateux**». Il s'agit de polypes faits d'une composante adénomateuse dysplasique «greffée» sur l'architecture festonnée caractéristique des polypes hyperplasiques (Urbanski *et al.*, 1984).

C'est en 1990 que Longacre et Fénoglio-Preiser ont décrit une série de « polypes mixtes hyperplasiques et adénomateux ». Ils les comparaient à des lésions témoins de type adénome tubuleux conventionnels, des PH et des polypes hyperplasiques / polypes adénomateux au sein desquels les deux composantes, polype hyperplasique et adénome conventionnel, sont nettement individualisées. Ces auteurs ont proposé de nommer les « polypes mixtes hyperplasiques et adénomateux » «adénome festonné» car certains d'entre eux étaient associés à des adénocarcinomes infiltrants, afin de les distinguer des polypes hyperplasiques et des adénomes conventionnels (Longacre *et Fenoglio-Preiser*, 1990). Ensuite, plusieurs observations ont rapporté l'existence de «polypes hyperplasiques», le plus souvent de grande taille et situés dans le côlon droit, contigus à d'authentiques adénocarcinomes (Warner *et al.*, 1994). Enfin, en 1996, Torlakovic *et Snover* ont analysé rétrospectivement les polypes de 6 patients atteints de «polypose hyperplasique» associée dans 4 cas à un adénocarcinome colique. Dans cette étude, ils rapportaient que de nombreux polypes des polyposes hyperplasiques étaient en fait des adénomes festonnés et proposaient de renommer cette entité « polypose adénomateuse festonnée ». Le lien entre polypes festonnés et adénocarcinome colique semblait définitivement établi et certains évoquaient l'existence d'«une voie festonnée de carcinogenèse colique» (Jass *et al.*, 1999)

En 2003, Torlakovic *et al.* ont analysé rétrospectivement, selon une méthode statistique de regroupement et discrimination, 289 polypes festonnés sporadiques et ont proposé de les distinguer en fonction de la répllication normale ou anormale des cellules épithéliales des cryptes des polypes

festonnés : 1) **les polypes hyperplasiques** sont ainsi caractérisés par un compartiment de prolifération normal des cryptes, cantonné à la base de la crypte. Trois types de polypes hyperplasiques ont été définis en fonction de leur production de mucus : les polypes hyperplasiques à prédominance de cellules microvésiculaires, les polypes hyperplasiques à prédominance de cellules caliciformes et les polypes hyperplasiques pauvres en mucines; 2) **les adénomes festonnés sessiles ou polypes festonnés sessiles (SSA : Sessile Serrated Adenoma)** caractérisés par une zone de prolifération de distribution anormale, des anomalies de la maturation des cellules sécrétoires et des anomalies architecturales importantes des cryptes (dilatation, horizontalisation et ramification). Ces « adénomes festonnés sessiles » ne présentent pas de lésions cytologiques de dysplasie, le terme d'adénome est défini à partir des seules anomalies architecturales de ce polype. L'existence d'«**adénomes festonnés sessiles avec lésions dysplasiques**» a été décrite par la suite. Ils sont caractérisés par la présence dans un adénome festonné sessile de lésions cytologiques «conventionnelles» de dysplasie, authentifiées par la présence de cellules basophiles au rapport nucléo-cytoplasmique augmenté et une pseudo-stratification nucléaire (Yachida *et al.*, 2009). Le **terme d'adénome festonné traditionnel** (TSA : Traditionnal Serrated Adenoma) est réservé aux lésions **présentant des lésions dysplasiques** : il s'agit de polypes festonnés souvent pédiculés ou filiformes présentant des anomalies architecturales importantes caractérisées par la perte de l'ancrage du fond des cryptes avec la musculaire muqueuse, et des anomalies cytologiques dysplasiques caractérisées par la présence de cellules éosinophiles, aux noyaux de taille variable et pluri-stratification nucléaire (Torlakovic *et al.*, 2003 ; Torlakovic *et al.*, 2008). Certains de ces polypes sont illustrés dans la Figure 4 (page 52).

Dans plusieurs publications, **le potentiel de transformation carcinomateuse des polypes festonnés** est évoqué (Longacre *et Fenoglio-Preiser*, 1990 ; Kudo *et al.*, 2004, Makinen *et al.*, 2001). La description morphologique des polypes festonnés montre qu'il existe probablement différents continuum de progression des polypes festonnés vers le cancer colorectal (Jass *et al.*, 1999, 2000, 2001).

Les études récentes de **biologie moléculaire des polypes festonnés ont apporté des éléments permettant de lier la voie morphologique dite festonnée de carcinogénèse colique à la voie moléculaire d'instabilité microsatellitaire.**

En 2003, Goldstein décrivait l'existence de cancers colorectaux instables pour les microsatellites dans des territoires de résection préalable de polypes festonnés (polype hyperplasique secondairement requalifié en adénome festonné sessile). L'analyse des polypes prélevés dans les pièces de colectomie de patients traités pour cancer colorectal a montré que l'incidence des adénomes festonnés sessiles était

significativement plus grande dans les carcinome MSI que dans les carcinomes MSS (Hawkins *et Ward*, 2001). Dans cette étude était montré que les adénomes festonnés sessiles présentaient les mêmes caractéristiques que les cancers synchrones instables pour les microsatellites à savoir la perte d'expression de *MLHI* par hyperméthylation de son promoteur.

Des études démontrent la présence de **différences moléculaires** entre les lésions d'adénomes festonnés (décrits dans les polyposes festonnées adénomateuses) et les classiques polypes hyperplasiques observés au niveau du côlon gauche.

Plusieurs études ont rapporté que les polypes hyperplasiques à cellules micro-vésiculaires et les adénomes festonnés présentent avec une fréquence plus élevée une méthylation des îlots CpG de l'ADN et une mutation de *B-RAF* que les polypes hyperplasiques à prédominance de cellules caliciformes qui présentent plus fréquemment une mutation de *K-RAS* (Kambara *et al.*, 2004, O'Brien *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2004).

O'Brien *et al.* ont étudié la méthylation de l'ADN extrait de 79 polypes festonnés «hyperplasiques» provenant de patients indemnes de polypose hyperplasique. Ils observaient une association significative entre le phénotype CIMP et la localisation colique proximale et le type histologique des polypes festonnés. En effet, le phénotype CIMP, incluant l'hyperméthylation de *MLHI*, était plus fréquent dans les adénomes festonnés sessiles que dans les polypes hyperplasiques avec cellules caliciformes. La fréquence du phénotype CIMP était intermédiaire dans les polypes hyperplasiques de type microvésiculaire, supérieure à celle des polypes hyperplasiques à cellules caliciformes mais inférieure à celle des adénomes festonnés sessiles. Cette observation a suggéré l'existence d'un *continuum* entre les polypes hyperplasiques microvésiculaires et les adénomes festonnés sessiles, en particulier dans le côlon droit.

L'étude récente de Yachida *et al.* (2009) est intéressante dans la mesure où elle permet peut-être de faire le lien existant entre polype hyperplasique de type microvésiculaire, adénome festonné sessile et cancer colorectal instable pour les microsatellites (MSI). Ces auteurs rapportent l'existence d'une mutation de *B-RAF* dans 50% des polypes hyperplasiques et 100% des adénomes festonnés sessiles. Ils constatent aussi une expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine dans 29% des adénomes festonnés sessiles et 100% des adénomes festonnés sessiles avec dysplasie mais dans aucun polype hyperplasique. L'accumulation de  $\beta$ -caténine n'était pas due d'après les auteurs à une mutation du gène *CTNBI* de la  $\beta$ -caténine. Aucun adénome festonné sessile ou adénome festonné sessile avec dysplasie ne présentait une mutation de *K-RAS*. Les mutations de *K-RAS* étaient observées dans 20% des PH et dans 100% des adénomes festonnés traditionnels. Aucun adénome traditionnel ne présentait de mutation de *B-RAF* et 36% d'entre eux présentaient une expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine (Tableau I). Cette étude apporte

des arguments moléculaires nouveaux justifiant la distinction entre les adénomes festonnés sessiles (mutés pour *B-RAF*) et les adénomes festonnés traditionnels (mutés pour *K-RAS*) et l'existence probable de plusieurs voies festonnées de carcinogenèse colorectale.

Sample	BRAF	KRAS	CTNNB1	β-catenin IHC
<b>Hyperplastic polyps (HP)</b>				
1	V600E	G12D	WT	Normal
2	WT	WT	WT	Normal
3	V600E	WT	WT	Normal
4	WT	WT	WT	Normal
5	WT	WT	WT	Normal
6	V600E	WT	WT	Normal
7	V600E	WT	WT	Normal
8	WT	WT	WT	Normal
9	WT	G12D	WT	Normal
10	V600E	WT	WT	Normal
<b>Sessile serrated adenomas (SSA)</b>				
11	V600E	WT	WT	Normal
12	V600E	WT	WT	Normal
13	V600E	WT	WT	Normal
14	V600E	WT	WT	Normal
15	V600E	WT	WT	Normal
16	V600E	WT	WT	Abnormal 1
17	V600E	WT	WT	Abnormal 1
18	V600E	WT	WT	Abnormal 1
19	V600E	WT	WT	Abnormal 1
<b>Sessile serrated adenomas with dysplasia (SSAD)</b>				
20	V600E	WT	WT	Abnormal 2
21	fail	WT	WT	Abnormal 2
22	V600E	WT	WT	Abnormal 1
23	V600E	WT	WT	Abnormal 2
24	V600E	WT	WT	Abnormal 2
25	V600E	WT	WT	Abnormal 1
26	V600E	WT	WT	Abnormal 1
27	V600E	WT	WT	Abnormal 1
28	V600E	WT	WT	Abnormal 1
29	V600E	WT	WT	Abnormal 1
30	V600E	WT	WT	Abnormal 1
31	V600E	WT	WT	Abnormal 2
32	V600E	WT	WT	Abnormal 2
<b>Traditional serrated adenomas (TSA)</b>				
33	WT	G12V	WT	Abnormal 2
34	WT	G12D	WT	Normal
35	WT	G12D	WT	Abnormal 1
36	WT	G12D	WT	Normal
37	WT	G12D	WT	Normal
38	WT	G12V	WT	Normal
<b>Tubular adenoma (TA)</b>				
39	WT	WT	WT	Abnormal 2
40	WT	WT	WT	Abnormal 2
41	WT	WT	WT	Abnormal 2

**Tableau II : caractéristiques génétiques des polypes festonnés.** D'après Yachida *et al.*, 2009.

En pratique, pour les anatomopathologistes, le diagnostic reproductible de ces polypes festonnés est encore difficile même si les progrès récents de leur décryptage moléculaire rendent leur classification plus compréhensible. Un schéma des différents polypes festonnés vous est proposé (Figure 4). Actuellement, il peut être proposé deux voies de progression des polypes festonnés associés à des anomalies moléculaires distinctes:

- Une première voie, prédominante dans le côlon droit, initiée par des polypes hyperplasiques à prédominance de cellules micro-vésiculaires, évoluant vers des adénomes festonnés sessiles puis des adénomes festonnés sessiles avec dysplasie (dysplasie conventionnelle) se transformant en carcinome colorectal (plutôt de type mucineux). Cette voie serait associée à une accumulation d'anomalie génétique et épigénétique : mutation activatrice de *B-RAF*, activation de la voie Wnt, instabilité microsatellitaire accompagnée d'un phénotype CIMP.
- Une deuxième voie, prédominante dans le côlon gauche, caractérisée par l'apparition d'adénomes festonnés traditionnels évoluant vers des cancers colorectaux (plutôt de type médullaire ou mucineux). Ces lésions seraient associées à la mutation de *K-RAS* et à une activation rare de la voie

Wnt.

### Lésions festonnées non dysplasiques

**Polype Hyperplasique (PH)**  
1962  
Morson



**Polype festonné sessile**  
1996-2003  
Torlakovic *et al.*

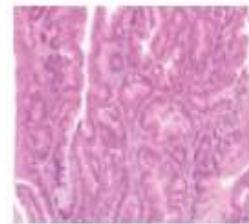


Colon droit, PH Sessile  
Anomalies des cryptes

### Lésions festonnées dysplasiques

**Polype mixte hyperplasique et adénomateux (PMHA)**  
1990  
Longacre Fénoglio Preiser

**Adénome festonné traditionnel (TSA)**  
2003-2008  
Torlakovic *et al.*



Colon gauche  
Cellules éosinophiles  
Cellules dysplasiques

**Adénome festonné sessile avec dysplasie  
SSA-Dysplasique**  
2009-2010  
Yashida *et al.*



#### Figure 4 : Schéma des différents polypes festonnés.

PMHA : Polype mixte hyperplasique et adénomateux ; SSA : adénome festonné sessile ; TSA : adénome festonné traditionnel

#### 2.2.4. Le profil CIMP (CpG Island methylator phenotype) : vers une nouvelle classification des CCR ?

De nombreux travaux montrent abondamment que l'oncogenèse n'est pas seulement affaire de

génomique mais aussi d'épigénomique, c'est à dire de modifications aboutissant à un "reprogrammation" cellulaire hors du champ des modifications structurales du génome. Les modifications épigénétiques sont de nature très diverses, et celles qui nous intéressent ici sont les méthylations des îlots CpG. Ces îlots CpG correspondent à l'association d'un résidu cytosine avec un résidu guanosine pour former des paires di-nucléotidiques. Ces séquences, situées notamment dans les séquences des promoteurs de certains gènes, sont normalement non méthylées (voir revues générales Issa, 2004 et Worthley *et al.*, 2007). Leur méthylation supprime l'expression d'un gène en inhibant de façon directe la fixation des facteurs de transcription, mais aussi en influençant l'acétylation des histones, et donc l'accessibilité du gène à toute la machinerie nécessaire à la transcription. D'une manière générale, les cellules cancéreuses sont caractérisées par une hypométhylation globale. Mais on observe aussi des méthylations d'îlots CpG dans certains cancers. Certaines de ces méthylations sont rencontrées au cours du vieillissement tissulaire normal, alors que d'autres semblent assez spécifiques de certains types tumoraux, au point de faire proposer une véritable "signature oncoépigénomique" caractéristique d'un mode donné d'oncogenèse.

Certains gènes sont plus fréquemment méthylés dans les cancers colorectaux (gènes de type C, « Cancer related », tels que *MLH1* et *p16*). D'autres gènes sont plus souvent méthylés dans la muqueuse colique normale que dans les cancers (gènes de type A, « Age related », tels que *MINT6*, *MINT24*, *MINT32*, *ER*).

En pratique clinique, un premier panel de 5 marqueurs a été proposé pour classer les cancers en cancer «CIMP+ » ou «CIMP-» (CpG Island Methylator phenotype + ou -). Ce panel incluait l'analyse de la méthylation des régions promotrices des gènes *MLH1*, *P16*, *MINT1*, *MINT2* et *MINT31*. Ainsi, plusieurs auteurs ont tenté de classer les CCR selon le profil de méthylation des îlots CpG de l'ADN et d'autres anomalies génétiques : mutations *B-RAF*, *K-RAS* : Les cancers CIMP+ survenaient plus fréquemment chez les femmes âgées qui présentaient des lésions coliques proximales. Les cancers MSI-H partagent ces mêmes caractéristiques et sont généralement de bon pronostic. Mais, on identifie un groupe de tumeurs CIMP+ / non MSI-H avec un mauvais pronostic. Les tumeurs CIMP+ partagent également certaines caractéristiques moléculaires avec les tumeurs MSI-H comme les mutations de *B-RAF*. Cependant, un faible pourcentage de tumeurs CIMP+ présente plutôt une mutation de *K-RAS*. Devant la difficulté d'obtenir une classification reproductible, d'autres panels de marqueurs de méthylation ont été proposés (*CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX2*, *SOCS1*).

Dans ce contexte, Shen *et al.* (2007) démontre que l'on peut classer les CCR selon le profil de méthylation des îlots CpG de l'ADN et d'autres anomalies génétiques : mutations *B-RAF*, *K-RAS*, *p53*. Il définit ainsi 3 grandes classes : La classe «CIMP1» : CIMP+, fréquence élevée de MSI (80%), fréquence élevée de *B-RAF* muté (53%) et peu de mutations de *K-RAS* (16%) et de *p53* (11%) ; la

classe «CIMP2» : CIMP+, fréquence élevée de *K-RAS* muté (92%), avec de rares cas MSI et de rares mutations de *B-RAF* (4%) ou de *p53* (31%) ; la classe «CIMP-» : taux élevé de mutation *p53* (71%), avec des taux bas de MSI (12%), de mutations de *B-RAF* (2%) ou de *K-RAS* (33%) (Shen *et al.*, 2007). Ce travail démontre l'hétérogénéité de l'oncogenèse tumorale. L'impact de cette approche sur une nouvelle classification histopronotique ou une nouvelle voie d'oncogenèse reste encore à définir.

## 2.3. Physiopathologie moléculaire

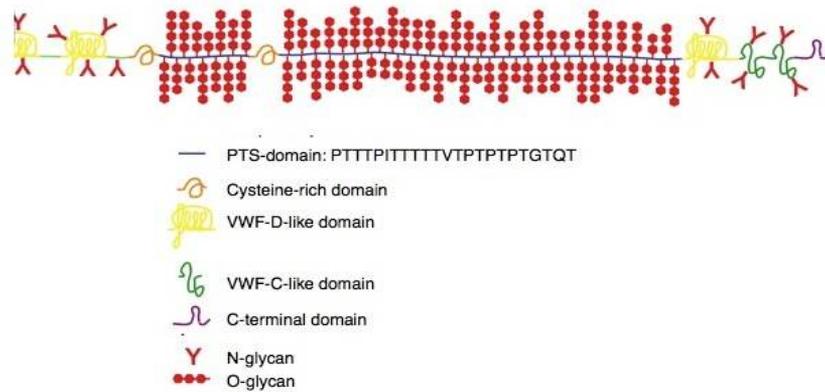
Dans ce chapitre, nous aborderons les **effecteurs moléculaires** dont la cartographie *in situ* est importante pour modéliser la morphogénèse, la différenciation et la progression tumorales. Il est bien évidemment impossible de recenser de manière exhaustive les molécules candidates à ce rôle. Nous citerons ici quelques-uns des effecteurs moléculaires les plus représentatifs, du fait de leur rôle bien établi dans l'adhésion intercellulaire, l'adhésion à la matrice extracellulaire (MEC), le maintien de fonctions différenciées... Puis, nous mentionnerons comment leur étude a influencé nos conceptions de la progression tumorale. Ces effecteurs moléculaires peuvent naturellement être présents dans la tumeur elle-même. C'est pourquoi nous décrirons d'abord les effecteurs appartenant au contingent tumoral. Mais, il faut noter que certains des effecteurs appartenant au contingent stromal peuvent avoir un rôle important dans la morphogénèse lésionnelle, soit par interaction directe de type ligand-récepteur avec les cellules tumorales, soit de manière plus indirecte en exerçant une pression sélective positive ou négative sur le contingent tumoral. C'est pourquoi nous distinguerons deux volets, celui des effecteurs moléculaires du contingent tumoral et celui du contingent stromal.

### 2.3.1. Le contingent tumoral

#### La mucosécrétion

##### *Introduction*

**Les mucines** sont définies biochimiquement comme des glycoprotéines de structure filamenteuse de masse moléculaire élevée, porteuses de milliers de chaînes O-glycanniques (représentant 60 à 80 % du poids sec de la molécule) et capables de former un réseau macromoléculaire par homo-oligomérisation via l'établissement de ponts disulfures (revue générale Porchet *et* Aubert, 2004).



**Figure 5 : Exemple de structure d'une mucine sécrétoire, MUC2.** Schéma modifié d'après Dekker et al., 2002.

Elles sont constituées d'un squelette peptidique (l'apomucine, codée par un gène MUC) dont la région centrale, constituée de séquences d'acides aminés répétés en tandem, est riche en résidus de proline, sérine et thréonine sur lesquels se greffent les chaînes O-glycanniques débutant par un résidu N-acétyl galactosamine (GalNac). Il s'agit de motifs différents des chaînes N-Glycanniques qui elles débutent par un résidu N-acétyl glucosamine, greffé sur un résidu asparagine situé aux extrémités N-terminale (Nt) et C-terminale (Ct) de l'apomucine (Dekker *et al.*, 2002).

Les chaînes latérales glycanniques sont très hétérogènes en taille et en charge. Les principaux sucres qui les composent sont le fucose, le galactose, la N-acétylgalactosamine, la N-acétylglucosamine et les acides sialiques. La structure des chaînes glycanniques dépend en grande partie de l'expression spécifique des glycosyltransférases.

Ainsi, on peut distinguer trois sous-groupes de mucines selon leur composition glycannique : les mucines neutres, pauvres en résidus acides (fucomucines) retrouvées en majorité dans l'estomac et au fond des cryptes intestinales ; les mucines acides (sialomucines) essentiellement retrouvées au sommet des villosités intestinales ; et les mucines très acides (sulfomucines) présentes en majorité au sein de l'œsophage et du côlon. Le caractère acide est lié au degré de sialylation et de sulfatation des chaînes oligosaccharidiques. Dans le côlon, il existe un gradient le long de l'axe de la crypte : les sulfomucines prédominent dans le fond de la crypte alors que les mucines neutres se trouvent préférentiellement à la base de la crypte et au niveau de l'épithélium de surface (Corfield *et al.*, 2001 ; Filipe *et al.*, 1979 ; Robbe *et al.*, 2003). Cette construction aboutit à la formation de mucosubstances connues depuis longtemps par les biochimistes. Appelées d'abord substance colloïde d'après leur aspect macroscopique, elles ont été caractérisées par histochimie grâce aux colorations de PAS (Periodic acid Schiff) et BA (Bleu Alcian) (pH = 1 et pH = 2,5, respectivement) (Goldman *et al.*, 1968) et HID (High iron Diamin) (Spicer *et al.*, 1965). On l'identifie dans des compartiments intracellulaire et extracellulaire. La

disponibilité de lectines marquées a permis la caractérisation des résidus glycaniques libres des mucines.

Au-delà de l'identification histochimique de la fraction glycanique des mucines, les travaux de l'Ecole Lilloise (Aubert *et* Porchet) ont été fondamentaux dans l'identification des gènes codant pour le squelette polypeptidique des mucines de sécrétion et leur organisation génomique (Porchet *et al.*, 1991 ; Pigny *et al.*, 1996). En collaboration avec les Pathologistes Lillois, Aubert et Porchet ont également permis l'étude de la spécificité tissulaire de l'expression de ces gènes et la production de sondes et anticorps spécifiques dirigés contre le squelette peptidique des mucines (Bartman *et al.*, 1998 ; Buisine *et al.*, 1998 ; Buisine *et al.*, 2000a ; Buisine *et al.*, 2000b). A ce jour, ce travail de clonage des mucines a abouti à l'identification de 20 gènes MUC classés par ces auteurs en trois groupes selon la structure des gènes d'apomucines, et non sur des critères liés aux chaînes glycaniques (Porchet *et al.*, 2004) :

1) les mucines de «membrane» ou mucines membranaires (molécules transmembranaires) comme MUC1 (EMA) et MUC4, les mieux caractérisées, codées par deux gènes localisés respectivement en 1q21 (Swallow *et al.*, 1987) et en 3q29 (Gross *et al.*, 1992). La caractéristique commune de ces mucines est la présence d'un domaine hydrophobe permettant leur ancrage à la membrane cellulaire. Les mucines membranaires sont impliquées dans la signalisation cellulaire, les interactions cellule-cellule et les interactions cellule-matrice extracellulaire.

2) les mucines de «sécrétion» ou mucines secrétées comme MUC2 (Figure 5) et MUC5AC, MUC5B et MUC6, codées par quatre gènes localisés au sein d'un cluster sur le chromosome 11 en p15.5 (Pigny *et al.*, 1996). Elles forment le gel de mucus par l'établissement de ponts disulfures engageant leurs domaines Ct et Nt, riches en cystéines et conservés au cours de l'évolution (Desseyn *et al.*, 1998). Elles jouent le rôle de barrière physique envers notamment les bactéries et les molécules de grande taille en raison de l'encombrement stérique créé par les chaînes oligosaccharidiques, et de barrière de diffusion sélective pour les petites molécules ioniques grâce aux différentes concentrations en oligosaccharides chargés négativement.

3) le groupe dit des « inclassables » réunit des gènes pour lesquels la légitimité du symbole MUC peut être discutée et comprend les glycoprotéines secrétées comme par exemple MUC8 ou MUC9....

Nous nous intéresserons uniquement aux mucines de sécrétion, qui peuvent traduire une différenciation cellulaire particulière.

### ***Mucines de sécrétion***

- Détection (histochimie-immunohistochimie-RT-PCR)

La détection des mucines par histochimie a pu être réalisée grâce aux colorations de PAS et Bleu Alcian (BA) (Goldman *et al.*, 1968). Le PAS détecte les mucines neutres, préférentiellement observées dans l'estomac ; le Bleu alcian détecte les mucines acides, préférentiellement observées au niveau de l'intestin grêle et du côlon. Ainsi, ces colorations simples permettent d'identifier des mucines différentes (par leur type de glycosylation) le long du tractus digestif.

Le clonage du squelette peptidique des gènes des mucines a permis d'isoler différents types de mucines et de produire des sondes et des anticorps dirigés spécifiquement contre un type de mucine donné. Cependant, certains anticorps monoclonaux disponibles reconnaissent la protéine immature, peu glycosylée, présente dans l'appareil de Golgi et/ou le réticulum endoplasmique, mais pas la protéine mature entièrement glycosylée en raison de l'encombrement stérique généré par les chaînes glycaniques (Devine *et al.*, 1993). De même, l'utilisation de la technique de RT-PCR quantitative a permis également de mettre en évidence des mucines (Van Klinken *et al.*, 1998). Ainsi, il est apparu qu'il existait une expression différentielle des mucines au niveau du tube digestif.

## MUC2

Le gène *MUC2* a été cloné par l'équipe de Kim (Gum *et al.*, 1989 ; Gum *et al.*, 1992). Ce clonage a permis très rapidement le développement de sondes moléculaires permettant des études de distribution d'expression des ARNm au niveau du tube digestif par l'équipe lilloise (Audie *et al.*, 1993 ; Buisine *et al.*, 1998) puis, plus tardivement, le développement d'anticorps (Blank *et al.*, 1994). Chez l'adulte sain, le gène *MUC2* est principalement exprimé par les cellules caliciformes de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon. *MUC2* est faiblement à modérément exprimé au sein de l'épithélium bronchique (Audie *et al.*, 1993). Son expression décrite au niveau de l'estomac est liée à une métaplasie intestinale (Audie *et al.*, 1993 ; Buisine *et al.*, 2000a).

## MUC5AC

Chez l'adulte sain, le gène *MUC5AC* est principalement exprimé au sein des épithélia de surface de l'estomac et des bronches (Audie *et al.*, 1993). *MUC5AC* n'est pas exprimé au sein de l'épithélium intestinal adulte. Cependant, au cours du développement, une expression transitoire de l'ARNm a été détectée dans l'intestin primitif entre 8 et 12 semaines d'aménorrhée (Buisine *et al.*, 1998).

## MUC5B

Ce gène est principalement exprimé par les glandes sous-muqueuses bronchiques (Audie *et al.*, 1993) et oesophagiennes (Guillem *et al.*, 2000). Il n'est pas exprimé au sein de l'épithélium gastrique adulte.

Toutefois, au cours du développement, une expression transitoire de l'ARNm a été détectée dans l'estomac entre 8 et 27 semaines d'aménorrhée (Buisine *et al.*, 2000a).

## MUC6

L'ARNm et l'apomucine ont été retrouvés principalement au sein de la muqueuse gastrique, du pancréas et de la vésicule biliaire (Bartman *et al.*, 1998). Il est modérément exprimé dans le duodénum, au sein des glandes de Brünner, au niveau de l'iléon terminal et du côlon droit (Toribara *et al.*, 1993). Il n'est pas exprimé par l'épithélium colique normal.

### □ Synthèse et sécrétion des mucines

Comme toute glycoprotéine produite sous forme de granules de sécrétion, les mucines sont synthétisées sous forme de peptides naissants sur la membrane des ribosomes puis transportées dans les citernes du réticulum endoplasmique granuleux (REG). Les modifications post-traductionnelles comme le repliement et l'oligomérisation ont lieu principalement dans le réticulum endoplasmique granuleux tandis que l'addition de chaînes hydrocarbonées se déroule plus tardivement au cours du passage cis-trans Golgi dans les granules de sécrétion.

La biosynthèse des mucines et notamment celle de MUC2 a été étudiée dans des lignées d'adénocarcinome colique humain ou des explants de muqueuse colique humaine (Tytgat *et al.*, 1994 ; McCool *et al.*, 1995). La N-glycosylation, correspondant à un contingent très minoritaire des chaînes glycosylées, est initiée très tôt lorsque les apomucines transitent dans le réticulum endoplasmique avec la fixation en bloc d'oligosaccharides riches en mannose. L'oligomérisation des mucines via la formation de ponts disulfures survient précocement, après la N-glycosylation mais avant la O-glycosylation (Asker *et al.*, 1998). Cette oligomérisation est probablement sous l'influence des enzymes disulfide isomérase du REG. Si la N-glycosylation est inhibée par la tunicamycine, la synthèse de mucines est réduite et l'oligomérisation est retardée (Dekker *et al.*, 1990). Puis, les résidus N-glycosylés riches en mannose sont retirés dans le RE par les glycosidases. Les oligomères sont transportés vers le Cis-Golgi. Ces mouvements de protéines du RE vers le Cis-Golgi sont contrôlés par les **protéines chaperonnes** qui assurent le «contrôle-qualité» des protéines transportées. Pour MUC2, la chaperonne a été identifiée : il s'agit de la **calréticuline** (McCool *et al.*, 1999, voir plus loin chapitre calréticuline). Dans le cis-Golgi, des glycosyltransférases réalisent l'élongation de la chaîne de sucres pour aboutir à un motif central de glycosylation, lui-même modifié par sialylation, sulfatation, acétylation ou fucosylation (Hanisch *et al.*, 2001). Quand la chaîne glucidique est achevée, la mucine s'accumule dans le trans-

Golgi. Naissent alors les granules denses, présents en grand nombre dans le voisinage du trans-Golgi. La condensation de ces granules s'accompagne d'une augmentation du calcium au sein de ces granules. Le déplacement des granules du golgi vers la membrane apicale est contrôlé par les interactions avec les microtubules et le réseau d'actine. L'exocytose ou la sécrétion à la membrane apicale est la résultante d'une fusion des membranes apicale et vésiculaire. Il existe deux formes de sécrétion : une sécrétion basale, non régulée, sans stockage et une sécrétion stimulée, régulée, impliquant une forme de stockage intermédiaire répondant à des stimuli particuliers (Burgess *et al.*, 1987).

□ Régulation de la synthèse. Comment fonctionne MUC2 ?

La régulation de la mucosécrétion, bien qu'assez sensiblement différente d'un type cellulaire à un autre, peut se réduire à trois étapes :

- 1/ la régulation des mécanismes d'exocytose des mucines préformées ;
- 2/ la régulation de la synthèse et notamment la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour le squelette peptidique (quatre gènes localisés au sein d'un cluster sur le chromosome 11 en p15.5 (Pigny *et al.*, 1996) ;
- 3/ la régulation de la glycosylation par les glycosyltransférases, elles-mêmes sous la dépendance de gènes spécifiques.

Au total, il apparaît que la synthèse et la sécrétion correspondent à un ensemble de signalisations très complexes et finement régulées :

L'exocytose des mucines de sécrétion est régulée par les agonistes cholinergiques et par le VIP, qui ont une action synergique. Cette démonstration a été faite au cours des années 1980 par les équipes de C. Laboisse et M. Laburthe (Laburthe *et al.*, 1989).

Quant à la régulation transcriptionnelle des gènes *MUC*, elle a été étudiée par l'équipe de Lille pour le gène *MUC2* dont on connaît le promoteur et dont la stimulation peut être due à de multiples facteurs passant par la voie des MAPKinases (Mitogen-Activated Protein Kinases) qui conduit à l'activation de facteurs de transcription tels que NF-kB (Van Seuningen *et al.*, 2001). Cette voie est activée en amont par des médiateurs primaires que sont les cytokines pro-inflammatoires (IL1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  via leurs récepteurs), les facteurs de croissance (EGF, TGF- $\alpha$ ), les produits libérés par les bactéries.. Du fait de la présence de nombreux îlots CpG, ce gène fait l'objet d'une régulation épigénétique (Gratchev *et al.*, 2002).

Quant à la régulation de l'expression des glycosyltransférases, elle se situe en dehors du champ d'étude de ce chapitre.

### *Mucines en pathologie*

L'existence de modifications des mucines en pathologie colique tumorale ainsi que dans les lésions pré-néoplasiques est connue depuis l'avènement de l'histochemie des glycannes. Les modifications glycaniques qui ont été mises en évidence ont peu apporté à la classification des tumeurs, à l'étude de leur pronostic et à la compréhension de la pathogénie.

Cependant, ces dernières années, le clonage des gènes codant pour les apomucines a fourni des outils nouveaux permettant :

- 1/ de produire un modèle d'inactivation pour le gène *MUC2* et plus généralement pour des gènes impliqués dans le phénotype mucosécrétant ;
- 2/ d'étudier l'expression des gènes de mucines dans des lignées cancéreuses coliques humaines ainsi que leur régulation ;
- 3/ de corréler l'expression des gènes des mucines à des données clinico-pathologiques, grâce à des biocollections de tumeurs.

□ Modèles de souris invalidées

#### *Inactivation du gène MUC2*

A notre connaissance, il n'existe qu'un seul **modèle de souris invalidée pour le gène *Muc2***, celui publié par l'équipe d'Augenlicht dans *Science* en 2002 (Velcich *et al.*, 2002). Dans ces souris invalidées pour le gène *Muc2* (*Muc2<sup>-/-</sup>*), les cellules caliciformes perdent leur morphologie caractéristique tandis que la taille des cryptes est significativement allongée, résultant d'une augmentation du nombre de cellules par crypte et d'une rupture de l'équilibre prolifération/apoptose (augmentation de la prolifération, diminution de l'apoptose), accompagnée d'une augmentation de la vitesse de migration des cellules épithéliales le long de l'axe crypto-villositaire. A l'âge de un an, 65% des souris invalidées pour le gène *Muc2* développent des tumeurs intestinales. Chez les jeunes souris, les tumeurs (adénome villositaire, tubuleux ou tubulo-villositaire) étaient restreintes à l'intestin grêle ; chez les souris plus âgées, la majorité des adénomes s'était transformée en adénocarcinomes de localisation intestinale mais également parfois colique. De plus, 15% des souris âgées présentaient des tumeurs rectales (Velcich *et al.*, 2002). Ces résultats tendent à montrer que *MUC2* est indispensable à l'homéostasie épithéliale. La disparition de *MUC2* serait associée à l'apparition et à la progression des

carcinomes colorectaux.

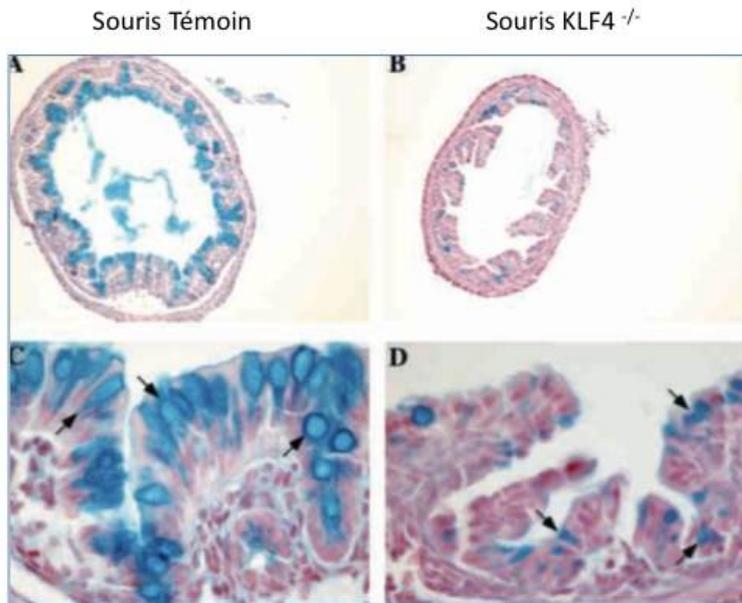
**Le croisement des souris *Muc2*<sup>-/-</sup> avec des souris portant une mutation du gène *APC* (*Apc*<sup>1638N/+</sup> ou *Apc*<sup>Min/+</sup>) entraîne une augmentation du développement des tumeurs (Yang *et al.*, 2008). Ces tumeurs présentent une inflammation subclinique «moléculaire» comparable à celle observée dans les souris *Apc*<sup>Min/+</sup> traitées par le DSS (Dextran Sodium Sulfate), agent provoquant une réaction inflammatoire. Cette étude conclut que le développement de ces tumeurs chez les souris invalidées pour le gène *Muc2* est la conséquence d'une inflammation. Cette réponse inflammatoire participe à la tumorigénèse chez la souris *Apc*<sup>Min/+</sup> (Yang *et al.*, 2008).**

Toutes ces données ont conduit l'équipe d'Augenlicht à suggérer que le gène *MUC2* pourrait être un gène suppresseur de tumeur. Un élément en faveur de cette hypothèse est le fait que l'expression de ce gène est diminuée dans un grand nombre de CCR.

#### *Invalidation de gènes affectant le phénotype mucosecrétant*

De manière intéressante, les travaux ces dernières années ont identifié plusieurs gènes (*KLF4*, *CDX2*, *SOX9*, *ATOH1*) capables de modifier le phénotype mucosecrétant. Dans certains cas, des souris invalidées ont été produites. Nous donnerons deux exemples, l'invalidation de *KLF4* (Krüppel-like factor 4) et celle de *ATOH1* (Atonal homolog 1, codant pour Math1 chez la souris et Hath1 chez l'homme) :

En 2002, Katz *et al.* montrent dans le modèle de **souris déficientes en *KLF4***, une diminution du nombre de cellules caliciformes matures et également une expression anormale de *MUC2*, «en patch», au sein de cellules peu différenciées (voir Figure 6).

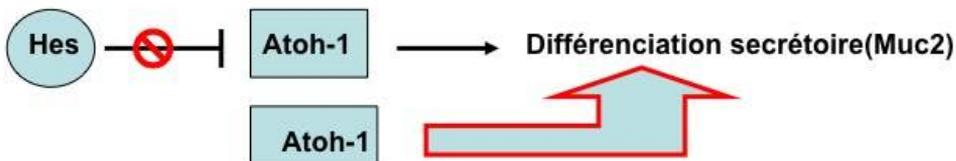
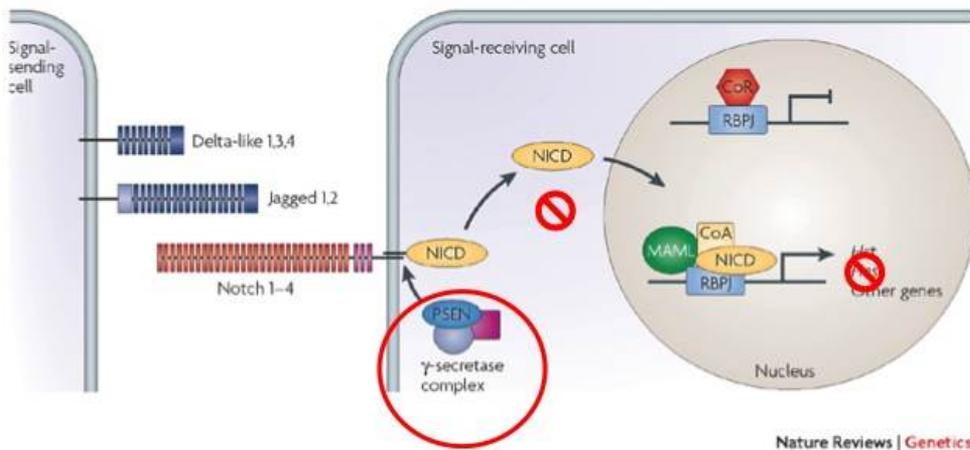


**Figure 6 : Diminution importante du nombre de cellules caliciformes (cellules colorées par le bleu alcian) dans le côlon des souris déficientes en KLF4 (B et D) par rapport à celui des souris témoins sauvages (A et C).** Coloration au Bleu Alcian ; faible et fort grossissement. D'après Katz *et al.*, 2002.

Les cellules entérocytaires ainsi que les cellules neuroendocrines sont préservées. Dans ce travail, l'influence éventuelle de l'ablation de KLF4 sur l'oncogenèse colique n'a pas été étudiée (Katz *et al.*, 2002). Cependant, plus récemment, il a été montré que l'haplo-insuffisance de KLF4 augmente le développement des adénomes chez les souris *Apc*<sup>Min/+</sup> (Ghaleb *et al.*, 2007).

Dans une démarche analogue d'inactivation, Yang *et al.* montrent que l'**invalidation de *Math1*** chez la souris aboutit à une disparition des cellules caliciformes, des cellules de Paneth et des cellules neuroendocrines. Les cellules « absorbantes », entérocytaires sont préservées. Ces expériences d'inactivation tendent à montrer l'existence d'un précurseur commun aux cellules sécrétoires (cellules caliciformes, cellules neuroendocrines et cellules de Paneth) (Yang *et al.*, 2001). Des études récentes ont montré que l'expression de *Math1* est sous la dépendance de la voie de signalisation Notch. Cette voie de signalisation implique un contrôle juxtacrine de récepteurs (dits récepteurs Notch) à la surface des cellules par des ligands maintenant bien identifiés (*Jagged-1*, *Delta-like..*). L'activation des récepteurs Notch entraîne une maturation protéolytique de l'endodomaine de ces récepteurs impliquant une famille de protéases, les  $\gamma$ -secrétases (voir revue générale Baron *et al.*, 2003) (Figure 7).

## Signalisation Notch



**Figure 7 : Voie de signalisation de Notch.** L'inhibition de la voie Notch par un inhibiteur des  $\gamma$ -secrétases entraîne une augmentation d'expression du gène ATOH1 et une différenciation mucosécrétoire.

Cette maturation protéolytique libère le domaine intracellulaire de Notch (NICD), dont l'adressage nucléaire produit une activité répressive sur Math1 (Zheng *et al.*, 2000). Des travaux récents montrent que **le blocage de la voie Notch** par l'utilisation d'un inhibiteur des  $\gamma$ -secrétases chez la souris, entraîne une augmentation du nombre de cellules caliciformes (van Es *et al.*, 2005 ; Zheng *et al.*, 2009), ainsi qu'une augmentation d'expression du gène *ATOH1/MATH1* (van Es *et al.*, 2005), du gène *KLF4* et de la protéine KLF4 (Zheng *et al.*, 2009).

Enfin, un inhibiteur des  $\gamma$ -secrétases diminue le nombre de cellules prolifératives dans les adénomes sans modifier le nombre des adénomes chez la souris *APC<sup>Min/+</sup>* (van Es *et al.*, 2005).

Tous ces éléments sont en faveur d'une régulation commune de *MATH1* et de *KLF4* par la voie de signalisation Notch. Très récemment, un travail publié dans PLOS par Bossuyt, tend à faire du gène *ATOH1/MATH1* un gène lui aussi suppresseur de tumeur (Bossuyt *et al.*, 2009).

Au total, ce sont donc au moins trois gènes, *KLF4*, *ATOH1* et *MUC2*, tous impliqués dans le phénotype mucosécrétant, qui peuvent prétendre au statut de gène suppresseur de tumeur dans le côlon. Il ressort de ces expériences modélisant le rôle de ces trois gènes, que le phénotype mucosécrétant pourrait être inversement associé au potentiel tumorigène en oncologie colique.

Dans un contexte d'oncogenèse, on peut se demander si l'induction d'une différenciation mucosécrétante, soit par surexpression de *ATOH1* ou de *KLF4*, soit par blocage pharmacologique des  $\gamma$ -sécrétases, pourrait avoir un effet de prévention de la carcinogenèse, compte-tenu notamment du rôle potentiel de *MUC2* comme gène suppresseur de tumeur.

□ Les données de la pathologie humaine

La disponibilité d'anticorps spécifiques des différentes classes de mucines de sécrétion a été à la source de nombreuses études visant à étudier le spectre d'expression de ces mucines au cours de la carcinogenèse colique humaine.

Parmi les nombreux travaux publiés, nous retiendrons ceux qui s'intéressent aux modifications d'expression de *MUC2*, notamment en relation avec *KLF4* et *ATOH1* : 1) au cours de cancérogenèse colique, 2) en relation avec l'histologie et avec le statut MSS/MSI des tumeurs et 3) en relation avec le pronostic (voir tableaux III et IV).

*Expression du gène MUC2 au cours de la transition adénome-adénocarcinome*

Dans un travail publié en 1999, l'équipe de Jass a comparé par immunohistochimie l'expression des gènes *MUC1*, *MUC2*, *MUC4* et *MUC5AC* dans des polypes hyperplasiques, des adénomes festonnés et dans des adénomes conventionnels. Ces auteurs n'ont pas observé de modifications d'expression des apomucines dans les différents types de polypes conventionnels par rapport à l'épithélium colique normal sauf pour *MUC5AC* qui était présent dans 60% des adénomes et seulement 20% des muqueuses normales. Dans les polypes hyperplasiques et les adénomes festonnés, il existait à la fois une augmentation de *MUC2* et de *MUC5AC* (Biemer-Hüttmann *et al.*, 1999).

L'étude de Xu *et al.*, qui analyse par immunohistochimie 48 adénomes sporadiques, montre une diminution d'expression de *KLF4* dans ces adénomes par rapport à la muqueuse normale (Xu *et al.*, 2008). Park *et al.* montrent également une diminution d'expression d'*ATOH1/HATH1* dans les adénomes tubuleux. Par contre, ils observent une expression forte d'*ATOH1* dans les lésions festonnées (polypes hyperplasiques (PH) et adénomes festonnés (AF)) (Park *et al.*, 2006).

*Qu'en est-il de l'expression de MUC2 ainsi que de KLF4 et ATOH1 dans les adénocarcinomes coliques ?*

Plusieurs types de travaux montrent, de manière générale, qu'il existe au cours de la transition adénome-adénocarcinome, une diminution d'expression de MUC2 (Blank *et al.*, 1994 ; Biemer-Hüttmann *et al.*, 2000 ; Park *et al.*, 2006), de KLF4 (Zhao *et al.*, 2004 ; Choi *et al.*, 2006 ; Xu *et al.*, 2008) mais aussi de ATOH1/HATH1 (Leow *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2006) (cf tableaux III et IV ci – dessous). Mises en perspective, ces données sont en accord avec un rôle de gène suppresseur de tumeur pour les gènes *MUC2*, *KLF4* et *ATOH1/HATH1*.

Nb de cas	Marqueurs	Expression	Corrélations	Auteurs
37 CCR côlon gauche	IHC(anti-non VNTR) MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6  ARNm (HIS)	MUC2 T=N (IHC) (34/36) Marquage périnucléaire Acquisition de MUC5AC dans les tumeurs (23/36)  Pas de détection de MUC5B, MUC6	̄ de MUC2 dans les tumeurs peu différenciées Pas de différence entre carcinomes mucineux et non mucineux	Sylvest er <i>et al.</i> 2001
88 CCR dont  -31CCRmucineux - 57CCRnonmucineu x 28 CCR de Novo 29 avec adénomes  -25 adénomes villeux -25 adénomes tubuleux	IHC : MUC2  ARN (RT-PCR)	T>N 40% adénomes tubuleux 48% adénomes villeux 72% CCRmucineux 31% CCR avec adénomes  T<N 79% CCR de Novo 4% des CCR mucineux	Association de MUC2 avec le type histologique  Pas de corrélation entre expression de MUC2, le grade ou le stade des CCR	Blank <i>et al.</i> 1994
93 CCR dont 74 CCRnonmucineux 19 CCR mucineux  29 polypes dont 5 SSA  Statut MSS/MSI CCR : 22 MSI-H 24 MSI-L 47 MSS	IHC MUC2 MUC5AC	CCR MUC2+ MUC5AC+ CCRm 89% 63% CCRnm 47% 41%  CCR MUC2+ MUC5AC+ MSI-H 86% 77% MSI-L 42% 33% MSS 32% 28%  MUC2 et MUC5AC dans SSA	̄ de MUC2 dans les CCR non mucineux  Association de MUC2 avec le type histologique (CCRmucineux), la localisation (CD) et le statut MSI  MUC2 et MUC5AC dans les CCR MSI-H et les SSA MSI-H	Biemer- Hüttma nn <i>et al.</i> 2000
96CCRmucineux( m) 98CCRnonmucineu x (nm)  CD: côlon droit CG : côlon gauche	IHC MUC2 MUC5AC  CCR MSI+ 39% CCRm (CD) 9% CCRm (CG) 12% CCRnm (CD) 0% CCRnm (CG)	MUC2+ MUC5A C+ CCRnm 13% 13% CCRm 89% 49%  CCRmucineux MUC2+ MUC5AC+ CD : 96% 58% CG : 82% 37%	̄ de MUC2 dans les CCR nm  Association de MUC2 et MUC5AC avec le type histologique (CCRm), le statut MSI et la localisation (CD)	Park <i>et al.</i> 2006
1420 CCR	IHC MUC2  MSS/MSI	MSS : ̄MUC2 associée à ̄ survie à 5 ans MSI : ̄MUC2 <sup>57</sup> associée à ̄ survie à 5 ans)	̄MUC2 associée à une survie plus courte dans les deux groupes MSS et MSI	Lugli <i>et al.</i> 2007

**Tableau III : Expression des mucines dans les carcinomes colorectaux (CCR) en relation avec les facteurs clinicopathologiques.** L'expression des mucines est évaluée dans le tissu tumoral (T) et le tissu normal (N) par immunohistochimie (IHC), et/ou par des techniques de RT-PCR ou hybridation in situ (HIS) pour l'ARNm. SSA : adénome festonné sessile. CCRm : carcinome mucineux ; CCRnm : carcinome non mucineux.

### *Relation avec la morphologie*

Dès le début des années 1990, plusieurs auteurs ont recherché une relation entre l'expression du gène *MUC2* et le type histologique des carcinomes colorectaux. Par exemple, Ho *et al.* (1993) ont rapporté une forte expression de *MUC2* dans les adénocarcinomes mucosécrétants et une faible expression de *MUC2* dans les adénocarcinomes dits « non mucineux ». Velcich *et al.* (1993) ont rapporté également une plus forte expression de *MUC2* dans les lignées cancéreuses coliques mucosécrétantes par rapport à celles non mucosécrétantes.

Dans un travail publié en 1994, Blank *et al.* ont comparé l'expression du gène *MUC2* par RT-PCR et par IHC dans des adénocarcinomes mucineux (définis par des «flaques» de mucus dans plus de la moitié du volume tumoral) et des adénocarcinomes dits non mucosécrétants. Ils observent une forte expression de *MUC2* dans les adénocarcinomes mucineux par rapport aux carcinomes non mucosécrétants. Ces résultats sont corroborés par ceux de Park *et al.* (2006) et de Jass *et al.* (2000) (cf tableau III).

De manière intéressante, le même type de travail a été effectué en déterminant l'expression de *ATOH1* et de *KLF4* dans ces deux types d'adénocarcinomes. On retrouve de manière analogue, une hyperexpression de *HATH1* dans les carcinomes mucosécrétants (Leow *et al.*, 2004 ; Park *et al.* 2006). Les études, portant sur l'analyse de l'expression de *KLF4* dans les CCR, n'ont pas précisé les variations d'expression selon les sous types histologiques (Choi *et al.*, 2006 ; Xu *et al.*, 2008) (cf tableau IV).

Mises en perspective, ces données seraient en faveur du maintien de ces 3 gènes dits suppresseurs de tumeurs dans les adénocarcinomes mucineux. Cependant, toutes ces études ne distinguent pas, au sein des adénocarcinomes mucosécrétants, les différents sous-types histologiques, notamment les carcinomes en bagues à chaton. On peut en effet penser que les adénocarcinomes mucosécrétants représentent un groupe hétérogène sur le plan biologique et oncogénétique qu'il reste à démembrer. Cependant, Park *et al.* les différencient en sous-types histologiques et retrouvent, dans les carcinomes mucineux mais également dans les carcinomes en bagues à chaton, une hyperexpression de *MUC2* et *ATOH1* (Park *et al.*, 2006).

Nb de cas	Marqueurs	Expression	Corrélations	Auteurs
30 CCR dont 8 explorés en génétique	KLF4- (ARNm)  LOH Hyperméthylation	T<N  2/8 2/8	$\bar{}$ de KLF4 dans les CCR  Perte d'hétérozygotie et mécanisme épigénétique	Zhao <i>et al.</i> 2004
123 CCR (sous types histologiques non précisés)	KLF4 (IHC- TMA)	$\bar{}$ de KLF4 dans 24% des CCR	$\bar{}$ de KLF4 dans les CCR  Pas d'association avec différenciation, grade, stade..	Choi <i>et al.</i> 2006
49 CCR 8 adénomes  178 CCR, 48 adénomes	KLF4 (ARNm)  KLF4 (IHC)	T<N dans 89% des CCR et 75% des adénomes	$\bar{}$ KLF4 dans les CCR et adénomes  Tendance à une meilleure survie globale chez patients métastatiques KLF4+ vs patients KLF4-	XU <i>et al.</i> 2008
37 CCR dont 15 CCRmucineux 15CCRnonmucineux 7 C bagues à chaton  Adénomes (Ad) -15 PH -15 SSA -15 Ad tubuleux	HATH1 (IHC)	HATH1+ MUC2 + PH 100% 100% SSA 87% 85% Ad tubuleux 7% 36%  CCRm 100% 100% CCRnm 7% 38% C bagues 100% 100% A chaton	$\bar{}$ HATH1 dans CCR non mucineux et adénomes tubuleux  Expression de HATH1 et MUC2 plus fréquente dans les CCRm, les C bagues à chaton et les lésions festonnées (PH et SSA)	Park <i>et al.</i> 2006
12 CCR dt 1 CCRmucineux	HATH1 (ARN et IHC)	T < N sauf dans le CCRmucineux	$\bar{}$ de HATH1 dans les CCR sauf pour le CCR mucineux	Leow <i>et al.</i> 2004

**Tableau IV : Expression de KLF4 et ATOH1 dans les carcinomes colorectaux (CCR) et les polypes festonnés en relation avec les facteurs clinicopathologiques.** L'expression de KLF4 et ATOH1 est évaluée dans le tissu tumoral (T) et le tissu normal (N) par immunohistochimie (IHC), Tissue Microarrays (TMA) et/ou par des techniques de RT-PCR pour l'ARNm. CCRm : carcinome colorectal mucineux ; CCRnm : carcinome colorectal non mucineux ; C : carcinome ; PH : polype hyperplasique ; SSA : adénome festonné sessile ; Ad : adénome.

#### *Relation avec le statut MSS/MSI*

Le caractère mucineux des tumeurs coliques étant souvent associé à une instabilité microsatellitaire (MSI), plusieurs études ont recherché un lien entre l'expression des mucines et le statut MSS/MSI.

L'étude de Jass *et al.* montre une expression plus fréquente de MUC2 dans les CCR MSI-H (86% cas), MSI-L (42%) par rapport aux CCR MSS (32%). L'expression conjointe de MUC2 et MUC5AC est

observée dans 68% des CCR MSI-H et dans 10% des CCR MSI-L/MSS ( $p=0.0003$ ) (Biermer-Hüttmann *et al.*, 2000). L'étude de Park démontre une expression plus forte de MUC2 et MUC5AC au niveau des carcinomes mucineux du côlon droit, plus fréquemment de phénotype MSI-H (Park *et al.*, 2006). De façon intéressante, un phénotype identique MUC2 et MUC5AC+ est décrit dans les adénomes sessiles et les polypes hyperplasiques (Biermer-Hüttmann *et al.*, 1999). On pourrait donc penser que cette double expression est une signature d'oncogénèse particulière.

### *Relation avec le pronostic*

La valeur pronostique de l'expression de MUC2 a été peu étudiée.

L'équipe de Jass a effectué une étude rétrospective associant l'immunohistochimie de MUC2 (parmi d'autres biomarqueurs) sur puces tissulaires ou Tissue microarrays (TMA) de 1420 CCR non sélectionnés et non consécutifs en relation avec le statut MSS/MSI (déterminé par immunohistochimie) et la survie des patients. Les résultats montrent que la perte de MUC2 est un facteur pronostique péjoratif dans les cancers sporadiques, qu'ils soient de type MSS ou de type MSI. La valeur respective du stade TNM ou autre facteur pronostique validé n'est pas recherchée dans cette étude univariée (Lugli *et al.*, 2007) (tableau III).

Une seconde étude publiée en 2008, sur les mêmes 1420 patients, montre que la perte de MUC2 était significativement associée à une survie plus courte que celle observée chez les patients exprimant MUC2. La valeur pronostique de MUC2 était la plus significative pendant les 5 à 7 premiers mois et s'estompait au bout de 13 mois. En outre, MUC2 était un facteur pronostique indépendant du stade pTNM, du grade, ou de l'invasion vasculaire. Mais cette indépendance disparaissait après ajustement au statut MSS/MSI (Adams *et al.*, 2009).

Une seule étude, celle de Xu *et al.*, mentionne une relation entre l'expression de KLF4 dans les CCR et la survie des patients. Dans cette étude portant sur 178 CCR analysés par immunohistochimie, les patients métastatiques ganglionnaires (N+) exprimant KLF4 (KLF4+) ont tendance à avoir une meilleure survie par rapport aux patients N+ n'exprimant pas KLF4 (KLF4-) (Xu *et al.*, 2008). On ne dispose pas d'étude sur la valeur pronostique d'ATOH1.

De ces études nous pouvons tirer trois conclusions pertinentes dans le cadre de notre travail de thèse :

- 1) Le phénotype mucosécrétant n'est pas sous la dépendance d'un seul gène mais résulte de la contribution de plusieurs facteurs, incluant le gène *MUC2* spécifique des mucines coliques, mais d'autres gènes régulateurs ou impliqués dans la morphogénèse des cellules caliciformes. Il s'agit donc d'un processus multifactoriel.

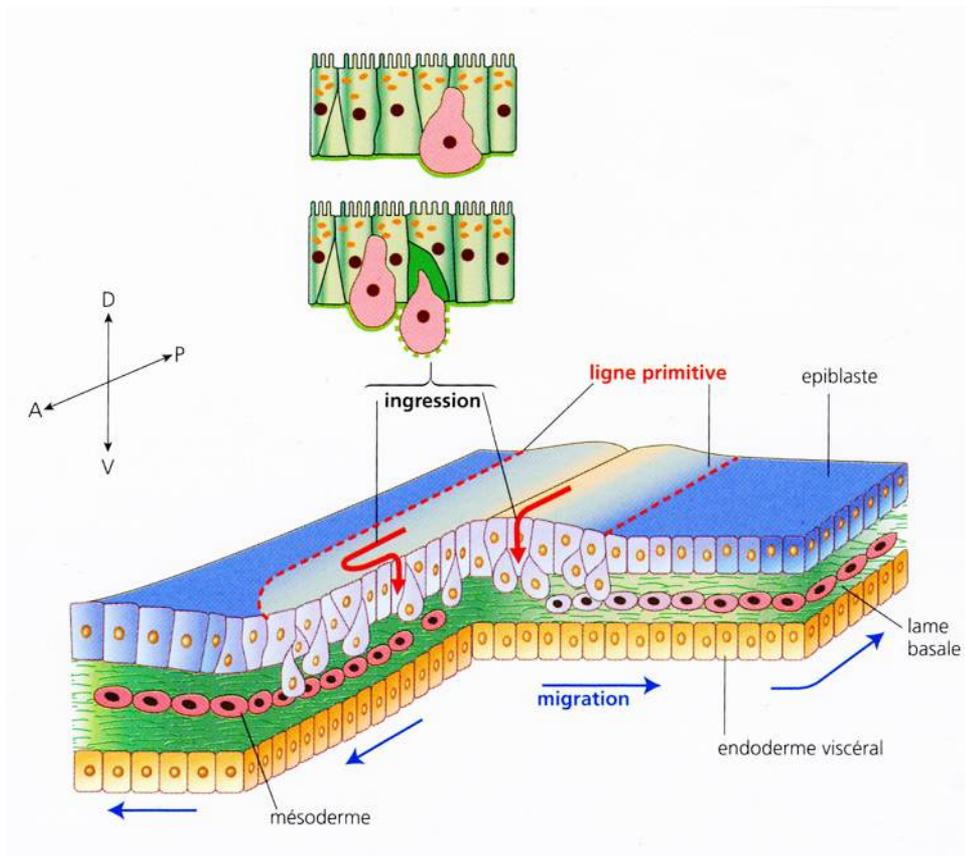
- 2) C'est la modélisation, notamment chez l'animal invalidé, de l'impact de ces gènes sur l'oncogenèse, qui a en grande partie désigné ces gènes comme gènes d'intérêt en pathologie humaine.
- 3) Notre projet concernant la calréticuline comme protéine impliquée dans le phénotype mucosécrétant s'inscrit d'ores et déjà dans une telle démarche (1) puisqu'elle était issue d'un travail préliminaire de modélisation chez la souris et (2) qu'il était important de décrire son statut dans les CCR.

Plus généralement, le constat immunophénotypique de la diminution d'un gène d'intérêt (participant au phénotype ou impliqué dans la biologie des cellules épithéliales) doit faire penser à l'hypothèse « gène suppresseur de tumeur » et doit donc faire rechercher systématiquement les éléments associés à un tel rôle. On verra plus loin que dans le cas de la diminution d'expression d'ADAM15, une telle recherche ne peut être modélisée chez l'animal du fait de la faible homologie entre le gène murin et le gène humain.

### **La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)**

#### ***Introduction***

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un processus morphogénétique intervenant au cours du développement dans l'étape de la gastrulation. Cette étape est caractérisée par des mouvements cellulaires coordonnés dans l'espace et dans le temps, remaniant la distribution des feuillets embryonnaires pour établir le plan d'organisation primaire de l'embryon. Le processus de gastrulation décrit histologiquement, notamment chez la souris, convertit l'embryon à deux feuillets – endoderme viscéral et épiblaste – en un embryon triblastique, c'est-à-dire contenant les trois feuillets fondateurs du plan d'organisation primaire de l'embryon : ectoderme, mésoderme et endoderme. Après la formation de la ligne primitive (structure transitoire formée par dépression de l'épiblaste dans la région postérieure de l'embryon) et au contact de cette structure, va se développer une transition épithélium-mésenchymateuse qui s'effectue en trois phases (cf Figure 8 ci-dessous). En premier lieu, une hyperpolarisation cytoplasmique (redistribution des organelles dans la cellule), un remodelage des jonctions cellulaires, une modification de l'adhésion intercellulaire et une déformation locale de la matrice extracellulaire affectent les cellules de l'épiblaste. Puis, interviennent le détachement apical des cellules, la destruction locale de la matrice extracellulaire et la dépolarisation cytoplasmique. Enfin, ces cellules mésenchymateuses s'insinuent et migrent (Darribère, 2003).



**Figure 8: La conversion épithélium-mésenchyme au niveau de la ligne primitive.** D'après Darribère, 2003.

Il s'agit donc d'une forme de plasticité durant laquelle les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques dites « épithéliales » et acquièrent des propriétés typiques des cellules mésenchymateuses. Ce processus se caractérise par des modifications morphologiques des cellules épithéliales (perte de polarité et acquisition d'un phénotype fusocellulaire) qui traduisent une adaptation fonctionnelle, c'est-à-dire une acquisition des propriétés de mobilité et de migration de ces cellules épithéliales. L'acquisition de ces propriétés fonctionnelles nouvelles est associée à des modifications moléculaires qu'on peut traduire sous forme de « patron » immunophénotypique.

### *En quoi ce processus nous intéresse-t-il ?*

Tout simplement parce que certains auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle des tumeurs pouvaient récapituler un processus embryonnaire de TEM. Cette récapitulation, si elle existe, pose le problème de la subordination de la morphogénèse tumorale à des mécanismes analogues à ceux qui interviennent pendant l'embryologie et qui peuvent être modélisés au niveau moléculaire.

L'enjeu est donc pour le pathologiste de repérer à travers l'étude des tumeurs les « patrons » évocateurs d'une TEM, soit par un aspect morphologique particulier, soit par un immunophénotype évoquant par exemple une perte d'adhésion ou une acquisition de mobilité. L'enjeu pour le biologiste est de

rechercher, à travers une modélisation animale, une subordination de ce phénotype à un changement moléculaire suspecté par le morphologiste. Enfin, l'enjeu pour le thérapeute sera de déterminer si ce principe de subordination moléculaire permet de définir une cible thérapeutique.

Ce concept de TEM a été appliqué à plusieurs types de phénomènes pathologiques incluant notamment la fibrose rénale (Boutet *et al.*, 2006), et bien sûr la progression néoplasique. Kalluri *et al.* (1999) propose, en effet, de classer la TEM en trois sous-types différents, ces sous-types sont fondés sur les contextes dans lesquels ils surviennent.

Le «type 1» est associé à l'embryogenèse et au développement comme nous l'avons précédemment défini. Il s'agit d'un phénomène transitoire, n'entraînant jamais de fibrose ni de phénotype invasif. Il ne survient pas dans un contexte inflammatoire. Il génère des cellules mésenchymateuses (cellules mésenchymateuses primaires) qui, potentiellement, peuvent subir une transition mésenchymo-épithéliale pour générer un épithélium secondaire (cf début du chapitre). Le «type 2» est associé à la régénération tissulaire, à la fibrose. Son initiation et sa persistance dépendent d'un stimulus inflammatoire. Il génère notamment des fibroblastes qui produisent une matrice extracellulaire riche en collagène. Le «type 3» survient dans un contexte de croissance et progression tumorale (Kalluri *et Weinberg*, 2009).

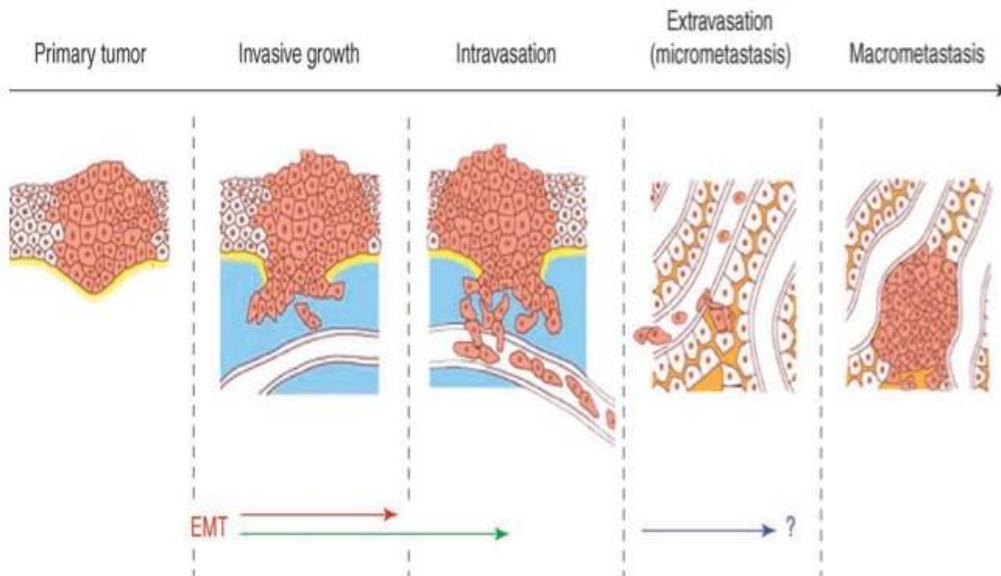
Nous nous intéresserons ici à la TEM uniquement dans les processus néoplasiques. Nous commencerons par décrire les éléments utiles au pathologiste pour définir ou pour évoquer une TEM. En effet, le pathologiste a depuis longtemps utilisé des termes qui se superposent à ce phénomène, par exemple, le terme d'anaplasie employé pour la première fois par Hansemann à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. Nous évoquerons ensuite les modèles existants permettant d'établir les mécanismes auxquels la TEM est subordonnée. Enfin, nous insisterons sur le rôle d'une molécule d'adhésion, la E-cadhérine, qui est une des principales clés de l'adhésion intercellulaire des cellules épithéliales et dont la perte ou l'inhibition est probablement un des facteurs essentiels de cette TEM.

### ***La TEM : les arguments évocateurs pour le pathologiste ; TEM et cancer : est-ce une réalité ?***

La carcinogenèse a été définie comme suit par Chambers *et al.*, 2002 : «La carcinogenèse correspond à un changement du programme génétique et épigénétique qui aboutit à la dérégulation de l'homéostasie cellulaire. L'étape clé de la carcinogenèse est l'apparition de cellules migrantes dans le but de constituer des sites secondaires de croissance. Pour cela, une cascade d'étapes est nécessaire, initiée par l'échappement des cellules tumorales du site primitif, l'infiltration locale du stroma, la migration vers la lumière des vaisseaux sanguins du site primitif, l'agrégation aux plaquettes, l'adhésion de l'embolie néoplasique circulant à l'endothélium des vaisseaux de l'organe cible, l'extravasation des cellules

tumorales, la colonisation de l'organe cible et l'expansion tumorale secondaire».

D'après la définition donnée ci-dessus et le schéma (Figure 9) très simplifié ci dessous et forcément très réducteur, il apparaît que ce processus de progression des néoplasies et d'évolution métastatique évoque une analogie avec le processus de TEM tel qu'il a été défini en embryologie.



**Figure 9: Transition épithélio-mésenchymateuse et cancer.** D'après Huber *et al.*, 2005.

*Si l'on reprend la définition des caractéristiques dites « épithéliales » des tumeurs ainsi que les caractéristiques « mésenchymateuses », que peut-on en déduire ?*

Par définition, le terme TEM s'applique uniquement aux cancers dérivés des épithélia (carcinomes) qui correspondent à 90% des tumeurs. Ces carcinomes sont typiquement caractérisés sur le plan immunophénotypique par l'expression de cytokératines ou de sous-classes de cytokératines, de molécules d'adhésion intercellulaire dont la principale est la E-cadhérine ainsi que, dans certains cas, de molécules associées à la polarité (occludine, ZO1..). *Stricto sensu*, le terme TEM désigne donc une perte de ces caractéristiques immunophénotypiques et un gain de marqueurs mésenchymateux, le plus général étant un filament intermédiaire de type vimentine.

Pour le pathologiste, un très bon exemple de tumeur adoptant une TEM est celui du carcinosarcome

utérin, tumeur au sein de laquelle co-existent un contingent avec un authentique phénotype histologique carcinomateux s'accompagnant d'un immunophénotype épithélial, et un contingent mésenchymateux identifiable sur le plan histologique et immunophénotypique. Prise dans ce sens restrictif, la TEM n'intéresse qu'une minorité de tumeurs. C'est pourquoi, Klymkowsky *et* Savagner (2009) suggèrent d'utiliser le terme de pseudo-TEM pour englober un processus plus général. Ces auteurs proposent 3 critères pour définir un phénotype pseudo-TEM dans les carcinomes humains : 1/ la polarité cellulaire, 2 / la cohésion cellulaire et 3/ l'expression des filaments intermédiaires. A partir de ces critères, sont définis 4 phénotypes de pseudo-TEM. Le phénotype 0 : les cellules tumorales sont différenciées, cohésives, polarisées, de phénotype épithélial ; le phénotype 1 : la majorité des cellules ont perdu leur polarité mais sont encore cohésives et expriment des cytokératines ; le phénotype 2 : il existe une perte d'adhésion intercellulaire mais la majorité des cellules expriment les cytokératines ; le phénotype 3 : il existe une perte d'expression des cytokératines et une expression notable de la vimentine dans la majorité des cellules (Klymkowski *et* Savagner, 2009).

Certains des critères qui sont suggérés pour l'acquisition d'un phénotype pseudo-TEM sont utilisés par les pathologistes en routine. Par exemple, en pathologie mammaire, l'expression de la E-cadhérine, molécule clé dans l'adhésion intercellulaire, est utilisée pour distinguer les adénocarcinomes canauxaux du sein qui expriment la E-cadhérine des carcinomes lobulaires invasifs qui ne l'expriment pas (Bex *et al.*, 1996).

Au delà de la classification des tumeurs en utilisant un immunophénotype évocateur d'une TEM (dans notre cas, il s'agit de la perte de la E-cadhérine) se pose le problème de la subordination de la progression tumorale aux mécanismes de cette perte.

Dans un certain nombre de tumeurs la perte de la E-cadhérine est un processus plus ou moins tardif qui est le résultat d'un processus épigénétique : méthylation du promoteur du gène (Garinis *et al.*, 2002), intervention de facteurs de transcription répresseurs de l'expression de la E-cadhérine tels Snail 1 (Snail), Snail 2 (Slug) (Pena *et al.*, 2005) ...

Dans d'autres cas, la perte de E-cadhérine provient d'un processus mutationnel initial qui peut même être considéré comme initiateur de la néoplasie notamment dans les formes familiales de carcinome gastrique diffus à cellules indépendantes (Rodriguez-Sanjuan *et al.*, 2006).

### ***Les cancers coliques et la TEM***

En cancérologie colique, est-ce que les critères définis plus haut s'appliquent aux adénocarcinomes ? En d'autres termes, peut-on les re-classer dans les 4 catégories (de 0 à 3) définies par Klymkowsky *et*

Savagner ?

Dans leur revue générale sur TEM et cancer, Klymkowsky et Savagner incluent les adénocarcinomes coliques dans le grade 3 de leur classification. Leurs arguments reposent sur la perte des cytokératines par les cellules tumorales et le gain d'expression de la vimentine. L'inclusion des adénocarcinomes coliques dans le grade 3 de la classification est manifestement à reconsidérer dans la mesure où dans la majorité d'entre eux, l'expression d'un sous-type de cytokératine (CK20, CK18) est maintenue. Il est bien clair que les critères de TEM dans les cancers coliques sont largement à revoir et doivent inclure un ensemble de marqueurs comprenant les molécules d'adhésion intercellulaire comme la E-cadhérine, ainsi que des molécules impliquées dans l'adhésion à la matrice, et dans la migration. Nous rejoignons ici l'article n°2 de la thèse où nous proposons de nouveaux critères de pseudo-TEM.

A côté d'une TEM intéressant la totalité de la tumeur, plusieurs auteurs ont décrit un phénotype de TEM uniquement présent au niveau du **front d'invasion de la tumeur**, renforçant l'idée que cette transformation des cellules puisse participer à la dissémination métastatique. Dans une série de 72 cas de CCR bien différenciés métastatiques, Brabletz *et al.* (2001) décrivent le phénotype et l'immunophénotype (expression de E-cadhérine et de  $\beta$ -caténine par IHC) des cellules tumorales dans la partie centrale et au niveau du front d'invasion de la tumeur primitive et des métastases. Ils montrent la présence d'un patron identique dans la tumeur et la métastase associant 1) dans la partie centrale, des cellules tumorales cohésives avec une expression membranaire de la E-cadhérine (60% des cas) et un marquage membranaire et cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine et, 2) au niveau du front d'invasion, des cellules peu cohésives fusiformes, une absence de marquage ou un marquage cytoplasmique de la E-cadhérine et un intense marquage nucléaire et cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine. Ces auteurs ont voulu savoir si la mutation *APC* était une condition nécessaire à ces changements morphologiques et immunophénotypiques. Dans les tumeurs analysées, ils observent une perte d'hétérozygotie, une mutation d'*APC* (11/21) ou une mutation de la  $\beta$ -caténine (2/21) dans 13/21 cas. Cette observation souligne que ces changements ne dépendent pas nécessairement d'altérations génétiques de ces gènes et dépendent peut-être de signaux extérieurs du microenvironnement (Brabletz *et al.*, 2001).

Parallèlement, Prall *et al.*, (2005) décrivent le **phénomène de «budding»** ou bourgeonnement cellulaire au niveau du front d'invasion des CRC. Ils le définissent par la présence de cellules isolées ou regroupées en petits amas, détachées des glandes tumorales au niveau du front d'invasion. Ces cellules, décrites par différents auteurs, se caractérisent par un immunophénotype particulier : perte de la E-cadhérine et induction de la N-cadhérine, expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine, présence de la vimentine, accumulation intracytoplasmique de la chaîne  $\gamma 2$  de la laminine, surexpression de certaines métalloprotéases comme la matrilysine (Pyke *et al.*, 1995 ; Brabletz *et al.*, 1998). Il existe donc

d'importantes analogies entre le phénomène de «budding» et celui de la TEM. Le phénomène de «budding» représente vraisemblablement un des phénotypes pseudo-TEM propre au cancer colorectal (Prall *et al.*, 2005).

### *La modélisation de la TEM en cancérologie colique : à la recherche d'une subordination*

La modélisation *in vitro* à partir de lignées cancéreuses coliques humaines permet une vue dynamique des modifications, et donc permet de cerner un phénomène qui peut être réversible. Le terme réversible signifie que «des cellules tumorales pourraient transitoirement exprimer un phénotype TEM à un moment clé de la progression tumorale (front d'invasion, processus métastatique) et par la suite revenir à un état de non TEM». En d'autres termes, on ne peut pas éliminer l'hypothèse selon laquelle les cellules tumorales pourraient passer du grade 1 à 3 et revenir au grade 0. L'approche par culture *in vitro* permet de conforter ou non cette hypothèse. Un autre intérêt de cette approche consiste à rechercher par une étude à large spectre les protéines ou les gènes dont l'expression est modifiée au cours du processus de TEM, ce qui peut amener à l'identification de nouveaux biomarqueurs de TEM. Enfin, l'approche *in vitro* permet de modéliser plus ou moins fidèlement le rôle de tel ou tel gène dans la TEM (étude des effets biologiques de l'inactivation d'un gène d'intérêt dans des cellules en culture).

Nous insisterons dans ce paragraphe sur 3 approches *in vitro* de la TEM à partir de lignées cancéreuses coliques humaines : il s'agit du modèle des « sphéroïdes » utilisé par Bates *et al.* (2005), celui décrit par Kim *et al.* (2010) et le « modèle d'invasion des sphéroïdes » utilisé par Brabletz *et al.* (2001).

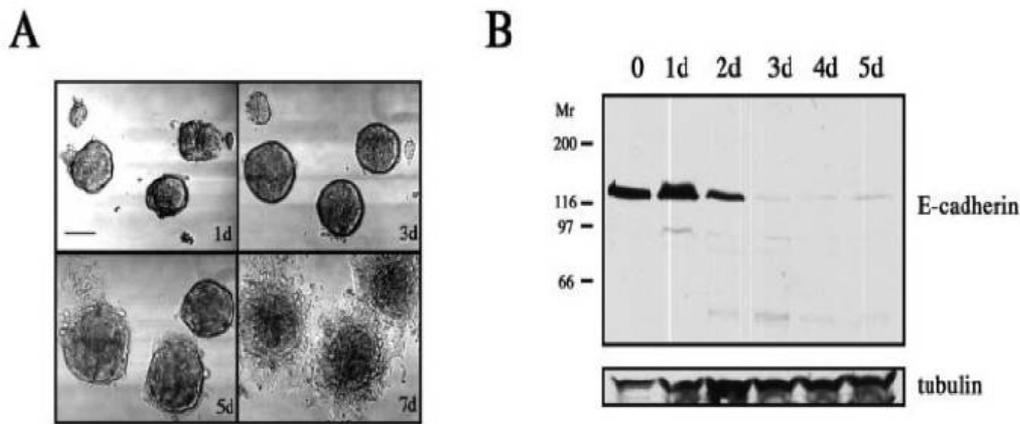
#### □ Le modèle des « sphéroïdes »

Ce modèle utilise une lignée cellulaire carcinomateuse humaine LIM 1863, issue d'une tumeur colique décrite initialement comme «peu différenciée» (Whitehead *et al.*, 1987). Cette lignée cellulaire, développée en 1987 par Whitehead, est constituée par des cellules carcinomateuses bien différenciées qui prolifèrent de façon autonome en suspension sous forme de sphères, très organoïdes, organisées autour d'une lumière centrale. Les cellules sont bien différenciées, de phénotype entérocytaire ou de type mucosécrétant). Elles sont polarisées, cohésives avec des jonctions serrées, la cohésion des cellules étant dépendante du calcium (Hayward *et al.*, 1992). Ce modèle possède plusieurs intérêts : il croît **spontanément** de façon tridimensionnelle (sans artifice de culture cellulaire à base de matrice cellulaire de collagène, ou de système de rotation..), il reproduit la structure d'une glande, **très organoïde** par rapport aux autres lignées cellulaires qui se développent sur monocouche. Il est constitué de **cellules**

**différenciées, polarisées et cohésives avec expression de la E-cadhérine.** Ce système apparaît tout à fait approprié pour essayer d'induire une TEM. Bates *et al.* (2003) ont induit une TEM dans ces cellules en les traitant par le TGF $\beta$ . Les cellules deviennent plus fusiformes, adhèrent au substrat (en réalisant une monocouche) et migrent. On constate parallèlement à ces changements morphologiques et fonctionnels des changements moléculaires avec une disparition de la E-cadhérine, molécule d'adhésion clé dans le processus de TEM (Figure 10).

Cette induction de TEM est facilitée par l'utilisation de TNF $\alpha$ , produit initialement par des macrophages activés mis en co-culture avec les cellules LIM1863. Cet exemple illustre l'intérêt de ce modèle qui permet d'étudier le processus de TEM et d'évoquer les facteurs de subordination de ce processus, et donc de proposer éventuellement des cibles thérapeutiques potentielles.

Ce modèle est très intéressant mais pose une question : quelle est la généralisation de ce concept développé à partir d'une seule lignée cellulaire tumorale ? On doit garder à l'esprit le fait que, dans nombre de cancers coliques, en particulier MSI, il existe une insensibilité au TGF $\beta$  notamment due aux mutations de *TGF $\beta$ RII* (Markowitz *et al.*, 1995 ; Fujiwara *et al.*, 1998). On peut donc se demander si cette insensibilité de certains CCR au TGF $\beta$  limite la capacité d'effectuer une TEM. Pino *et al.* (2010) montrent dans des lignées cellulaires coliques MSI, l'existence d'une mutation de *TGF $\beta$ RII*, qui rend insensible ces lignées à une TEM induite par le TGF $\beta$ .



**Figure 10 : Induction d’une TEM par le TGFβ dans la lignée organoïde LIM 1863.** (A) Changements morphologiques documentés par microscopie en contraste de phase à 1, 3, 5 et 7 jours après traitement par le TGFβ. (B) : La perte de la E-cadherine caractérise la TEM. Immunoblot réalisé à différents temps sur les extraits cellulaires. D’après Bates *et al.*, 2005.

Plus récemment, Bates *et al.* (2005) ont montré dans leur modèle de TEM précédemment décrit, une augmentation de l’intégrine  $\alpha\beta6$ , marqueur mésenchymateux, récepteur de la ténascine et de la fibronectine. Dans ce modèle, ils démontrent que les cellules post-TEM ont acquis des propriétés de migration (test sur plaque de fibronectine) par rapport à la lignée sans TEM. Cet effet est aboli par l’utilisation d’un anticorps neutralisant anti- $\beta6$ . Ces auteurs montrent que les cellules post-TEM, ayant acquis l’intégrine  $\beta6$ , sécrètent du TGFβ, sécrétion qui participe à la pérennisation du phénotype TEM. Ainsi, l’utilisation de ce modèle *in vitro* a permis d’évoquer le rôle de l’intégrine  $\alpha\beta6$  dans le processus de TEM. De façon intéressante, ils démontrent dans une série de 488 CCR l’intérêt de cette intégrine comme facteur pronostique. Dans leur série, ils montrent qu’une expression élevée de  $\beta6$  est associée à une survie plus courte. Cette association est particulièrement intéressante pour les tumeurs de stade précoce.

□ La lignée colique SW480

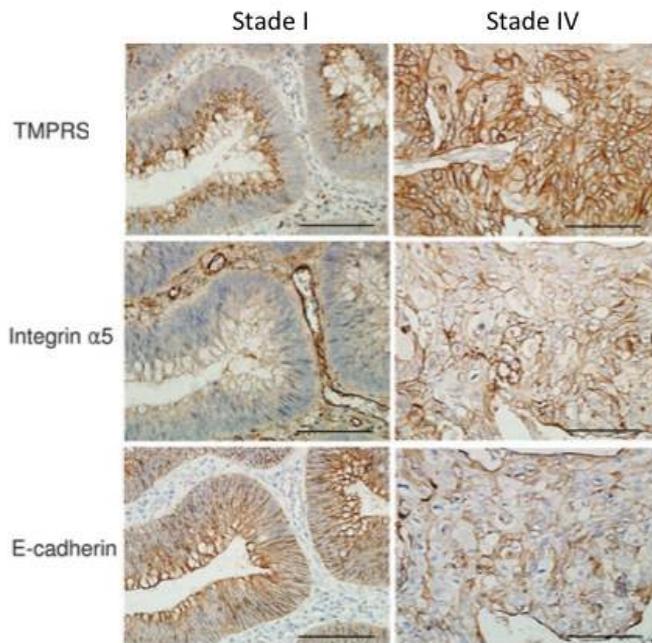
Une lignée plus «classique», la lignée carcinomateuse colique SW480 dont la croissance est en monocouche, est utilisée pour explorer la TEM. Jung *et al.* (2008) induisent une TEM dans cette lignée par transfection d’une sérine protéase transmembranaire de type II (TMPRSS4). L’intérêt porté à cette

protéine vient du fait que plusieurs auteurs ont constaté une augmentation de son expression dans des cancers pancréatiques (Wallrapp *et al.*, 2000) mais également dans les cancers coliques et pulmonaires (Park *et al.*, résultats non publiés), sans que l'on comprenne sa signification. Jung *et al.* (2008) observent une augmentation importante de l'expression de cette protéine dans la majorité des lignées cellulaires (HT29, Caco2..) excepté dans la lignée SW480 où son expression est faible.

La transfection de TMPRSS4 dans cette dernière lignée entraîne un phénotype de type TEM : les cellules transfectées sont plus allongées et moins cohésives. Elles sont mobiles, adhèrent plus facilement à la matrice extracellulaire (plaque recouverte de collagène ou de fibronectine..). Ces nouvelles propriétés fonctionnelles apparaissent spécifiques puisqu'elles disparaissent par des tests d'inhibition spécifique au niveau ARN (siRNA) ou protéique (inhibiteur de sérine protéase). Le phénotype TEM est observé au niveau moléculaire : perte membranaire de la E-cadhérine et de ZO1, augmentation des marqueurs mésenchymateux (actine musculaire lisse, cadherine-11), et réorganisation du réseau d'actine avec apparition de fibres de stress. Cette diminution d'expression de la E-cadhérine s'accompagne d'une induction de SIP1/ZEB2, inhibiteurs transcriptionnels de la E-cadhérine. Ces auteurs montrent que l'injection de ces cellules transfectées chez la souris nude entraînent plus de métastases hépatiques par rapport aux souris contrôles (Jung *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces données suggère que TMPRSS4 contrôle l'invasion et le potentiel métastatique des cellules cancéreuses humaines en facilitant l'apparition d'une TEM. Plus récemment, ces auteurs ont continué d'explorer les mécanismes de la TEM par hyperexpression de la TMPRSS4 dans cette même lignée. Ils montrent que cette transfection entraîne une activation de différentes protéines (FAK, ERK...) mais surtout une augmentation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . La diminution d'expression de la E-cadhérine ne permet pas d'obtenir une TEM complète (absence de migration cellulaire). L'utilisation d'un inhibiteur de cette intégrine (anticorps clone IIA1) entraîne une régression du phénotype TEM.

L'hyperexpression par transfection de cette intégrine dans la lignée entraîne un phénotype complet de TEM. Il apparaît que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est fondamentale dans l'induction de la TEM par transfection de TMPRSS4.

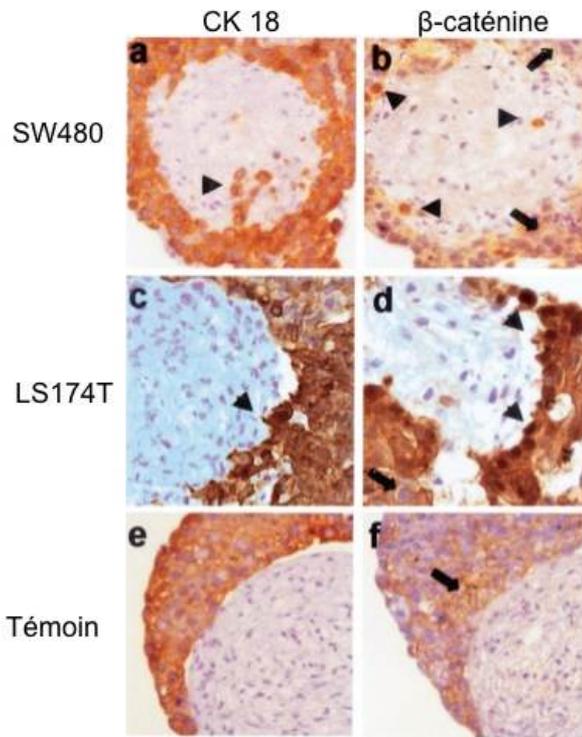


**Figure 11 : Expression de TMPRSS4, de l'intégrine  $\alpha 5$  et de la E-cadhérine dans les CCR de stades I et IV par immunohistochimie.** CCR de stade I (colonne de gauche) : faible expression de TMPRSS4, absence d'expression de l'intégrine  $\alpha 5$  et expression membranaire de la E-cadhérine. CCR de stade IV (colonne de droite) : forte expression de TMPRSS4, acquisition de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5$  et expression anormale de la E-cadhérine. D'après Kim *et al.* (2010).

Ces auteurs ont recherché s'il existait une association entre l'expression de TMPRSS4 et de  $\alpha 5\beta 1$  par immunohistochimie dans une série de CCR de stades différents. Ils montrent que l'expression de TMPRSS4 est plus élevée dans les cancers de stade plus avancé (Figure 11). De plus, cette augmentation d'expression de TMPRSS4 est associée de façon significative à une augmentation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Kim *et al.*, 2010).

Le modèle de « l'invasion des sphéroïdes » utilisé par Brabletz

Ce modèle, décrit par Kunz-Schughart *et al.* en 1999, utilisé par Brabletz *et al.* (2001) consiste en une co-culture de lignées coliques humaines avec des fibroblastes disposés en une sphère. Le but de cette construction est de modéliser l'invasion tumorale au niveau du front d'invasion et donc d'étudier le phénotype des cellules épithéliales coliques pénétrant dans cette sphère mésenchymateuse.



**Figure 12 : Accumulation nucléaire de la  $\beta$ -caténine dans les cellules SW480 infiltrant la sphère.**

La cytokératine 18 (CK18) marque les cellules tumorales entourant ou infiltrant la sphère fibroblastique (a et c). Les cellules infiltrantes ou celles situées au niveau du front d'invasion (pointe de flèche) présentent une accumulation nucléaire de  $\beta$ -caténine, alors que la majorité des cellules cohésives ne présentent pas d'accumulation nucléaire de  $\beta$ -caténine (flèche) (b et d). D'après Brabletz *et al.*, 2001.

Deux lignées coliques humaines ont été utilisées : la lignée SW480 (*APC* mutée) et la lignée LS174T ( $\beta$ -caténine mutée).

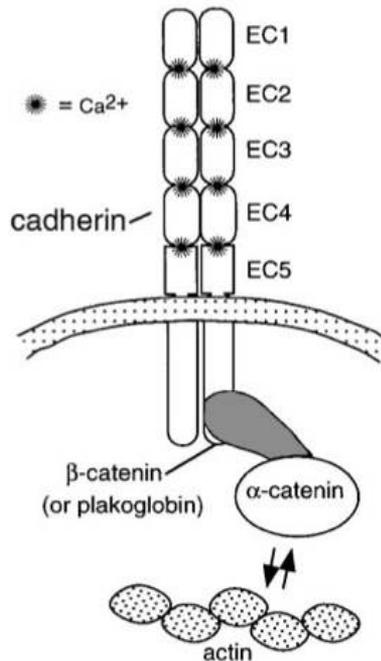
Seules les cellules SW480 infiltrantes et au contact des fibroblastes de la sphère présentent une accumulation nucléaire de  $\beta$ -caténine. La lignée LS174T est moins infiltrante ; cependant, les cellules au contact des fibroblastes présentent également une accumulation nucléaire de  $\beta$ -caténine. On note une absence d'accumulation nucléaire de  $\beta$ -caténine dans la lignée témoin non invasive (Figure 12). Ces résultats montrent que le phénomène invasif est associé avec la translocation nucléaire de  $\beta$ -caténine.

Ce modèle montre que l'accumulation nucléaire de  $\beta$ -caténine n'est pas la conséquence d'une mutation d'*APC* seule mais qu'elle peut être modulée par des signaux externes. Il souligne que la TEM observée au niveau du front d'invasion peut être un phénomène transitoire dépendant du microenvironnement (Brabletz *et al.*, 2001).

Ces données montrent l'intérêt de la modélisation pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires auxquels la TEM est subordonnée. La Figure 13 illustre la complexité des mécanismes moléculaires



intracytoplasmique et un domaine extracellulaire permettant l'interaction cellule-cellule (Figure 14).



**Figure 14: Structure du complexe Cadhérine-caténine.** D'après Yap *et al.*, 2007.

Ce domaine extracellulaire est constitué de 5 répétitions de type “cadhérine” (EC1 à 5, séparées les unes des autres par des sites de fixation au calcium) qui interagissent avec les molécules des cadhérines voisines (interaction homotypique) dépendante du calcium, pour former une molécule “zip” continue d'adhésion cellulaire. (Shapiro *et al.*, 1995 ; Nagar *et al.*, 1996). Son interaction avec le cytosquelette et les microfilaments d'actine passe par le complexe de la famille des caténines (β-caténine ou γ-caténine). Le complexe E-cadhérine-β-caténine ou γ-caténine interagit avec le cytosquelette via la α-caténine (Yap *et al.*, 1997). Ainsi, il existe un véritable continuum moléculaire entre le cytosquelette de cellules adjacentes (Figure 14).

#### ***Expression de E-cadhérine dans la muqueuse colique normale et dans les CCR***

Dans la muqueuse colique normale, cette molécule est exprimée au pôle baso-latéral des colonocytes de toute la crypte (Savas *et al.*, 2007). Cette expression participe à l'intégrité de la muqueuse. La majorité des études montrent une diminution de l'expression de la E-cadhérine dans les CCR (Tableau V). On observe soit une perte complète d'expression soit une diminution partielle et/ou une redistribution cytoplasmique de la E-cadhérine. Cette modification d'expression apparaît souvent hétérogène au sein

de la tumeur, ou bien observée dans la partie centrale et/ou au niveau du front d'invasion (Kinsella *et al.*, 1992 ; Nigam *et al.*, 1993 ; Rosivatz *et al.*, 2004 ; Ngam *et al.*, 2007).

***Signification de la perte de la E-cadhérine dans les CCR : les données apportées par l'examen des CCR***

- Valeur pronostique de la E-cadhérine ?

De nombreuses études ont été réalisées pour essayer de démontrer une relation entre la diminution et/ou l'expression cytoplasmique de la E-cadhérine et des facteurs pronostiques tels le stade ou l'invasion métastatique. Les résultats sont très discordants avec parfois des corrélations (Ngan *et al.*, 2007 ; Garinis *et al.*, 2002) mais dans d'autres cas aucune relation (Kinsella *et al.*, 1992 ; Nigam *et al.*, 1993 ; Ilyas *et al.*, 1997, El-Bahrawy *et al.*, 2001) (Tableau V).

Nb de cas	Marqueurs	Expression	Corrélations	Auteurs
30 cas	E-cadhérine IHC, HIS	T>N (marquage cytopl. )  - marquage membranaire (7% des cas)	Pas de corrélation avec le stade et le grade Corrélation avec tumeurs peu différenciées	El- Bahrawy <i>et al.</i> 2001
140 cas Stade II, III	E-cadhérine IHC	T<N (- membranaire (61% des cas)	Corrélation avec la survie (stade II)	Ngan <i>et al.</i> 2007
40 cas	E-cadhérine IF	T<N (18/40 = 45%)	Pas de corrélation avec le stade	Kinsella <i>et al.</i> 1992
28 cas	E-cadhérine IHC	T<N (8/28 = 28%)  T<N dans 100% des tumeurs peu différenciées (5/5)	Pas de corrélation avec le stade Corrélation avec tumeur peu différenciée	Nigam <i>et al.</i> 1993
68 cas 22 RER+ 32 RER- 14 CCR avec MICI	E-cadhérine IHC  Perte allélique <i>CDH1</i>  Anomalie de l'exon 16	T<N (27/68 = 38%)  4/40 (10%)  3/22 RER+ (14%) (uniquement observé dans ce groupe)	Pas d'association avec le grade, le statut RER... Pas d'association avec RER  Pas d'association entre la - de E-cadherine et les anomalies génétiques	Ilyas <i>et al.</i> 1997
63 cas	E-cadhérine IHC :  E-cadhérine :ARN m  Méthylation du promoteur	T<N 21/63 = 33%  - ARNm (29/61 = 47%)  Méthylation dans 34/61=56% Parmi 34 cas méthylés, 15/34 présentent -ARNm et p	Association entre la présence de E-cadhérine et l'absence de métastases ganglionnaires  Association entre la - de ARNm et la présence de métastases ganglionnaires N+  Association entre - E- cadhérine et la méthylation du promoteur	Garinis <i>et al.</i> 2002
80 cas	E-cadhérine IHC N-cadhérine IHC-ARN  Facteurs de transcription répresseurs de CDH1ARN	E-cadhérine T<N (15/80 = 19%) Apparition de N- cadhérine (35/80 ; 44%)	La de N-cadherine est associée à une E-cadherine normale  Pas d'anomalie de Twist, SNAIL et SIP1	Rosivatz <i>et al.</i> 2004
114 cas	E-cadhérine IHC, ARNm  Facteurs de transcription répresseur de CDH1 (SNAIL..) ARNm	SNAIL (72/114 = 63%)  IHC=ARNm	Association entre SNAIL et diminution des ARNm de E-cadhérine (excepté dans le groupe avec de ZEB1) Association entre - ARNm E-cadhérine et la faible différenciation et métastases ganglionnaires	Pena <i>et al.</i> 2005

**Tableau V: Expression de la E-cadhérine dans les carcinomes colorectaux (CCR) et corrélation avec les paramètres clinicopathologiques.** L'expression de E-cadhérine est évaluée dans le tissu tumoral (T) et le tissu normal (N) par immunohistochimie (IHC), immunofluorescence (IF) et/ou par des techniques de RT-PCR pour l'ARNm. IHC : immunohistochimie ; CDH1 : gène de la E-cadhérine. MICI : maladie inflammatoire chronique intestinale.

Ces discordances résultent notamment des différentes méthodologies utilisées comme l'analyse de l'ARNm, les études par Western-blot et les études immunohistochimiques avec des anticorps différents dirigés contre les domaines extracellulaires ou intracellulaires. De plus, l'interprétation de l'immunomarquage obtenu est variable selon les articles, avec une prise en compte du marquage cytoplasmique ou membranaire de la E-cadhérine. Le seuil retenu comme négatif ou correspondant à une diminution d'expression de la E-cadhérine est également variable selon les études. D'autre part, comme la E-cadhérine appartient au complexe E-cadhérine- $\beta$ -caténine, l'analyse isolée de la E-cadhérine semble insuffisante pour rendre compte de l'état de ce complexe.

□ E-cadhérine et différenciation tumorale – TEM

Plusieurs auteurs se sont intéressés au rôle de la E-cadhérine dans la différenciation tumorale. Il a été rapporté que l'expression de la E-cadhérine était diminuée dans les tumeurs sporadiques peu différenciées, notamment de l'estomac (Oka *et al.*, 1992), de la prostate (Schlken *et al.*, 1992) et de la thyroïde (Brabant *et al.*, 1993). Par contre, cette perte d'expression est absente ou moins marquée dans les cancers bien différenciés comme les carcinomes infiltrants mammaires (Moll *et al.*, 1993) et les cancers gastriques de type intestinaux (Oka *et al.*, 1992).

Dans les CCR, plusieurs observations décrivent une association entre la perte d'expression de la E-cadhérine et le caractère peu différencié des tumeurs (Nigam *et al.*, 1993 ; El-Bahrawy *et al.*, 2001). D'autre part, dans les cancers du côlon, certains auteurs ont décrit une perte d'expression de la E-cadhérine hétérogène dans toute la tumeur, plus volontiers observée au niveau du front d'invasion de la tumeur, là où les cellules apparaissent plus fusiformes. Bates décrit une acquisition de l'intégrine mésenchymateuse  $\alpha\beta 6$  dans ces cellules du front d'invasion (Bates *et al.*, 2005). De plus, Rosivatz *et al.* (2004) se sont intéressés à l'expression de la N-cadhérine (marqueur mésenchymateux décrit dans la TEM) et de la E-cadhérine dans une série de 80 CCR. Ils décrivent une acquisition de ce marqueur dans 44% des cas. Cette expression est le plus souvent associée à une expression membranaire normale de la E-cadhérine. Les mécanismes de ces régulations sont loin d'être élucidés : la N-cadhérine pourrait avoir un effet dominant sur la E-cadhérine si l'on se rapporte à l'expérience de Nieman *et al.*. Ces auteurs montrent que la transfection de N-cadhérine dans une lignée cellulaire de carcinome mammaire entraîne une augmentation de la mobilité indépendamment du statut de la E-cadhérine (Nieman *et al.*, 1999).

Ces éléments suggèrent qu'au niveau du front d'invasion, la perte de la E-cadhérine est plus à considérer comme un facteur de TEM ou de pseudo-TEM comme nous l'avons décrit précédemment.

### *Les modèles d'études de la E-cadhérine*

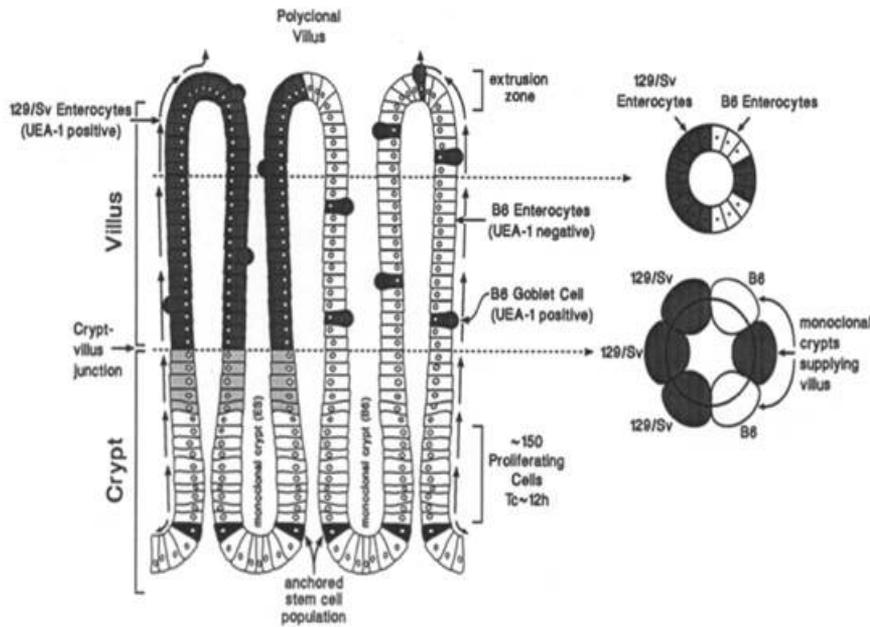
Il était donc important d'essayer de modéliser le rôle de la E-cadherine dans la progression tumorale en se posant deux questions :

- 1) Quelles sont les conséquences biologiques de la suppression de la E-cadhérine dans des cellules épithéliales normales (rôle dans l'oncogénèse?) et dans les cellules tumorales ?
- 2) La perte d'expression de la E-cadhérine est-elle liée à un statut particulier de son gène ?

□ Modélisation chez l'animal de la E-cadhérine

Le modèle le plus abouti des conséquences de l'inactivation de la E-cadhérine a été rapporté par Hermiston *et* Gordon (1995). Comme la déficience en E-cadhérine est rapidement létale dans la période embryonnaire précoce (Larue *et al.*, 1994), il n'a pas été possible de définir les fonctions physiologiques des cadhérines pendant et après l'organogenèse. Hermiston *et* Gordon ont réussi à contourner ce problème en créant une chimère, en introduisant des cellules embryonnaires (129/Sv) transfectées avec la N-cadhérine mutée (sous le contrôle d'un promoteur actif dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle) dans des blastocytes d'une souris C57BL/6 en utilisant la propriété dominante négative de cette forme de N-cadhérine. Ainsi, cette construction permet d'induire une perte d'expression de la E-cadhérine, soit uniquement dans les cellules intestinales différenciées post-mitotiques (Hermiston *et* Gordon, 1995a), soit à la fois dans les cellules souches et les cellules intestinales différenciées (Hermiston *et* Gordon, 1995b). Il s'agit pour cette équipe d'obtenir un intestin chimérique dans lequel seules certaines cryptes et ou parties de cryptes ont une perte de E-cadhérine. Ainsi, il existe au sein de l'intestin un témoin normal (cellules non transfectées) auquel on peut comparer les effets de la perte de E-cadhérine (Figure 15).

Ces auteurs montrent que les cellules transfectées perdent leur différenciation (perte de la bordure en brosse), sont moins cohésives et deviennent plus fusiformes. La production de mucus en surface est discontinuée avec pullulation d'amas de bactéries Gram négatives. Ces données traduisent une rupture de la barrière épithéliale. De plus les cellules migrent plus rapidement le long de la crypte et présentent une apoptose plus précoce (test de TUNEL).



**Figure 15 : Vue schématique de l'intestin grêle d'une souris adulte chimérique C57BL6-129/Sv permettant d'induire une perte d'expression de la E-cadhérine dans certaines cryptes ou une partie des cryptes.** Les cellules intestinales transfectées (129/Sv) se distinguent des cellules intestinales contrôles B6 par leur capacité à fixer le UEA-1 (L- a-fucose –specific lectin). D'après Herminston *et* Gordon, 1995a.

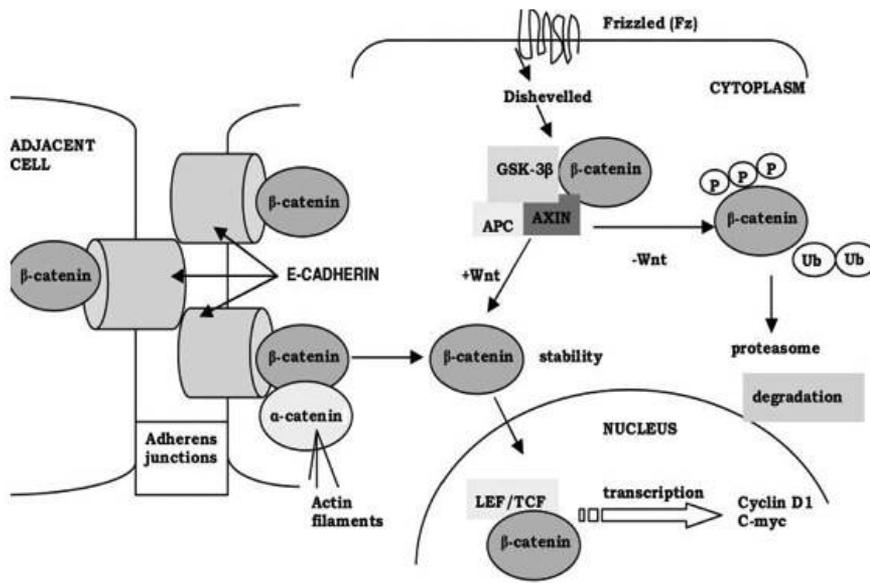
Mais, il n'est pas observé d'adénomes (Herminston *et* Gordon, 1995a). Par contre, l'induction d'une diminution d'expression de la E-cadhérine dans l'ensemble des cellules de l'axe crypto-villositaire, y compris les cellules souches, entraîne une colite inflammatoire de type Crohn et surtout des adénomes dès 3 mois avec une progression vers un adénocarcinome à partir de 19 mois de vie (Herminston *et* Gordon, 1995b).

Ces études ont un double intérêt : 1) Sur le plan physiologique, elles montrent l'importance de la E-cadhérine dans le maintien de la barrière épithéliale ; 2) Sur le plan de l'oncogenèse, elles montrent que la perte de la E-cadhérine entraîne un processus tumoral selon un modèle de perte de gène suppresseur de tumeur. Cependant, on ne sait pas si la tumorigenèse est un phénomène primitif ou est secondaire à l'inflammation.

De plus, cette survenue d'adénomes est très évocatrice, bien que se situant dans un contexte différent, des résultats de la mutation *APC* dans les souris *Apc<sup>Min/+</sup>*.

*Peut-on envisager un lien entre ces deux modèles ?*

L'effet de la E-cadhérine converge vers la rétention, la libération et/ou la dégradation de la  $\beta$ -caténine via le complexe APC-GSK3 $\beta$ . Lorsque l'un des composants du complexe est manquant, il y a une accumulation cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine avec translocation nucléaire de celle-ci. Dans le modèle de la souris *Min*<sup>+</sup> et dans celui de Gordon, on peut supposer que la libération de la  $\beta$ -caténine suivie d'une translocation nucléaire apparaît comme une force motrice d'initiation d'adénome. La Figure 16 illustre les différentes voies d'accumulation et de translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine.



**Figure 16 : Le complexe E-cadhérine-  $\beta$ -caténine. Les voies d'accumulation et de translocation nucléaire de  $\beta$ -caténine.** D'après Tsanou *et al.*, 2008.

□ Les lignées cellulaires

Les lignées cancéreuses coliques humaines apportent un nouvel éclairage sur le rôle de la E-cadhérine, cette fois-ci non plus dans l'oncogenèse mais dans la biologie des cellules tumorales elles-mêmes. Il est relativement facile soit d'inhiber la production de E-cadhérine dans des cellules tumorales par une technologie de siRNA, soit de restaurer la E-cadhérine par transfection dans une lignée qui ne l'exprime pas. Nous nous intéresserons aux effets de la transfection de la E-cadhérine dans une lignée qui

spontanément ne l'exprime pas. Efstathiou *et al.* (1999) ont transfecté le cDNA de la E-cadhérine dans la lignée cancéreuse colique humaine LS174T. Cette lignée transfectée (LSBAT17) présente une capacité d'adhésion intercellulaire augmentée, mise en évidence par test d'agrégation cellulaire (évaluation en fonction du temps du pourcentage de cellules isolées par rapport aux cellules agrégées). La spécificité de cet effet est confirmée par l'utilisation d'un anticorps bloquant la E-cadhérine (DECMA-1) qui annule cette agrégation de cellules. De plus, cette transfection entraîne l'apparition d'une polarité cellulaire, mise en évidence sur gel de collagène. Les cellules LSBAT17 sont plus cohésives et forment des amas bien organisés avec des noyaux en position basale, contre le collagène. Ces cellules transfectées ont une croissance cellulaire moindre par rapport aux lignées contrôles (lignées transfectées avec le plasmide vide). Cette transfection restaure le complexe E-cadhérine- $\beta$ -caténine, annulant la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine qui est un moteur de prolifération.

Ces auteurs ont voulu savoir quelles étaient les conséquences de cette transfection sur le complexe E-cadhérine- $\beta$ -caténine. L'étude par immunofluorescence de ces cellules transfectées par rapport aux lignées témoins non transfectées confirmaient une expression membranaire de la E-cadhérine qui était associée à une expression de l' $\alpha$ -caténine et une augmentation de l'expression cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine. Enfin, ces auteurs montrent *in vivo* que cette transfection diminue l'invasion cellulaire. L'injection de la lignée transfectée (LSBAT17) chez la souris nude entraîne une tumeur de plus petite taille par rapport à celle observée chez la souris nude contrôle (injection de la lignée parentale non transfectée, déficiente en E-cadhérine (LS174T) (Efstathiou *et al.*, 1999). Ces données soulignent le rôle de la E-cadhérine via le complexe E-cadhérine- $\beta$ -caténine dans différents mécanismes incluant la polarité cellulaire, l'adhésion intercellulaire, la croissance et la migration cellulaire tumorale.

***Est ce que la perte ou la diminution de la E-cadhérine est en relation avec/ou subordonnée à un statut particulier du gène CDH1?***

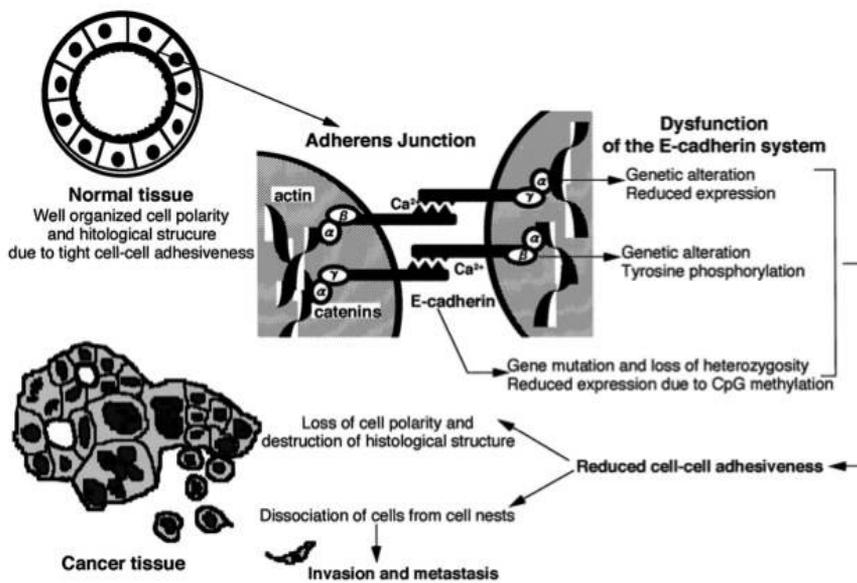
Deux mécanismes essentiels rendent compte de la perte et/ou de la diminution de l'expression de la E-cadhérine dans les carcinomes : il s'agit de la perte d'hétérozygotie (16q) ou de la mutation du gène de la E-cadhérine (*CDH1*), et de l'hyperméthylation du promoteur de ce gène (Figure 17). Dans les CCR, la diminution de la E-cadhérine est rarement attribuée à une mutation du gène de la E-cadhérine (*CDH1*) (Ilyas *et al.*, 1997) contrairement aux carcinomes mammaires lobulaires (Berx *et al.*, 1996) ou aux carcinomes gastriques diffus (Muta *et al.*, 1996).

Efstathiou *et al.* ont détecté une mutation inactivatrice de la E-cadhérine dans seulement 7% (3/43) des lignées cancéreuses coliques testées (Efstathiou *et al.*, 1999).

Dans l'étude d'Ilyas, incluant 68 CCR (22 RER+, 32 RER-, 14 CCR inflammatoires), il observe une

perte allélique dans seulement 10% des tumeurs (4/40) et une délétion au sein de l'exon 16 dans 14% des tumeurs RER+ (3/22). Dans cette étude, ils n'observent pas de corrélation entre ces modifications du gène et l'expression de la E-cadherine par immunohistochimie (Ilyas *et al.*, 1997). Comme ni les mutations ni les pertes d'hétérozygotie ne semblent jouer un rôle crucial dans l'inactivation de la E-cadherine dans les CCR, d'autres mécanismes ont été étudiés, le principal étant une méthylation du promoteur de ce gène (tableau V, page 86).

La **méthylation du promoteur du gène *CDHI*** est le mécanisme le plus fréquemment en cause dans les CCR. L'étude de Garinis *et al.* (2002) retrouve une méthylation du promoteur du gène *CDHI* dans 56% des cas étudiés (34/61). Parallèlement, l'expression de la E-cadherine a été évaluée par immunohistochimie en appréciant le pourcentage de cellules épithéliales tumorales marquées. Trois groupes ont été définis : groupe I ; 0 à 30% de cellules marquées ; groupe II : 31 à 50% de cellules marquées et groupe III : > de 50% de cellules marquées. Cette méthylation du promoteur du gène *CDHI* est associée de façon significative à une absence ou diminution extrême d'expression de la E-cadherine (groupe I en IHC, n= 21) au niveau protéique et au niveau ARN (15/34 cas (44%) ; p=0,018). Cependant, ces auteurs décrivent un certain nombre de cas présentant une diminution partielle de la E-cadherine (groupe II en IHC), sans observer de méthylation du promoteur (20/33, 60%) (Garinis *et al.*, 2002). Le mécanisme d'hyperméthylation du promoteur est décrit notamment dans les CCR survenant dans un contexte de maladie inflammatoire intestinale (Wheeler *et al.*, 2001).



**Figure 17 : Multiples mécanismes d'inactivation de la E-cadhérine dans les cancers humains, responsables d'une perte de l'adhésion cellulaire. D'après Hirohashi *et al.*, 1998.**

Parallèlement aux études qui ont porté sur une signature génique ou épigénétique (perte d'hétérozygotie, mutation du gène ou méthylation du promoteur), d'autres études montrent que l'expression de la E-cadhérine peut être modulée par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels.

Comme la E-cadhérine est impliquée dans la TEM, certains auteurs ont recherché l'existence dans les CCR de mécanismes de **répression transcriptionnelle de *CDH1*** par des facteurs inhibiteurs de la transcription qui se fixent sur les éléments E-box du promoteur de la E-cadhérine (par exemple Snail, Slug, SIP-1..), mécanismes classiquement décrits dans la TEM. Rosivatz *et al.* n'ont pas trouvé d'anomalie de Twist, Snail et SIP1 dans leur série incluant 80 cas de CCR dont 15 cas (15/80 ; 19%) présentaient une diminution d'expression de E-cadhérine (Rosivatz *et al.*, 2004). Par contre, ils montrent l'acquisition de la N-cadhérine dans 44 % des CCR avec pour ces cas une E-cadhérine normale. L'hypothèse d'un effet dominant de la N-cadhérine sur la E-cadhérine a été proposée. Péna *et al.* trouvent une augmentation du facteur de transcription Snail (ARNm) dans 63% des cas de CCR étudiés. Cette augmentation est associée à une diminution de l'ARNm de la E-cadhérine (Pena *et al.*, 2005).

De même, comme le TGF $\beta$  est impliqué dans les CCR, certains auteurs ont montré l'implication de SMAD4 dans la régulation de la E-cadhérine dans les tumeurs primitives colorectales et dans les

lignées cellulaires. SMAD4 apparaissait comme un régulateur positif des cadhérines (Müller *et al.*, 2002 ; Reinacher-Schick *et al.*, 2004).

Des phénomènes post-transcriptionnels de répression de la E-cadhérine ont également été décrits. En effet, l'intégrité structurale et fonctionnelle du complexe cadhérine-caténine est régulée par phosphorylation. Par exemple, l'hyperexpression de la tyrosine kinase Src par transfection dans une lignée colique humaine SW480 entraîne une dissociation du complexe cadhérine-caténine mis en évidence par des techniques de co-immunoprécipitation et des études de co-localisation, et une perte de l'adhésion intercellulaire calcium-dépendante. On note une translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine. Il est probable que Src agisse également sur la voie des FAK (Irby *et al.*, 2002).

Les mécanismes de régulation de la E-cadhérine sont multiples (Figure 17). Dans les CCR, la prédominance des régulations transcriptionnelles (par hyperméthylation du promoteur *CDH1* ou par répression transcriptionnelle de *CDH1*) et post-transcriptionnelles laisse supposer que cette régulation n'est pas figée dans le temps. L'analyse isolée de l'expression de la E-cadhérine est d'interprétation difficile ; elle semble mieux s'intégrer dans un patron général morphologique et immunophénotypique comme nous le proposons dans l'article n°2.

### 2.3.2. *Le contingent stromal*

Le terme de contingent stromal désigne une variété considérable de cellules, incluant le tissu de soutien de type fibroblastique et de type myofibroblastique, un contingent de cellules endothéliales, un contingent de cellules immunitaires comprenant des macrophages et des cellules lymphoïdes. Il existe des données issues de l'observation et de l'expérimentation montrant que le contingent tumoral dialogue avec les différents types cellulaires du contingent stromal par l'intermédiaire de cytokines, de facteurs de croissance mais aussi par des contacts intercellulaires impliquant l'activité de métalloprotéases, d'intégrines, de protéines ADAM (voir plus loin)...

Par l'intermédiaire de ce dialogue paracrine (correspondant à des signaux régionaux) et juxtacrine (nécessitant un contact physique entre deux cellules adjacentes) et aussi par des phénomènes plus généraux comme l'ischémie locale, s'établissent des processus morphogénétiques qui ne sont manifestement pas issus de la subordination à la génétique tumorale et qui impliquent le concept de «morphogenèse émergente ou de morphogenèse par auto-organisation liée au microenvironnement».

A ce stade de la progression tumorale au sein d'une tumeur infiltrante, il est difficile de modéliser ce remodelage en considérant la tumeur «*in toto*» et il est parfois plus utile de modéliser ce remodelage en divisant la tumeur en différents secteurs que sont le front d'invasion et le contingent central. Ce front

d'invasion est censé représenter la partie la plus récente de la tumeur, alors que la partie centrale représente le contingent le plus ancien. Avec cette division de la tumeur, il a été possible de modéliser la progression tumorale. Cette modélisation fait appel notamment pour le front d'invasion à la notion de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). On s'aperçoit alors qu'il existe une contradiction entre la notion de TEM embryologique correspondant à la réalisation d'un programme génétique et la TEM tumorale qui, dans nombre de cas, peut être considérée comme un processus émergent.

Il est une autre manière d'aborder la morphogenèse tumorale en s'intéressant plus spécifiquement à un contingent plus particulier qu'est le contingent stromal avec les cellules inflammatoires et immunitaires. Ainsi, il est possible de distinguer sur le plan de la répartition des cellules lymphoïdes au sein de la tumeur : un contingent lymphoïde extra-tumoral de type Crohn-like (sous forme d'îlots lymphoïdes avec ou non des centres germinatifs) ou de type péri-tumoral, ainsi qu'un contingent de cellules lymphoïdes dites intraépithéliales par analogie aux lymphocytes intraépithéliaux de la muqueuse normale.

En effet, dès 1986-1987, l'équipe de Jass montrait l'intérêt potentiel de quantifier cet infiltrat lymphoïde péri-tumoral pour apprécier le pronostic des cancers rectaux. Ce paramètre (présence d'un infiltrat péri-tumoral), associé à trois autres paramètres (limitation tumorale à la paroi du tube digestif, envahissement ganglionnaire, aspect du front d'invasion (bien limité ou infiltrant), permettait d'établir un score. Il était possible d'isoler plus facilement un nombre plus important de tumeurs de bon et mauvais pronostic par rapport à la classification de Dukes (Jass *et al.*, 1987). De même, la présence d'une réaction lymphoïde de type Crohn-like pouvait avoir un intérêt pronostique dans les CCR dans une étude univariée (Graham *et al.*, 1990), mais également dans une étude multivariée (Harrison *et al.*, 1995). Un peu plus tard, cette analyse de la répartition du contingent lymphoïde ainsi que la dissection des populations lymphoïdes impliquées, a permis de montrer une association encore inexplicée entre le processus oncogénétique (tumeur MSI) et le contingent stromal. Par exemple, Dolcetti *et al.* (1999) étudient de façon comparative le type de population lymphoïde (réaction Crohn-like, lymphocytes intratumoraux de phénotype T (CD3, CD8, TIA-1) activés (Granzyme B) dans une série de CCR incluant 18 tumeurs MSI et 37 tumeurs MSS. Dans cette étude multivariée, ces auteurs montrent une prévalence plus élevée des lymphocytes intra épithéliaux de types T cytotoxiques activés au sein des CCR de type MSI (Dolcetti *et al.*, 1999). L'étude d'Alexander *et al.* (2001) montre que la lymphocytose intraépithéliale est l'un des paramètres les plus discriminants pour identifier une tumeur MSI (Alexander *et al.*, 2001). De plus, il apparaît que l'analyse combinée de la population lymphoïde en intégrant les différents types d'infiltrat (Crohn-like, péri-tumoral, périglandulaire et les lymphocytes intraépithéliaux) constitue un paramètre intéressant car associé significativement à une survie plus longue indépendamment du statut ganglionnaire, du phénotype MSS/MSI (Ogino *et al.*, 2009).

Cependant, cette étude ne précise pas la valeur de ce paramètre par rapport à la classification TNM. Ainsi, il apparaît que l'analyse de la population lymphoïde est un paramètre intéressant avec une certaine valeur pronostique et que c'est plus le paramètre « lymphocytose intraépithéliale » qui semble le plus spécifiquement associé au phénotype MSI.

Une dernière approche du rôle de contingent lymphoïde intra-tumoral dans la progression tumorale, que l'on peut appeler « approche globale », consiste à rechercher une éventuelle association entre l'intensité de l'infiltrat lymphoïde et son immunophénotype d'une part et, d'autre part, la survie sans événement des patients porteurs d'un adénocarcinome colique, sans stratification selon la morphologie et le type d'oncogénèse. Ces données sont issues d'une seule équipe, celle de Pagès, dont quelques études sont rapportées ici.

Dans une étude portant sur 959 CCR, l'équipe de Pagès *et al.* (2005) étudie les relations entre les tumeurs présentant (« VELIPI + ») ou non (« VELIPI - ») des signes d'invasion précoce (vasculaire, lymphatique et/ou des embolus périnerveux), et l'intensité et le type de l'infiltrat inflammatoire (cytométrie en flux, immunohistochimie, ARNm). Ils montrent que les patients sans signe d'invasion vasculaire (VELIPI-), dont la survie est plus longue, présentent un immunophénotype différent de celui des patients « VELIPI+ ». Ces patients (VELIPI-) présentent un profil de type Th1 (IFN- $\gamma$  avec une augmentation de lymphocytes mémoires CD45RO+, CD8+, granzyme+, perforine+..) (Pagès *et al.*, 2005). Dans une série de 29 CCR de stade peu élevé (I et II), cette même équipe montre une corrélation entre la présence d'une réaction immunitaire CD45RO+, CD8+ et un meilleur pronostic (Pagès *et al.*, 2009). Dans une dernière étude incluant 108 patients et utilisant une approche « intégrative » (Q-PCR, TMA, répertoire TCR des lymphocytes T...) couplée à une analyse bioinformatique, ces auteurs montrent une corrélation entre un répertoire TCR particulier et l'expression spécifique de certaines chimiokines (CX3CL1..) et molécules d'adhésion (ICAM1..). De plus, cette étude suggère une corrélation entre un répertoire TCR particulier et la survie des patients (Mlecnik *et al.*, 2010). On peut néanmoins regretter dans ces études l'absence de stratification des CCR en fonction de la morphogénèse (type histologique), du statut MSS/MSI, ou pour le dernier article du stade pTNM, critères « standards » de l'étude des CCR.

Au terme de cette réflexion générale sur l'importance du contingent stromal, on peut conclure qu'il intervient dans le remodelage continu de la tumeur et qu'il est manifestement impliqué dans la progression tumorale. La modélisation de ses actions est extrêmement difficile du fait de l'intrication de phénomènes d'auto-organisation (ou d'émergence) et de phénomènes qui sont manifestement liés à un programme génétique particulier (MSI). On peut s'attendre donc à une hétérogénéité morphologique de la tumeur et à une hétérogénéité de la cartographie des effecteurs moléculaires de la morphogénèse

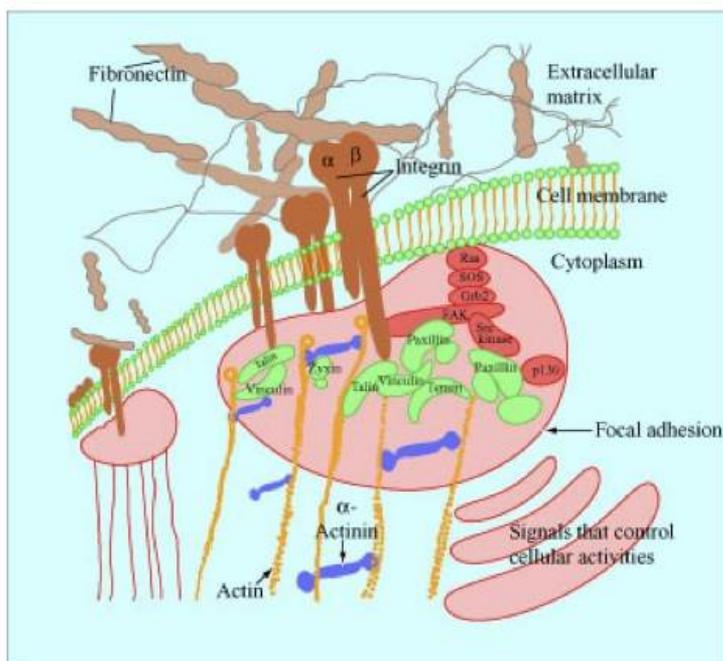
tumorale. Dans ce contexte, il est bien évident que la modélisation animale n'est pas pertinente. C'est la modélisation *in situ* par immunophénotypage qui est la meilleure approche de cette complexité.

### *2.3.3. Un exemple d'effecteur moléculaire appartenant aux deux contingents : les intégrines*

#### **Description, fonction d'adhésion, lien entre la matrice extracellulaire et le milieu intracellulaire**

Une grande partie de la littérature concernant les cancers et les intégrines a montré l'implication de cette famille de récepteurs d'adhésion dans la prolifération, la migration et la survie des cellules tumorales. Les intégrines se lient directement aux composants de la matrice extracellulaire et fournissent la traction cellulaire nécessaire à la mobilité et à l'invasion. Le remodelage de la matrice extracellulaire est aussi contrôlé par les intégrines. Outre leur effet lié à leur engagement avec des ligands spécifiques, il est maintenant assez clair que, dans certains cas, des intégrines sans ligand peuvent influencer positivement et négativement la survie tumorale (voir revues générales Ruoslahti, 1991 et Desgrosellier *et al.*, 2010).





**Figure 19 : Les intégrines : le lien entre la matrice extracellulaire et le milieu intracellulaire.**

D'après Burridge *et al.*, 1988.

Bien qu'elles puissent médier directement les interactions cellulaires, les intégrines ont un rôle fondamental dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. La séquence tripeptidique Arg-Gly-Asp (RGD), présente sur de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire (ex : fibronectine), est reconnue par les intégrines  $\alpha v$  et  $\alpha 5\beta 1$ , de même que les séquences Glu-Ile-Leu-Asp-Val (EILDV) et Arg-Glu-Asp-Val (REDV), présentes sur des formes d'épissage particulières de la fibronectine, sont reconnues par l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  (Pytela *et al.*, 1985 ; Guan *et al.*, 1990). Il ne s'agit pas là du répertoire exhaustif des séquences reconnues sur la matrice extracellulaire. En se liant aux constituants de la matrice extracellulaire, les intégrines peuvent recruter différentes protéines aux fonctions variées pour former des structures connues sous le terme «d'adhésion focale». Bien que n'ayant pas d'activité phosphokinase propre, les intégrines, en se regroupant, recrutent et activent des kinases telles que les FAKs (Focal Adhesion Kinases) et les kinases de la famille des Src (SFKs).

Les intégrines font également le lien entre la matrice extracellulaire et l'actine du cytosquelette en recrutant des protéines comme la taline, la paxilline, l' $\alpha$ -actinine, la tensine ou la vinculine (Burridge *et al.*, 1988) (Figure 19).

Les fonctions des intégrines sont dépendantes dans un certain nombre de cas de l'affinité pour leur

ligand. Une augmentation d'activité ou d'activation peut être induite par le regroupement des intégrines ou par une augmentation de signalisation intracellulaire via des protéines à fonction GTPasique (Mitra *et al.*, 2006).

### *L'expression des intégrines dans les tumeurs*

De nombreuses intégrines contribuent à la progression tumorale (Bates *et al.*, 2005 ; Adachi *et al.*, 2000 ; Vonlaufen *et al.*, 2001). Ainsi, dans les tumeurs d'origine épithéliale, certaines intégrines exprimées par les cellules épithéliales normales incluant  $\alpha6\beta4$ ,  $\alpha6\beta1$ ,  $\alpha\nu\beta5$ ,  $\alpha2\beta1$  et  $\alpha3\beta1$  sont généralement maintenues dans le contingent tumoral bien que leur niveau d'expression puisse être modifié (Choy *et al.*, 1990). Ces intégrines sont impliquées dans l'adhésion à la membrane basale mais aussi peuvent contribuer à la migration, la prolifération et la survie des cellules tumorales.

Cependant, il existe des cas où l'expression de certaines intégrines peut être différente entre la tumeur et les cellules normales correspondantes comme  $\alpha\nu\beta3$ ,  $\alpha5\beta1$  et  $\alpha\nu\beta6$ , qui sont généralement très faiblement exprimées par les tissus épithéliaux normaux adultes voir absentes, alors qu'elles peuvent être fortement exprimées dans certaines tumeurs (Bello *et al.*, 2001). Les modifications du niveau d'expression des intégrines ne vont pas toujours dans le sens d'une augmentation. Ainsi, l'expression de l'intégrine  $\alpha2\beta1$  est diminuée dans des cellules tumorales, ce qui est un facteur potentiel de dissémination tumorale. La preuve a été fournie par la réexpression de  $\alpha2\beta1$  dans les cellules cancéreuses de carcinome mammaire en culture (Mm5MT) qui aboutit à une réversion de certains caractères de malignité, suggérant que  $\alpha2\beta1$  pourrait agir dans certains cas comme un gène suppresseur de tumeur (Zutter *et al.*, 1995).

Des études de corrélation du niveau d'expression de certaines intégrines avec des paramètres tels que la progression tumorale, des métastases ou la survie des patients, montrent qu'il existe dans certains cas une association significative entre les variations d'expression des intégrines et la progression tumorale. Ainsi, Desgrosellier *et al.* (2010) ont pu établir très récemment un récapitulatif entre le niveau d'expression des intégrines et la progression tumorale (tableau VI). Comme le souligne cet auteur, cette liste est loin d'être exhaustive (Desgrosellier *et al.*, 2010 ; Yoshimura *et al.*, 2009 ; Bates *et al.*, 2005).

<b>Organe</b>	<b>Intégrine</b>	<b>Corrélation</b>	<b>Auteur</b>
Peau -Mélanome	avb3 a5b1	méta ganglionnaires	Danen <i>et al.</i> 1994
Sein	a6b4 avb3	méta osseuses - survie	Friedrichs <i>et al</i> 1995 Takayama <i>et al</i> 2005
Prostate	avb3	méta osseuses	McCabe <i>et al</i> 2007
Pancréas	avb3	méta ganglionnaires	Hosotani <i>et al</i> 2002
Col	avb6	- survie	Hazelbag <i>et al</i> 2007
Cerveau Glioblastome	avb3 avb5	Expression au niveau du front d'invasion	Bello <i>et al</i> 2001
Poumon	a5b1	- survie des patients sans méta ganglionnaires	Adachi <i>et al</i> 2000
Côlon	avb3	- survie ;méta hépatiques	Vonlaufen <i>et al</i> 2001
Côlon	a2	méta hépatiques	Yoshimura <i>et al</i> 2009
Côlon	avb6	- survie	Bates <i>et al</i> 2005

**Tableau VI : Expression des intégrines dans les tumeurs et corrélation avec le pronostic.** Tableau modifié d'après Desgrosellier *et al.*, 2010.

### **Rôle des intégrines dans le contingent tumoral**

Les intégrines, de par leur lien étroit entre le milieu extracellulaire (MEC) et le milieu intracellulaire, sont des candidates idéales dans les fonctions d'adhésion, de migration cellulaire mais aussi dans les signalisations de survie cellulaire et d'apoptose. Leurs effets varient selon le type cellulaire et l'environnement.

#### ***Migration, invasion***

L'adhésion des intégrines à la matrice extracellulaire favorise la traction cellulaire permettant l'invasion. La migration cellulaire requiert généralement la signalisation de la kinase d'adhésion focale (FAK) et des kinases de la famille des Src (Mitra *et al.*, 2006). Cependant, on décrit des effets inverses des intégrines sur la migration. Certaines intégrines comme  $\beta 1$  peuvent inhiber la mobilité cellulaire (Kren *et al.*, 2007). Il est difficile de proposer un seul schéma explicatif de l'implication des intégrines dans la migration cellulaire.

De plus, les intégrines contribuent à l'invasion cellulaire en régulant l'activité et la localisation des métalloprotéases comme celle de MMP2 (Matrix Métalloprotéase 2) et de l'urokinase-type

plasminogen activator (uPA) (Maupas-Schwalm *et al.*, 2009).

### ***Prolifération- survie - apoptose***

En plus de leur rôle dans la migration et l'adhésion cellulaire, les intégrines ont la capacité soit de promouvoir la survie cellulaire soit d'initier l'apoptose. En outre, il a été rapporté, dans des cellules épithéliales mammaires murines MCF10A, que le blocage conjoint de l'adhésion des cellules au substrat et de l'adhésion intercellulaire (blocage de la E-cadhérine), affecte l'expression de la cycline D1, ce qui suggère une régulation par les intégrines des protéines du cycle cellulaire (Fournier *et al.*, 2008). Cependant, ce travail n'approfondit pas la spécificité des intégrines mises en jeu.

Les intégrines participent à la survie des cellules par différents mécanismes tels l'augmentation de l'expression de bcl-2 (Zhang *et al.*, 1995) ou de FLIP (Aoudjit *et al.*, 2001a), l'activation de la voie de PI3K-AKT (Aoudjit *et al.*, 2001b), la signalisation NF- $\kappa$ B (Courter *et al.*, 2005) et/ou l'inactivation de p53 (Bao *et al.*, 2004). Ces voies de survie sont souvent régulées par l'interaction entre une intégrine spécifique et un récepteur de facteur de croissance. Par exemple, l'intégrine  $\alpha\beta 3$  des cellules endothéliales interagit avec le récepteur du facteur de croissance des fibroblastes FGF-R (Fibroblast Growth Factor Receptor) et empêche l'apoptose (Hood *et al.*, 2003). Cette propriété est confirmée par l'utilisation d'antagonistes dirigés contre  $\alpha\beta 3$  et  $\alpha\beta 5$ , qui entraîne la mort des cellules endothéliales et donc diminue l'angiogenèse (Scatena *et al.*, 1998). Par contre, de façon surprenante, dans les modèles de souris déficientes en  $\beta 3$  et  $\beta 5$ , l'angiogenèse n'est pas inhibée. Au contraire, on observe une augmentation de l'angiogenèse tumorale (Reynolds *et al.*, 2002). Ces auteurs ont montré qu'il n'y avait pas de recrutement d'autres intégrines, mais une augmentation du VEGFR2 dans les cellules endothéliales. Ces résultats montrent l'existence d'importantes différences entre les études impliquant des délétions génétiques et celles utilisant des antagonistes dans les modèles animaux adultes.

D'autre part, des études ont montré le rôle des intégrines dans la modulation de l'apoptose. Ainsi, des intégrines présentes sur des cellules adhérentes mais sans ligands (« unligated integrins ») peuvent entraîner une mort cellulaire apoptotique par recrutement et activation de la caspase 8. Cette mort cellulaire induite par une signalisation très particulière a reçu le nom de integrin-mediated-death (IMD) (Stupack *et al.*, 2001). L'IMD serait distincte de l'anoïkis qui elle-même est une apoptose en réponse au détachement cellulaire. De manière intéressante, il a été démontré que la perte de la caspase 8 est un des mécanismes par lequel les cellules tumorales peuvent échapper à la mort cellulaire par IMD, ce mécanisme favorisant le processus métastatique (Stupack *et al.*, 2006). On ne sait pas encore très bien quel est le niveau de participation de l'IMD dans les effets thérapeutiques entraînés par les antagonistes

des intégrines.

### *Le cas d' $\alpha 5\beta 1$ dans les cancers coliques*

Le cas de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , notamment en cancérologie colique, est intéressant pour plusieurs raisons :

Tout d'abord les travaux fondamentaux, initiés par Zhang *et al.* ont montré que l'expression de  $\alpha 5\beta 1$  peut augmenter la survie cellulaire par l'augmentation de l'expression de bcl2. Cette démonstration est fondée sur le modèle de cellules ovariennes de Hamster Chinois (CHO) dans lequel la surexpression de l'intégrine  $\alpha 5$  entraîne une survie des cellules largement améliorée, lors de l'adhésion à une matrice de fibronectine, en l'absence de sérum. Il ne s'agissait pas d'un effet non spécifique, puisque la surexpression de  $\alpha v\beta 1$  ne reproduisait pas cet effet (Zhang *et al.*, 1995).

Plus tard, l'équipe de Brattain s'est intéressée plus spécifiquement au rôle de  $\alpha 5\beta 1$  sur les propriétés tumorales de cellules cancéreuses coliques. Gong *et al.* ont examiné le niveau d'expression d' $\alpha 5\beta 1$  dans 6 lignées cancéreuses coliques humaines qui ont été classées en fonction de leur capacité d'adhésion à la fibronectine. L'expression des intégrines a été mesurée par RT-PCR quantitative. Les résultats montrent que les lignées dites hautement invasives exprimaient le plus haut niveau d' $\alpha 5\beta 1$  (ARN et protéine) alors que les lignées les moins invasives expriment faiblement  $\alpha 5\beta 1$ . Afin d'examiner le rôle de la sous-unité  $\alpha 5$  dans la progression tumorale, une expression de cette sous-unité a été faite par transfection de cellules qui ne l'expriment pas constitutivement. Cette surexpression entraînait une augmentation de la tumorigénicité chez la souris nude (Gong *et al.*, 1997).

De plus, l'expression de la sous-unité alpha 5 dans les cellules cancéreuses coliques humaines HT29 qui n'expriment que la sous-unité  $\beta 1$  (donc, la restauration de  $\alpha 5\beta 1$ ) produisait des réarrangements du cytosquelette dans les minutes suivants l'adhésion à la fibronectine, associés à la formation de fibres de stress, de complexes d'adhésion focale et à la phosphorylation de résidus tyrosine de plusieurs protéines (Schmidt *et al.*, 1998). Pour ces auteurs, il apparaît que ces modifications sont associées en fait à une réduction de tumorigénicité car dans leurs données non publiées et rapportées dans la discussion de cet article, la surexpression de  $\alpha 5\beta 1$  dans ces cellules entraînerait une diminution de la tumorigénicité par des tests *in vitro* (prolifération en milieu semi-solide) et *in vivo* chez la souris nude.

Cette apparente contradiction entre les résultats de Schmidt et de Gong pourrait provenir du fait que dans le travail de Schmidt il n'y a pas une véritable restauration de  $\alpha 5\beta 1$  mais en fait une manipulation sélective d'une sous-unité dont les résultats doivent être interprétés avec beaucoup de précaution. Plus récemment, Murillo *et al.* ont effectué une approche sur lignée cancéreuse colique humaine sur la base d'un traitement par des anticorps anti- $\alpha 5$  et des anticorps anti- $\beta 1$ . Les résultats de ce travail ont montré

que le blocage de l'intégrine  $\alpha 5$  inhibait l'adhésion des cellules cancéreuses coliques, induisait l'apoptose des cellules tumorales en association avec une diminution de l'activité de PI3 kinases. Ces auteurs vont jusqu'à suggérer une possibilité de traitement ciblé des cancers coliques par blocage de la sous-unité  $\alpha 5$  du complexe  $\alpha 5\beta 1$  (Murillo *et al.*, 2004).

De manière intéressante, dans un modèle murin de progression tumorale, il a été montré qu'un peptide inhibiteur  $\alpha 5\beta 1$  en combinaison avec le 5-Fluorouracil (5-FU) était capable de diminuer la progression tumorale (Stoeltzing *et al.*, 2003).

Ainsi donc, il apparaît que l'expression de  $\alpha 5\beta 1$  par les cellules cancéreuses coliques peut entraîner des signaux de survie et éventuellement de progression tumorale. L' $\alpha 5$  pourrait être une cible thérapeutique innovante.

Etonnamment, très peu d'auteurs ont étudié le niveau d'expression  $\alpha 5\beta 1$  dans les carcinomes coliques humains. Stallmach a étudié par immunohistochimie le niveau d'expression de plusieurs intégrines ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ...) dans 19 CCR par rapport au tissu normal adjacent. Il montre une diminution d'expression de ces intégrines dans les cellules carcinomateuses. La diminution d'expression de  $\alpha 3$  et  $\alpha 5$  était observée précocement au stade d'adénome mais était hétérogène (Stallmach *et al.*, 1992). Su *et al.* mettent également en évidence une diminution d'expression de  $\alpha 5\beta 1$  dans les CCR. Cependant, leur étude prend en compte une intensité de marquage globale sans mentionner l'expression propre de chaque cellule cancéreuse (Su *et al.*, 2002). L'étude de Gulubova décrit une expression de  $\alpha 5\beta 1$  uniquement dans le stroma des CCR et des métastases coliques hépatiques (Gulubova *et al.*, 2006). Ces études, portant sur un nombre de cas limités et/ou avec une analyse partielle de l'immunomarquage au sein des différentes populations de la tumeur, ne permettent pas de conclusion formelle.

Tout récemment, l'étude de Kim montre le rôle de TMPRSS4 (Type Two Transmembrane Serine Protease) dans l'invasion et dans la TEM dans les CCR. L'augmentation d'expression de TMPRSS4 est associée à une perte d'expression de la E-cadhérine (marqueur classique de la TEM), et à l'apparition de l'intégrine  $\alpha 5$  dans les cellules épithéliales (Kim *et al.*, 2010).

### **Rôle des intégrines dans le contingent stromal**

A côté de leur rôle fondamental au niveau du contingent tumoral, les intégrines sont également très impliquées au niveau du contingent stromal et participent donc à la réponse des cellules hôtes. Les cellules endothéliales, les cellules inflammatoires, les plaquettes vont donc utiliser les intégrines dans différentes fonctions telles l'angiogenèse, la réponse desmoplasique et la réponse immune.

## ***Angiogenèse***

L'implication des intégrines dans l'angiogenèse passe par la création de contacts intercellulaires d'adhésion mais aussi par la coopération avec des facteurs de croissance. Les vaisseaux tumoraux sont immatures avec une réduction des cellules péricytaires (Baluk *et al.*, 2005). Ils présentent souvent une augmentation de l'expression de  $\alpha v\beta 3$  mais également de  $\alpha v\beta 5$ , permettant aux cellules endothéliales de se fixer sur les protéines de la matrice comme la fibronectine, la vitronectine, le fibrinogène... De plus, les caractéristiques de certaines protéines de la matrice tumorale peuvent être différentes et faciliter les interactions avec les intégrines : en effet, le collagène peut subir une protéolyse qui permet de rendre accessible son domaine RGD, facilitant la liaison avec l'intégrine  $\alpha v\beta 3$ . Ces contacts intercellulaires d'adhésion permettraient la survie et ou le déplacement des cellules endothéliales. De plus, les interactions des intégrines avec certains facteurs de croissance favorisent l'angiogenèse. Par exemple,  $\alpha v\beta 3$  et FGF-R entraînent une angiogenèse dépendante de FGF et,  $\alpha v\beta 5$  et VEGF-R2 entraînent une angiogenèse dépendante de VEGF (Friedlander *et al.*, 1995).

L'intérêt des intégrines dans l'angiogenèse réside également dans la possibilité par les cellules endothéliales d'exprimer  $\alpha 4\beta 1$ , ce qui permet une interaction directe avec les cellules périvasculaires VCAM1+ (Garmy-Susini *et al.*, 2005). Ce recrutement de cellules périvasculaires est également sous la dépendance de récepteurs de facteurs de croissance, dont la régulation est dépendante de l'interaction avec les intégrines. Ainsi, le recrutement de ces cellules périvasculaires dépendant des intégrines permettrait d'obtenir des vaisseaux plus matures et donc plus sensibles aux drogues.

## ***Réaction desmoplastique***

Les fibroblastes participent à la progression tumorale par leur sécrétion de facteurs de croissance, mais également par leur production de collagène. Une étude récente a permis de montrer que l'expression de l'intégrine  $\alpha 11\beta 1$  par les fibroblastes augmente la croissance tumorale en stimulant la sécrétion de l'insulin growth factor 2 (IGF2) (Zhu *et al.*, 2007).

## ***Réaction immunitaire***

On décrit pour les tumeurs solides un phénomène de « homing cellulaire ». Il s'agit du recrutement de cellules circulantes dérivant de la moelle osseuse au niveau des tumeurs solides au sein desquelles elles

peuvent avoir un effet suppresseur de tumeur ou au contraire un effet « stimulant », notamment en participant à la néovascularisation. Ce homing implique les intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\beta 3$ . Dès 2006, Jin *et al.* démontrent *in vitro* que l'adhésion des cellules myéloïdes à l'endothélium est médiée par l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  qui interagit avec la molécule VCAM, molécule de la super famille des Immunoglobulines exprimée par l'endothélium activé. Ces auteurs démontrent *in vitro* que l'utilisation d'un antagoniste spécifique de  $\alpha 4\beta 1$  empêche la fixation des cellules myéloïdes sur une plaque recouverte de VCAM recombinant soluble. Pour démontrer *in vivo* le rôle des intégrines dans le homing des cellules myéloïdes au sein de la tumeur, ils injectent des monocytes humains marqués dans des souris présentant une tumeur mammaire en présence d'antagonistes humains d'intégrines. En présence d'antagoniste de  $\alpha 4\beta 1$ , les monocytes n'adhèrent pas aux vaisseaux. De plus, l'utilisation de l'antagoniste  $\alpha 4\beta 1$  sur le modèle murin avec des cellules de carcinome pulmonaire montre une diminution significative des macrophages intra-tumoraux, avec une réduction de la densité vasculaire et une diminution partielle de la croissance tumorale (Jin *et al.*, 2006).

Plus récemment, Feng *et al.* montrent dans un modèle murin que l'intégrine  $\alpha \nu \beta 3$  est également cruciale dans le homing intratumoral des cellules de la moelle et dans la néoangiogenèse. L'expression d'une forme inactive de l'intégrine  $\beta 3$  par les cellules issues de la moelle ne permet pas leur homing intratumoral et entraîne une réduction de l'angiogenèse tumorale et une diminution de la tumeur. La retransplantation de moelle restaure un homing et une angiogenèse satisfaisante (Feng *et al.*, 2008). Donc, il apparaît que les intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\beta 3$  sont impliquées dans le homing intratumoral des cellules dérivées de la moelle osseuse et qu'elles favorisent l'angiogenèse tumorale.

### *Conclusion du chapitre physiopathologie moléculaire*

En conclusion, ces exemples montrent l'importance du rôle des effecteurs moléculaires dans la construction et l'évolution des tumeurs. Ils peuvent être étudiés par des approches très différentes. On peut distinguer des approches globales, généralement quantitatives, au niveau ARNm (Q-PCR) ou au niveau protéique (immunoblot). Toutefois, ces approches sont souvent insuffisantes et peuvent même être trompeuses. Par exemple, une étude fondée uniquement sur l'expression d'ARNm peut ne pas refléter l'expression de la protéine, qui est le véritable effecteur moléculaire. En outre, différentes formes d'épissage d'un ARNm peuvent donner naissance à des protéines tronquées de fonctions très différentes. Enfin, ces approches globales ne renseignent pas sur les cellules qui expriment la protéine d'intérêt. Ceci est d'autant plus important que certaines protéines sont quasi-ubiquitaires. C'est pourquoi, on doit accorder une grande importance à la cartographie de ces molécules effectrices, qui peut être effectuée par des techniques immunohistochimiques, voire d'hybridation *in situ* ou par des

méthodes de microdissection laser associées à des études protéomiques ou à la Q-PCR. On doit souligner enfin le renouveau des techniques d'immunofluorescence, couplées à une analyse en microscopie confocale, qui permet d'étudier les relations topographiques d'effecteurs moléculaires ainsi que des co-localisations moléculaires.

### **3. MOLECULES UBIQUITAIRES - LE COUPLE CALRETICULINE-CD91 ET LE COUPLE ADAM15- INTEGRINES : INTERVENANTS POTENTIELS DANS LA MORPHOGENÈSE, LA DIFFERENCIATION ET LA PROGRESSION TUMORALE**

---

#### **3.1. Calréticuline**

##### *3.1.1. Introduction*

La calréticuline est une protéine ubiquitaire qui a des fonctions très variées. Le gène peut être qualifié de pléiotropique. Pourquoi s'intéresser à cette protéine dans les CCR ? Pour répondre à cette question, il nous faut remonter aux années 2003-2004 et à l'état de la littérature à cette époque. En effet, les études de protéomique venaient d'identifier la calréticuline comme une protéine qui connaissait une variation très importante d'expression dans un modèle d'oncogenèse et de progression tumorale chez la souris *Apc<sup>Min/+</sup>* (Cole *et al.*, 2000). C'est ce travail princeps qui a attiré notre attention.

Depuis cette date, les publications sur les fonctions de la calréticuline n'ont cessé de croître. Pour des raisons de simplicité de l'exposé, nous présenterons une revue générale des domaines dans lesquels la calréticuline est impliquée, pour nous concentrer par la suite sur son rôle dans les CCR à l'époque de notre travail. Nous réserverons pour la discussion de notre article les données les plus récentes sur calréticuline et les CCR.

##### *3.1.2. Calréticuline : de la découverte à la « structure-fonction » et à des localisations multiples*

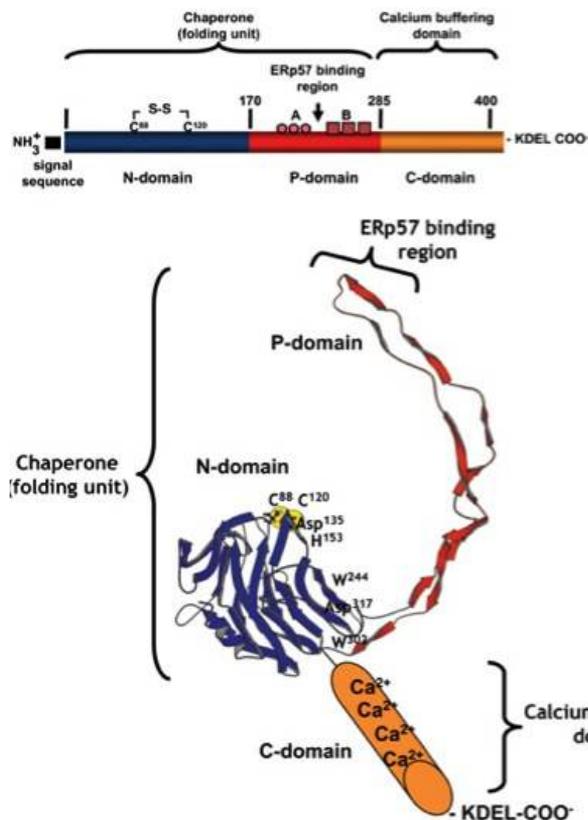
En 1974, la calréticuline est pour la première fois isolée du réticulum sarcoplasmique du muscle de

lapin. A cette époque, on lui donne le nom de HACBP (pour High-affinity calcium-binding protein) (Ostwald *et al.*, 1974). En 1989, le cDNA codant pour cette protéine est isolé par les groupes de Koch et Michalak (Smith *et al.*, 1989 ; Fliegel *et al.*, 1989). L'examen de sa séquence révèle la présence d'une séquence C terminale de rétention au réticulum endoplasmique (KDEL) (Pelham *et al.*, 1989). De plus amples analyses montrent qu'il s'agit d'une protéine majeure de fixation du calcium, localisée dans la lumière du réticulum endoplasmique (Opas *et al.*, 1991). Cette protéine est renommée « calréticuline ».

Les caractéristiques de la calréticuline sont rapportées dans les revues générales de Michalak *et al.* (2009) et de Coppolino *et al.* (1998).

Le gène de la calréticuline comprend 9 exons et 8 introns et est situé sur le chromosome 19. Le promoteur du gène de la calréticuline contient de multiples sites potentiels de liaison avec des facteurs de transcription. Mais, parmi eux, très peu ont été étudiés quant à leurs effets biologiques. Par exemple, l'expression de la calréticuline est augmentée par les ligands de PPAR $\gamma$ , et inversement des niveaux élevés de calréticuline ont des effets inhibiteurs sur l'expression de PPAR $\gamma$  sur l'adipogenèse par des mécanismes de « feed-back négatif » (Szabo *et al.*, 2008). Au cours de la cardiogenèse, plusieurs facteurs de transcription sont décrits comme activateurs (NKX2 (NK2 transcription factor related, locus5), GATA6 (GATA-binding protein 6), MEF2C (Myocyte enhancer factor 2C) ou répresseurs de l'activité transcriptionnelle de la calréticuline (COUP-TF1 (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor 1) (Opas *et al.*, 2001 ; Lynch *et al.*, 2005 ; Qui *et al.*, 2008).

La calréticuline est une protéine de 46-kDa. Cependant, les anomalies de migration en électrophorèse SDS-PAGE, probablement dues à une charge négative importante, font que la calréticuline prend l'apparence d'une protéine de 60kDa. Cette protéine est constituée de trois domaines : le domaine N-terminal, le domaine dit «P» et le domaine C-terminal. Cette protéine contient une séquence signal N-terminale clivable qui la dirige vers le réticulum endoplasmique, et une séquence C-terminale de rétention au réticulum endoplasmique KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) (Figure 20).



**Figure 20 : Représentation linéaire et en 3D de la structure de la calréticuline.** D'après Michalak *et al.*, 2009.

- Le domaine N-terminal a une structure tridimensionnelle globuleuse composée de 8 feuillets  $\beta$  anti-parallèles (Michalak *et al.*, 2002). Il comprend les sites de fixation à des polypeptides, à des hydrates de carbone (Leach *et al.*, 2002 ; Kapoor *et al.*, 2004), un site de fixation au Zinc (Baksh *et al.*, 1995) et un site de liaison aux groupements disulfures (Andrin *et al.*, 2000). Le domaine N-terminal (via les sites de fixation aux polypeptides et aux hydrates de carbone) ainsi que le P-domaine (voir plus loin) sont nécessaires pour permettre à la calréticuline d'exercer sa fonction de chaperonne (Leach *et al.*, 2002). En effet, la mutation d'un résidu histidine, His 153, entraîne un changement de conformation de la protéine, responsable d'une perte de cette fonction de chaperonne (Guo *et al.*, 2003). De plus, au sein de ce domaine, est décrit un segment qui interagit avec les récepteurs des hormones stéroïdes (Burns *et al.*, 1994) et les domaines cytoplasmiques des sous-unités  $\alpha$  des intégrines (Kwon *et al.*, 2000).

- Le P domaine, situé dans la partie médiane de la calréticuline, est riche en proline, lui conférant une certaine flexibilité. Il contient des séquences d'acides aminés répétés en tandem, potentiellement impliquées dans la fonction lectine de cette protéine (Vassilakos *et al.*, 1998). Cette région peut interagir avec la protéine du réticulum endoplasmique p57 (ERp57). L'interaction de la calréticuline avec ERp57 est annulée par les mutations Glu 239, Asp 24, Glu 243 et Trp 244. De plus, ce domaine

contient un site de fixation au  $\text{Ca}^{++}$  (haute affinité mais faible capacité). Il contient très vraisemblablement un signal de localisation nucléaire.

- Le C domaine de la calréticuline est riche en résidus chargés négativement, permettant la fixation de  $\text{Ca}^{++}$  et son stockage (Nakamura *et al.*, 2001).

Les données *in silico* ainsi que des études de microscopie confocale montrent une localisation subcellulaire de la calréticuline au niveau du réticulum endoplasmique. Cependant, d'autres études ont décrit une localisation cytoplasmique, nucléaire, membranaire et même extracellulaire (Arosa *et al.*, 1999 ; Kwon *et al.*, 2000 ; Yoon *et al.*, 2000 ; Elton *et al.*, 2002)

Toutes ces données suggèrent donc que le rôle de la calréticuline n'est pas limité à la liaison du calcium et à celui de chaperonne. Sa localisation membranaire et extracellulaire en fait donc un médiateur extracellulaire susceptible d'interactions avec un ou plusieurs récepteurs.

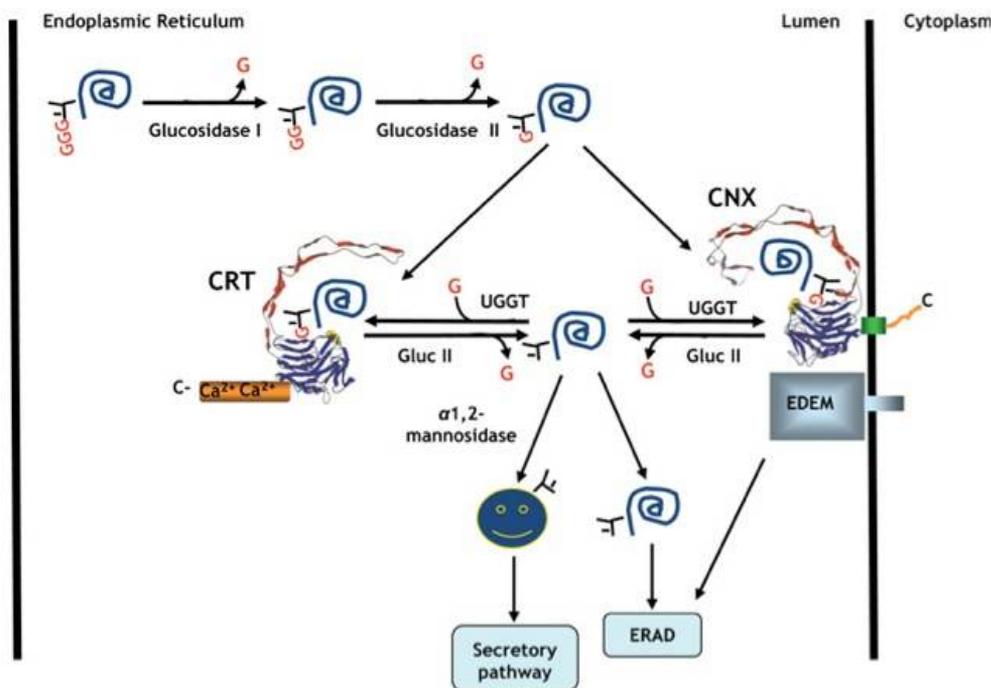
L'étude des modèles animaux et de lignée cellulaires, sur- ou sous- exprimant la calréticuline a permis d'apporter des éléments importants sur la fonctionnalité de cette protéine. Notamment, la description par Mesaeli *et al.* (1999) des effets de l'invalidation de la calréticuline chez la souris a fourni un modèle expérimental sérieux pour l'étude des fonctions cellulaires et tissulaires de cette protéine. Nous verrons que cette protéine joue un rôle majeur dans des fonctions essentielles telles l'immunité, l'apoptose, la cicatrisation, le développement... et l'oncogenèse.

### **La fonction chaperonne de calréticuline**

La calréticuline est d'abord connue pour son rôle de chaperonne. Les chaperonnes sont des protéines du réticulum endoplasmique (calnexine, ERp57, Grp94...), dont le rôle est de permettre une conformation fonctionnelle des protéines néosynthétisées dans le réticulum endoplasmique.

Ses domaines de liaison aux polypeptides et aux hydrates de carbone (effet lectine) en font une candidate majeure pour un rôle de chaperonne.

En effet dans le réticulum endoplasmique, les protéines néoformées non matures interagissent avec des protéines chaperonnes et des enzymes comprenant la Bip (protéine fixant la chaîne lourde des immunoglobulines) / Grp 78 (protéine régulatrice du glucose), la calréticuline, la calnexine, la Grp 94 et la PDI (protéine disulfide isomérase) et la ERp57 (Bedard *et al.*, 2005). Chacune de ces protéines a un rôle propre : la Bip/ Grp78 et la Grp94 reconnaissent la région hydrophobe exposée de protéines néoformées ; elles permettent leur repliement et leur assemblage.



**Figure 21 : Le cycle calréticuline / calnexine.** Calréticuline, calnexine et ERp57 sont responsables du repliement et du contrôle-qualité des protéines nouvellement synthétisées. Dans le réticulum endoplasmique, la protéine oligosaccharidique nouvellement synthétisée, présente des résidus glucidiques riches en mannose. Ces résidus sont séquentiellement retirés par les glucosidases permettant l'interaction des chaperonnes avec un monosaccharide. Le cycle de déglycosylation / glycosylation (par l'UGGT) peut se répéter pendant le repliement de la protéine pour permettre l'entrée de la protéine dans la voie sécrétoire ou de dégradation (ERAD). CRT : calréticuline ; CNX : Calnexine. D'après Michalak *et al.*, 2009.

La calréticuline et la calnexine interagissent avec les glycoprotéines néoformées grâce à leurs sites de fixation aux polypeptides et à leur site lectine. La PDI et la ERp57 permettent le repliement de protéines grâce à la formation de ponts disulfures pour les protéines qui contiennent des résidus cystéines. La calréticuline ainsi que la calnexine sont impliquées dans le cycle «contrôle-qualité» des protéines (Figure 21). En d'autres termes, les protéines « malformées », c'est-à-dire dont la structure tridimensionnelle est incomplète, restent liées au couple calréticuline-calnexine et sont recyclées jusqu'à l'obtention d'une conformation correcte, ou sont dirigées vers un compartiment de dégradation (Hebert *et Molinari*, 2005).

Ces chaperonnes ont donc un rôle majeur dans le repliement des protéines, leur assurant une conformation fonctionnelle. Dans plusieurs tissus, elles apparaissent redondantes comme le montre le modèle de souris déficientes en calréticuline. En effet, ces souris ont un développement embryonnaire

normal de la plupart des organes sauf du cœur où cette redondance disparaît (Mesaeli *et al.*, 1999).

La fonction chaperonne ainsi que la fonction de liaison au  $\text{Ca}^{++}$  de la calréticuline sont impliquées dans nombre de processus cellulaires dont on ne citera seulement que quelques exemples. La calréticuline et la calnexine sont impliquées dans l'assemblage des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I). Ainsi, dans les fibroblastes déficients en calréticuline, les molécules CMH de classe I sont très rapidement exportées du réticulum endoplasmique, ce qui aboutit à une charge peptidique inefficace et à une absence de reconnaissance des lymphocytes T. L'expression dans ces cellules de la calnexine ne répare pas ce déficit, ce qui prouve que l'assemblage du CMH de classe I dépend principalement de la calréticuline (Gao *et al.*, 2002).

Forstner et son équipe ont fait la démonstration de l'implication de la calréticuline dans la synthèse des mucines intestinales de type MUC2 (Mc Cool *et al.*, 1999). L'étude de la synthèse et de la sécrétion des mucines (production de l'apomucine, oligomérisation des apomucines, glycosylation, chaperonning, stockage vésiculaire, exocytose, régulation neuropeptidergique et par les cytokines) constitue « per se » un domaine de recherche extraordinairement riche mais difficile et complexe. En effet, le chercheur se heurte à deux types de difficultés : des difficultés méthodologiques liées à la manipulation biochimique de molécules de très haut poids moléculaire et à la rareté des modèles cellulaires permettant ces études. En biologie des cellules épithéliales coliques, on a proposé d'utiliser des explants de muqueuse intestinale mis en culture mais ceux-ci ont une survie très courte. Les premiers modèles permettant les études de la synthèse de mucines ont été obtenus dans les années 1980 par manipulation et clonage de la lignée HT29 (Augeron *et Laboisse*, 1984). Ceci a permis de valider un certain nombre de lignées cancéreuses coliques humaines comme modèles pour l'étude de la synthèse, de la sécrétion (exocytose) des mucines ainsi que de la régulation de l'expression des mucines. Utilisant cette approche (fondée sur l'utilisation de lignées cancéreuses coliques LS180, HT29/A1), l'équipe de Forsner et al. a étudié le rôle de différentes chaperonnes dans la biosynthèse des mucines dont MUC2 (Mc Cool *et al.*, 1999). Sur la base de ces lignées, les auteurs ont effectué des marquages par incorporation métabolique d'acides aminés marqués (méthionine  $\text{S}^{35}$ ) suivi de période de chasse en milieu froid de temps variable (pulse-chase), puis d'immunoprécipitation avec un anticorps d'intérêt, électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-page) et d'autoradiographie. Lorsque cela était nécessaire, les protéines co-précipitées étaient révélées par immunoblot. Les points suivants ont été démontrés par cette équipe :

- la maturation des mucines MUC2 se fait par un processus d'homo-oligomérisation des chaînes peptidiques par formation de ponts disulfures.
- la calréticuline co-immuno-précipite avec la protéine MUC2 de manière précoce et transitoire pendant la période de chasse. Cette liaison précoce de la calréticuline avec la protéine MUC2 est sensible à l'activité endo-H ainsi que le traitement des cellules par la tunicamycine (inhibiteur de la N-

glycosylation), ce qui apporte la preuve d'une liaison intraréticulaire fondée sur la N-glycosylation de MUC2 (via la chaîne glycanique Glc1Man9GlcNAc2).

Tous ces éléments sont tout-à-fait cohérents avec la structure de la calréticuline qui en fait une candidate chaperonne par son activité lectine. Enfin, en utilisant une approche analogue, la calnexine a été détectée comme chaperonne mineure de MUC2. Cet article de l'équipe de Forstner est important dans la mesure où il a focalisé notre attention sur une fonction importante de la calréticuline dans la biologie des cellules épithéliales intestinales et a en grande partie motivé notre projet de recherche. Les implications du travail de l'équipe de Forstner, à la lumière de notre propre travail et à la lumière des modèles dont nous disposons actuellement, seront examinées dans la partie discussion du premier article de cette thèse.

### **Calréticuline et homéostasie calcique**

Le calcium intracellulaire a un rôle fondamental dans la régulation de la plupart des fonctions de la cellule. La majorité du calcium intracellulaire est stocké dans la lumière du réticulum endoplasmique. Les fluctuations de la concentration du calcium réticulaire provoque des déficits d'adressage des protéines du réticulum endoplasmique vers l'appareil de golgi (Ashby *et al.*, 2001), des anomalies du transport des molécules à travers les pores nucléaires (Greber *et al.*, 1995), et une anomalie de fonction des chaperonnes (Stevens *et al.*, 1999).

La preuve du rôle fondamental de la calréticuline en tant que protéine régulant l'homéostasie calcique est apportée par l'utilisation du modèle de souris déficientes en calréticuline (Mesaeli *et al.*, 1999). Dans ce modèle, les souris déficientes en calréticuline meurent par arrêt de développement cardiaque à J14,5. Le cœur présente des parois ventriculaires fines et des colonnes charnues plus profondes. Il existe également une exencéphalie et, si les embryons survivent au delà de 16,5 jours, un omphalocèle. Dans ces cellules crt<sup>-/-</sup>, il existe une inhibition du relargage de calcium par la bradykinine, des anomalies d'activation de l'activité phosphatase de la calcineurine, des anomalies de la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-AT3 (Nuclear factor of activated T cells), et des anomalies d'activation de facteurs de transcription de la famille GATA, facteurs impliqués dans la cardiogénèse. Les cellules déficientes en calréticuline ont simplement une modeste diminution de la capacité de repliement des protéines (Molinari, 2004). De même, l'augmentation d'expression de la calréticuline n'a pas d'impact sur le repliement des protéines, mais affecte l'homéostasie calcique (Bastianutto *et al.*, 1995 ; Arnaudeau *et al.*, 2002). De façon intéressante, la réexpression cardiaque de la calcineurine activée constitutivement (forme tronquée de la calcineurine) dans le modèle de souris déficientes en calréticuline permet d'annuler cet arrêt de développement cardiaque (Guo *et al.*, 2002).

Ce travail démontre que le rôle de la calréticuline réside principalement dans le contrôle de

l'homéostasie calcique et, qu'au cours de l'embryogénèse, chaque chaperonne a un rôle propre et qu'il n'y a pas de redondance protéique au niveau cardiaque.

### **La calréticuline extraréticulaire...**

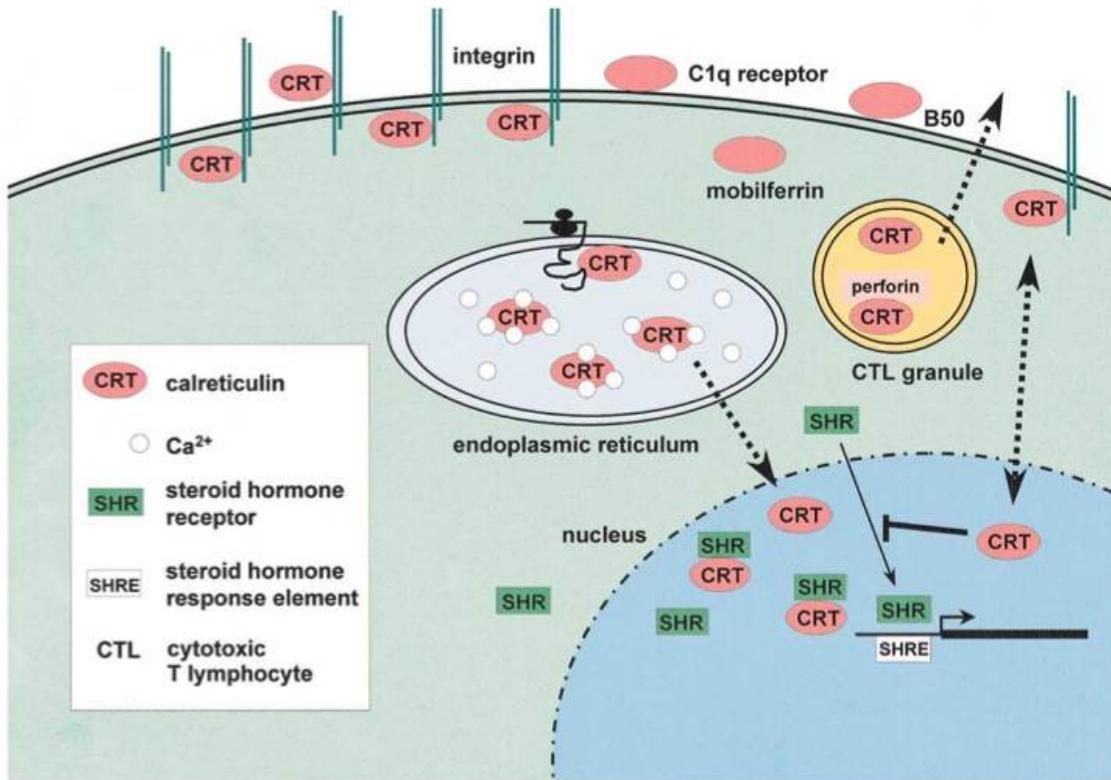
Les premières études d'immunomarquage à l'or montrent que la calréticuline est localisée au niveau du réticulum endoplasmique et au niveau de la membrane nucléaire (Huh *et al.*, 2003). Cette localisation s'accorde tout-à-fait avec les données structurales de cette protéine : cette protéine contient une séquence signal N-terminale clivable qui la dirige vers le réticulum endoplasmique et une séquence C-terminale de rétention au réticulum endoplasmique KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu). Cependant, pendant ces vingt dernières années, la calréticuline a été impliquée dans des processus très divers en dehors du réticulum endoplasmique, notamment à la surface des cellules, dans le cytoplasme et au sein du noyau. La calréticuline est observée au niveau de la surface extracellulaire des plaquettes où elle interagit avec l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  et la glycoprotéine VI et donc module les interactions plaquette-collagène (Elton *et al.*, 2002). De même, elle est observée à la surface de cellules intervenant dans la présentation d'antigènes (Arosa *et al.*, 1999), mais également à la surface de corps apoptotiques (Gardai *et al.*, 2005). Dans ce dernier cas, on a pu attribuer à la calréticuline un rôle de ligand dans le processus de phagocytose de corps apoptotiques.

La calréticuline se lie à un récepteur initialement décrit comme le récepteur de l' $\alpha 2$  macroglobuline (Moestrup *et al.*, 1989 ; Ashcom *et al.*, 1990) et identifié actuellement sous le nom de CD91. Par la suite, des données récentes montrent que CD91 est également le récepteur de plusieurs protéines de choc thermique (Basu *et al.*, 2001). CD91 est présent sur les cellules de la lignée monocyttaire, mais également sur d'autres types cellulaires incluant les hépatocytes, les cellules épithéliales intestinales et les fibroblastes (Moestrup *et al.*, 1992). Cette association entre la calréticuline et son récepteur CD91 joue un rôle important dans le processus de phagocytose et d'élimination des corps apoptotiques (Gardai *et al.*, 2005). Cette association peut être directe ou indirecte via notamment l'intervention de la fraction C1q du complément qui fixe les corps apoptotiques. Ce complexe est ensuite reconnu par la calréticuline et se lie secondairement au CD91 (Tarr *et Eggleton*, 2005).

La localisation cytoplasmique de la calréticuline est suggérée par son rôle dans l'activation cytoplasmique des intégrines. En effet, la calréticuline peut se fixer sur la séquence KXGFFKR des intégrines, séquence intracytoplasmique présente sur les  $\alpha$ -intégrines (Kwon *et al.*, 2000). De plus, elle peut interagir directement avec les récepteurs des hormones (glucocorticoïdes, androgènes) et peut donc inhiber la transcription de gènes sensibles aux stéroïdes (Burns *et al.*, 1994 ; Dedhar *et al.*, 1994).

Dans quelques études, on décrit une localisation nucléaire de la calréticuline notamment dans les hépatocarcinomes (Yoon *et al.*, 2000). La Figure 22 illustre les localisations multiples possibles de la

calréticuline.



**Figure 22 : Localisations multiples de la calréticuline.** La calréticuline exerce plusieurs fonctions dans les compartiments intracellulaire et extracellulaire. D'après Coppolino *et al*, 1998.

### 3.1.3. Calréticuline : rôle à l'échelle des tissus et des organes

L'importance de la calréticuline a d'ores et déjà été signalée dans notre description du modèle d'invalidation chez la souris (Mesaeli *et al.*, 1999). On rappellera que la létalité survient à 14 jours et provient d'un arrêt du développement cardiaque alors que le développement des autres organes est normal. Il est cependant possible d'étudier les fonctions de la calréticuline dans des tissus adultes par une approche d'invalidation grâce à un modèle «d'invalidation-transgénèse» : ce modèle est fondé sur une souris invalidée pour la calréticuline dont on a assuré un développement embryonnaire normal par transgénèse, assurant l'expression ciblée de la forme activée de la calcineurine au niveau cardiaque (Guo *et al.*, 2002). Ainsi, on dispose d'un modèle dans lequel des tissus adultes comportent des cellules qui sont invalidées pour la calréticuline. Au-delà des travaux sur l'influence de la calréticuline sur l'organogenèse, la disponibilité de cellules déficientes en calréticuline et qui peuvent être maintenues en culture, offre un champ d'investigation important pour l'étude des fonctions de la calréticuline hors développement embryonnaire.

Dans ce chapitre, nous nous restreindrons à quelques fonctions telles que l'immunité, l'apoptose, l'angiogenèse, la cicatrisation, toutes ces fonctions étant impliquées dans le remodelage

tissulaire. Enfin nous terminerons ce chapitre par les données qui ont permis d'impliquer la calréticuline dans l'oncogénèse.

### **Calréticuline et immunité**

La calréticuline est impliquée dans l'immunité de par son effet « immunogène » et de par son rôle au niveau des lymphocytes cytotoxiques.

La calréticuline a été identifiée comme un antigène présent dans le sérum de malades atteints de différentes pathologies auto-immunes, comprenant le lupus érythémateux systémique (Kishore *et al.*, 1997 ; Sontheimer *et al.*, 1991), la maladie coeliaque (Karská *et al.*, 1995), ou différentes maladies parasitaires (Ferreira *et al.*, 2005). Les auto-anticorps pourraient reconnaître la calréticuline seule (Tanaka *et al.*, 2006) et la calréticuline associée au complexe ribonucléoprotéique Ro-SSA (Franceschini *et Cavazzana* 2005). Ces observations indiquent que la calréticuline pourrait être un important auto-antigène chez certains individus et pourrait éventuellement jouer un rôle dans la pathogénie des maladies autoimmunes en s'associant à différents complexes. On ne peut toutefois pas exclure que ces complexes soient contingents dans la genèse de la maladie. De façon intéressante, des auteurs ont utilisé la propriété immunogénique de la calréticuline pour augmenter les réponses cellulaires et humorales chez des souris vaccinées. «Des souris vaccinées» avec un plasmide contenant un fragment d'ADN codant pour la calréticuline, associé à l'antigène cible tumoral (HPV-16) ont une augmentation très importante de la réponse immune cytotoxique TCD8+, qui a un effet protecteur anti-tumeur (Cheng *et al.*, 2001 ; Cheng *et al.*, 2005).

La calréticuline protégerait les lymphocytes cytotoxiques d'une autolyse due à la présence de granules cytotoxiques. Les lymphocytes cytotoxiques sont impliqués dans le système immunitaire via la libération de facteurs spécifiques, la perforine dont l'activité est dépendante du Ca<sup>++</sup> et le granzyme. La calréticuline interagit avec la perforine par son P domaine et à moindre degré par son N domaine. Cette interaction des deux protéines ne se fait qu'en l'absence de calcium (Andrin *et al.*, 1998). Il a été constaté que la calréticuline inhibe l'activité lytique de la perforine purifiée sur des érythrocytes et il a été proposé que ce mécanisme inhibiteur pourrait protéger les lymphocytes T cytotoxiques de leur propre perforine pendant la lyse des cellules cibles. Cependant, cette hypothèse n'a jamais été testée expérimentalement et il n'est pas exclu que la calréticuline bloque l'activité perforine de manière non spécifique, simplement en chélatant le calcium du milieu d'incubation. Plus récemment une approche du rôle de la calréticuline dans la cytotoxicité des lymphocytes T et des cellules NK a été examinée en utilisant un modèle de souris avec invalidation de la calréticuline et transgénèse de la calcineurine

cardiaque (voir plus haut). Chez ces animaux arrivés à l'état adulte, des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) ont été dérivés des splénocytes, ces lymphocytes étant invalidés en calréticuline. Le déficit en calréticuline n'affectait pas les composantes du système de lyse ni la capacité de dégranulation des CTL ni la survie pendant la dégranulation et l'attaque des cellules cibles. Cependant, le déficit en calréticuline affectait l'efficacité de la formation du complexe cellule effectrice – cellule cible, qui est un pré-requis pour la lyse de la cellule cible. Les auteurs concluent que la calréticuline n'est pas indispensable à l'activité du granzyme et de la perforine mais est nécessaire pour la création d'une interaction du lymphocyte et de la cellule cible et pour la création de la « synapse lytique » (Sipione *et al.*, 2005).

### **Calréticuline et cicatrisation**

La calréticuline est impliquée également dans la cicatrisation. En effet, l'application locale de calréticuline sur de larges plaies dans une souris diabétique favorise la cicatrisation avec un tissu de granulation plus abondant et plus cellulaire que dans les souris contrôles (Nanney *et al.*, 2008). Ceci est en partie expliqué par l'effet prolifératif de la calréticuline sur les kératinocytes et les fibroblastes *in vitro* ainsi que son effet sur la migration cellulaire et sur la stimulation de métalloprotéases (Wu *et al.*, 2007).

### **Calréticuline et apoptose**

En tant que protéine de fixation du calcium, la calréticuline est candidate à la signalisation de l'apoptose via les variations de calcium. L'apoptose peut être induite par différents agents. En effet, l'hyperexpression de calréticuline permet une sensibilité accrue à l'apoptose induite par la staurosporine ou la thapsigargine, associée à un relargage du cytochrome C mitochondrial. A l'opposé, les cellules déficientes en calréticuline sont résistantes à l'apoptose en raison d'une diminution des stocks de  $Ca^{++}$  dans le RE (Nakamura *et al.*, 2000). Ainsi, la calréticuline peut moduler l'apoptose en régulant la mobilisation du calcium. De plus, la calréticuline pourrait intervenir dans l'apoptose en contrôlant la stabilité de la protéine p53 (Mesaeli *et al.*, 2004). En effet, dans des cellules déficientes en calréticuline, une dégradation anormale et un défaut de localisation nucléaire de p53 sont observés. Ainsi l'absence de calréticuline pourrait protéger les cellules de l'apoptose médiée par p53 lors d'un stress génotoxique.

Son deuxième rôle dans l'apoptose réside dans l'élimination des cellules apoptotiques. En effet, le phénomène apoptotique se caractérise par une mort cellulaire sans réaction inflammatoire. L'association de calréticuline avec la phosphatidylserine à la surface de la cellule constitue le signal obligatoire de reconnaissance permettant l'élimination des cellules mortes par des phagocytes

« professionnelles » (macrophages, polynucléaires neutrophiles) et par des phagocytes « non professionnels » (fibroblastes) (Gardai *et al.*, 2005). La calréticuline se lie au récepteur CD91, présent sur les cellules phagocytes, ce qui permet l'élimination des corps apoptotiques par phagocytose (Gardai *et al.*, 2005). Les données récentes montrent que l'apoptose est souvent impliquée dans le remodelage tissulaire. Dans le modèle de souris déficientes en calréticuline, les anomalies de la cardiogenèse ont été expliquées principalement par des troubles de l'homéostasie calcique imputés à la perte de fonction de la calréticuline (Mesaeli *et al.*, 1999). Il est très probable qu'un défaut d'élimination des corps apoptotiques soit également en cause.

### **Calréticuline, vasostatine et angiogenèse**

Le fragment N terminal (1-180) de la calréticuline, appelé vasostatine a été isolé dans le surnageant d'une lignée cellulaire immortalisée par le virus d'Ebstein - Barr (Pike *et al.*, 1998). La vasostatine, la calréticuline complète, la calréticuline délétée ( $\Delta$ 1-120) et le fragment interne de la calréticuline (120-180), inhibent la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* (Pike *et al.*, 1999) et inhibent également l'angiogenèse et la prolifération tumorale *in vivo* (modèle de souris nude (athymique) injectées avec des cellules humaines de Lymphome de Burkitt) (Yao *et al.*, 2002a). Ces auteurs ont montré également *in vitro* que la vasostatine empêchait la prolifération de cellules endothéliales cultivées dans des puits recouverts de laminine. La laminine serait la cible de la vasostatine (Yao *et al.*, 2002b). La vasostatine bloquerait l'interaction de la cellule endothéliale avec la laminine, diminuant la capacité de la cellule endothéliale à s'attacher à la matrice extracellulaire et donc à croître.

Plusieurs équipes ont essayé d'utiliser cette propriété pour traiter les tumeurs avec parfois une efficacité (Jazowiecka-Rakus *et al.*, 2006) mais parfois aussi un effet délétère (gain de malignité de la tumeur) (Liu *et al.*, 2006).

### **Calréticuline et adhésion cellulaire**

Des travaux *in vitro* fondés sur la manipulation du niveau d'expression de la calréticuline dans des lignées de fibroblastes montrent que la calréticuline module l'adhésion cellulaire, notamment en régulant le niveau d'expression de la vinculine, de la N-cadhérine et la phosphorylation des résidus tyrosine (Opas *et al.*, 1996). D'autres travaux ont montré son interaction avec le domaine cytoplasmique des sous-unités alpha des intégrines, ainsi que le rôle de cette interaction dans la régulation de l'adhésion à la matrice extracellulaire (Coppolino *et al.*, 1995). Ces auteurs ont en outre montré, sur la base de cellules embryonnaires invalidées pour la calréticuline et dans lesquelles une restauration de son expression est effectuée, que la calréticuline est un régulateur essentiel des fonctions d'adhésion des intégrines, et que la signalisation intracellulaire des intégrines est médiée par un influx

de calcium (Coppolino *et al.*, 1997).

### Néoplasies

En raison de son implication dans l'apoptose, la cytotoxicité médiée par les CTL et les cellules NK, ainsi que dans l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines, la calréticuline apparaît comme un acteur du remodelage tissulaire en physiologie et en pathologie inflammatoire/immunitaire. Dans un tel contexte, il était donc logique que l'on s'intéresse à une pathologie où le remodelage tissulaire joue un rôle majeur : il s'agit de la morphogénèse tumorale. Un travail en particulier a attiré notre attention : il s'agissait d'une analyse protéomique des polypes de souris *Apc<sup>Min/+</sup>* (pour le modèle *Min* voir plus haut) par comparaison à des cryptes coliques de souris normales. Cette analyse comparative montrait un profil récurrent de variation de plusieurs protéines dans les polypes incluant une diminution de la calréticuline (Cole *et al.*, 2000).

Toutes ces données de la littérature, ainsi que les travaux de l'équipe de Forstner (Mac Cool *et al.*, 1999) montrant que la calréticuline est une chaperonne de la protéine MUC2, étaient pour nous une incitation à étudier l'expression de la calréticuline dans les CCR chez l'homme. Les seules données disponibles pour les CCR étaient des données protéomiques, parfois contradictoires (Brunagel *et al.*, 2003 ; Alfonso *et al.*, 2005). Il n'existait pas d'analyse immunohistochimique exhaustive de l'expression de la calréticuline dans les CCR en corrélation avec les critères clinicopathologiques. Ces points seront discutés dans l'article n°1.

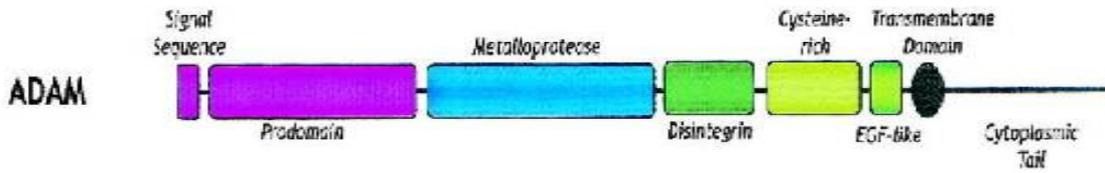
## **3.2. ADAM15**

### *3.2.1. Généralités*

Les ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease), aussi appelées MDC (Metalloprotease/Disintegrin/Cys-rich), constituent une famille de glycoprotéines transmembranaires de type I, multidomaines, dont la partie extracellulaire comporte un domaine métalloprotéase, un domaine d'adhésion disintégrine, et un domaine riche en cystéines (Figure 23) (voir revue générale de Seals *et Courtneidge*, 2003). Ce sont des molécules complexes possédant des activités d'adhésion et de protéolyse.

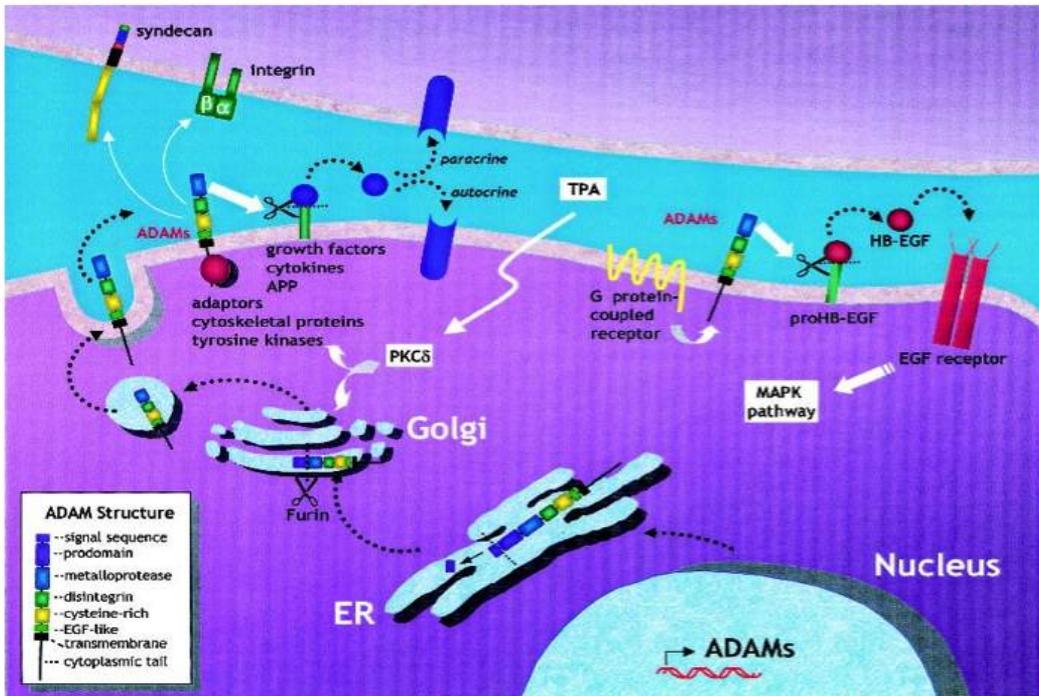
Elles sont synthétisées sous forme de pro-protéine avec un prodomaine qui inhibe le site catalytique du domaine métalloprotéase par un mécanisme dit de commutation de cystéine (« cysteine switch »). Pendant la maturation au niveau du réticulum endoplasmique, le prodomaine est clivé par des

proprotéines convertases de type furine avec formation d'une protéine mature avec un domaine métalloprotéase actif.



**Figure 23 : Structure générale des ADAMs.** D'après Seals et al., 2003.

La diversité des domaines présents dans les protéines ADAMs rend compte de la multitude d'effets biologiques qui leur sont attribués (Figure 24). Les protéines ADAMs sont impliquées dans différents processus que sont la fusion cellulaire, la maturation protéolytique et la libération extracellulaire de facteurs de croissance (EGF, TGF $\alpha$ ) et de cytokines (TNF $\alpha$ ), la différenciation et l'adhésion cellulaire (Seals *et* Courtneidge, 2003).



**Figure 24 : Les ADAMs, protéines ubiquitaires, aux fonctions multiples.** Une vue générale de la synthèse et d'une partie de leurs fonctions. D'après Seals *et Courtneidge*, 2003.

Parmi les 34 protéines ADAM décrites, incluant les 19 ADAMs humaines, l'**ADAM15 connue sous le nom de MDC-15 ou Metargidine (Metalloprotease-RGD-disintegrin)** est la seule ADAM qui possède une séquence RGD (arginine-glycine-acide aspartique) de liaison aux intégrines dans la boucle du domaine disintégrine (Krätzschar *et al.*, 1996). On doit souligner que l'ADAM15 de souris ne présente pas cette séquence RGD (Lum *et al.*, 1998). Par conséquent, la modulation du rôle d'ADAM15 dans des modèles de souris ne peut pas totalement reproduire ce qui se passe chez l'homme. La présence de cette séquence RGD suggère un rôle spécifique d'ADAM15 humain dans la liaison aux intégrines et donc dans les **interactions intercellulaires**. Ce motif RGD est impliqué dans la liaison d'ADAM15 aux intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha5\beta1$  (Zhang *et al.*, 1998 ; Nath *et al.*, 1999) ; néanmoins, ADAM15 est aussi capable de fixer l'intégrine  $\alpha9\beta3$  indépendamment du motif RGD (Eto *et al.*, 2000). La preuve de cette capacité d'interaction d'ADAM15 avec les intégrines est apportée par l'article de Herren, qui montre que l'hyperexpression d'ADAM15 dans une lignée fibroblastique NIH3T3 favorise les interactions intercellulaires (Herren *et al.*, 2001). Une autre fonction majeure d'ADAM15 est la **migration cellulaire**, résultant très probablement du remodelage de la matrice extracellulaire grâce à son domaine métalloprotéase (Martin *et al.*, 2002). ADAM15 appartient à la superfamille des métalloprotéases dites «à Zinc». ADAM15 est une ADAM dans laquelle le domaine métalloprotéase est dans une forme mature. Ce dernier possède le site consensus de fixation au Zinc, indispensable à

l'activité de l'enzyme : HexxHxxGxxH. Des études *in vitro* ont montré que l'ADAM15 est capable de cliver le collagène IV et la gélatine. Cette activité métalloprotéase propre à ADAM15 est probablement impliquée dans l'augmentation de la migration des cellules mésangiales glomérulaires (Martin *et al.*, 2002). De plus, le domaine cytoplasmique d'ADAM15 présente des motifs impliqués dans la signalisation tels des séquences riches en proline et des résidus tyrosine. Le domaine intracellulaire d'ADAM15 possède des séquences riches en proline, suggérant une interaction possible avec des protéines contenant le domaine SH3 Src homologue. Poghosyan *et al.* (2002) ont montré que le domaine cytoplasmique d'ADAM15 peut former des interactions dépendantes de la phosphorylation avec la famille des protéines kinases de type Src et avec la protéine adaptatrice Grb2 dans les lignées cellulaires hématopoïétiques. La séquence d'acides aminés intracytoplasmique contient des sites potentiels de phosphorylation sur des tyrosines, suggérant que l'ADAM15 peut interagir avec le domaine SH2 de protéines via des phosphotyrosines (Poghosyan *et al.*, 2002), mais également par l'intermédiaire de sites potentiels de phosphorylation situés sur les résidus sérine et thréonine (Charrier *et al.*, 2005).

Sur la base de ces données, ADAM15 est donc une candidate idéale dans les processus pathologiques comportant un remodelage tissulaire important impliquant des interactions intercellulaires, des interactions entre cellules-matrice et/ou des activités protéolytiques.

L'ADAM15 a été clonée pour la première fois en 1996 par Krätzschmar à partir de cellules adénocarcinomeuses mammaires (Krätzschmar *et al.*, 1996). Peu de temps après, elle a été clonée à partir de cellules humaines endothéliales de la veine du cordon ombilical (HUVECs) et de culture de myocytes aortiques humains (Herren *et al.*, 1997). Le gène ADAM15 est localisé sur le chromosome 1q21.3, il comprend 23 exons et 22 introns. L'étude de Kleido *et al.*, a montré l'existence de 13 isoformes d'ADAM15 avec un patron d'expression différent selon les tissus humains normaux. Ces formes proviennent d'un épissage alternatif qui intéresse les exons 18 à 23, qui correspondent au domaine intra-cytoplasmique de la protéine. Dans cette étude, les différentes protéines issues de cet épissage alternatif n'ont pas été caractérisées (Kleino *et al.*, 2007)

Ces premières données (clonage de la protéine ADAM15 à partir de cellules humaines endothéliales) ont amené les chercheurs à s'intéresser à l'expression et au rôle de l'ADAM15 durant le processus athéromateux, qui implique une morphogénèse et un remodelage tissulaire. Pour ces raisons historiques, nous décrirons brièvement le rôle d'ADAM15 dans le processus athéromateux et dans l'angiogénèse avant de nous intéresser plus spécifiquement aux fonctions de l'ADAM15 dans l'intestin. Dans cet organe, ADAM15 est impliquée dans des phénomènes de remodelage inflammatoire ainsi que dans des remodelages liés à la progression tumorale.

### 3.2.2. Athérosclérose

La découverte d'une hyperexpression d'ADAM15 au sein de lésions athéromateuses a fait suggérer sa possible implication dans cette pathologie (Herren *et al.*, 1997). De même, Al-Fakhiri *et al.* ont également mis en évidence une hyperexpression des intégrines  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$  concomitante à celle d'ADAM15, dans des lésions athéromateuses. Ces molécules étaient exprimées par les cellules musculaires lisses au sein de la plaque athéromateuse (Al-Fakhiri *et al.*, 2003). Dans cette étude, ils démontrent *in vitro* que le traitement de cellules musculaires lisses provenant d'artère ou de veine humaine par le facteur de croissance dérivant des plaquettes (PDGF) entraîne une hyperexpression des intégrines  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$ , suivie d'une hyperexpression d'ADAM15. ADAM15 pourrait agir comme un régulateur des intégrines, favorisant (à travers une activité métalloprotéase) ou inhibant la migration des cellules musculaires lisses. Dans ce dernier cas, ADAM15, favorisant les interactions cellulaires, limiterait la migration cellulaire (Herren *et al.*, 2001).

D'autres études ont montré le rôle d'ADAM15 dans l'athérosclérose par le biais des plaquettes. En effet, les plaquettes expriment l'intégrine  $\alpha II\beta 3$  qui peut interagir avec ADAM15 (Langer *et al.*, 2005). L'hyperexpression d'ADAM15 dans des cellules de type endothélial (HUVEC) augmente l'adhésion des plaquettes dans des conditions normales de flux sanguin et le traitement des HUVEC avec une combinaison de cytokines (TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$ ) augmente discrètement mais de façon significative l'expression d'ADAM15. De plus, l'incubation de plaquettes avec de l'ADAM15 recombinante entraîne une sécrétion de CD62P /P-selectin et de CD40L, facteurs qui favorisent l'activité protéolytique, la sécrétion de chimiokines et l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales. Ainsi, l'ADAM15, exprimée par les cellules endothéliales, pourrait agir comme un récepteur des plaquettes, lesquelles secréteraient des médiateurs inflammatoires qui à leur tour stimuleraient les cellules endothéliales, permettant secondairement le recrutement de cellules inflammatoires.

### 3.2.3. Angiogenèse

Plusieurs découvertes font évoquer le rôle d'ADAM15 dans l'angiogenèse. Tout d'abord, l'ADAM15 est exprimée par les cellules endothéliales (Herren *et al.*, 1997). ADAM15 est impliquée dans la migration cellulaire et est capable de digérer la gélatine et le collagène IV, propriétés requises pour la dissémination et la migration des cellules endothéliales (Martin *et al.*, 2002). De plus, l'ADAM15 interagit avec les intégrines  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$ , molécules connues pour promouvoir la prolifération et la migration des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (Moiseeva *et al.*, 2001).

Le modèle de souris déficiente en ADAM15 ne montre aucun phénotype pathologique particulier

(Horiuchi *et al.*, 2003). L'extrapolation de ces résultats doit être prise avec précaution dans la mesure où la structure d'ADAM15 de souris est différente de celle de l'ADAM15 humain. Cependant, l'intérêt de ce modèle réside dans son utilisation : en effet, ces auteurs ont recherché le rôle d'ADAM15 dans la néovascularisation pathologique dans 2 modèles : la rétinopathie de la prématurité et celui de la progression d'un mélanome. Dans ce premier modèle, les souriceaux âgés de 7 jours sont placés dans une atmosphère très riche en oxygène (75%) puis ensuite dans une atmosphère normale. Cette diminution brutale de la concentration en oxygène entraîne un fort stimulus angiogénique, responsable d'une néovascularisation pathologique de la rétine chez les sujets contrôles. Les néovaisseaux rétiens observés chez les souris contrôles expriment fortement l'ADAM15 par immunohistochimie. Par contre, les souris déficientes en ADAM15 présentent une néovascularisation rétinienne moindre par rapport aux souris témoins. Dans le second modèle, des cellules mélaniques sont implantées dans le flanc des souris ADAM15 déficientes et des souris contrôles. Les souris ADAM15 *-/-* présentent de façon significative des tumeurs de plus petite taille. Cependant, ces tumeurs ne présentent pas de défaut de néovascularisation. Ce deuxième modèle, même s'il n'apporte pas la preuve du rôle d'ADAM15 dans la néovascularisation, montre un rôle d'ADAM15 dans la progression tumorale.

L'article de Trochon-Joseph *et al.* (2004) montre également le rôle d'ADAM15 dans l'angiogenèse et la progression tumorale. Afin de reproduire les effets spécifiques du domaine disintégrine humaine comportant la séquence RGD (séquence absente chez la souris), ils utilisent la forme recombinante du domaine disintégrine d'ADAM15 humaine (Recombinant Disintegrin Domain, RDD) et ils démontrent *in vitro* que la RDD inhibe la formation de capillaires dans une lignée de cellules endothéliales par inhibition de la prolifération et de la migration cellulaire. *In vivo*, ils fabriquent un système d'induction de synthèse et de sécrétion de RDD par le muscle squelettique (système Tet-ON/Tet OFF, activé par la doxycycline) chez la souris nude. Dans ce modèle, ils inoculent des cellules carcinomateuses mammaires. De façon intéressante, RDD inhibe la croissance tumorale des cellules inoculées de façon significative. Ces tumeurs traitées par RDD présentent une vascularisation moindre (53%) par rapport à celles des souris contrôles. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la croissance tumorale par la RDD passe par une inhibition de l'angiogenèse. Et ces auteurs vont bien plus loin en suggérant cette forme recombinante comme biothérapie (Trochon-Joseph *et al.*, 2004). Ces derniers résultats (rôle anti-angiogénique et anti-tumoral de la RDD) peuvent apparaître contradictoires avec ceux du modèle ADAM15 *-/-* dans lequel ADAM15 favorise l'angiogenèse. Ils suggèrent que la RDD et ADAM15 n'ont pas les mêmes effets biologiques. L'effet pro-angiogénique pourrait être plutôt médié par le domaine métalloprotéase qui, en dégradant les composants de la matrice extracellulaire, permettrait la migration des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. Une autre explication est que l'inclusion de la séquence RGD spécifiquement humaine dans le domaine de la RDD ait un rôle anti-

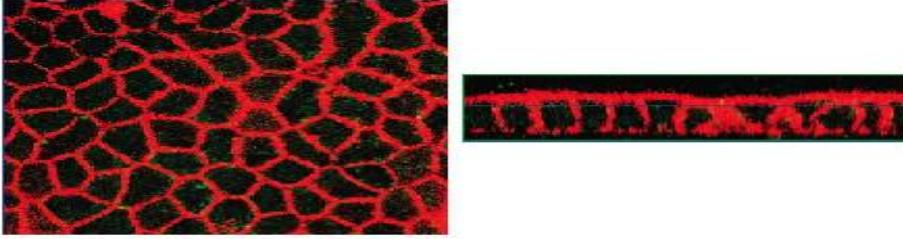
angiogénique.

Ces données montrent le rôle très important d'ADAM15 dans l'angiogenèse, mécanisme impliqué dans les cancers. La possibilité d'une cible thérapeutique renforce l'intérêt pour cette protéine.

#### 3.2.4. *ADAM15 et intestin*

##### **Expression d'ADAM15 dans la muqueuse colique normale**

La présence d'ADAM15 dans l'intestin normal a été démontrée par Northern Blot (Krätzschmar *et al.*, 1996), Immunoblot (Charrier *et al.*, 2005) et par immunohistochimie (Mosnier *et al.*, 2006). L'immunoblot réalisé sur des fragments d'intestin grêle humain normal montre l'existence d'une pro-forme et d'une forme mature d'ADAM15. Par contre, dans le côlon normal, on observe une seule forme d'ADAM15, de taille intermédiaire entre la pro-forme et la forme mature (Charrier *et al.*, 2005). L'étude de l'expression d'ADAM15 par immunohistochimie montre que plusieurs types cellulaires expriment l'ADAM15 (Mosnier *et al.*, 2006). L'ADAM15 est exprimée par l'ensemble des cellules épithéliales coliques normales de toute la crypte sans gradient d'expression particulier. Il s'agit d'un marquage sur les membranes basolatérales associé à un marquage cytoplasmique de type golgien. L'ADAM15 est aussi exprimée par les cellules myofibroblastiques péricryptiques, les cellules endothéliales des vaisseaux, les fibres musculaires lisses autour des veinules et artérioles et par des rares cellules mononucléées de la lamina propria. Le rôle d'ADAM15 a été étudié en utilisant une lignée cellulaire humaine colique Caco2-BBE qui possède un phénotype de type intestin grêle et qui exprime ADAM15 (Figure 25). Cette lignée exprime la pro-forme et la forme mature d'ADAM15. Les techniques de RT-PCR montrent la présence d'au moins deux isoformes d'ADAM15, qui diffèrent par leur domaine intracytoplasmique (Charrier *et al.*, 2005).



**Figure 25 : Localisation d'ADAM15 dans la lignée cancéreuse colique humaine Caco2-BBE (IF/microscopie Confocale):** l'ADAM15 est localisée sur les membranes apicales et basolatérales et en intracellulaire. D'après Charrier *et al.*, 2005.

Charrier *et al.* ont pu montrer, en induisant une hyperexpression d'ADAM15 (transfection de l'isoforme courte) dans cette lignée, que cette hyperexpression diminuait la migration cellulaire dans un modèle de blessure-réparation tissulaire sur une monocouche de Caco2 (Charrier *et al.*, 2005). Ces résultats sont en accord avec ceux de Herren *et al.* qui montrent que l'ADAM15 inhibe les mécanismes de réparation dans une lignée fibroblastique NIH3T3 (Herren *et al.*, 2001). Dans cette lignée, ADAM15 inhibe la migration cellulaire en augmentant les interactions intercellulaires. Il est raisonnable de penser qu'ADAM15 pourrait être impliquée dans les interactions homotypiques intercellulaires (interactions entre cellules de même nature) par un mécanisme de type ligand-récepteur entre intégrines et ADAM15, interactions nécessaires à la formation de la barrière épithéliale. L'ensemble de ces données fait d'ADAM15 humaine une bonne candidate pour intervenir à la fois en pathologie inflammatoire et tumorale.

### **Expression d'ADAM15 dans l'inflammation intestinale**

Ce sont les travaux de Mosnier *et al.* (2006) portant sur la régulation de l'expression d'ADAM15 dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, qui ont apporté des éléments nouveaux dans le rôle possible d'ADAM15 dans cette pathologie. Les données obtenues par RT-PCR et par Immunoblot montrent une importante augmentation d'ADAM15 dans les muqueuses inflammatoires par rapport à la muqueuse normale. L'étude conjointe de l'expression d'ADAM15 et de ses ligands montre un contact cellulaire étroit entre des cellules endothéliales ADAM15+ et des cellules inflammatoires exprimant  $\alpha 5\beta 1+$  (macrophages, polynucléaires neutrophiles) dans les muqueuses inflammatoires, mais également un contact cellulaire étroit entre des cellules épithéliales intestinales ADAM15+ et des cellules inflammatoires  $\alpha 5\beta 1+$  (Mosnier *et al.*, 2006). Ces interactions intercellulaires hétérotypiques font

suggérer qu'ADAM15 participe à l'adhésion des leucocytes et à leur transmigration à travers l'endothélium mais aussi à travers l'épithélium intestinal (Mosnier *et al.*, 2006 ; Charrier-Hisamuddin *et al.*, 2008).

### **Expression d'ADAM15 dans les cancers**

Plusieurs études ont recherché l'expression d'ADAM15 dans différents cancers par des techniques différentes (Tableau VII). Par exemple, l'étude de Yamada a montré une expression plus forte de l'ARNm d'ADAM15 dans les cellules carcinomateuses d'une dizaine de cas de tumeurs pancréatiques obtenues par microdissection par rapport aux cellules normales adjacentes (Yamada *et al.*, 2007). De même, l'étude de Carl-Macgrath montre également une augmentation de l'expression d'ADAM15 au niveau des cellules carcinomateuses gastriques par rapport à l'épithélium normal adjacent (étude Immunohistochimique et par RT-PCR quantitative) (Carl-Macgrath *et al.*, 2005). L'étude de l'expression d'ADAM15 par immunohistochimie dans les cancers pulmonaires (incluant différents sous-types tumoraux) montre une expression souvent augmentée d'ADAM15 dans les cellules tumorales. De façon intéressante, l'expression semble plus intense au niveau du front d'invasion par rapport au centre de la tumeur. Par contre, l'expression d'ADAM15 n'est pas différente selon les différents sous-types histologiques tumoraux examinés (Schütz *et al.*, 2004) (Tableau VII).

L'expression d'ADAM15 dans les cancers du sein est variable selon les études rapportées : l'étude de Lendeckel *et al.* s'intéresse uniquement aux ARNm totaux d'ADAM15 dans une vingtaine de tumeurs mammaires le plus souvent infiltrantes (incluant des carcinomes canauxiers et des carcinomes lobulaires) par rapport au tissu normal adjacent. L'expression est peu intense, comparable dans la tumeur et le tissu normal. Cette étude, portant uniquement sur des extraits totaux de tumeur, incluant donc un « mélange » de cellules tumorales et stromales, ne permet pas de conclure quant à l'expression réelle par les cellules carcinomateuses (Lendeckel *et al.*, 2005).

Organe	Technique	ADAM15	Facteur pronostique	Référence
Pancréas n=9	ARMm Microdissection laser	T>N	Non spécifié	Yamada <i>et al.</i> 2007
Estomac n= 32	IHC ARNm	T>N	Non spécifié	C-Mgrath. <i>et al.</i> 2005
Poumon n=70	IHC	T>N	Expression plus forte au niveau du front d'invasion  Pas d'association avec le stade  Pas d'association avec le sous-type histologique	Schütz <i>et al.</i> 2004
Sein n=20	IHC/ARNm	T>N	Association avec les embolies vasculaires	Kuefer <i>et al.</i> 2006
Prostate n=167	IHC/ARNm	T>N	Association avec le stade et le score de Gleason	
Colon n= <10	IHC	T>N		
Sein n=16	ARNm	T=N	Non spécifié	Lendeckel <i>et al.</i> 2004

**Tableau VII : Tableau récapitulant l'expression d'ADAM15 dans différents cancers et son association à différents paramètres clinicopathologiques.** L'expression d'ADAM15 est évaluée dans le tissu tumoral (T) et le tissu normal (N) par immunohistochimie (IHC) et/ou par des techniques de RT-PCR pour l'ARNm.

L'étude de Kuefer *et al.* (2006) évaluant l'intensité de l'immunomarquage d'ADAM15 sur des Tissue Microarrays (TMA) généralistes incluant du tissu mammaire normal (n=37), des carcinomes mammaires (n=66) ainsi que leurs métastases (n=12) montre une expression plus élevée d'ADAM15 dans les carcinomes mammaires par rapport au tissu normal. Cependant, l'anticorps est dirigé contre un peptide de la souris et la spécificité du marquage chez l'homme n'a pas été étudiée.

Les tumeurs métastatiques présentaient le plus haut niveau d'expression. L'expression d'ADAM15 plus élevée dans les métastases et l'association qui est retrouvée entre l'expression d'ADAM15 et l'angio-invasion montre que cette molécule peut être impliquée dans le processus métastatique. Cette relation entre l'expression d'ADAM15 et l'angio-invasion est intéressante pour plusieurs raisons : d'abord, parce que l'angio-invasion a été rapportée comme un facteur prédictif de progression tumorale (Martin

*et al.*, 1987), de rechute locale ou ayant un impact sur la survie globale (Watermann *et al.*, 2004). D'autre part, ADAM15 a été récemment décrite comme une cible thérapeutique potentielle pour les inhibiteurs de la néovascularisation, à partir des données du modèle de souris déficientes en ADAM15 (voir plus haut). De plus, l'ADAM15 contient une séquence RGD qui est connue pour interagir avec les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha v\beta 3$ , intégrines impliquées dans l'angiogenèse. Dans cette étude, l'ADAM15 est également hyper-exprimée dans les carcinomes prostatiques. Cette expression est également associée à des tumeurs plus agressives (avec un score de Gleason plus élevé) et de stade avancé. Cette hyperexpression d'ADAM15 associée à des paramètres pronostiques font suggérer qu'ADAM15 a un rôle dans le processus métastatique et qu'ADAM15 pourrait être une cible thérapeutique pour les patients qui présentent des cancers avec des stades évolués et des cancers plus agressifs.

*Mais, comment cette hyperexpression d'ADAM15 peut-elle avoir un impact sur la croissance tumorale et la dissémination métastatique ?*

Ces auteurs ont transfecté une lignée stable de carcinome prostatique LNCap avec ADAM15. L'analyse des lignées transfectées et des lignées contrôles montrent que l'hyperexpression d'ADAM15 était associée à une induction de protéases (MMP24..) et d'inhibiteurs de métalloprotéases (TIMP2..). Dans un second article, ces mêmes auteurs étudient sur une lignée cancéreuse prostatique agressive PC-3 les conséquences d'une variation d'expression d'ADAM15 (Najy *et al.*, 2008a). Ils induisent une diminution d'expression d'ADAM15 (shADAM15 PC-3) par une technologie de « lentiviral-based short hairpin RNA ». Les expérimentations *in vivo* effectuées chez la souris immunodéficiente (souris SCID) tentent à montrer dans ce modèle très particulier une moindre tumorigénicité de la lignée déficiente en ADAM15. Les expériences *in vitro* montrent que la diminution d'ADAM15 dans ces lignées PC3 entraîne une diminution de la migration cellulaire (évaluée par un test de blessure-réparation) et une diminution de l'adhésion des cellules à différentes matrices (fibronectine, laminine..). Étonnamment, les résultats sont en contradiction avec ceux de l'équipe de D. Merlin qui montrent que dans un test de blessure-réparation, c'est la surexpression d'ADAM15 qui entraîne une diminution de la réparation (Charrier *et al.*, 2005). Cette contradiction peut indiquer soit des fonctions différentes dans des types cellulaires différents, soit une inaptitude des modèles cellulaires proposés ou bien des approches de manipulation d'expression de gènes pour étudier les fonctions de la protéine concernée. En outre, en association avec la diminution d'ADAM15, ces auteurs notent une diminution du clivage de la N-cadhérine, normalement exprimée fortement par les lignées métastatiques sauvages, une diminution de l'expression des intégrines  $\alpha v$  et du CD44 ainsi qu'une diminution de la métalloprotéase

MMP9.

De plus, les auteurs utilisent un modèle d'invasion vasculaire par les cellules tumorales en faisant une co-culture de cellules tumorales prostatiques et de cellules endothéliales issues du cordon ombilical ou de cellules endothéliales issues de la microcirculation. Ils montrent que la diminution d'expression d'ADAM15 dans ces lignées affecte leur pouvoir d'adhésion et de migration sur les monocouches de cellules vasculaires endothéliales. Dans cette expérimentation, le rôle d'ADAM15 dans le processus métastatique est aussi étudié par l'injection intravasculaire des lignées déficientes shADAM15 PC-3 chez les souris SCID, qui entraîne moins de métastases osseuses et pulmonaires par rapport aux souris contrôles (Najy *et al.*, 2008a). L'ensemble de ces résultats rend compte du rôle fonctionnel d'ADAM15 dans les carcinomes prostatiques via des interactions avec l'endothélium vasculaire et de son rôle dans la progression métastatique.

Dans un article récent, Najy *et al.* (2008b) démontrent un nouveau mécanisme d'action d'ADAM15. Dans une lignée de carcinome mammaire, ADAM15 peut induire le clivage de la E-cadhérine générant une forme soluble dans des conditions de carence en facteurs de croissance. Cette dernière forme semble stabiliser et activer les récepteurs HER2 et HER3 qui, par la voie Erk, favorise la prolifération et la migration

### **Expressions d'ADAM15 dans les cancers colorectaux**

Il n'existe à notre connaissance qu'un seul travail où l'expression d'ADAM15 est étudiée sur des Tissue Microarrays (TMA) généralistes incluant des cancers coliques dont le nombre n'est pas précisé. Cette étude immunohistochimique a été faite avec un anticorps de souris dont on ne connaît pas la spécificité. Dans cette série très hétérogène, ils ne tirent aucune conclusion quant à l'expression d'ADAM15 dans cette pathologie tumorale colique en dehors du fait qu'il y aurait une forte suppression dans les cancers (localisation à l'échelon cellulaire non précisée) (Kuefer *et al.*, 2006).

Dans un tel contexte d'absence d'études d'expression d'ADAM15 dans les CCR humains et compte-tenu du rôle potentiel d'ADAM15 dans le remodelage cellulaire, il nous est apparu important d'étudier le rôle d'ADAM15 et de ces principaux ligands dans une série de cancers du côlon.

### **III. RESULTATS**

# 1. ARTICLE N°1

---

## 1.1. Introduction

Notre intérêt pour la calréticuline a été éveillé par les travaux de l'équipe de Forstner (Forstner *et al.*, 1999), puis par d'autres travaux, que nous résumerons ici :

En biologie cellulaire, l'équipe de Forstner montrait dès 1999 que la calréticuline joue un rôle de chaperonne dans le processus de maturation des mucines de sécrétion MUC2, spécifiques des cellules mucosécrétantes caliciformes de l'épithélium intestinal normal (Mc Cool *et al.*, 1999). En cancérologie, *MUC2* semblait être un gène clef dans la mesure où son invalidation chez la souris en faisait un gène candidat suppresseur de tumeur (Velcich *et al.*, 2002).

Il nous semblait donc important d'élucider le statut d'une protéine, la calréticuline, dans les cancers colorectaux, du fait de sa relation avec à la fois le processus de différenciation intestinale et la cancérologie colorectale par l'intermédiaire de MUC2. Enfin, notre intérêt pour une étude cartographique d'expression de calréticuline dans les CCR résidait dans le fait que les seules données disponibles alors étaient les données des études protéomiques initiées par Brunagel *et al.* (2003). Il est à noter que ces études ont été par la suite contredites par Alfonso *et al.* (2005). Ces résultats apparemment contradictoires pouvaient s'expliquer par le fait que la calréticuline est une protéine ubiquitaire. Seule, donc, une cartographie immunohistochimique pouvait résoudre cette contradiction.

Sur un plan plus « mécanistique », l'article de Cole *et al.*, publié en 2000, fondé sur une étude protéomique des adénomes de la souris *Apc<sup>Min/+</sup>* montrait une diminution précoce d'expression de la calréticuline. Cet article avait pour nous une double signification : d'une part, les données n'étaient pas très étonnantes dans la mesure où elles étaient en accord avec la notion d'une dédifférenciation épithéliale au cours du processus néoplasique. La diminution d'expression de calréticuline pouvait donc être un élément contingent, secondaire à une diminution d'expression de MUC2... A l'opposé, cette diminution d'expression étant un phénomène précoce, on ne pouvait éliminer l'hypothèse d'un rôle moteur de cette diminution dans la morphogenèse et/ou la dédifférenciation des néoplasies colorectales. Cette protéine était d'autant plus intrigante qu'il n'existait aucun modèle d'invalidation chez la souris permettant d'identifier éventuellement un rôle de gène suppresseur de tumeur : en effet, l'invalidation de la calréticuline a un effet léthal sur l'embryogénèse en bloquant la morphogenèse cardiaque (Mesaeli *et al.*, 1999).

En dehors de ces articles centrés sur la cancérologie colorectale, d'autres éléments nous intriguaient : la

calréticuline pouvait être considérée comme un effecteur pléiotrope dans la mesure où son rôle dans l'immunité commençait alors à émerger via son récepteur, le CD91 (Gardai *et al.*, 2005).

Au total, donc, nous avons suffisamment d'éléments d'interrogation pour entreprendre un travail visant à élucider le statut de la calréticuline dans les carcinomes colorectaux (CCR). Le travail présenté ci-après est fondé essentiellement sur une biocollection de 58 patients pour lesquels nous avons l'annotation clinicopathologique ainsi que des échantillons congelés maintenus en tumorothèque. Il est évident que cette biocollection de tumorothèque était essentielle parce que les anticorps anti-calréticuline dont nous disposions à l'époque n'étaient utilisables que sur tissu congelé. Le fait de disposer d'échantillons congelés a aussi permis une analyse conjointe de plusieurs marqueurs permettant d'étudier les rapports topographiques de ces protéines. Enfin, nous disposions au sein de l'unité U539 de lignées cancéreuses coliques humaines, de préparations de cellules épithéliales coliques isolées permettant des études d'expression de la calréticuline par immunoblot.

Le but de ce travail était 1/ de déterminer par immunohistochimie semi - quantitative l'expression de la calréticuline dans une série d'adénocarcinomes coliques humains par comparaison avec l'épithélium colique normal, 2/ d'examiner son expression en rapport avec les données clinicopathologiques des tumeurs et 3/ de déterminer sa relation d'expression éventuelle avec son récepteur CD91 dans le contexte de relation tumeur-stroma. Les données sont rapportées dans l'article ci-joint.

## **1.2. Résumé de l'article N°1 : « Altered calreticulin expression in human colon cancer. Maintenance of calreticulin expression is associated with mucinous differentiation »**

**(Toquet *et al.*, *Oncol. Rep.* 2007, 17 : 1101-1107)**

La calréticuline est une protéine chaperonne, responsable du stockage du calcium dans le réticulum endoplasmique. C'est une protéine multifonctionnelle, ligand du récepteur «éboueur» CD91. Des études récentes, basées sur des analyses protéomiques globales utilisant des échantillons comprenant à la fois des cellules tumorales et des cellules non tumorales, ont montré des modifications de l'expression de la calréticuline dans les adénocarcinomes coliques, parfois contradictoires. Les objectifs de cette étude étaient de : 1) déterminer l'expression de la calréticuline et de son récepteur CD91 dans 58 adénocarcinomes coliques humains, comparée à celle de la muqueuse normale appariée, par analyse immunohistochimique semi-quantitative, et 2) d'examiner les associations entre les caractéristiques

phénotypiques des cellules tumorales et l'expression de calréticuline et/ou de CD91. Une diminution de l'expression de la calréticuline était observée dans 51,7% des adénocarcinomes coliques. De façon concordante, une analyse quantitative par immunoblot montrait une diminution significative de l'expression de la calréticuline dans des lignées cancéreuses coliques humaines par rapport aux préparations de cellules épithéliales coliques humaines normales. Dans la muqueuse colique normale, une coexpression du CD91 et de la calréticuline était observée dans les cellules épithéliales et dans les fibroblastes péricryptiques. Le couple Calréticuline / CD91, qui définit une fonction de «phagocyte amateur» des cellules épithéliales, était significativement diminué dans 48% des adénocarcinomes. Enfin, le maintien de l'expression de la calréticuline dans les adénocarcinomes était associé de façon significative à la différenciation mucineuse de ces tumeurs. Tous ces résultats montrent que la calréticuline joue très vraisemblablement un rôle déterminant dans la différenciation des adénocarcinomes coliques humains.

### 1.3. Discussion

Les données essentielles de cet article sont fondées sur l'exploitation d'une biocollection de CCR en utilisant un anticorps anti-calréticuline très spécifique, ne reconnaissant sur différents lysats cellulaires (normaux ou tumoraux) qu'une seule bande attendue d'environ 60kDa. Nous avons observé dans la moitié des CCR une diminution très nette de l'expression de la calréticuline par rapport à l'épithélium colique normal. Cette diminution était également observée dans les lignées cancéreuses colorectales par rapport aux préparations de cellules épithéliales isolées normales. Lorsqu'on recherchait une relation avec les paramètres clinicopathologiques, on trouvait une corrélation très significative entre le maintien de l'expression de la calréticuline et la différenciation mucineuse. Ce dernier élément est tout-à-fait en accord avec le rôle connu de la calréticuline en tant que chaperonne de MUC2, MUC2 étant connu comme très exprimé dans les carcinomes mucineux (Park *et al.*, 2006). Alors que nous avons trouvé une corrélation avec la morphologie tumorale pour la calréticuline ainsi que des pistes pour une recherche d'avenir (voir ci dessous), nous n'avons pas d'élément marquant en ce qui concerne la localisation de CD91, y compris avec les paramètres cliniques. Le nombre relativement faible de cas étudiés est peut-être à l'origine de cette absence de relation avec les paramètres cliniques.

Le fait que nous retrouvions une diminution d'expression de la calréticuline dans nombre de CCR est en accord avec un modèle selon lequel la diminution de calréticuline pourrait être un phénomène précoce (voir les données de la souris *Apc<sup>Min/+</sup>*), qui serait constant au cours de la progression tumorale. En d'autres termes, le gène codant pour la calréticuline pourrait-il être un gène suppresseur de tumeur ? Les données de la littérature fondées sur des études *in vitro* vont à l'appui de notre hypothèse. En effet, il a été montré expérimentalement que l'augmentation de la calréticuline diminue la motilité cellulaire et augmente l'étalement des cellules ; inversement, la perte de calréticuline aboutit à des effets biologiques inverses, à savoir une augmentation de la motilité cellulaire et une diminution de l'adhésion au substrat (Opas *et al.*, 1996). De manière très intrigante, la calréticuline pourrait intervenir dans la réparation de l'ADN en contrôlant la stabilité de la protéine p53 (Mesali *et al.*, 2004). L'absence de calréticuline pourrait protéger les cellules de l'apoptose médiée par p53 lors d'un stress génotoxique conférant ainsi aux cellules un avantage sélectif de survie dans un environnement hostile. Tous ces éléments montrent donc que la calréticuline pourrait exercer un effet suppresseur de tumeur. Dans un autre domaine, celui de l'oncogenèse prostatique, un récent article de Alur *et al.* (2009) a franchi le pas et propose la calréticuline comme gène suppresseur de tumeur dans la prostate.

En oncologie colorectale, une étape majeure reste à franchir, c'est celle d'un modèle animal permettant de tester le rôle éventuel de gène suppresseur de tumeur. Un modèle animal nouveau, indisponible au moment où nous faisons notre recherche, pourrait fournir un argument décisif. Il s'agit d'une souris parvenant à l'état adulte et pourtant déficiente en calréticuline. Cette souris a pu être produite par l'équipe de Guo *et al.* (2002) qui a contourné l'obstacle de la létalité embryonnaire en faisant une surexpression cardiaque de la calcineurine activée, ce qui supplée l'absence de calréticuline pour la morphogénèse cardiaque. Dans ce modèle animal, les cellules épithéliales coliques devraient être déficientes en calréticuline.

Il est donc important de rechercher chez ces souris adultes des modifications pré-néoplasiques ou néoplasiques de l'appareil digestif, ou tout au moins une susceptibilité particulière à un environnement cancérigène. Notre projet de recherche pourrait consister à : 1/ étudier la production de mucines et en particulier MUC2 chez ces souris, 2/ rechercher des adénomes intestinaux, 3/ examiner l'incidence des adénocarcinomes «spontanés» ou ceux induits par un agent susceptible d'induire une cancérogenèse colorectale (azoxyméthane) ou ceux observés chez une souris hétérozygote issue du croisement d'une souris déficiente en calréticuline avec une souris Apc<sup>Min/+</sup>.

Au terme de cette recherche, on pourra donc hiérarchiser l'effet éventuel de l'invalidation de la calréticuline dans le processus d'oncogénèse par rapport aux données actuellement disponibles. Compte-tenu de l'impact de l'exploitation de ce modèle animal, des contacts vont être pris pour entreprendre une recherche collaborative.

## 2. ARTICLE N°2

---

### 2.1. Introduction

Le travail présenté ici est issu d'une réflexion qui a débuté au sein de l'équipe de l'U539, à l'aube des années 2000, en liaison avec Didier Merlin, responsable d'une équipe de recherche à Atlanta (biologie des cellules épithéliales intestinales). A cette époque, venait d'être isolée et clonée une toute nouvelle famille de protéines dont l'acronyme assez étrange « ADAM » (A Disintegrin And Metalloprotease) révélait des propriétés de métalloprotéase et de liaison avec les intégrines (Blobel *et al.*, 1997).

Le rôle biologique de ces protéines multi-domaines et multifonctionnelles restait à élucider. De très nombreuses publications au début des années 2000 montraient l'intervention des membres de cette famille de protéines, notamment ADAM17, dans la signalisation cellulaire par maturation protéolytique et dispersion de cytokines (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF $\alpha$ ), de facteurs de croissance (Tumor Growth Factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), Epidermal Growth Factor (EGF)) (Black *et al.*, 1997 ; Sunnarborg *et al.*, 2002). La plupart des études étaient alors centrées sur des modèles hyper-réductionnistes. L'intérêt de notre équipe s'est vite porté sur ADAM17 en raison de sa fonction métalloprotéase, permettant le clivage protéolytique notamment de TNF $\alpha$  et de son récepteur, ainsi que TGF $\alpha$  et EGF, impliqués dans la pathologie digestive inflammatoire et/ou en oncologie digestive. C'est ainsi que le groupe a publié plusieurs articles sur le rôle d'ADAM17 en pathologie inflammatoire (Jarry *et al.*, 2006 ; Fréour *et al.*, 2009 ; Mosnier *et al.*, 2009) et en pathologie tumorale (Blanchot-Jossic *et al.*, 2005).

Parallèlement, l'équipe de Didier Merlin montrait qu'un autre représentant de la famille ADAM, ADAM15 (MDC-15 ou Metargidine), intervenait dans la migration cellulaire des cellules épithéliales intestinales dans un modèle *in vitro* de blessure-réparation tissulaire sur une monocouche par manipulation génétique (Charrier *et al.*, 2005).

ADAM15 était donc une molécule d'intérêt, potentiellement impliquée dans le remodelage des maladies inflammatoires. C'est ce qui a été montré très clairement par l'exploitation d'une biocollection de tissus de maladies inflammatoires chroniques intestinales (Mosnier *et al.*, 2006) et modélisé *in vitro* (Charrier *et al.*, 2007).

L'investissement de l'équipe dans les travaux sur ADAM15 et la démonstration de son rôle dans le remodelage tissulaire en pathologie inflammatoire nous a amené à examiner le rôle de cette molécule en

pathologie tumorale colorectale, selon une approche qui, in fine, était assez analogue à celle employée pour la calréticuline :

- Comme dans le cas de la calréticuline, nous étions en présence avec ADAM15 d'une protéine ubiquitaire, impliquée dans l'adhésion et la migration cellulaire (Herren *et al.*, 2005 ; Charrier *et al.*, 2005).
- De la même façon que pour la calréticuline, nous étions en présence d'une protéine pour laquelle il était impossible d'effectuer une modélisation de son implication chez la souris car la protéine ADAM15 de la souris diffère de la protéine ADAM15 humaine (Lum *et al.*, 1998).

L'approche que nous avons choisie était nettement plus élaborée et plus complète dans la mesure où elle visait à établir : 1) une connexion avec un patron morphogénétique, 2) une recherche de subordination à un événement épigénétique (méthylation du promoteur d'ADAM15), 3) plus généralement une subordination à un mode d'oncogenèse particulière (statut MSS/MSI) et 4) une recherche d'association avec le pronostic.

L'étude présentée ci-après est fondée sur une biocollection de 94 cancers colorectaux (CCR), annotée clinicopathologiquement. Elle comprend une étude immunohistochimique semi-quantitative de l'expression de la protéine ADAM15, des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  (son ligand) et  $\alpha 3\beta 1$  et de la E-cadhérine, protéines d'adhésion à la matrice ou intervenant dans l'adhésion intercellulaire. Cette étude comprend également l'analyse d'ADAM15 au niveau ARN, la recherche d'une méthylation de son promoteur et enfin une étude de survie (courbe de survie de Kaplan –Meier).

Les données sont rapportées dans l'article joint.

## **2.2. Résumé de l'article N°2 : « ADAM15 to $\alpha 5\beta 1$ integrin switch in colon carcinoma cells : a late event in cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis »**

**(Toquet *et al.*, Int. J. Cancer. 2010 Dec 28. [Epub ahead of print] )**

L'ADAM15, un des membres de la famille des ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease), est une protéine transmembranaire qui se lie à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  via la séquence RGD de son domaine d'adhésion. L'ADAM15, exprimée par les cellules épithéliales coliques humaines normales, est impliquée dans la réparation épithéliale et le remodelage tissulaire au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Les objectifs de cette étude étaient 1) d'analyser l'expression d'ADAM15 dans une série d' adénocarcinomes coliques et dans la muqueuse normale appariée, et 2) d'établir les relations spatiales d'ADAM15 avec son ligand l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , marqueur mésenchymateux, mais également avec d'autres molécules d'adhésion comme l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  et la E-cadhérine. Une série de 94 adénocarcinomes du côlon «classiques» étaient gradés selon la classification de l'OMS. Une étude immunohistochimique était réalisée sur tissu congelé, avec les anticorps dirigés contre l'ADAM15, les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha 3\beta 1$ , et la E-cadhérine. Le taux d'expression des ARNm de l'ADAM15 était quantifié par Q-RT-PCR. De plus, la méthylation du promoteur d'ADAM15 ainsi que le statut d'instabilité microsatellitaire (MSS/MSI) étaient examinés. Trente-six pourcent des carcinomes colorectaux présentaient une diminution d'expression d'ADAM15 dans les cellules tumorales, confirmée au niveau des ARNm dans la majorité des cas et sans méthylation du promoteur d'ADAM15. La diminution d'expression d'ADAM15 était associée au caractère histologique peu différencié des carcinomes. De plus, elle était associée à l'acquisition de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par les cellules tumorales ainsi qu'à une diminution d'expression de l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  et de la E-cadhérine. Enfin, ce profil d'expression, caractéristique d'une transition épithélio-mésenchymateuse, était observé tardivement dans les cancers de pronostic péjoratif.

## 2.3. Discussion

Ce travail est le tout premier à explorer, dans une série de CCR à l'aide d'une biocollezione annotée, l'expression d'ADAM15, de son ligand et de protéines d'adhésion en relation avec le mode d'oncogenèse des tumeurs. Les principales données rapportées dans ce travail montrent :

- 1) Une diminution d'expression (voire une disparition) d'ADAM15 dans 23% des cas de CCR par rapport à la muqueuse colique normale. Cette diminution d'expression a été déterminée par immunohistochimie semi-quantitative en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre le domaine extracellulaire d'ADAM15. Elle n'est donc pas spécifique d'une isoforme puisque les formes d'épissage alternatif ne concernent que le domaine cytosolique de ce gène (Kleino *et al.*, 2007).
- 2) Cette diminution d'expression de la protéine était subordonnée à une diminution d'expression des ARNm correspondants (les amorces de RT-PCR ayant été choisies au niveau de l'ectodomaine, c'est à dire indépendamment des formes d'épissage).
- 3) Cette diminution d'expression n'était pas liée à une méthylation du promoteur d'ADAM15. En effet, l'étude *in silico* effectuée par Stéphane Bézieau avait démontré l'existence d'îlots CpG, cibles potentielles de méthylation du promoteur. Ces sites avaient d'ailleurs été retrouvés par Kleino *et al.* (2007).
- 4) Cette diminution était associée à un phénotype de carcinome peu différencié dont le patron immunophénotypique évoquait une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).
- 5) Enfin, ce processus morphogénétique était un événement tardif dans la progression tumorale et était associé à un mauvais pronostic.

Cette étude montre qu'il est possible de modéliser et hiérarchiser l'action d'une protéine impliquée dans la migration cellulaire au cours de la progression tumorale. Toutefois, un certain nombre de questions sont posées par ce travail :

- La diminution d'expression d'ADAM15 n'est pas associée à un mode d'oncogenèse particulier (MSS/MSI) et n'est pas associée à une méthylation de son promoteur. Comme il s'agit d'un événement tardif dans la progression tumorale, cette diminution d'expression évoque une indépendance de la subordination aux conditions initiales, qui pourrait être expliquée par une réponse à des modifications microenvironnementales au cours de la progression tumorale. En particulier, il serait intéressant d'étudier les formes d'épissage alternatif des ARNm associées à cette diminution d'expression d'ADAM15, ce qui pourrait nous donner des indications sur la signalisation intracellulaire associée à cette diminution d'expression. En effet, les isoformes de la protéine ADAM15, déduites de l'épissage

alternatif des ARNm, et présentant vraisemblablement des modifications de leurs séquences intracytoplasmiques riches en tyrosine et/ ou proline, présentent probablement des interactions différentes avec les protéines régulatrices contenant le domaine SH2 ou SH3.

- Enfin, nous avons remarqué que, dans plusieurs types de cancer, ce n'est pas une diminution de l'expression d'ADAM15 qui a été observée mais une augmentation d'expression (Kuefer *et al.*, 2006 ; Yamada *et al.*, 2007). Celle-ci, lorsqu'elle est déterminée de façon globale, peut révéler en fait un phénomène purement associé au stroma de la tumeur mais qui ne renseigne pas sur le statut des cellules tumorales elles-mêmes. Toutefois, il est tout-à-fait possible que, dans certains types tumoraux, il existe une augmentation d'ADAM15 alors que, dans d'autres, on trouvera une diminution d'expression. Cela traduit le caractère «tissu-spécifique» des fonctions de ce gène, impliquant peut-être des formes d'épissage particulières.

Il existe d'ores et déjà des exemples montrant que les fonctions d'adhésion et de migration d'ADAM15 diffèrent d'un tissu à l'autre (Martin *et al.*, 2002 ; Herren *et al.*, 2005). Cette notion de «tissu-spécificité» est importante dans la mesure où elle a un impact sur la définition des cibles moléculaires. Une cible ne peut être définie isolément. Elle doit être définie dans un contexte tissulaire donné.

## **IV. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**

Au terme de ce travail de thèse, je suis amenée à faire quelques remarques concernant l'évolution de notre réflexion sur un sujet aussi complexe que celui de l'oncogenèse et de la progression de cancers colorectaux (CCR) et aux suites à donner aux travaux présentés ici.

En tant que Pathologiste, je pense légitime de mettre en perspective le rôle du Pathologiste dans la recherche en cancérologie colorectale. Le paradigme dominant actuellement tend à valoriser essentiellement le décryptage «à haut débit» des altérations génétiques (mutations, délétions, réarrangements etc...) dont la partie la plus médiatisée est représentée par le séquençage global du génome des cellules tumorales et le bilan exhaustif des modifications épigénétiques. D'ores et déjà, une multitude de données nouvelles ont été réunies et on peut penser que l'accumulation ira vers un accroissement exponentiel. Le problème majeur qui est bien souligné actuellement est : que faire de ces données ?

Naturellement, il faut les hiérarchiser, c'est-à-dire, séparer celles qui sont les moteurs de l'oncogenèse et de la progression tumorales, de celles qui sont contingentes ou secondaires. Pour cela, la recherche dispose de modèles animaux de plus en plus élaborés, consistant majoritairement en des souris invalidées ou modifiées par transgénèse. Ces modèles, comme nous l'avons vu, ont leurs limitations, souvent sous-estimées dans les conclusions qui sont tirées de leur exploitation. Il existe aussi des modèles *in vitro*, consistant en des lignées essentiellement tumorales, dont on peut modifier le phénotype ou les propriétés biologiques en agissant par manipulation génétique, par voie pharmacologique ou en activant les récepteurs par des ligands spécifiques. Ces modèles *in vitro* eux aussi ont les limitations de tout modèle réductionniste.

Globalement, le décryptage du répertoire des anomalies génétiques et l'utilisation de modèles réductionnistes permettent de définir des gènes et des molécules qui sont potentiellement impliquées dans l'oncogenèse et la progression tumorale. C'est ce que nous avons appelé les effecteurs moléculaires. L'utilisation raisonnée des biocollections tumorales humaines est clairement un outil de choix, véritable modèle au même titre que ceux déjà décrits plus haut avec l'avantage toutefois de révéler les gènes «en action» au sein d'une tumeur.

Pour être considérée comme modèle, une biocollection ne doit pas être simplement un stock de tissus normaux et pathologiques, maintenus sous forme congelée en respectant des règles de traçabilité et de contrôle qualité du prélèvement. La notion de biocollection implique de connecter le tissu pathologique aux données clinicopathologiques disponibles au moment du prélèvement et aussi au suivi du patient. Ainsi, au-delà des études analytiques des tissus cryopréservés (recherche de mutation ou anomalie épigénétique du gène d'intérêt, RT-PCR, étude protéomique...), il est possible de faire une cartographie semi-quantitative par immunohistochimie des effecteurs d'intérêt, éventuellement en relation avec leurs partenaires moléculaires. Idéalement, les données issues de l'exploitation des tissus pathologiques

doivent être en cohérence avec, lorsque cela est possible, la modélisation *in vivo* ou *in vitro* chez l'animal. Parfois même, c'est l'utilisation de biocollections qui est la seule approche disponible pour décrypter le rôle des effecteurs moléculaires lorsqu'il n'existe pas de modèle animal disponible ou lorsqu'il s'agit de molécule ubiquitaire.

Notre recherche sur calréticuline et ADAM15 s'inscrit typiquement dans ce contexte.

#### □ **Calréticuline**

Le problème que nous avons posé initialement était celui d'une étude semi-quantitative d'expression de la protéine associée à une étude topographique de manière à différencier l'expression au sein du contingent tumoral de l'expression au sein du contingent stromal. La biocollection sur laquelle a été fondée notre étude, a apporté des données nouvelles à savoir une diminution d'expression de la calréticuline dans un sous-groupe de carcinome colorectaux (CCR). La dichotomie des CCR selon le niveau d'expression de la calréticuline définissait-elle deux sous-groupes d'intérêt ? La réponse était oui en ce qui concerne la différenciation tumorale. Cependant, nous n'avons pu déterminer de relation entre ces sous-groupes et l'oncogénétique (statut MSS/MSI), ainsi que le stade et /ou le pronostic. En fait, la faiblesse de la biocollection résidait essentiellement dans l'insuffisance du nombre de cas inclus. L'impératif de cohérence avec la seule modélisation animale disponible (protéomique chez la souris *Apc<sup>Min/+</sup>*) implique que la perte de calréticuline devrait être un évènement précoce au cours de l'oncogenèse et stable au cours de la progression tumorale. La disponibilité récente d'un modèle de souris invalidée en calréticuline devrait permettre d'approfondir la problématique de la subordination de la morphogénèse et de la progression tumorale à la perte d'expression de la calréticuline. Nous souhaitons donc poursuivre ce travail selon 2 axes : le premier visera à utiliser une biocollection beaucoup plus importante pour étudier l'expression de la calréticuline. L'outil d'exploitation idéal serait la technique de Tissue Micro-arrays (TMA) en association avec un anticorps utilisable en paraffine. Le second, consistera à essayer de nouer un partenariat avec l'équipe qui a développé le modèle d'inactivation de la calréticuline pour approfondir l'exploitation de ce modèle animal.

#### □ **ADAM15**

Partant d'une biocollection nettement plus importante que lors du précédent travail, il nous a été possible de tirer de cette étude une plus ample moisson de données. En effet, la démonstration que nous avons faite d'une diminution de l'expression de cette protéine au sein du contingent tumoral a été couplée à une démonstration de la subordination à un taux d'ARN diminué, sans modification épigénétique (recherche de méthylation d'îlots CpG du promoteur du gène). La diminution d'expression de la protéine était clairement associée à un processus morphogénétique de type transition épithélio-

mésenchymateuse, ce phénomène étant tardif et associé à un mauvais pronostic. Tous ces éléments permettent d'établir une hiérarchisation du rôle de l'ADAM15 lors de la progression tumorale. Enfin, les données obtenues par l'exploitation de la biocollection sont tout-à-fait cohérentes avec les résultats obtenus par Didier Merlin, basés sur une approche très réductionniste des actions de cette protéine.

### **Pourquoi définir des effecteurs moléculaires d'intérêt dans le déroulement de la progression tumorale ?**

Cette question est tout-à-fait fondamentale car, *in fine*, les réponses apportées vont influencer la démarche thérapeutique. L'approche fondée sur des biocollections et, notamment, l'étude topographique d'expression des effecteurs d'intérêt, permet de considérer une cible thérapeutique dans son contexte, permettant d'éviter l'écueil d'une vision «isolée», réductionniste et possiblement erronée de cette cible thérapeutique.

Notre démarche s'inscrit donc dans une hiérarchisation temporelle et spatiale des effecteurs moléculaires qui doit être fructueuse pour déterminer dans quel contexte histopathologique (morphogénétique) ces effecteurs peuvent devenir des cibles thérapeutiques.

## **V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## A

- Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260:812-6.
- Adachi M, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Inufusa H, Miyake M. Significance of integrin alpha5 gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:96-101.
- Adams H, Tzankov A, Lugli A, Zlobec I. New time-dependent approach to analyse the prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in colon cancer and diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Pathol* 2009; 62:986-97.
- Akino F, Mitomi H, Nakamura T, Ohtani Y, Ichinoe M, Okayasu I. High apoptotic activity and low epithelial cell proliferation with underexpression of p21(WAF1/CIP1) and p27Kip1 of mucinous carcinomas of the colorectum: comparison with well-differentiated type. *Am J Clin Pathol* 2002; 117:908-15.
- Al-Fakhri N, Wilhelm J, Hahn M, Heidt M, Hehrlein FW, Endisch AM, Hupp T, Cherian SM, Bobryshev YV, Lord RS, Katz N. Increased expression of disintegrin-metalloproteinases ADAM-15 and ADAM-9 following upregulation of integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 in atherosclerosis. *J Cell Biochem* 2003; 89:808-23.
- Alexander J, Watanabe T, Wu TT, Rashid A, Li S, Hamilton SR. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2001; 158:527-35.
- Alfonso P, Núñez A, Madoz-Gurpide J, Lombardia L, Sánchez L, Casal JI. Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Proteomics* 2005; 5:2602-11.
- Alur M, Nguyen MM, Eggener SE, Jiang F, Dadras SS, Stern J, Kimm S, Roehl K, Kozlowski J, Pins M, Michalak M, Dhir R, Wang Z. Suppressive roles of calreticulin in prostate cancer growth and metastasis. *Am J Pathol* 2009; 175:882-90.
- Andrin C, Corbett EF, Johnson S, Dabrowska M, Campbell ID, Eggleton P, Opas M, Michalak M. Expression and purification of mammalian calreticulin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2000; 20:207-15.
- Andrin C, Pinkoski MJ, Burns K, Atkinson EA, Krahenbuhl O, Hudig D, Fraser SA, Winkler U, Tschopp J, Opas M, Bleackley RC, Michalak M. Interaction between a Ca<sup>2+</sup>-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry* 1998; 37:10386-94.
- Aoudjit F, Vuori K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*. 2001a; 20:4995-5004.
- Aoudjit F, Vuori K. Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. *J Cell Biol* 2001b; 152:633-43.
- Arnaudeau S, Frieden M, Nakamura K, Castelbou C, Michalak M, Demaurex N. Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem* 2002; 277:46696-705.
- Arosa FA, de Jesus O, Porto G, Carmo AM, de Sousa M. Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class I molecules. *J Biol Chem* 1999;274:16917-22.
- Ashby MC, Tepikin AV. ER calcium and the functions of intracellular organelles. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12:11-7.

Ashcom JD, Tiller SE, Dickerson K, Cravens JL, Argraves WS, Strickland DK. The human alpha 2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2-macroglobulin. *J Cell Biol* 1990;110:1041-8.

Asker N, Axelsson MA, Olofsson SO, Hansson GC. Dimerization of the human MUC2 mucin in the endoplasmic reticulum is followed by a N-glycosylation dependent transfer of the mono- and dimers to the Golgi apparatus. *J Biol Chem*. 1998;273:18857-63.

Audie JP, Janin A, Porchet N, Copin MC, Gosselin B, Aubert JP. Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1479-85.

Augeron C, Laboisse CL. Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res* 1984;44:3961-9.

## **B**

Baksh S, Spamer C, Heilmann C, Michalak M. Identification of the Zn<sup>2+</sup> binding region in calreticulin. *FEBS Lett* 1995;376:53-7.

Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:102-11.

Bao W, Strömblad S. Integrin alphav-mediated inactivation of p53 controls a MEK1-dependent melanoma cell survival pathway in three-dimensional collagen. *J Cell Biol*. 2004 Nov 22;167:745-56.

Baron M. An overview of the Notch signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol*. 2003 Apr;14:113-9.

Bartman AE, Buisine MP, Aubert JP, Niehans GA, Toribara NW, Kim YS, Kelly EJ, Crabtree JE, Ho SB. The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues. *J Pathol* 1998;186:398-405.

Bastianutto C, Clementi E, Codazzi F, Podini P, De Giorgi F, Rizzuto R, Meldolesi J, Pozzan T. Overexpression of calreticulin increases the Ca<sup>2+</sup> capacity of rapidly exchanging Ca<sup>2+</sup> stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function. *J Cell Biol* 1995;130:847-55.

Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 2001;14:303-13.

Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, Sheppard D, Oettgen P, Mercurio AM. Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest* 2005;115:339-47.

Bates RC, Mercurio AM. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Mol Biol Cell* 2003;14:1790-800.

Bello L, Francolini M, Marthyn P, Zhang J, Carroll RS, Nikas DC, Strasser JF, Villani R, Cheresch DA, Black PM. Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery* 2001;49:380-9; discussion390.

Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, de Leeuw WJ, Nollet F, van Roy F, Cornelisse C. E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene* 1996;13:1919-25.

Biemer-Hüttmann AE, Walsh MD, McGuckin MA, Ajioka Y, Watanabe H, Leggett BA, Jass JR. Immunohistochemical staining patterns of MUC1, MUC2, MUC4, and MUC5AC mucins in hyperplastic polyps,

serrated adenomas, and traditional adenomas of the colorectum. *J Histochem Cytochem* 1999;47:1039-48.

Biemer-Hüttmann AE, Walsh MD, McGuckin MA, Simms LA, Young J, Leggett BA, Jass JR. Mucin core protein expression in colorectal cancers with high levels of microsatellite instability indicates a novel pathway of morphogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6:1909-16.

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 1997;385:729-33.

Blanchot-Jossic F, Jarry A, Masson D, Bach-Ngohou K, Paineau J, Denis MG, Laboisie CL, Mosnier JF. Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J Pathol* 2005;207:156-63.

Blank M, Klussmann E, Krüger-Krasagakes S, Schmitt-Gräff A, Stolte M, Bornhoeft G, Stein H, Xing PX, McKenzie IF, Verstijnen CP, et al. Expression of MUC2-mucin in colorectal adenomas and carcinomas of different histological types. *Int J Cancer* 1994;59:301-6.

Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell* 1997;90:589-92.

Bossuyt W, Kazanjian A, De Geest N, Van Kelst S, De Hertogh G, Geboes K, Boivin GP, Luciani J, Fuks F, Chuah M, VandenDriessche T, Marynen P, Cools J, Shroyer NF, Hassan BA. Atonal homolog 1 is a tumor suppressor gene. *PLoS Biol.* 2009 Feb 24;7(2):e39.

Boutet A, De Frutos CA, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J, Nieto MA. Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J* 2006;25:5603-13.

Boveri T. Über mephrilige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. [On multipolar mitosis as a means of analysis of the cell nucleus]. *Verhandl. Physik.-medizinische Gesellschaft zu Würzburg. Neue Folge* 1902;35:67-90; translated by S Gluecksohn-Waelsch, and published in : *Foundations of Experimental Embryology*. 2nd ed. New York : Hafner Press; 1974.p.74-97.

Brabant G, Hoang-Vu C, Cetin Y, Dralle H, Scheumann G, Mölne J, Hansson G, Jansson S, Ericson LE, Nilsson M. E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies. *Cancer Res* 1993;53:4987-93.

Brabletz T, Jung A, Hermann K, Günther K, Hohenberger W, Kirchner T. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract* 1998;194:701-4.

Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10356-61.

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258-61.

Brünagel G, Shah U, Schoen RE, Getzenberg RH. Identification of calreticulin as a nuclear matrix protein associated with human colon cancer. *J Cell Biochem* 2003;89:238-43.

Buisine MP, Devisme L, Savidge TC, Gespach C, Gosselin B, Porchet N, Aubert JP. Mucin gene expression in human embryonic and fetal intestine. *Gut* 1998;43:519-24.

Buisine MP, Devisme L, Degand P, Dieu MC, Gosselin B, Copin MC, Aubert JP, Porchet N. Developmental mucin gene expression in the gastroduodenal tract and accessory digestive glands. II. Duodenum and liver, gallbladder, and pancreas. *J Histochem Cytochem*. 2000a;48:1667-76.

Buisine MP, Devisme L, Maunoury V, Deschodt E, Gosselin B, Copin MC, Aubert JP, Porchet N. Developmental mucin gene expression in the gastroduodenal tract and accessory digestive glands. I. Stomach. A relationship to gastric carcinoma. *J Histochem Cytochem*. 2000b;48:1657-66.

Burgess TL, Kelly RB. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol* 1987;3:243-93.

Burlak C, Whitney AR, Mead DJ, Hackstadt T, Deleo FR. Maturation of human neutrophil phagosomes includes incorporation of molecular chaperones and endoplasmic reticulum quality control machinery. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:620-34.

Burns K, Duggan B, Atkinson EA, Famulski KS, Nemer M, Bleackley RC, Michalak M. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature* 1994;367:476-80.

Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 1988;4:487-525.

## C

Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roessner A, Röcken C. The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int J Oncol* 2005;26:17-24.

Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*. 2009 Nov-Dec;59(6):366-78.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563-72.

Chandler I, Houlston RS. Interobserver agreement in grading of colorectal cancers-findings from a nationwide web-based survey of histopathologists. *Histopathology* 2008;52:494-9.

Chapuis PH, Dent OF, Fisher R, Newland RC, Pheils MT, Smyth E, Colquhoun K. A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Br J Surg* 1985;72:698-702.

Charrier L, Yan Y, Driss A, Labois CL, Sitaraman SV, Merlin D. ADAM-15 inhibits wound healing in human intestinal epithelial cell monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G346-53.

Charrier L, Yan Y, Nguyen HT, Dalmaso G, Labois CL, Gewirtz AT, Sitaraman SV, Merlin D. ADAM-15/metargidin mediates homotypic aggregation of human T lymphocytes and heterotypic interactions of T lymphocytes with intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2007;282:16948-58.

Charrier-Hisamuddin L, Labois CL, Merlin D. ADAM-15: a metalloprotease that mediates inflammation. *FASEB J* 2008;22:641-53.

Cheng WF, Hung CF, Chai CY, Hsu KF, He L, Ling M, Wu TC. Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J Clin Invest* 2001;108:669-78.

Cheng WF, Hung CF, Chen CA, Lee CN, Su YN, Chai CY, Boyd DA, Hsieh CY, Wu TC. Characterization of DNA vaccines encoding the domains of calreticulin for their ability to elicit tumor-specific immunity and antiangiogenesis. *Vaccine* 2005;23:3864-74.

Choi BJ, Cho YG, Song JW, Kim CJ, Kim SY, Nam SW, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Altered expression of the

KLF4 in colorectal cancers. *Pathol Res Pract* 2006;202:585-9.

Choy MY, Richman PI, Horton MA, MacDonald TT. Expression of the VLA family of integrins in human intestine. *J Pathol* 1990;160:35-40.

Cole AR, Ji H, Simpson RJ. Proteomic analysis of colonic crypts from normal, multiple intestinal neoplasia and p53-null mice: a comparison with colonic polyps. *Electrophoresis* 2000;21:1772-81.

Coppolino M, Leung-Hagesteijn C, Dedhar S, Wilkins J. Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *J Biol Chem* 1995;270:23132-8.

Coppolino MG, Dedhar S. Calreticulin. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:553-8.

Coppolino MG, Woodside MJ, Demaurex N, Grinstein S, St-Arnaud R, Dedhar S. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* 1997;386:843-7.

Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci* 2001;6:D1321-57.

Courter DL, Lomas L, Scatena M, Giachelli CM. Src kinase activity is required for integrin alphaVbeta3-mediated activation of nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 2005;280:12145-51.

Cripps WH. Two cases of disseminated polypus of the rectum. *Transact Path Soc London* 1882;33:165-68.

## D

Danen EH, Ten Berge PJ, Van Muijen GN, Van 't Hof-Grootenboer AE, Bröcker EB, Ruiter DJ. Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology* 1994;24:249-56.

Darribère T. *Le développement d'un mammifère : la souris*. Ed Belin. Paris. 2003.

De Leeuw WJ, Berx G, Vos CB, Peterse JL, Van de Vijver MJ, Litvinov S, Van Roy F, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen AM. Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ. *J Pathol* 1997;183:404-

Dedhar S, Rennie PS, Shago M, Hagesteijn CY, Yang H, Filmus J, Hawley RG, Bruchofsky N, Cheng H, Matusik RJ, et al. Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature* 1994;367:480-3.

Dekker J, Rossen JW, Büller HA, Einerhand AW. The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci*. 2002 Mar;27(3):126-31.

Dekker J, Strous GJ. Covalent oligomerization of rat gastric mucin occurs in the rough endoplasmic reticulum, is N-glycosylation-dependent, and precedes initial O-glycosylation. *J Biol Chem* 1990;265:18116-22.

Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010;10:9-22.

Desseyn JL, Buisine MP, Porchet N, Aubert JP, Degand P, Laine A. Evolutionary history of the 11p15 human mucin gene family. *J Mol Evol* 1998;46:102-6.

Devine PL, McGuckin MA, Birrell GW, Whitehead RH, Sachdev GP, Shield P, Ward BG. Monoclonal antibodies reacting with the MUC2 mucin core protein. *Br J Cancer* 1993;67:1182-8.

Dikovskaya D, Schiffmann D, Newton IP, Oakley A, Kroboth K, Sansom O, Jamieson TJ, Meniel V, Clarke A,

Näthke IS. Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J Cell Biol* 2007;176:183-95. Erratum in: *J Cell Biol* 2007;176:369.

Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, Vecchiato N, Macri E, Fornasarig M, Boiocchi M. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* 1999;154:1805-13.

Dukes CE. Familial intestinal polyposis. *J Clin Pathol* 1947;1:34-37.

## **E**

Edelmann W, Umar A, Yang K, Heyer J, Kucherlapati M, Lia M, Kneitz B, Avdievich E, Fan K, Wong E, Crouse G, Kunkel T, Lipkin M, Kolodner RD, Kucherlapati R. The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression. *Cancer Res* 2000;60:803-7.

Edelmann W, Yang K, Umar A, Heyer J, Lau K, Fan K, Liedtke W, Cohen PE, Kane MF, Lipford JR, Yu N, Crouse GF, Pollard JW, Kunkel T, Lipkin M, Kolodner R, Kucherlapati R. Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility. *Cell* 1997;91:467-77.

Efstathiou JA, Liu D, Wheeler JM, Kim HC, Beck NE, Ilyas M, Karayiannakis AJ, Mortensen NJ, Kmiot W, Playford RJ, Pignatelli M, Bodmer WF. Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2316-21.

El-Bahrawy MA, Poulosom R, Jeffery R, Talbot I, Alison MR. The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2001 ;32:1216-24.

Elton CM, Smethurst PA, Eggleton P, Farndale RW. Physical and functional interaction between cell-surface calreticulin and the collagen receptors integrin alpha2beta1 and glycoprotein VI in human platelets. *Thromb Haemost* 2002;88:648-54.

Escande F, Aubert JP, Porchet N, Buisine MP. Human mucin gene MUC5AC: organization of its 5'-region and central repetitive region. *Biochem J* 2001;358:763-72.

Eto K, Puzon-McLaughlin W, Sheppard D, Sehara-Fujisawa A, Zhang XP, Takada Y. RGD-independent binding of integrin alpha9beta1 to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. *J Biol Chem* 2000;275:34922-30.

## **F**

Faux MC, Ross JL, Meeker C, Johns T, Ji H, Simpson RJ, Layton MJ, Burgess AW. Restoration of full-length adenomatous polyposis coli (APC) protein in a colon cancer cell line enhances cell adhesion. *J Cell Sci* 2004;117:427-39.

Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001;10:721-33.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67. Torlakovic E, Snover DC. Serrated adenomatous polyposis in humans. *Gastroenterology* 1996;110:748-55.

Feng W, McCabe NP, Mahabeleshwar GH, Somanath PR, Phillips DR, Byzova TV. The angiogenic response is dictated by beta3 integrin on bone marrow-derived cells. *J Cell Biol* 2008;183:1145-57.

Ferreira V, Molina MC, Schwaeble W, Lemus D, Ferreira A. Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin modulate the complement system and angiogenesis? *Trends Parasitol* 2005;21:169-74.

Filipe MI. Mucins in the human gastrointestinal epithelium: a review. *Invest Cell Pathol* 1979;2:195-216.

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-38. Erratum in: *Cell* 1994;77:167.

Fliegel L, Burns K, MacLennan DH, Reithmeier RA, Michalak M. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1989;264:21522-8.

Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH, Clevers H. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 2001;3:433-8.

Fournier AK, Campbell LE, Castagnino P, Liu WF, Chung BM, Weaver VM, Chen CS, Assoian RK. Rac-dependent cyclin D1 gene expression regulated by cadherin- and integrin-mediated adhesion. *J Cell Sci* 2008;121:226-33

Franceschini F, Cavazzana I. Anti-Ro/SSA and La/SSB antibodies. *Autoimmunity* 2005;38:55-63.

Francí C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gómez S, Rodríguez R, Escrivà M, Montserrat-Sentís B, Baró T, Garrido M, Bonilla F, Virtanen I, García de Herreros A. Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene* 2006;25:5134-44.

Frayling IM. Familial adenomatous polyposis. *Encyclopedia of live sciences* 2005;1-4.

Fréour T, Jarry A, Bach-Ngohou K, Dejoie T, Bou-Hanna C, Denis MG, Mosnier JF, Laboisie CL, Masson D. TACE inhibition amplifies TNF-alpha-mediated colonic epithelial barrier disruption. *Int J Mol Med*. 2009 Jan;23(1):41-8.

Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 1995;270:1500-2.

Friedrichs K, Ruiz P, Franke F, Gille I, Terpe HJ, Imhof BA. High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res* 1995;55:901-6.

Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, Rashid A, Longo P, Eshleman JR, Booker S, Lynch HT, Jass JR, Green JS, Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1998;153:1063-78.

## G

Gao, B., Adhikari, R., Howarth, M., Nakamura, K., Gold, M. C., Hill, A. B., Knee, R., Michalak, M. and Elliott, T. Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity* 2002;16: 99–109.

Gardai SJ, McPhillips KA, Frasnich SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 2005;123:321-34.

Garinis GA, Menounos PG, Spanakis NE, Papadopoulos K, Karavitis G, Parassi I, Christeli E, Patrinos GP, Manolis EN, Peros G. Hypermethylation-associated transcriptional silencing of E-cadherin in primary sporadic colorectal carcinomas. *J Pathol* 2002;198:442-9.

- Garmy-Susini B, Jin H, Zhu Y, Sung RJ, Hwang R, Varner J. Integrin alpha4beta1-VCAM-1-mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation. *J Clin Invest* 2005;115:1542-51.
- Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M, Tagliabue E, Castiglioni F, Villani L, Magalotti C, Gibelli N, Oliviero B, Ballardini B, Da Prada G, Zambelli A, Costa A. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5650-5
- Ghaleb AM, McConnell BB, Nandan MO, Katz JP, Kaestner KH, Yang VW. Haploinsufficiency of Krüppel-like factor 4 promotes adenomatous polyposis coli dependent intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 2007;67:7147-54.
- Goldman H, Ming SC. Mucins in normal and neoplastic gastrointestinal epithelium. Histochemical distribution. *Arch Pathol* 1968;85:580-6.
- Gong J, Wang D, Sun L, Zborowska E, Willson JK, Brattain MG. Role of alpha 5 beta 1 integrin in determining malignant properties of colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1997;8:83-90.
- Graham DM, Appelman HD. Crohn's-like lymphoid reaction and colorectal carcinoma: a potential histologic prognosticator. *Mod Pathol* 1990;3:332-5.
- Gratchev A, Siedow A, Bumke-Vogt C, Hummel M, Foss HD, Hanski ML, Kobalz U, Mann B, Lammert H, Mansmann U, Stein H, Riecken EO, Hanski C. Regulation of the intestinal mucin MUC2 gene expression in vivo: evidence for the role of promoter methylation. *Cancer Lett*. 2001;168:71-80. Erratum in: *Cancer Lett* 2002;175:107.
- Greber UF, Gerace L. Depletion of calcium from the lumen of endoplasmic reticulum reversibly inhibits passive diffusion and signal-mediated transport into the nucleus. *J Cell Biol* 1995;128:5-14.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66:589-600.
- Gross MS, Guyonnet-Duperat V, Porchet N, Bernheim A, Aubert JP, Nguyen VC. Mucin 4 (MUC4) gene: regional assignment (3q29) and RFLP analysis. *Ann Genet* 1992;35:21-6.
- Grunwald GB. The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:797-805.
- Guan JL, Hynes RO. Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. *Cell* 1990;60:53-61
- Guillem P, Billeret V, Buisine MP, Flejou JF, Lecomte-Houcke M, Degand P, Aubert JP, Triboulet JP, Porchet N. Mucin gene expression and cell differentiation in human normal, premalignant and malignant esophagus. *Int J Cancer* 2000;88:856-61.
- Gulubova M, Vlaykova T. Immunohistochemical assessment of fibronectin and tenascin and their integrin receptors alpha5beta1 and alpha9beta1 in gastric and colorectal cancers with lymph node and liver metastases. *Acta Histochem* 2006;108:25-35.
- Gum JR, Byrd JC, Hicks JW, Toribara NW, Lamport DT, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *J Biol Chem* 1989;264:6480-7.
- Gum JR Jr, Hicks JW, Toribara NW, Rothe EM, Lagace RE, Kim YS. The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region. *J Biol Chem* 1992;267:21375-83.

Guo L, Nakamura K, Lynch J, Opas M, Olson EN, Agellon LB, Michalak M. Cardiac-specific expression of calcineurin reverses embryonic lethality in calreticulin-deficient mouse. *J Biol Chem* 2002;277:50776-9.

Guo L, Groenendyk J, Papp S, Dabrowska M, Knoblach B, Kay C, Parker JM, Opas M, Michalak M. Identification of an N-domain histidine essential for chaperone function in calreticulin. *J Biol Chem* 2003;278:50645-53.

## H

Halberg RB, Waggoner J, Rasmussen K, White A, Clipson L, Prunuske AJ, Bacher JW, Sullivan R, Washington MK, Pitot HC, Petrini JH, Albertson DG, Dove WF. Long-lived Min mice develop advanced intestinal cancers through a genetically conservative pathway. *Cancer Res* 2009;69:5768-75.

Hamilton SR, Aaltonen LA. WHO classification of tumours. Tumours of the digestive system. Lyon;IARC Press; 2000.

Hanisch FG, Reis CA, Clausen H, Paulsen H. Evidence for glycosylation-dependent activities of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases rGalNAc-T2 and -T4 on mucin glycopeptides. *Glycobiology* 2001;11:731-40.

Hansemann D. Über asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen and deren biologische Bedeutung. 5 On the asymmetrical cell division in epithelial cancers and its biological significance). *Arch Pathol Anat etc Berl (Virchow's Arch)* 1890;119:229-326.

Hansemann D. Studien über die Spezifität, den Altruismus und die Anaplasie der Zellen mit besonderer Berücksichtigung der Geschwülste. [Studies of the specificity, altruism and anaplasia of cells with special reference to tumours]. Berlin:A. Hirschwald; 1893

Harrison JC, Dean PJ, el-Zeky F, Vander Zwaag R. Impact of the Crohn's-like lymphoid reaction on staging of right-sided colon cancer: results of multivariate analysis. *Hum Pathol* 1995;26:31-8.

Hawkins NJ, Ward RL. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1307-13.

Hayward IP, Whitehead RH. Patterns of growth and differentiation in the colon carcinoma cell line LIM 1863. *Int J Cancer* 1992;50:752-9.

Hazelbag S, Kenter GG, Gorter A, Dreef EJ, Koopman LA, Violette SM, Weinreb PH, Fleuren GJ. Overexpression of the alpha v beta 6 integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival. *J Pathol* 2007;212:316-24.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281:1509-12.

Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev* 2007;87:1377-408.

Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6870-5.

Hermiston ML, Gordon JI. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1995a;129:489-506.

Hermiston ML, Gordon JJ. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 1995b;270:1203-7.

Herren B, Raines EW, Ross R. Expression of a disintegrin-like protein in cultured human vascular cells and in vivo. *FASEB J* 1997;11:173-80.

Herren B, Garton KJ, Coats S, Bowen-Pope DF, Ross R, Raines EW. ADAM15, overexpression in NIH3T3 cells enhances cell-cell interactions. *Exp Cell Res* 2001;271:152-60.

Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA. Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 1986;25:473-6.

Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1993;53:641-51.

Hood JD, Frausto R, Kiosses WB, Schwartz MA, Chersesh DA. Differential alphaV integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis. *J Cell Biol* 2003;162:933-43.

Horiuchi K, Weskamp G, Lum L, Hammes HP, Cai H, Brodie TA, Ludwig T, Chiusaroli R, Baron R, Preissner KT, Manova K, Blobel CP. Potential role for ADAM15 in pathological neovascularization in mice. *Mol Cell Biol* 2003;23:5614-24.

Hosotani R, Kawaguchi M, Masui T, Koshihara T, Ida J, Fujimoto K, Wada M, Doi R, Imamura M. Expression of integrin alphaVbeta3 in pancreatic carcinoma: relation to MMP-2 activation and lymph node metastasis. *Pancreas* 2002;e30-5.

Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:548-58.

Huh YH, Yoo SH. Presence of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor isoforms in the nucleoplasm. *FEBS Lett* 2003;555:411-8.

## I

Ilyas M, Tomlinson IP, Hanby A, Talbot IC, Bodmer WF. Allele loss, replication errors and loss of expression of E-cadherin in colorectal cancers. *Gut* 1997;40:654-9.

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.

Irby RB, Yeatman TJ. Increased Src activity disrupts cadherin/catenin-mediated homotypic adhesion in human colon cancer and transformed rodent cells. *Cancer Res* 2002;62:2669-74.

Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:988-93.

## J

Jais P, Sabourin JC, Bombled J, Rougier P, Lasser P, Duvillard P, Bénard J, Bressac-de Paillerets B. Absence of somatic alterations of the EBI gene adenomatous polyposis coli-associated protein in human sporadic colorectal cancers. *Br J Cancer* 1998;78:1356-60.

Jarry A, Bach-Ngohou K, Masson D, Dejoie T, Lehur PA, Mosnier JF, Denis MG, Labois CL. Human colonic myocytes are involved in postischemic inflammation through ADAM17-dependent TNFalpha production. *Br J Pharmacol* 2006;147:64-72.

Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, Bussey HJ, Morson BC, Northover JM, Todd IP. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 1986;10:437-59.

Jass JR, Love SB, Northover JM. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987;1:1303-6.

Jass JR. Serrated adenoma and colorectal cancer. *J Pathol* 1999;187:499-502.

Jass JR, Iino H, Ruzskiewicz A, Painter D, Solomon MJ, Koorey DJ, Cohn D, Furlong KL, Walsh MD, Palazzo J, Edmonston TB, Fishel R, Young J, Leggett BA. Neoplastic progression occurs through mutator pathways in hyperplastic polyposis of the colorectum. *Gut* 2000;47:43-9.

Jass JR. Serrated route to colorectal cancer: back street or super highway? *J Pathol* 2001;193:283-5.

Jass JR. Limitations of the adenoma-carcinoma sequence in colorectum. *Clin Cancer Res* 2004;10:5969-70; author reply 5970.

Jazowiecka-Rakus J, Jarosz M, Szala S. Combination of vasostatin gene therapy with cyclophosphamide inhibits growth of B16(F10) melanoma tumours. *Acta Biochim Pol* 2006;53:199-202.

Jessurun J, Romero-Guadarrama M, Manivel JC. Medullary adenocarcinoma of the colon: clinicopathologic study of 11 cases. *Hum Pathol* 1999;30:843-8.

Jin H, Su J, Garmy-Susini B, Kleeman J, Varner J. Integrin  $\alpha 4\beta 1$  promotes monocyte trafficking and angiogenesis in tumors. *Cancer Res* 2006;66:2146-52.

Jung H, Lee KP, Park SJ, Park JH, Jang YS, Choi SY, Jung JG, Jo K, Park DY, Yoon JH, Park JH, Lim DS, Hong GR, Choi C, Park YK, Lee JW, Hong HJ, Kim S, Park YW. TMPRSS4 promotes invasion, migration and metastasis of human tumor cells by facilitating an epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 2008;27:2635-47.

## K

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119:1420-8. Erratum in: *J Clin Invest* 2010;120:1786.

Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Young J, Jass JR, Leggett BA. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 2004;53:1137-44.

Kapoor M, Ellgaard L, Gopalakrishnapai J, Schirra C, Gemma E, Oscarson S, Helenius A, Suroli A. Mutational analysis provides molecular insight into the carbohydrate-binding region of calreticulin: pivotal roles of tyrosine-109 and aspartate-135 in carbohydrate recognition. *Biochemistry*. 2004;43:97-106.

Karská K, Tucková L, Steiner L, Tlaskalová-Hogenová H, Michalak M. Calreticulin--the potential autoantigen in celiac disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;209:597-605.

Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Lee CS, Labosky PA, Yang VW, Kaestner KH. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development*. 2002;129:2619-28.

Kim S, Kang HY, Nam EH, Choi MS, Zhao XF, Hong CS, Lee JW, Lee JH, Park YK. TMPRSS4 induces invasion and epithelial-mesenchymal transition through upregulation of integrin  $\alpha 5$  and its signaling pathways. *Carcinogenesis* 2010;31:597-606.

Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P,

McKechnie D, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991;253:661-5.

Kinsella AR, Green B, Lepts GC, Hill CL, Bowie G, Taylor BA. The role of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in large bowel tumour cell invasion and metastasis. *Br J Cancer* 1993;67:904-9.

Kishore U, Sontheimer RD, Sastry KN, Zappi EG, Hughes GR, Khamashta MA, Reid KB, Eggleton P. The systemic lupus erythematosus (SLE) disease autoantigen-calreticulin can inhibit C1q association with immune complexes. *Clin Exp Immunol* 1997;108:181-90.

Kleino I, Ortiz RM, Huovila AP. ADAM15 gene structure and differential alternative exon use in human tissues. *BMC Mol Biol* 2007;8:90.

Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol* 2009;174:1588-93.

Krätzschmar J, Lum L, Blobel CP. Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J Biol Chem* 1996;271:4593-6.

Kren A, Baeriswyl V, Lehembre F, Wunderlin C, Strittmatter K, Antoniadis H, Fässler R, Cavallaro U, Christofori G. Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of beta1-integrin function. *EMBO J* 2007;26:2832-42.

Kudo T, Matsumoto T, Esaki M, Yada S, Hirahashi M, Kayashima K, Yao T, Iida M. Small invasive colonic cancer occurring in a hyperplastic polyp. *Endoscopy* 2004;36:825-8.

Kuefer R, Day KC, Klee CG, Sabel MS, Hofer MD, Varambally S, Zorn CS, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Day ML. ADAM15 disintegrin is associated with aggressive prostate and breast cancer disease. *Neoplasia* 2006;8:319-29.

Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biol Int*. 1999;23:157-61.

Kwon MS, Park CS, Choi K, Ahn J, Kim JJ, Eom SH, Kaufman SJ, Song WK. Calreticulin couples calcium release and calcium influx in integrin-mediated calcium signaling. *Mol Biol Cell* 2000;11:1433-43.

## L

Laburthe M, Augeron C, Rouyer-Fessard C, Roumagnac I, Maoret JJ, Grasset E, Laboisse C. Functional VIP receptors in the human mucus-secreting colonic epithelial cell line CL.16E. *Am J Physiol* 1989;256:G443-50.

Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, Clark S, Johnson V, Bell J, Frayling I, Efstathiou J, Pack K, Payne S, Royle R, Gorman P, Sheer D, Neale K, Phillips R, Talbot I, Bodmer W, Tomlinson I. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat Med* 1999;5:1071-5

Lane N, Kaplan H, Pascal RR. Minute adenomatous and hyperplastic polyps of the colon: divergent patterns of epithelial growth with specific associated mesenchymal changes. Contrasting roles in the pathogenesis of carcinoma. *Gastroenterology* 1971;60:537-51.

Langer H, May AE, Bültmann A, Gawaz M. ADAM 15 is an adhesion receptor for platelet GPIIb-IIIa and induces platelet activation. *Thromb Haemost* 2005;94:555-61.

Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:8263-7.

Leach MR, Cohen-Doyle MF, Thomas DY, Williams DB. Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin. *J Biol Chem* 2002;277:29686-97.

Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75:1215-25.

Lendeckel U, Kohl J, Arndt M, Carl-McGrath S, Donat H, Röcken C. Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:41-8.

Leow CC, Romero MS, Ross S, Polakis P, Gao WQ. Hath1, down-regulated in colon adenocarcinomas, inhibits proliferation and tumorigenesis of colon cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:6050-7.

Lindblom A, Tannergård P, Werelius B, Nordenskjöld M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet* 1993;5:279-82.

Liu M, Imam H, Oberg K, Zhou Y. Gene transfer of vasostatin, a calreticulin fragment, into neuroendocrine tumor cells results in enhanced malignant behavior. *Neuroendocrinology* 2005;82:1-10.

Lockhart-Mummery JP. Cancer and heredity. *Lancet* 1925;1:427-9.

Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1990;14:524-37.

Lugli A, Zlobec I, Baker K, Minoo P, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR. Prognostic significance of mucins in colorectal cancer with different DNA mismatch-repair status. *J Clin Pathol* 2007;60:534-9.

Lum L, Reid MS, Blobel CP. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J Biol Chem* 1998;273:26236-47.

Lynch J, Guo L, Gelebart P, Chilibeck K, Xu J, Molkentin JD, Agellon LB, Michalak M. Calreticulin signals upstream of calcineurin and MEF2C in a critical Ca(2+)-dependent signaling cascade. *J Cell Biol* 2005;170:37-47.

Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med* 1966;117:206-12.

## M

McCabe NP, De S, VasANJI A, Brainard J, Byzova TV. Prostate cancer specific integrin alphavbeta3 modulates bone metastatic growth and tissue remodeling. *Oncogene* 2007;26:6238-43

Mäkinen MJ, George SM, Jernvall P, Mäkelä J, Vihko P, Karttunen TJ. Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis. *J Pathol* 2001;193:286-94.

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995;268:1336-8.

Martin J, Eynstone LV, Davies M, Williams JD, Steadman R. The role of ADAM 15 in glomerular mesangial cell migration. *J Biol Chem* 2002;277:33683-9.

Martin SA, Perez-Reyes N, Mendelsohn G. Angioinvasion in breast carcinoma. An immunohistochemical study of factor VIII-related antigen. *Cancer* 1987;59:1918-22.

Maupas-Schwalm F, Bedel A, Augé N, Grazide MH, Mucher E, Thiers JC, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Integrin alpha(v)beta(3), metalloproteinases, and sphingomyelinase-2 mediate urokinase mitogenic effect. *Cell Signal* 2009;21:1925-34.

McCool DJ, Forstner JF, Forstner GG. Regulated and unregulated pathways for MUC2 mucin secretion in human colonic LS180 adenocarcinoma cells are distinct. *Biochem J* 1995;312:125-33.

McCool DJ, Okada Y, Forstner JF, Forstner GG. Roles of calreticulin and calnexin during mucin synthesis in LS180 and HT29/A1 human colonic adenocarcinoma cells. *Biochem J* 1999;341:593-600.

Menzel D. De excrescentiis verrucoso cristosis copiose in intestinis crassis dysenteriam passi observatis. *Acta med Berol* 1721;68-71.

Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause KH, Opas M, MacLennan DH, Michalak M. Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol* 1999;144:857-68.

Mesaeli N, Phillipson C. Impaired p53 expression, function, and nuclear localization in calreticulin-deficient cells. *Mol Biol Cell* 2004;15:1862-70.

Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2009;417:651-66.

Michalak M, Robert Parker JM, Opas M. Ca<sup>2+</sup> signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*. 2002;32:269-78.

Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:516-23.

Miyaki M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, Tanaka K, Muraoka M, Takahashi H, Amada Y, Fukayama M, et al. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res* 1994;54:3011-20.

Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992;1:229-33.

Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P, Kirilovsky A, Bindea G, Berger A, Camus M, Gillard M, Bruneval P, Fridman WH, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010;138:1429-40

Moestrup SK, Gliemann J. Purification of the rat hepatic alpha 2-macroglobulin receptor as an approximately 440-kDa single chain protein. *J Biol Chem* 1989;264:15574-7.

Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res* 1992;269:375-82.

Mogensen MM, Tucker JB, Mackie JB, Prescott AR, Näthke IS. The adenomatous polyposis coli protein unambiguously localizes to microtubule plus ends and is involved in establishing parallel arrays of microtubule bundles in highly polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 2002;157:1041-8.

Moiseeva EP. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res* 2001;52:372-86.

Molinari M, Eriksson KK, Calanca V, Galli C, Cresswell P, Michalak M, Helenius A. Contrasting functions of

calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control. *Mol Cell* 2004;13:125-35.

Moll R, Mitze M, Frixen UH, Birchmeier W. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Pathol* 1993;143:1731-42

Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7950-4.

Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 1990;247:322-4.

Mosnier JF, Jarry A, Bou-Hanna C, Denis MG, Merlin D, Laboisse CL. ADAM15 upregulation and interaction with multiple binding partners in inflammatory bowel disease. *Lab Invest* 2006;86:1064-73

Mosnier JF, Jarry A, Camdessanché JP, Antoine JC, Laboisse CL. In situ evidence of involvement of Schwann cells in ulcerative colitis: autocrine and paracrine signaling by A disintegrin and metalloprotease-17-mediated tumor necrosis factor alpha production. *Hum Pathol* 2009;40:1159-67.

Müller N, Reinacher-Schick A, Baldus S, van Hengel J, Berx G, Baar A, van Roy F, Schmiegel W, Schwarte-Waldhoff I. Smad4 induces the tumor suppressor E-cadherin and P-cadherin in colon carcinoma cells. *Oncogene* 2002;21:6049-58.

Munemitsu S, Souza B, Müller O, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P. The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res* 1994;54:3676-81.

Murillo CA, Rychahou PG, Evers BM. Inhibition of alpha5 integrin decreases PI3K activation and cell adhesion of human colon cancers. *Surgery* 2004;136:143-9.

Muta H, Noguchi M, Kanai Y, Ochiai A, Nawata H, Hirohashi S. E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of the stomach. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:843-8.

## N

Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 1996;380:360-4.

Nigam AK, Savage FJ, Boulos PB, Stamp GW, Liu D, Pignatelli M. Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1993;68:507-14

Najy AJ, Day KC, Day ML. ADAM15 supports prostate cancer metastasis by modulating tumor cell-endothelial cell interaction. *Cancer Res* 2008a;68:1092-9.

Najy AJ, Day KC, Day ML. The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. *J Biol Chem* 2008b;283:18393-401.

Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Goping IS, Opas M, Bleackley RC, Green DR, Michalak M. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol* 2000;150:731-40.

Nakamura K, Zuppini A, Arnaudeau S, Lynch J, Ahsan I, Krause R, Papp S, De Smedt H, Parys JB, Muller-Esterl W, Lew DP, Krause KH, Demarex N, Opas M, Michalak M. Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol* 2001;154:961-72. Erratum in: *J Cell Biol* 2001;155:1083.

Nanney LB, Woodrell CD, Greives MR, Cardwell NL, Pollins AC, Bancroft TA, Chesser A, Michalak M, Rahman M, Siebert JW, Gold LI. Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am J*

Pathol 2008;173:610-30.

Nath D, Slocombe PM, Stephens PE, Warn A, Hutchinson GR, Yamada KM, Docherty AJ, Murphy G. Interaction of metargidin (ADAM-15) with alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins on different haemopoietic cells. *J Cell Sci* 1999;112:579-87.

Neufeld KL, White RL. Nuclear and cytoplasmic localizations of the adenomatous polyposis coli protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3034-9.

Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, Ezumi K, Terayama M, Hemmi H, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Monden M. A multivariate analysis of adhesion molecules expression in assessment of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2007;95:652-62.

Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 1999;147:631-44.

## O

O'Brien MJ, Yang S, Clebanoff JL, Mulcahy E, Farraye FA, Amoroso M, Swan N. Hyperplastic (serrated) polyps of the colorectum: relationship of CpG island methylator phenotype and K-ras mutation to location and histologic subtype. *Am J Surg Pathol* 2004;28:423-34.

Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, Glickman JN, Ferrone CR, Mino-Kenudson M, Tanaka N, Dranoff G, Giovannucci EL, Fuchs CS. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res* 2009;15:6412-20.

Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Tahara H, Tamura S, Miyata M, Doki Y, Iihara K, Matsuyoshi N, Hirano S, et al. Immunohistochemical evaluation of E-cadherin adhesion molecule expression in human gastric cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992;421:149-56.

Opas M, Dziak E, Fliegel L, Michalak M. Regulation of expression and intracellular distribution of calreticulin, a major calcium binding protein of nonmuscle cells. *J Cell Physiol* 1991;149:160-71.

Opas M, Dziak E, Guo L, Lynch J, Nakamura K, Fliegel L, Kasahara H, Izumo S, Komuro I, Agellon LB, Michalak M. COUP-TF1 antagonizes Nkx2.5-mediated activation of the calreticulin gene during cardiac development. *J Biol Chem* 2001;276:2797-801

Opas M, Szewczenko-Pawlikowski M, Jass GK, Mesaeli N, Michalak M. Calreticulin modulates cell adhesiveness via regulation of vinculin expression. *J Cell Biol* 1996;135:1913-23.

Ostwald TJ, MacLennan DH. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1974;249:974-9.

## P

Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;353:2654-66.

Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, Galon J. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:5944-51.

Park SY, Lee HS, Choe G, Chung JH, Kim WH. Clinicopathological characteristics, microsatellite instability,

and expression of mucin core proteins and p53 in colorectal mucinous adenocarcinomas in relation to location. *Virchows Arch* 2006;449:40-7.

Park ET, Oh HK, Gum JR Jr, Crawley SC, Kakar S, Engel J, Leow CC, Gao WQ, Kim YS. HATH1 expression in mucinous cancers of the colorectum and related lesions. *Clin Cancer Res* 2006;12:5403-10.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.

Pelham HR. Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* 1989;5:1-23.

Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer *Science* 1993;260:810-2.

Peña C, García JM, Silva J, García V, Rodríguez R, Alonso I, Millán I, Salas C, de Herreros AG, Muñoz A, Bonilla F. E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations. *Hum Mol Genet* 2005;14:3361-70.

Pigny P, Guyonnet-Duperat V, Hill AS, Pratt WS, Galiegue-Zouitina S, d'Hooge MC, Laine A, Van-Seuning I, Degand P, Gum JR, Kim YS, Swallow DM, Aubert JP, Porchet N. Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics* 1996;38:340-52.

Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya-Feldstein J, Wirth P, Gupta G, Tosato G. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* 1998;188:2349-56.

Pike SE, Yao L, Setsuda J, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Atreya CD, Teruya-Feldstein J, Wirth P, Gupta G, Tosato G. Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. *Blood* 1999;94:2461-8.

Pino MS, Kikuchi H, Zeng M, Herraiz MT, Sperduti I, Berger D, Park DY, Iafrate AJ, Zukerberg LR, Chung DC. Epithelial to mesenchymal transition is impaired in colon cancer cells with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2010;138:1406-17.

Prall F, Nizze H, Barten M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology* 2005;47:17-24.

Poghosyan Z, Robbins SM, Houslay MD, Webster A, Murphy G, Edwards DR. Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 2002;277:4999-5007.

Porchet N, Dufosse J, Audie JP, Duperat VG, Perini JM, Nguyen VC, Degand P, Aubert JP. Structural features of the core proteins of human airway mucins ascertained by cDNA cloning. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:S15-8.

Porchet N, Aubert JP. [MUC genes: mucin or not mucin? That is the question]. *Med Sci* 2004;20:569-74.

Port K. Multiple polypenbildung im tractus intestinalis. *Deutsche Zeitschr Chir* 1896 ;42 :181-97.

Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2007;50:151-62.

Preto A, Figueiredo J, Velho S, Ribeiro AS, Soares P, Oliveira C, Seruca R. BRAF provides proliferation and survival signals in MSI colorectal carcinoma cells displaying BRAF(V600E) but not KRAS mutations. *J Pathol* 2008;214:320-7.

Prolla TA, Baker SM, Harris AC, Tsao JL, Yao X, Bronner CE, Zheng B, Gordon M, Reneker J, Arnheim N,

Shibata D, Bradley A, Liskay RM. Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair. *Nat Genet* 1998;18:276-9.

Purdie CA, Piris J. Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2000;36:121-6.

Pyke C, Salo S, Ralfkiaer E, Rømer J, Danø K, Tryggvason K. Laminin-5 is a marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer Res* 1995;55:4132-9.

Pytela R, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Identification and isolation of a 140kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* 1985;40:191-8

## Q

Qiu Y, Lynch J, Guo L, Yatsula B, Perkins AS, Michalak M. Regulation of the calreticulin gene by GATA6 and Evi-1 transcription factors. *Biochemistry* 2008;47:3697-704.

## R

Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418:934.

Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, Blamey RW, Ellis IO. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2008;26:3153-8.

Reinacher-Schick A, Baldus SE, Romdhana B, Landsberg S, Zapatka M, Mönig SP, Hölscher AH, Dienes HP, Schmiegel W, Schwarte-Waldhoff I. Loss of Smad4 correlates with loss of the invasion suppressor E-cadherin in advanced colorectal carcinomas. *J Pathol* 2004;202:412-20.

Reitmair AH, Redston M, Cai JC, Chuang TC, Bjerknes M, Cheng H, Hay K, Gallinger S, Bapat B, Mak TW. Spontaneous intestinal carcinomas and skin neoplasms in Msh2-deficient mice. *Cancer Res* 1996;56:3842-9.

Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, Sheppard D, Hynes RO, Hodivala-Dilke KM. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med* 2002;8:27-34.

Robbe C, Capon C, Maes E, Rousset M, Zweibaum A, Zanetta JP, Michalski JC. Evidence of regio-specific glycosylation in human intestinal mucins: presence of an acidic gradient along the intestinal tract. *J Biol Chem* 2003;278:46337-48.

Rodriguez-Sanjuan JC, Fontalba A, Mayorga M, Bordin MC, Hyland SJ, Trugeda S, Garcia RA, Gomez-Fleitas M, Fernandez F, Caldas C, Fernandez-Luna JL. A novel mutation in the E-cadherin gene in the first family with hereditary diffuse gastric cancer reported in Spain. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:1110-3.

Rosivatz E, Becker I, Bamba M, Schott C, Diebold J, Mayr D, Höfler H, Becker KF. Neoeexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. *Int J Cancer* 2004;111:711-9.

Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Munemitsu S, Polakis P. Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res* 1997;57:4624-30.

Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest* 1991;87:1-5.

## S

Samowitz WS, Slattery ML, Sweeney C, Herrick J, Wolff RK, Albertsen H. APC mutations and other genetic and epigenetic changes in colon cancer. *Mol Cancer Res* 2007;5:165-70.

Savas B, Ensari A, Percinel S, Kuzu I, Kuzu MA, Bektas M, Cetinkaya H, Kursun N. The significance of beta-catenin, E-cadherin, and P-cadherin expressions in neoplastic progression of colorectal mucosa: an immunohistochemical study. *Acta Gastroenterol Belg* 2007;70:339-44.

Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM. NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 1998;141:1083-93.

Schmidt R, Streit M, Kaiser R, Herzberg F, Schirner M, Schramm K, Kaufmann C, Henneken M, Schäfer-Korting M, Thiel E, Kreuser ED. De novo expression of the alpha5beta1-fibronectin receptor in HT29 colon-cancer cells reduces activity of C-SRC. Increase of C-SRC activity by attachment on fibronectin. *Int J Cancer* 1998;76:91-8

Schütz A, Härtig W, Wobus M, Grosche J, Wittekind Ch, Aust G. Expression of ADAM15 in lung carcinomas. *Virchows Arch* 2005;446:421-9.

Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 2003;17:7-30.

Secco GB, Fardelli R, Campora E, Lapertosa G, Gentile R, Zoli S, Prior C. Primary mucinous adenocarcinomas and signet-ring cell carcinomas of colon and rectum. *Oncology* 1994;51:30-4.

Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grübel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 1995;374:327-37.

Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez NS, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton SR, Issa JP. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:18654-9.

Sipione S, Ewen C, Shostak I, Michalak M, Bleackley RC. Impaired cytolytic activity in calreticulin-deficient CTLs. *J Immunol*. 2005;174:3212-9.

Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006;314:268-74.

Skalifasowski NW. Polyadenoma tractus intestinalis. *Vrac* 1881 ;4 :55-7.

Smith KJ, Johnson KA, Bryan TM, Hill DE, Markowitz S, Willson JK, Paraskeva C, Petersen GM, Hamilton SR, Vogelstein B, et al. The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2846-50.

Smith MJ, Koch GL. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J* 1989;8:3581-6.

Smits R, Kielman MF, Breukel C, Zurcher C, Neufeld K, Jagmohan-Changur S, Hofland N, van Dijk J, White R, Edelmann W, Kucherlapati R, Khan PM, Fodde R. Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes Dev* 1999;13:1309-21.

Solomon E, Voss R, Hall V, Bodmer WF, Jass JR, Jeffreys AJ, Lucibello FC, Patel I, Rider SH. Chromosome 5

allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* 1987;328:616-9.

Sontheimer RD, Lieu TS, McCauliffe DP. Molecular characterization of the Ro/SS-A autoimmune response. *Semin Dermatol* 1991;10:199-205.

Spicer SS. Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. *J Histochem Cytochem.* 1965 Mar;13:211-34.

Spirio L, Otterud B, Stauffer D, Lynch H, Lynch P, Watson P, Lanspa S, Smyrk T, Cavalieri J, Howard L, et al. Linkage of a variant or attenuated form of adenomatous polyposis coli to the adenomatous polyposis coli (APC) locus. *Am J Hum Genet.* 1992 Jul;51(1):92-100.

Stallmach A, von Lampe B, Matthes H, Bornhöft G, Riecken EO. Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during the benign to malign tumour transformation. *Gut* 1992;33:342-6.

Stevens FJ, Argon Y. Protein folding in the ER. *Semin Cell Dev Biol* 1999;10:443-54.

Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Fan F, Parry GC, Parikh AA, McCarty MF, Bucana CD, Mazar AP, Ellis LM. Inhibition of integrin alpha5beta1 function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-FU infusion reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice. *Int J Cancer* 2003;104:496-503

Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresch DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 2001;155:459-70.

Stupack DG, Teitz T, Potter MD, Mikolon D, Houghton PJ, Kidd VJ, Lahti JM, Cheresch DA. Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature* 2006;439:95-9.

Su JM, Gui L, Zhou YP, Zha XL. Expression of focal adhesion kinase and alpha5 and beta1 integrins in carcinomas and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:613-8.

Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA, Dove WF. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 1992;256:668-70. Erratum in: *Science* 1992;256:1114.

Sunnarborg SW, Hinkle CL, Stevenson M, Russell WE, Raska CS, Peschon JJ, Castner BJ, Gerhart MJ, Paxton RJ, Black RA, Lee DC. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J Biol Chem* 2002;277:12838-45.

Swallow DM, Gendler S, Griffiths B, Kearney A, Povey S, Sheer D, Palmer RW, Taylor-Papadimitriou J. The hypervariable gene locus PUM, which codes for the tumour associated epithelial mucins, is located on chromosome 1, within the region 1q21-24. *Ann Hum Genet* 1987;51:289-94.

Sylvester PA, Myerscough N, Warren BF, Carlstedt I, Corfield AP, Durdey P, Thomas MG. Differential expression of the chromosome 11 mucin genes in colorectal cancer. *J Pathol* 2001;195:327-35.

Szabo E, Qiu Y, Baksh S, Michalak M, Opas M. Calreticulin inhibits commitment to adipocyte differentiation. *J Cell Biol* 2008;182:103-16.

## T

Takayama S, Ishii S, Ikeda T, Masamura S, Doi M, Kitajima M. The relationship between bone metastasis from human breast cancer and integrin alpha(v)beta3 expression. *Anticancer Res* 2005;25:79-83.

Tanaka Y, Nakamura M, Matsui T, Iizuka N, Kondo H, Tohma S, Masuko K, Yudoh K, Nakamura H, Nishioka

K, Koizuka I, Kato T. Proteomic surveillance of autoantigens in relapsing polychondritis. *Microbiol Immunol* 2006;50:117-26.

Tarr J, Eggleton P. Immune function of C1q and its modulators CD91 and CD93. *Crit Rev Immunol* 2005;25:305-30.

Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-6.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.

Toribara NW, Robertson AM, Ho SB, Kuo WL, Gum E, Hicks JW, Gum JR Jr, Byrd JC, Siddiki B, Kim YS. Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning. *J Biol Chem* 1993;268:5879-85.

Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland JM. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol* 2003;27:65-8.

Torlakovic EE, Gomez JD, Driman DK, Parfitt JR, Wang C, Benerjee T, Snover DC. Sessile serrated adenoma (SSA) vs. traditional serrated adenoma (TSA). *Am J Surg Pathol* 2008;32:21-9. Erratum in: *Am J Surg Pathol* 2008;32:491.

Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008;68:4123-32.

Trobridge P, Knoblauch S, Washington MK, Munoz NM, Tsuchiya KD, Rojas A, Song X, Ulrich CM, Sasazuki T, Shirasawa S, Grady WM. TGF-beta receptor inactivation and mutant Kras induce intestinal neoplasms in mice via a beta-catenin-independent pathway. *Gastroenterology* 2009;136:1680-8.

Trochon-Joseph V, Martel-Renoir D, Mir LM, Thomaïdis A, Opolon P, Connault E, Li H, Grenet C, Fauvel-Lafève F, Soria J, Legrand C, Soria C, Perricaudet M, Lu H. Evidence of antiangiogenic and antimetastatic activities of the recombinant disintegrin domain of metargidin. *Cancer Res* 2004 64:2062-9.

Tsanou E, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer Res* 2008;28:3815-26.

Tytgat KM, Büller HA, Opdam FJ, Kim YS, Einerhand AW, Dekker J. Biosynthesis of human colonic mucin: Muc2 is the prominent secretory mucin. *Gastroenterology* 1994;107:1352-63.

## U

UICC. In Hermanek P, Sobin LH eds. *TNM classification of Malignant Tumours*, 4th edn, 2nd revision. Berlin: Springer Verlag, 1993.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261-8.

Urbanski SJ, Kossakowska AE, Marcon N, Bruce WR. Mixed hyperplastic adenomatous polyps--an underdiagnosed entity. Report of a case of adenocarcinoma arising within a mixed hyperplastic adenomatous polyp. *Am J Surg Pathol* 1984;8:551-6.

## V

Van Diest PJ. Reflections on the first issue of JCP. On "familial intestinal polyposis" by CE Dukes. *J Clin Pathol* 2000 ;53:4-5.

Van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F, Clevers H. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*. 2005 Jun 16;435(7044):959-63.

Van Klinken BJ, Dekker J, van Gool SA, van Marle J, Büller HA, Einerhand AW. MUC5B is the prominent mucin in human gallbladder and is also expressed in a subset of colonic goblet cells. *Am J Physiol*.1998;274:G871-8.

Van Seuning I, Pigny P, Perrais M, Porchet N, Aubert JP. Transcriptional regulation of the 11p15 mucin genes. Towards new biological tools in human therapy, in inflammatory diseases and cancer? *Front Biosci* 2001;6:D1216-34.

Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34:424-5.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453-6.

Vassilakos A, Michalak M, Lehrman MA, Williams DB. Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* 1998;37:3480-90

Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8698-702.

Velcich A, Augenlicht LH. Regulated expression of an intestinal mucin gene in HT29 colonic carcinoma cells. *J Biol Chem* 1993;268:13956-61.

Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht L. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 2002;295:1726-9.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.

Vonlaufen A, Wiedle G, Borisch B, Birrer S, Luder P, Imhof BA. Integrin alpha(v)beta(3) expression in colon carcinoma correlates with survival. *Mod Pathol* 2001;14:1126-32.

## W

Wallrapp C, Hähnel S, Müller-Pillasch F, Burghardt B, Iwamura T, Ruthenbürger M, Lerch MM, Adler G, Gress TM. A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2000;60:2602-6.

Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, Burgart LJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Thibodeau SN. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res* 2003;63:5209-12.

Warner AS, Glick ME, Fogt F. Multiple large hyperplastic polyps of the colon coincident with adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 1994;89:123-5.

Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913 *Arch Intern Med* 1913;12:546-55.

Watermann D, Madjar H, Sauerbrei W, Hirt V, Prömpeler H, Stickeler E. Assessment of breast cancer vascularisation by Doppler ultrasound as a prognostic factor of survival. *Oncol Rep* 2004;11:905-10.

Wheeler JM, Kim HC, Efstathiou JA, Ilyas M, Mortensen NJ, Bodmer WF. Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. *Gut* 2001;48:367-71.

Whitehead RH, Jones JK, Gabriel A, Lukies RE. A new colon carcinoma cell line (LIM1863) that grows as organoids with spontaneous differentiation into crypt-like structures in vitro. *Cancer Res* 1987;47:2683-9.

Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007;318:1108-13.

Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 2007;13:3784-91.

Wu M, Massaeli H, Durston M, Mesaeli N. Differential expression and activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the calreticulin deficient cells. *Matrix Biol* 2007;26:463-72.

## X

Xu J, Lü B, Xu F, Gu H, Fang Y, Huang Q, Lai M. Dynamic down-regulation of Krüppel-like factor 4 in colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:891-8.

## Y

Yachida S, Mudali S, Martin SA, Montgomery EA, Iacobuzio-Donahue CA. Beta-catenin nuclear labeling is a common feature of sessile serrated adenomas and correlates with early neoplastic progression after BRAF activation. *Am J Surg Pathol* 2009;33:1823-32.

Yamada D, Ohuchida K, Mizumoto K, Ohhashi S, Yu J, Egami T, Fujita H, Nagai E, Tanaka M. Increased expression of ADAM 9 and ADAM 15 mRNA in pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2007;27:793-9.

Yang S, Farraye FA, Mack C, Posnik O, O'Brien MJ. BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1452-9.

Yang K, Popova NV, Yang WC, Lozonschi I, Tadesse S, Kent S, Bancroft L, Matise I, Cormier RT, Scherer SJ, Edelmann W, Lipkin M, Augenlicht L, Velcich A. Interaction of Muc2 and Apc on Wnt signaling and in intestinal tumorigenesis: potential role of chronic inflammation. *Cancer Res* 2008;68:7313-22.

Yao L, Pike SE, Pittaluga S, Cherney B, Gupta G, Jaffe ES, Tosato G. Anti-tumor activities of the angiogenesis inhibitors interferon-inducible protein-10 and the calreticulin fragment vasostatin. *Cancer Immunol Immunother* 2002a;51:358-66.

Yao L, Pike SE, Tosato G. Laminin binding to the calreticulin fragment vasostatin regulates endothelial cell function. *J Leukoc Biol* 2002b;71:47-53.

Yap AS, Briehner WM, Gumbiner BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:119-46.

Yoon GS, Lee H, Jung Y, Yu E, Moon HB, Song K, Lee I. Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:1117-20.

Yoshimura K, Meckel KF, Laird LS, Chia CY, Park JJ, Olino KL, Tsunedomi R, Harada T, Iizuka N, Hazama S, Kato Y, Keller JW, Thompson JM, Chang F, Romer LH, Jain A, Iacobuzio-Donahue C, Oka M, Pardoll DM, Schulick RD. Integrin alpha2 mediates selective metastasis to the liver. *Cancer Res* 2009;69:7320-8.

## **Z**

Zhang XP, Kamata T, Yokoyama K, Puzon-McLaughlin W, Takada Y. Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC15(metargidin, ADAM-15) with integrin alphavbeta3. *J Biol Chem* 1998;273:7345-50.

Zhang Z, Vuori K, Reed JC, Ruoslahti E. The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6161-5.

Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, Babbin BA, Lamb NE, Yang VW. Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* 2004;23:395-402.

Zheng H, Pritchard DM, Yang X, Bennett E, Liu G, Liu C, Ai W. KLF4 gene expression is inhibited by the notch signaling pathway that controls goblet cell differentiation in mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G490-8.

Zheng JL, Shou J, Guillemot F, Kageyama R, Gao WQ. Hes1 is a negative regulator of inner ear hair cell differentiation. *Development* 2000;127 :4551-60.

Zhu CQ, Popova SN, Brown ER, Barsyte-Lovejoy D, Navab R, Shih W, Li M, Lu M, Jurisica I, Penn LZ, Gullberg D, Tsao MS. Integrin alpha 11 regulates IGF2 expression in fibroblasts to enhance tumorigenicity of human non-small-cell lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:11754-9.

Zutter MM, Santoro SA, Stautz WD, Tsung YL. Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7411-5.

## **IMPLICATION DE DEUX EFFECTEURS MOLECULAIRES UBIQUITAIRES, CALRETICULINE ET ADAM15, DANS LA MORPHOGENESE ET LA DIFFERENCIATION DES NEOPLASIES COLIQUES : UNE APPROCHE FONDEE SUR DES BIOCOLLECTIONS**

L'oncogénèse colique fait appel à la notion de morphogénèse subordonnée à des anomalies génétiques spécifiques agissant par l'intermédiaire d'effecteurs moléculaires, dont les fonctions peuvent être prédites par des modèles animaux. Cependant, au cours de la progression tumorale, la diversification des anomalies génétiques et des effecteurs se prête difficilement à la modélisation animale. L'exploitation de biocollections tumorales humaines est alors la clef de la modélisation du rôle des effecteurs potentiels. Ce travail de thèse, fondé sur l'utilisation de biocollections annotées de cancers colorectaux (CCR), vise à 1) examiner dans les CCR l'expression *in situ* de la calréticuline et de l'ADAM15, 2 protéines impliquées dans l'adhésion, la migration et la différenciation épithéliale et 2) corrélérer leur expression avec les données génétiques, clinicopathologiques et pronostiques des CCR.

Les points importants sont :

- une diminution d'expression de la calréticuline et de son récepteur CD91 dans les cellules néoplasiques des CCR, par rapport à l'épithélium colique normal apparié. Le maintien de l'expression de la calréticuline dans les CCR est associée à la différenciation mucineuse, en accord avec son rôle de chaperonne de la mucine MUC2 (article 1).

- une perte d'expression d'ADAM15 dans les CCR dé-différenciés, associée à la progression tumorale via un mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse, et à un pronostic péjoratif (article 2).

Cette étude permet de proposer une hiérarchisation spatiale et temporelle des effecteurs moléculaires dans les phénomènes de subordination de la progression néoplasique colique humaine.

### Mots-clés

Néoplasie colique, morphogénèse, différenciation, biocollections, cartographie immunohistochimique, effecteurs moléculaires, calréticuline, ADAM15

## **INVOLVEMENT OF TWO UBIQUITOUS MOLECULAR EFFECTORS, CALRETICULIN AND ADAM15, IN THE MORPHOGENESIS AND DIFFERENTIATION OF COLONIC NEOPLASIA : AN APPROACH BASED ON BIOCOLLECTIONS**

Colonic oncogenesis is linked to the concept of morphogenesis, subordinated to specific genetic abnormalities involving molecular effectors whose functions can be predicted by animal models. However, during tumor progression, the diversity of genetic abnormalities and effectors can hardly be modeled in animal models. The exploitation of human tumor tissue collections is pivotal in the modelization of potential effectors functions. The aims of this work, based on biocollections of colorectal cancers (CRC) with clinical annotations, were 1) to examine the *in situ* expression of calreticulin and ADAM15, 2 proteins involved in cell adhesion, migration and epithelial differentiation, and 2) to correlate their expression with the genetic, clinicopathological and prognostical data of CRC.

The main points of this study are:

- a down-regulation of calreticulin expression and its receptor CD91 in neoplastic cells of CRC, compared with normal paired epithelium. Maintenance of calreticulin expression is associated with mucinous differentiation, in line with its role as a chaperone of the mucin MUC2 (article 1).
- a loss of ADAM15 expression in de-differentiated CRC, associated with tumor progression through an epithelial-to-mesenchymal transition, and with a poor prognosis (article 2).

This study allows to propose a spatial and temporal ordering of molecular effectors in the subordinated events occurring in colonic neoplasia progression.

### Keywords

Colonic neoplasia, morphogenesis, differentiation, biocollections, immunohistochemical map, molecular effectors, calreticulin, ADAM15