



HAL
open science

Rôle des facteurs de transcription E2F2 et ID3 dans la progression tumorale et intérêt du ciblage de l'aminopeptidase N/CD13 dans le traitement du cancer colique humain

Manon Voegelin

► To cite this version:

Manon Voegelin. Rôle des facteurs de transcription E2F2 et ID3 dans la progression tumorale et intérêt du ciblage de l'aminopeptidase N/CD13 dans le traitement du cancer colique humain. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ122 . tel-00871983

HAL Id: tel-00871983

<https://theses.hal.science/tel-00871983>

Submitted on 11 Oct 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de Santé
EA-4438 (UdS) Physiopathologie et Recherche translationnelle

THÈSE présentée par :

Manon VOEGELIN

soutenue le : **05 juillet 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Rôle des facteurs de transcription E2F2 et ID3
dans la progression tumorale
et intérêt du ciblage
de l'aminopeptidase N/CD13
dans le traitement du cancer colique humain**

THÈSE dirigée par :

Mme GUENOT Dominique

Chargée de Recherches - HDR, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme ROUSSET Monique

Directeur de Recherches, Centre des Cordeliers

Mme LESUFFLEUR Thécla

Chargée de Recherches - HDR, Université Pierre et Marie Curie

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme TOMASETTO Catherine

Directeur de Recherches, Université de Strasbourg

Mme TARNUS Céline

Professeur, Université de Haute Alsace

Mme DONTENWILL Monique

Directeur de Recherches - HDR, Université de Strasbourg - Faculté
Pharmacie

Remerciements

Je remercie vivement le Dr Monique Rousset, le Dr Thécla Lesuffleur, le Dr Monique Dontenwill et le Pr Céline Tarnus pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse et de consacrer une partie de leur temps pour la lecture et l'appréciation de ce travail.

Je remercie aussi le Dr Michèle Kedinger, pour m'avoir permis de réaliser mon doctorat au sein de l'unité Inserm U682 qu'elle dirige.

Je remercie tout particulièrement le Dr Dominique Guenot, qui a toujours su être à l'écoute, aussi bien en tant que directrice de thèse, pour me guider dans mes choix scientifiques et pour me donner des coups de pouce dans des moments parfois plus difficiles, mais aussi sur le plan personnel et humain. Je te remercie surtout pour ta disponibilité à toute heure de la journée (ou de la nuit !), depuis mon stage de fin de Master jusqu'à aujourd'hui où je finalise ma thèse.

Un grand merci à toute l'équipe d'accueil dirigée par Dominique Guenot, notamment le Dr Marie-Pierre Gaub, le Dr Erwan Pencreac'h (avec apostrophe !), le Dr Eric Guérin, pour leurs conseils avisés ; Christelle Lasthaus, Laetitia Ruck, Sophie Billiger, Madeleine Jaillet, Nathalie Hamelin, pour leur aide technique et pour leur bonne humeur inconditionnelle.

Encore d'autres personnes, qu'on oublie parfois, Michèle, Pierre, Fanny, un grand merci pour la bonne santé et le moral de nos petites bêtes !

Je remercie également les personnes du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Biochimie du CHU de Hautepierre, avec Sylvie qui m'a soulagée de plusieurs PCR.

Je veux également dire merci à l'ensemble des personnes de l'unité Inserm, dont Olivier pour m'avoir encadrée pour les clonages ; Elisabeth, la reine des cellules et des coupes de tumeurs, sans dada préféré ; Christiane pour l'immuno, Léonor et Isabelle qui ont toujours été efficaces et réactives concernant l'administration, ainsi que tous ceux (qui sauront se reconnaître) pour les moments de détente bien mérités après de longues journées à chercher et rechercher, et parfois trouver...

Je remercie le plus sincèrement ma famille qui a toujours été là, mes parents pour m'avoir amenée et ramenée de nombreuses fois au laboratoire, souvent les week-ends, et bien sûr pour leur présence et leur soutien invariable.

Enfin, je remercie tous mes amis qui m'ont toujours encouragée et supportée tout au long de ma thèse.

En dernier lieu, je remercie l'association Alsace Contre le Cancer d'avoir financé les derniers mois de ma thèse.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES

ABREVIATIONS

INTRODUCTION	p.1
I. Généralité sur le côlon	p.1
1. Anatomie du tube digestif	p.1
2. Histologie du tube digestif	p.1
a) Les différentes couches histologiques	p.1
b) Structure et composition de la muqueuse intestinale	p.1
3. Différenciation des cellules de l'épithélium intestinal	p.3
a) Les cellules souches intestinales	p.3
b) Les quatre principaux types cellulaires dans l'intestin	p.7
c) Autres types cellulaires	p.7
II. Le cancer colorectal	p.9
1. Epidémiologie	p.9
2. Les facteurs de risques	p.9
a) Risque moyen	p.9
b) Risque élevé	p.10
c) Risque très élevé	p.10
3. Dépistage du cancer colorectal (risque moyen)	p.10
a) Dépistage organisé du CCR : état des lieux	p.10
b) Perspectives : les tests immunologiques	p.11
4. Genèse du cancer colorectal	p.11
a) Les foyers de cryptes aberrantes	p.11
b) Les polypes ou adénomes	p.13
c) Les carcinomes	p.13
III. Mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogenèse colique	p.15
1. Les phénotypes du CCR	p.15
a) Le phénotype CIN et anomalies chromosomiques	p.15
b) Le phénotype MIN	p.16
Anomalies moléculaires des tumeurs MIN	p.17
Diagnostic du phénotype CIN et MIN des CCR	p.17
c) Le phénotype CIMP	p.18
Diagnostic du phénotype CIMP	p.18
2. Formes héréditaires des CCR	p.18
a) La polypose adénomateuse familiale (FAP)	p.18
b) Le syndrome de Lynch	p.19
3. Importance des altérations génomiques dans la progression tumorale	p.19
4. Les principales voies de signalisations impliquées dans le cancer	p.21

a) Voie Wnt/APC/ β -caténine _____	p.21
Voie canonique _____	p.21
Mécanismes de régulation de la voie Wnt _____	p.23
Voie non-canonique _____	p.23
Dérégulation de la voie Wnt dans les cancers _____	p.25
b) Voie du TGF (Transforming Growth Factor)- β _____	p.25
c) Voie Ras/MAPK _____	p.27
d) Voie PI3K/Akt/mTOR _____	p.27
IV. La progression tumorale _____	p.29
1. Etapes principales de la progression tumorale _____	p.29
2. Maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal _____	p.31
a) Jonctions serrées _____	p.31
b) Jonctions adhérentes _____	p.33
c) Les desmosomes _____	p.34
3. Jonctions inter-cellulaires et progression tumorale _____	p.34
a) Altération des jonctions cellule-cellule dans les cancers _____	p.34
b) Programme TEM _____	p.37
c) Jonctions adhérentes, voie Wnt/ β -caténine et migration _____	p.37
4. Adhérence des cellules à la MEC et progression tumorale _____	p.39
a) Composition de la MB intestinale _____	p.39
b) Signalisation des intégrines _____	p.41
c) Migration cellulaire et jonctions cellule-matrice _____	p.41
d) Invasion et métalloprotéases matricielles _____	p.43
V. E2F2 et la famille des facteurs E2Fs _____	p.45
1. La famille des E2Fs _____	p.45
2. Fonctions des E2Fs _____	p.47
a) Les E2Fs et le cycle cellulaire _____	p.47
b) Gènes cibles et fonctions des E2Fs _____	p.48
3. Mécanismes de régulation de l'expression des E2Fs _____	p.48
4. E2Fs et cancer _____	p.49
a) Propriétés d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs des E2Fs _____	p.49
b) E2F2 dans les cancers humains _____	p.51
VI. La famille des facteurs ID3 et ID3 _____	p.51
1. Mécanismes d'action _____	p.51
2. Fonctions associées aux ID3 _____	p.53
3. Mécanismes de régulation _____	p.54
4. Dérégulations dans les cancers humains _____	p.54
VII. Thérapie des cancers colorectaux _____	p.55
1. Diagnostic _____	p.55
2. Classification des tumeurs coliques _____	p.55

3. La technique du ganglion sentinelle	p.55
4. Modes d'actions des thérapies anti-cancéreuses	p.58
a) Chimiothérapie conventionnelle : drogues génotoxiques	p.58
b) Thérapies ciblées	p.58
c) Les traitements anti-angiogéniques	p.61
L'angiogenèse tumorale	p.61
Mécanismes d'action	p.62
Limite des molécules anti-angiogéniques	p.62
5. Critères cliniques pour évaluer l'efficacité d'un traitement anti-tumoral	p.63
6. Traitements des cancers non métastatiques	p.65
a) Traitement chirurgical	p.65
b) Chimiothérapie adjuvante	p.65
7. Traitements des cancers métastatiques	p.65
a) Traitement chirurgical	p.65
b) Traitement néo-adjuvant	p.66
c) Chimiothérapie adjuvante	p.66
VIII. Aminopeptidase-N/CD13, une nouvelle cible thérapeutique	p.67
1. Structure de CD13	p.67
2. Mécanismes d'action de CD13	p.67
a) CD13, une aminopeptidase	p.69
b) CD13, un récepteur	p.69
c) CD13, un régulateur de signalisation	p.69
3. Fonctions régulées par CD13	p.70
a) Expression de CD13 dans les différents types cellulaires	p.70
b) Substrats de CD13 selon le type cellulaire	p.70
c) CD13 et adhésion inter-cellulaire	p.71
d) CD13 et néo-angiogenèse	p.71
e) CD13, marqueur de cellules souches cancéreuses	p.72
f) CD13 et stress cellulaire	p.72
g) CD13 et invasion tumorale	p.72
4. Expression dans les tumeurs humaines	p.72
5. Cible thérapeutique	p.73
a) CD13 en tant que cible thérapeutique	p.73
b) Le système CD13/NGR pour la délivrance des drogues thérapeutiques	p.73
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	p.75
CHAPITRE I : Etude fonctionnelle des facteurs de transcription E2F2 et ID3 comme marqueurs de progression tumorale dans le cancer colique humain	p.79
RATIONNEL DE L'ETUDE	p.81
OBJECTIFS	p.81
RESULTATS	p.83

PUBLICATION 1	p.85
PUBLICATION 2	p.119
ELEMENTS COMPLEMENTAIRES	p.159
I. Matériels et Méthodes	p.159
1. Construction des vecteurs lentiviraux pour la sous-expression de E2F2 et ID3	p.159
a) Choix des shRNA et du vecteur d'expression	p.159
b) Construction des vecteurs pLKO.1	p.159
2. Génération de la lignée stable HT29 sur-exprimant stablement E2F2	p.160
a) Choix du vecteur d'expression	p.160
b) Amplification de l'ADNc de E2F2 et addition des sites de restriction	p.160
c) Insertion dans le vecteur de clonage pCRII	p.161
d) Insertion dans le vecteur d'expression pQCXIP	p.161
e) Génération d'une lignée stable E2F2+	p.161
3. Analyse transcriptionnelle des gènes de la TEM	p.162
4. Double inhibition de l'expression de E2F2 et ID3	p.162
II. Résultats	p.163
1. Expression transcriptionnelle de ID3 dans les tumeurs coliques	p.163
2. Sous-expression de E2F2 et ID3 in vitro (Caco-2/TC7)	p.165
a) Rôle de la cavéoline-1	p.165
b) Analyse transcriptionnelle de 83 gènes relatifs à la TEM	p.165
3. Double inhibition de siE2F2 et siID3 dans les Caco-2/TC7	p.168
a) Efficacité de transfection	p.168
b) Impact sur l'adhésion et la migration	p.168
4. Impacts <i>in vivo</i> de la sur-expression de E2F2 (HT29-E2F2+)	p.168
a) Validation du modèle	p.168
b) Croissance tumorale	p.168
III. Discussion	p.172
Analyse transcriptionnelle : Plaque TEM	p.172
Cavéoline-1 et progression tumorale	p.173
Rôles de E2F2 et ID3 dans la délétion 1p36.11-12	p.174
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	p.177
CHAPITRE II : Intérêt du ciblage thérapeutique de CD13 par de nouveaux inhibiteurs chimiques dans le cancer du côlon	p.181
RESULTATS	p.183
PUBLICATION 3	p.185
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	p.217
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p.221
ANNEXES	p.245

LISTE DES FIGURES ET ANNEXES

<u>Figure 1:</u>	Anatomie du côlon	p.2
<u>Figure 2:</u>	Structure du tube digestif	p.2
<u>Figure 3:</u>	Anatomie de la muqueuse intestinale adulte	p.4
<u>Figure 4:</u>	Régulation de la différenciation des cellules épithéliales intestinales	p.5
<u>Figure 5:</u>	Cellules souches intestinales	p.5
<u>Figure 6:</u>	Cellules épithéliales intestinales	p.6
<u>Figure 7:</u>	Histologie d'une glande de Lieberkühn du côlon	p.6
<u>Figure 8:</u>	Répartition géographique des cancers coliques (2008)	p.8
<u>Figure 9:</u>	Nombre de nouveaux cas et décès en France des trois premiers cancers chez l'homme et la femme (2000)	p.8
<u>Figure 10:</u>	Indices comparatifs de mortalité (ICM) par cancer colorectal en 1995-97	p.8
<u>Figure 11:</u>	De la muqueuse intestinale normale vers un adénocarcinome	p.12
<u>Figure 12:</u>	Différents types histologiques des adénomes	p.12
<u>Figure 13:</u>	Altérations génétiques au cours de la progression des tumeurs de phénotype CIN et MIN	p.14
<u>Figure 14:</u>	Complexe d'attachement EB1/APC	p.14
<u>Figure 15:</u>	Classification des tumeurs coliques selon la fréquence en déséquilibres alléliques	p.20
<u>Figure 16:</u>	Voie Wnt/ β -caténine	p.22
<u>Figure 17:</u>	Complexe de dégradation de la β -caténine	p.22
<u>Figure 18:</u>	La voie du TGF- β	p.24
<u>Figure 19:</u>	Activation du récepteur à l'EGF (EGFR) et des voies de signalisation intracellulaires	p.24
<u>Figure 20:</u>	Voie Ras/MAPK	p.26
<u>Figure 21:</u>	Voie PI3K/Akt/mTor	p.26
<u>Figure 22:</u>	Etapes de la progression tumorale et de la dissémination métastatique	p.28
<u>Figure 23:</u>	Jonctions cellule-cellule et cellule-matrice	p.30
<u>Figure 24:</u>	Jonctions serrées (ou <i>zonula occludens</i>)	p.30
<u>Figure 25:</u>	Jonctions adhérentes (ou <i>zonula adherens</i>)	p.32
<u>Figure 26:</u>	Les desmosomes	p.32
<u>Figure 27:</u>	La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	p.35
<u>Figure 28:</u>	Relations entre les jonctions adhérentes, la voie Wnt et le remodelage du cytosquelette	p.36
<u>Figure 29:</u>	Nomenclature des 16 isoformes des laminines et représentation schématique de la laminine-111	p.38
<u>Figure 30:</u>	Représentation schématique de la membrane basale (MB)	p.38

<u>Figure 31:</u>	Signalisation bi-directionnelle des intégrines	p.40
<u>Figure 32:</u>	Modèle de migration cellulaire	p.42
<u>Figure 33:</u>	Intégrines et adhésions focales (Afs)	p.42
<u>Figure 34:</u>	La famille des E2Fs	p.44
<u>Figure 35:</u>	Le cycle cellulaire et les facteurs E2Fs	p.46
<u>Figure 36:</u>	Les gènes cibles des facteurs E2Fs	p.46
<u>Figure 37:</u>	microARN et régulation des E2Fs	p.50
<u>Figure 38:</u>	Mécanisme d'action dominant négatif des IDs	p.52
<u>Figure 39:</u>	Classification des cancers colorectaux	p.56
<u>Figure 40:</u>	Le 5-Fluorouracile (5-FU)	p.57
<u>Figure 41:</u>	Stratégies d'inhibition de la voie du VEGF	p.59
<u>Figure 42:</u>	Régulation de HIF1 α par la pression en oxygène	p.59
<u>Figure 43:</u>	Mécanismes de néo-vascularisation tumorale	p.60
<u>Figure 44:</u>	Réponse tumorale globale incluant toutes les combinaisons possibles de réponses tumorales	p.60
<u>Figure 45:</u>	Résection des métastases hépatiques dans le cancer du côlon	p.64
<u>Figure 46:</u>	Structure de l'aminopeptidase N/CD13	p.68
<u>Figure 47:</u>	Fonctions associées aux 3 mécanismes d'action de CD13	p.68
<u>Figure 48:</u>	Expression transcriptionnelle de ID3 dans les tissus sains et les carcinomes du côlon proximal et distal	p.164
<u>Figure 49:</u>	Expression de la cavéoline-1	p.164
<u>Figure 50:</u>	Résultats de l'analyse transcriptionnelle des gènes de la transition épithélio-mésenchymateuse « TEM »	p.166
<u>Figure 51:</u>	Efficacité de la double inhibition E2F2/ID3 par des siRNA	p.196
<u>Figure 52:</u>	Efficacité de la double inhibition E2F2/ID3 sur l'adhérence et la migration	p.170
<u>Figure 53:</u>	Efficacité de la sur-expression de E2F2 sur la croissance de tumeurs xénogreffées en sous-cutané	p.171
<u>Annexe 1 :</u>	Carte du vecteur lentiviral pLKO.1-TRC (<i>The RNAi Consortium</i>)	p.247
<u>Annexe 2 :</u>	Carte du vecteur plasmidique pReceiver-M09 (Genecopoeia)	p.248
<u>Annexe 3 :</u>	Carte du vecteur d'expression rétroviral pQCXIP	p.248
<u>Annexe 4 :</u>	Carte du vecteur plasmidique pCRII	p.249
<u>Annexe 5 :</u>	Liste des gènes de la plaque PCR « Transition Epithélio- Mésenchymateuse » (TEM)	p.250

ABREVIATIONS

5-FU	5-Fluorouracile
Å	Ångström
aa	Acide Aminé
AF	Adhésion Focale
AFAP	Attenuated Polypose Adénomateuse Familiale
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARNm	ARN messenger
BER	Base Excision Repair
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BMDc	Cellule myéloïde dérivée de la moelle osseuse
CCR	Cancer Colorectal
cdk	Cyclin-dependent kinase
CEA	Carcino-Embryonic Antigen
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CIMP	Phénotype Méthylateur des Ilots CpG
CIN	Chromosome Instable
Co-SMAD	Common-partner SMAD
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
DBD	DNA Binding Domain
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DG	Dystroglycane
Dsh	Dishevelled
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAP	Polypose Adénomateuse Familiale
FCA	Foyers de Cryptes Aberrantes
FDA	Food and Drug Administration
FI	Filament Intermédiaire
FN1	Fibronectine
Fz	Récepteur Frizzled
GEF	Guanine Exchange Factor
GST	Gène Suppresseur de Tumeur
HE	Hématoxyline-Eosine
HH	Hedgehog
HIF1 α	Hypoxia Inducible Factor 1 α
HLH	Hélice-Boucle-Hélice
HNPCC	Syndrome de Lynch
ICM	Indice Comparatif de Mortalité
ID	Inhibitor of Differentiation/Inhibitor of DNA binding
JAM	Junctional Adhesion Molécule
kDa	kDalton
KO	Knock-Out
LB	Lame Basale
LN	Laminine
LV	Leucovorine
MB	Membrane Basale
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MIN	Microsatellite Instable
miRNA	micro ARN
MMP	Métallo-Protéase Matricielle
MMR	Mismatch Repair
MSS	Microsatellite stable
MT-MMP	Membrane Type-MMP
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NES	Signal d'Exportation Nucléaire
NGR	Asparagine-glycine-arginine
NLS	Signal de Localisation Nucléaire
ORR	Objective Response Rate
OS	Overall Survival

PCP	Polar Cell Polarity
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFS	Progression Free Survival
PKC	Protéine Kinase C
PIGF	Placental Growth Factor
pRB	Protéine du rétinoblastome
QMPSF	Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments
RGD	Arginine-Glycine-Acide aspartique
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
R-SMAD	Receptor-activated SMAD
RT-qPCR	Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction
Ser	Sérine
TCR	T-cell Receptor
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TER	Résistance Jonctionnelle Trans-épithéliale
Thr	Thréonine
TIMP	Tissue Inhibitor of MMP
TKI	Inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase
UTR	Untranslated Region

INTRODUCTION

I. Généralité sur le côlon

1. Anatomie du tube digestif

Le tractus digestif se compose successivement de l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le gros intestin (cæcum, appendice, côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde) et le rectum (**Figure 1**). Le côlon droit (du caecum jusqu'au transverse) et le côlon gauche (du transverse gauche jusqu'au sigmoïde) ont des origines embryonnaires, une vascularisation et des fonctions distinctes (Bufill, 1990).

	Côlon droit	Côlon gauche
Origine embryonnaire	Intestin primitif moyen	Intestin primitif postérieur
Vascularisation	Artère mésentérique supérieure	Artère mésentérique inférieure
Fonctions	- Absorption de l'eau - Solidification des fèces	- Stockage - Production de mucus

2. Histologie du tube digestif

a) Les différentes couches histologiques

En partant de la lumière, le tube digestif comporte 5 tuniques (**Figure 2**) :

- *la muqueuse*, formée par l'épithélium de revêtement organisé en glande de Lieberkhün et par le chorion qui est le tissu conjonctif sous-jacent renfermant des lymphocytes diffus et des follicules lymphoïdes ;
- *la musculaire muqueuse*, mince couche de tissu musculaire lisse
- *la sous-muqueuse*, tissu conjonctif contenant les plexus nerveux de Meissner
- *la tunique musculaire*, décomposée en deux couches de tissu musculaire lisse, une circulaire interne et une longitudinale externe, séparées par les plexus nerveux d'Auerbach ;
- *la tunique externe*, est soit une couche de tissu conjonctif lâche, appelée « adventice », retrouvée aux extrémités du tube (œsophage et rectum), soit un épithélium simple (mésothélium), appelé « séreuse ».

b) Structure et composition de la muqueuse intestinale

Dans l'intestin grêle, l'épithélium de revêtement est organisé selon un axe crypte-villosité où les cryptes, invaginations appelées glandes de Lieberkühn, contiennent les cellules prolifératives (cellules souches intestinales et cellules progénitrices intermédiaires) ainsi que les

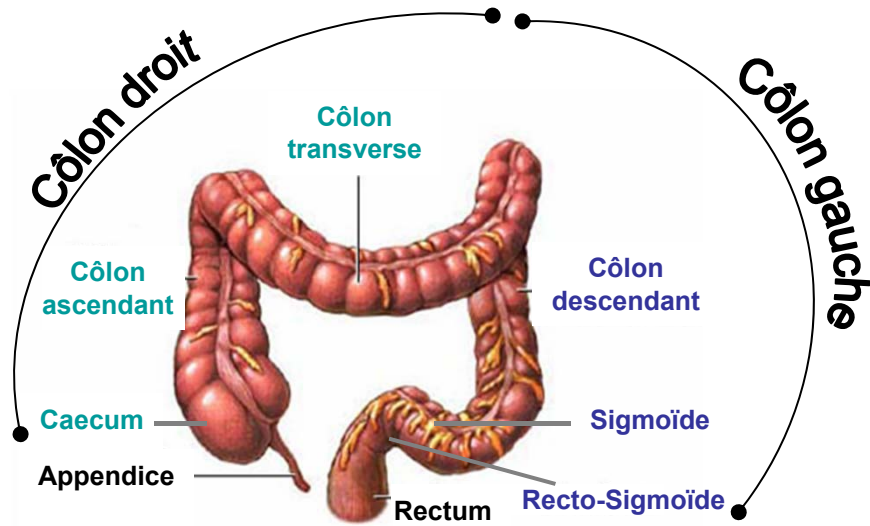


Figure 1: Anatomie du côlon. Le côlon droit comprend le caecum, le côlon ascendant et transverse. Le côlon gauche comprend le côlon descendant, recto-sigmoïde et sigmoïde.

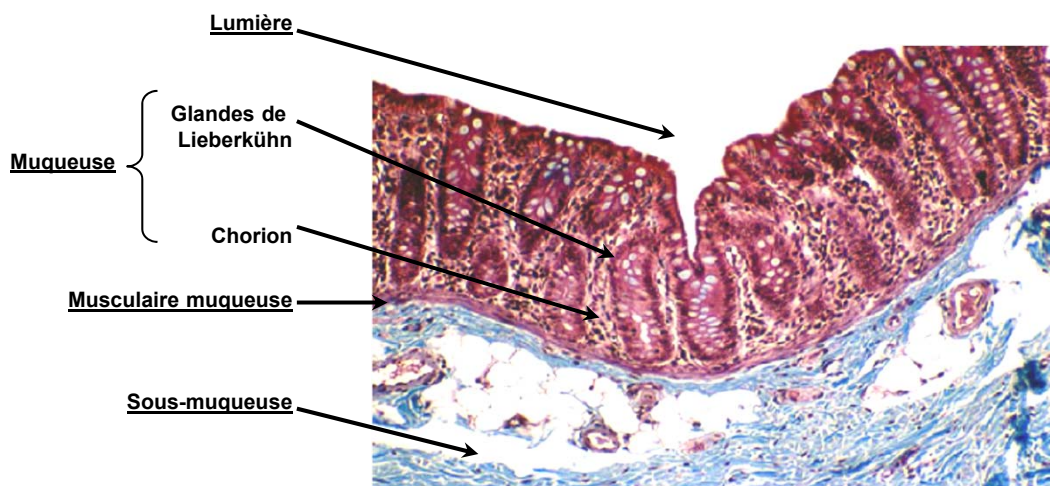


Figure 2: Structure du tube digestif. Coupe transversale du côlon faisant apparaître la lumière, la muqueuse (glandes + stroma), la musculaire muqueuse puis la sous-muqueuse.

cellules de Paneth (**Figure 3A**). Les cellules qui se différencient dans les cryptes migrent progressivement vers les villosités (protrusions de la muqueuse vers la lumière) et s'engagent dans un processus apoptotique trois jours après différenciation pour être ensuite desquamées vers la lumière intestinale (Hall et al., 1994). Par contre, la muqueuse colique ne comporte pas de villosités et se compose uniquement de cryptes dont les deux-tiers inférieurs correspondent au compartiment prolifératif (**Figure 3B**). Le tiers supérieur des cryptes et l'épithélium de surface plat contiennent les cellules différenciées.

3. Différenciation des cellules de l'épithélium intestinal

Les cellules différenciées de l'épithélium intestinal dérivent des cellules souches intestinales qui génèrent par division symétrique ou asymétrique des cellules progénitrices. Deux grands lignages sont discriminés selon les fonctions sécrétrices et absorbantes des cellules. La balance entre prolifération/différenciation ainsi qu'entre sécrétion/absorption est finement contrôlée par les voies de signalisation Wnt et Notch. En effet, ces deux voies semblent essentielles pour maintenir l'état indifférencié et prolifératif des cellules des cryptes mais aussi pour spécifier les cellules. La voie Wnt semble plutôt favoriser le lignage sécréteur via le facteur de transcription Math1 et des facteurs spécifiques interviennent pour la différenciation terminale (**Figure 4**). A l'inverse, la voie Notch favorise la différenciation entérocytaire puisqu'une de ses cibles directes, Hes1, réprime Math1 et favorise par conséquent, la lignée absorbante (Yeung et al., 2011).

a) Les cellules souches intestinales

Les cellules souches intestinales ont été identifiées au fond des cryptes et associées à l'expression du marqueur Lgr5, une cible de la voie Wnt. Ces cellules Lgr5-positives sont caractérisées par leur capacité à s'auto renouveler un grand nombre de fois sur une longue période (jusqu'à un an) et leur capacité à générer les différents types de cellules épithéliales (pluripotence) en passant par le statut de cellules progénitrices (Barker et al., 2007). D'autres marqueurs ont été identifiés comme Bmi1, un répresseur transcriptionnel de la famille Polycomb, retrouvé spécifiquement dans les cellules localisées en position +4 (quatrième cellule en partant de la base des cryptes) (Sangiorgi and Capecchi, 2008). Néanmoins, il n'y a pas de preuve à ce jour, que les cellules Lgr5+ et Bmi1+ font partie de la même population de cellules souches (**Figure 5**), d'autant plus que Lgr5 est retrouvé à la fois dans l'intestin grêle et le côlon alors que Bmi1 est restreint à l'intestin grêle proximal. L'environnement entourant les cryptes, particulièrement les myofibroblastes et les facteurs qu'ils sécrètent, forment une niche qui influence également l'état prolifératif et de différenciation des cellules souches.

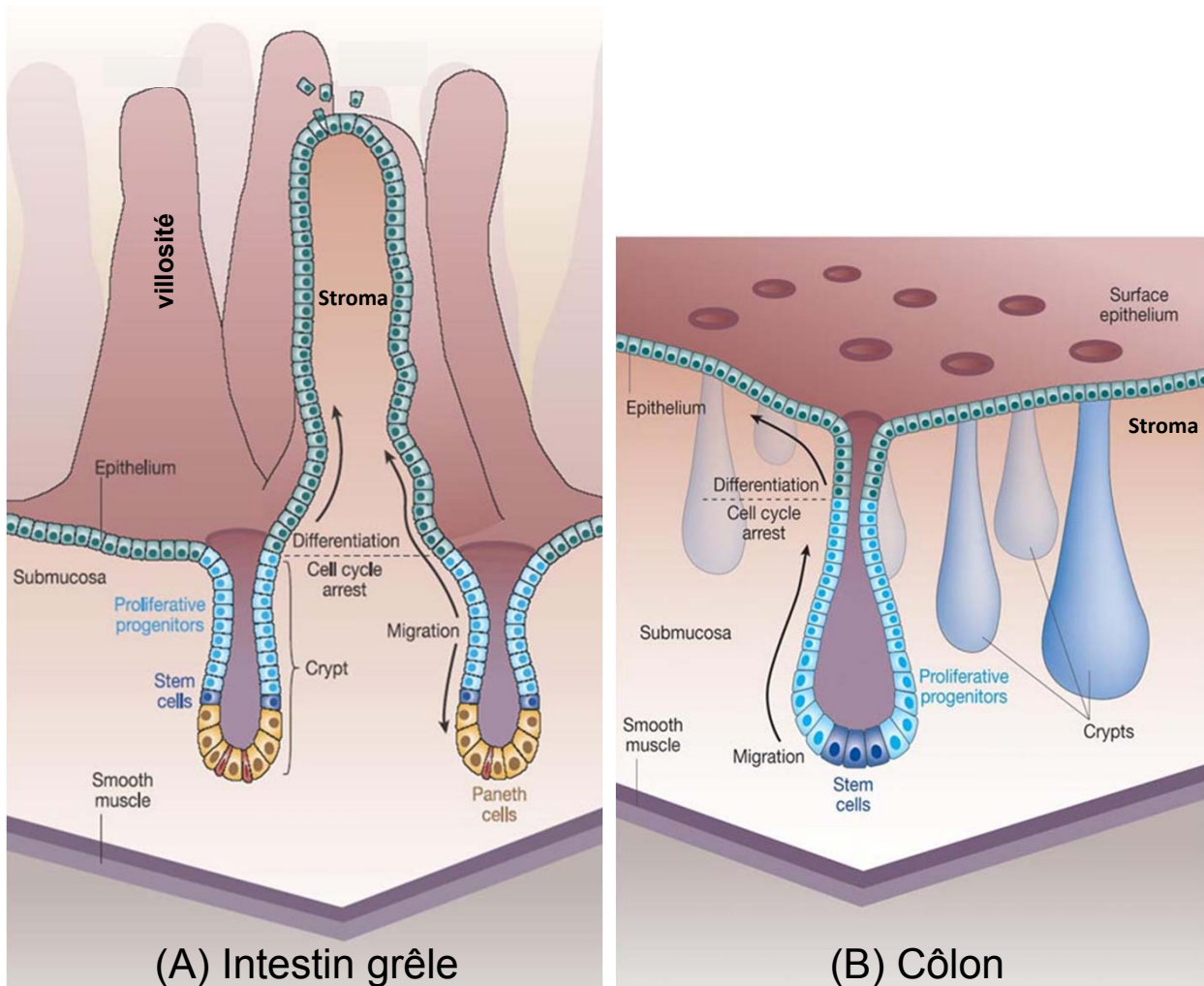


Figure 3: Anatomie de la muqueuse intestinale adulte. Représentation schématique de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon. L'intestin s'organise en un axe crypto-villositaire. (A) Dans l'intestin grêle, les cellules souches intestinales résident à côté des cellules de Paneth au fond des cryptes formant le compartiment prolifératif et les cellules différenciées (cellules en gobelet, cellules entéroendocrines et entérocytes) migrent vers les villosités. (B) Dans le côlon, la muqueuse est une surface plane avec uniquement des cryptes dont les deux tiers inférieurs correspondent au compartiment prolifératif. Les cellules de Paneth sont absentes dans le côlon.

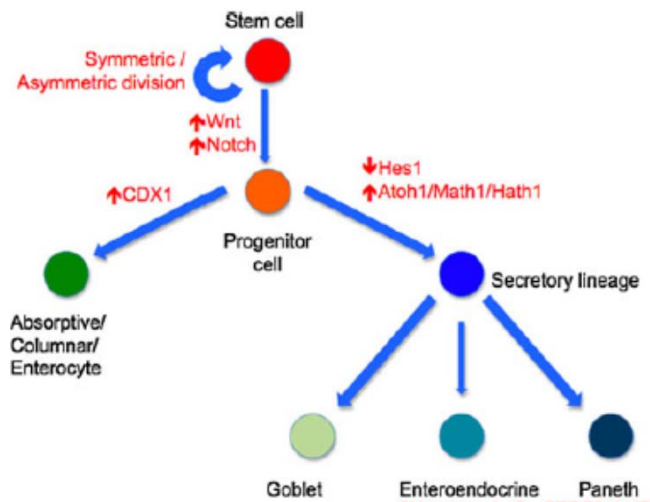


Figure 4: Régulation de la différenciation des cellules épithéliales intestinales (Yeung et al., 2011). Les cellules souches intestinales peuvent réaliser une division asymétrique pour donner une cellule souche et une cellule progénitrice ou une division symétrique pour donner deux cellules souches ou deux cellules progénitrices. Les voies Wnt et Notch sont étroitement impliquées dans le contrôle de ces divisions et dans la spécification des lignages absorbant et sécréteur. D'autres facteurs vont intervenir pour la différenciation terminale des cellules épithéliales comme CDX1, HES1 et MATH1.

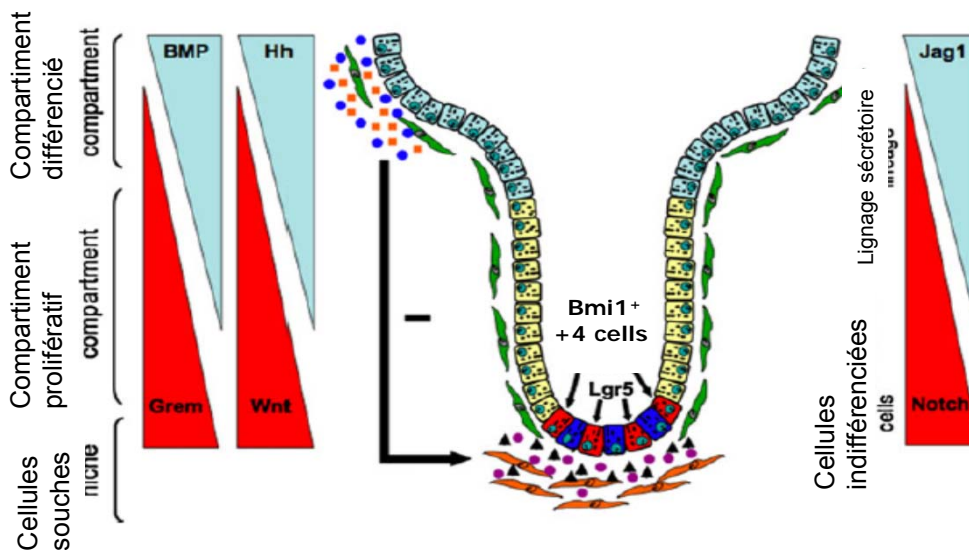


Figure 5: Cellules souches intestinales (Yeung et al., 2011). Les cellules souches intestinales exprimant les marqueurs Lgr5⁺ et Bmi1⁺ correspondent aux cellules à la base des cryptes et en position +4, respectivement. L'activation des voies Wnt et Notch suit un gradient le long de l'axe de la crypte, et est inverse à celui des voies BMP et Hedgehog (Hh).

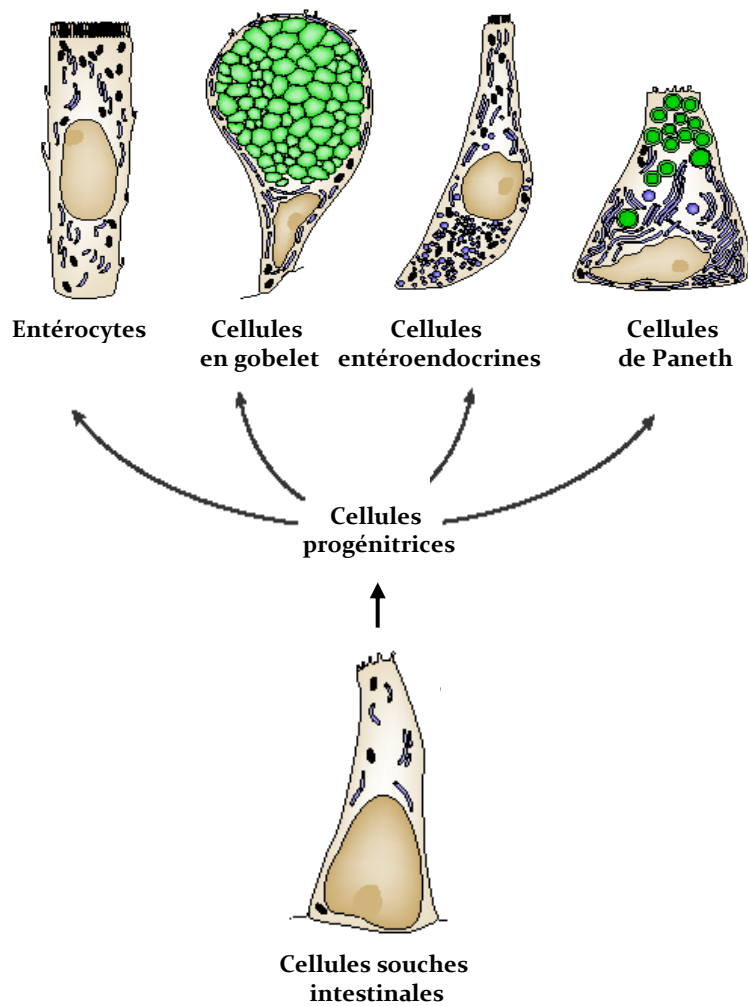


Figure 6: Cellules épithéliales intestinales. Les 4 principaux types cellulaires différenciés dérivent des cellules souches intestinales par l'intermédiaire des cellules progénitrices.

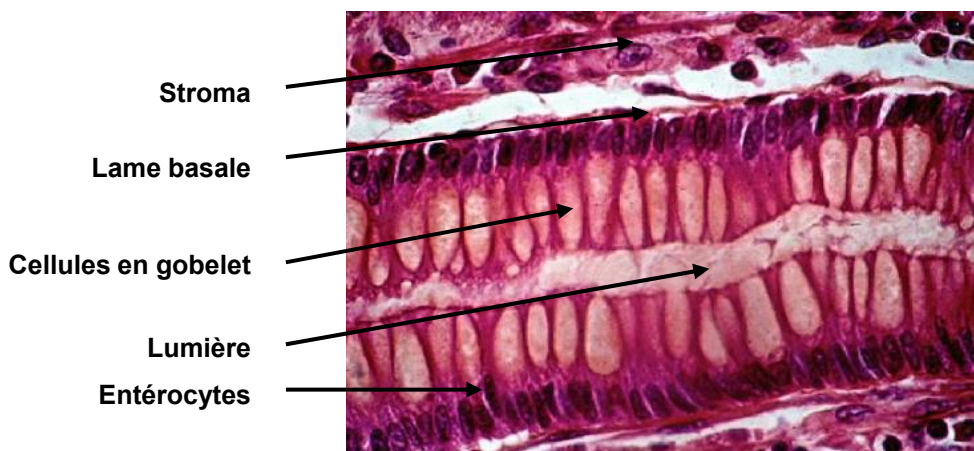


Figure 7: Histologie d'une glande de Lieberkühn du côlon. Avec les entérocytes, les cellules en gobelet sont majoritaires dans le côlon. La lame basale sépare les glandes du stroma.

b) Les quatre principaux types cellulaires dans l'intestin

Voici les différents types de cellules différenciées et leurs fonctions associées (van der Flier and Clevers, 2009) (**Figure 6**) :

- Les *cellules de Paneth*, absentes du côlon distal (gauche ou descendant), ont une forme pyramidale et sont responsables de la sécrétion de peptides anti-microbiens et de lysosymes. Elles sont particulières car ce sont les seules cellules différenciées à rester confinées dans le compartiment prolifératif au fond des cryptes, à côté des cellules souches intestinales.

- Les *cellules en gobelet* (cellules caliciformes) sécrètent le mucus composé de mucines et d'eau. Elles sont majoritaires dans la muqueuse colique (**Figure 7**).

- Les *cellules entéroendocrines* sont spécialisées dans la sécrétion d'hormones influençant le comportement sécrétoire et motile des cellules épithéliales.

- Les *entérocytes* présentent un plateau strié (bordure en brosse) sur la face apicale, avec des microvillosités disposées parallèlement et particulièrement organisées. Ce dispositif régule les phénomènes d'absorption grâce à l'importance des échanges entre les milieux extra- et intra-cellulaires. Des enzymes sont fixées à la membrane des cellules de la bordure en brosse au niveau des microvillosités et sont libérées dans la lumière suite à la desquamation cellulaire. Ces enzymes, qui sont des disaccharidases telle que la saccharase isomaltase, des peptidases et aminopeptidases telle que l'aminopeptidase-N/CD13 et les phosphatases alcalines, sont impliquées dans l'hydrolyse des glucides, des polypeptides et des lipides (Lallès, 2010).

c) Autres types cellulaires

D'autres types cellulaires beaucoup moins connus ont déjà été décrits. Par exemple, les cellules intestinales M, localisées dans les plaques de Peyer (intestin grêle) mais aussi dans les cryptes du côlon et du rectum, sont capables d'endocytoser des antigènes présents dans la lumière intestinale et pourraient donc jouer un rôle intermédiaire de cellules présentatrices aux follicules lymphoïdes via les cellules dendritiques (Miller et al., 2007). De plus, la présence des « tuft cells » ou « brush cells » a été rapportée dans l'appareil intestinal mais aussi respiratoire et ces cellules sont caractérisées par une importante bordure en brosse. Ces cellules représentent un quatrième type sécrétoire dans l'épithélium intestinal en produisant des opiacés, et des enzymes de synthèse de prostaglandines. Bien que ces cellules soit produites à partir des mêmes cellules souches Lgr5+ que les entérocytes, les cellules en gobelet, les cellules de Paneth, et les enterocytes, elles représentent un type cellulaire indépendant puisqu'elles expriment des marqueurs spécifiques et aucun des facteurs de transcription connus pour être nécessaires à la différenciation des autres types de cellules de l'épithélium intestinal ne sont nécessaires à la différenciation de ces cellules (Gerbe et al., 2011). De plus, ces auteurs suggèrent que les « tuft

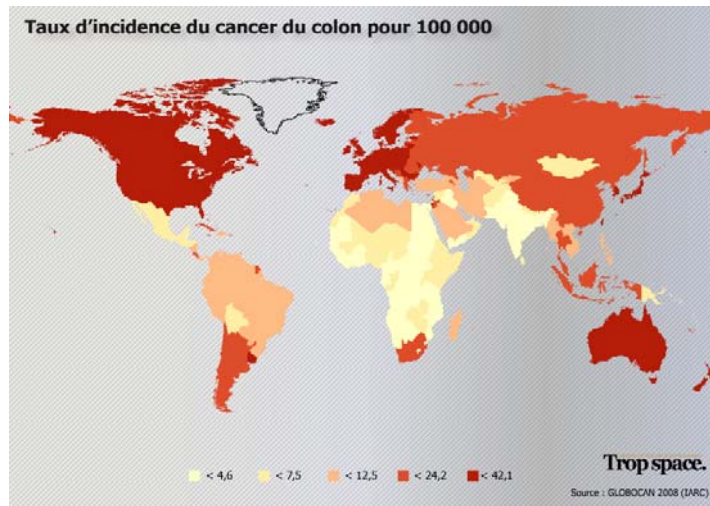


Figure 8: Répartition géographique des cancers coliques (2008). L'incidence du cancer du côlon est particulièrement élevée dans les pays développés.

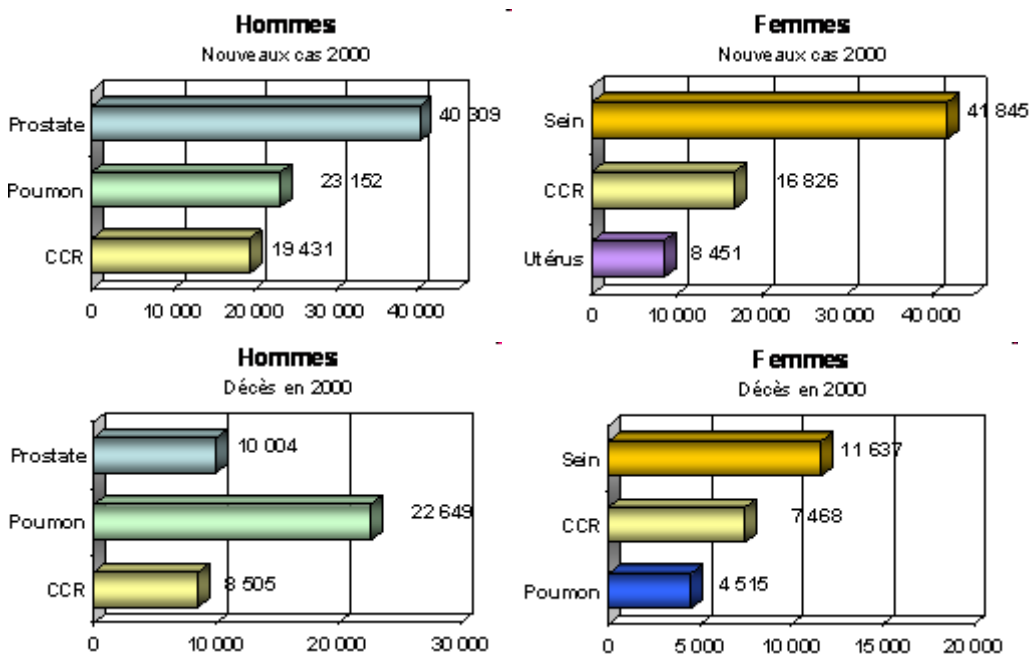


Figure 9: Nombre de nouveaux cas et décès en France des trois premiers cancers chez l'homme et la femme (2000). Source : Invs, Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000 (octobre 2003). CCR: cancer colorectal.

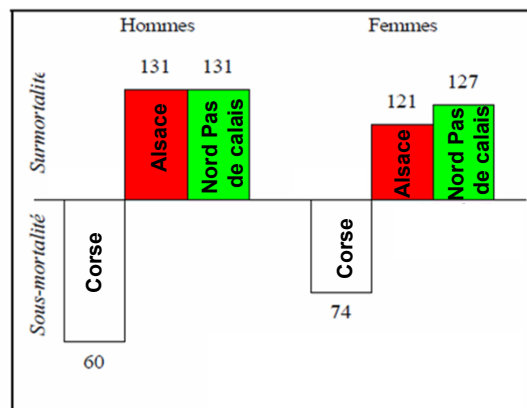


Figure 10: Indices comparatifs de mortalité (ICM) par cancer colorectal en 1995-97. ICM France métropolitaine = 100. Réalisation ORS Alsace – 1999.

cells » pourraient promouvoir l'inflammation et la tumorigenèse, et observent de telles cellules dans des stades précoces de tumeurs coliques.

II. Le cancer colorectal

1. Epidémiologie

Avec près de 8 millions de morts par cancer recensés dans le monde chaque année, le cancer est la deuxième cause de mortalité chez l'Homme après les maladies cardiaques. Depuis les années 1980, l'incidence a légèrement augmentée et pourtant la survie à 5 ans s'est légèrement améliorée, ce qui peut s'expliquer par un diagnostic plus précoce, des traitements adaptés et une meilleure prise en charge pré-opératoire (Sant et al., 2003). Les taux d'incidence du cancer colorectal (CCR) varient considérablement selon les pays. En effet, c'est un cancer qui se développe particulièrement dans les régions développées: il est fréquent en Amérique du Nord, en Australie, en Nouvelle Zélande, en Europe et au Japon. Par contre, il est rare en Amérique du Sud, en Asie et en Afrique (**Figure 8**). En France, l'incidence est parmi la plus élevée en Europe, avec 37 000 nouveaux cas par an, ce qui place le CCR au 3^e rang. Pourtant, l'étude Eurocare-3 a montré que la survie à 5 ans après diagnostic est meilleure en France par rapport à la moyenne européenne (Sant et al., 2003). En terme de nombre de nouveaux cas et de décès en France, le CCR est le 3^{ème} chez l'homme (après la prostate et le poumon) et le 2^{ème} chez la femme (après le sein) (**Figure 9**). L'incidence est plus élevée chez l'homme (37 pour 100 000) que chez la femme (24 pour 100 000) avec un sexe-ratio de 1.5 et la survie est légèrement meilleure chez la femme (Bouvier et al., 2009).

Si la répartition des CCR n'est pas égale dans le monde, elle ne l'est pas non plus en France. L'Alsace est la région où l'incidence des CCR est la plus élevée, avec un indice comparatif de mortalité (ICM) de 131 chez l'homme et de 121 chez la femme (ICM = 100 pour la moyenne nationale) (**Figure 10**) (Réalisation ORS Alsace – 1999). Le CCR est causé par des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux mais ce sont surtout ces derniers qui sont mis en cause dans la situation défavorable en Alsace. Parmi eux, on considère particulièrement les habitudes alimentaires locales (consommation de viandes rouges, de viandes salées et fumées et de charcuterie).

2. Les facteurs de risques

a) Risque moyen

Le risque moyen est attribué aux hommes et femmes ayant plus de 50 ans sans facteur de prédisposition connu (facteurs génétiques, antécédents). Dans ce cas, les facteurs

environnementaux comme l'alimentation, l'hygiène de vie (pratique d'une activité sportive) et la prise d'alcool et de tabac influenceront sur le développement d'un cancer (Conférence de consensus, 1998). Ces personnes sont surveillées dans le cadre d'un dépistage organisé.

b) Risque élevé

Le risque élevé (environ 20% de la population générale) prend en compte les antécédents familiaux et personnels. Les personnes ayant au moins un parent du 1^{er} degré atteint d'un CCR ou d'un adénome de > 1 cm, ayant développé lui-même un CCR ou des adénomes colorectaux, ou ayant une maladie inflammatoire chronique intestinale (rectocolite hémorragique ou maladie de Crohn) ont un risque 1.5 à 5 fois supérieur au risque moyen de développer un CCR. Le risque de développer un cancer dépend aussi des caractéristiques histologiques des adénomes colorectaux développés initialement. Les personnes ayant eu un cancer de l'ovaire, de l'utérus, du sein ou de l'intestin sont aussi à risque élevé. Ces personnes seront surveillées par coloscopie tous les 5 ans à partir de 60 ans.

c) Risque très élevé

Le risque très élevé (environ 5% de la population générale) correspond à des syndromes héréditaires dont les plus fréquents sont la polypose adénomateuse familiale (FAP) due à la mutation du gène APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) et le syndrome de Lynch (HNPCC). Ces personnes ont 80 à 100% de risque de développer un CCR et sont surveillées par coloscopie annuelle dès la puberté et jusqu'à l'âge de 40 ans pour les FAP, et tous les 2 ans dès l'âge de 25 ans, ainsi que par un examen gynécologique annuel après 30 ans pour les HNPCC.

3. Dépistage du cancer colorectal (risque moyen)

a) Dépistage organisé du CCR : état des lieux

La stratégie de dépistage du CCR utilise un test de sélection (et non de diagnostic) qui repose sur la recherche de sang occulte dans les selles (test Hemoccult[®] basé sur l'activité pseudoperoxydasique de l'hème), permettant de détecter, en plus des tumeurs de stade avancé, des tumeurs de stade précoce ou des polypes à haut risque de transformation maligne. Après une campagne menée dans 23 départements pilotes sur 5 millions de personnes (30% de la population cible nationale), le dépistage du cancer colorectal a été généralisé au niveau national en 2008 (Faivre et al., 2009). En pratique, le programme s'adresse à des personnes à risque moyen, de plus de 50 ans. A partir des bases de données de l'assurance maladie, les personnes concernées sont invitées à réaliser le test tous les 2 ans et en l'absence de réponse, une lettre de relance est

renvoyée 3 mois et 6 mois après. Le résultat est transmis à la personne, au médecin généraliste et à la structure de gestion départementale, et, en cas de test positif, le test Hemocult® est suivi d'une coloscopie. Cette approche permet de dépister des cancers au début de leur évolution afin de diminuer la mortalité. En effet, si le taux de participation atteint environ 50%, le dépistage organisé permet de diminuer de façon significative la mortalité due au CCR de 15 à 20% (Faivre et al., 2004). Néanmoins, en France, seulement 8 départements sur 95 ont atteint une participation au-dessus du seuil minimal de 45%, nécessaire pour obtenir un bénéfice significatif (European commission, 2009).

b) Perspectives : les tests immunologiques

Pour optimiser les bénéfices du dépistage organisé, une nouvelle gamme de tests de dépistage du CCR, également basés sur la détection de sang dans les fèces, a été développée. Il s'agit d'anticorps mono- et polyclonaux spécifiques de la partie globine de l'hémoglobine humaine. Le plan cancer 2009-2012 prévoit de déployer progressivement l'utilisation de ces tests immunologiques. En effet, ils présentent plusieurs avantages par rapport au test Hemocult® actuel: ils sont spécifiques de l'hémoglobine humaine et ne peuvent donc pas être positifs en présence d'hémoglobine animale issue de l'alimentation (comme c'est le cas du test Hemocult®) ; il sont plus spécifiques de saignements colorectaux que de saignements gastriques ou de l'intestin grêle ; et ils sont quantitatifs et plus sensibles. De plus, l'utilisation de ces tests permettrait d'optimiser le taux de participation en améliorant potentiellement l'acceptabilité du test (mode de prélèvement différent, nombre de prélèvements moins nombreux) (Institut National du Cancer, 2011).

4. Genèse du cancer colorectal

Le cancer colorectal a la particularité de se développer via de multiples étapes de transformation sur le plan moléculaire et morphologique (Fearon and Vogelstein, 1990). De manière schématique et séquentielle, les foyers de cryptes aberrantes (FCA) sont les lésions qui apparaissent le plus précocement au niveau de la muqueuse normale, et qui évoluent en adénome, puis en carcinome invasif qui pourra alors disséminer à distance via la voie sanguine ou lymphatique pour établir des métastases (**Figure 11**).

a) Les foyers de cryptes aberrantes

Les **FCA** peuvent se restreindre à une crypte aberrante ou à plusieurs cryptes et sont définies comme de petites lésions hyper- ou dysplastiques caractérisées par une augmentation de la taille des cryptes, une augmentation de l'espace entre elles et les cryptes normales, ainsi qu'un

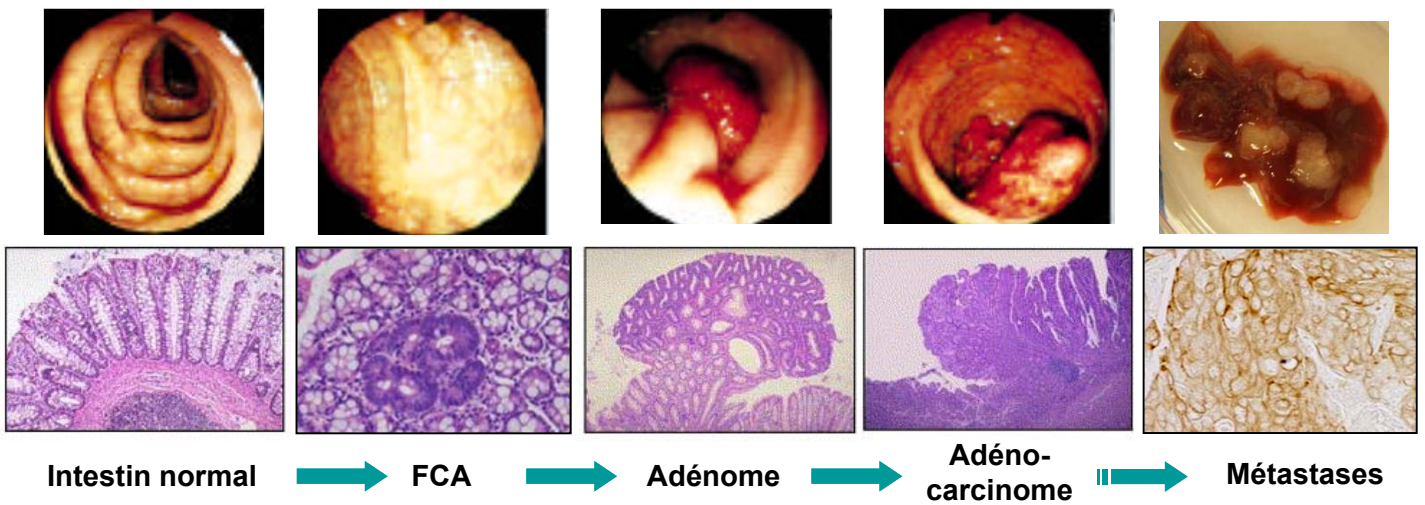


Figure 11: De la muqueuse intestinale normale vers un adénocarcinome. Coloscopie (en haut) et histologie (en bas) de l'intestin normal, d'un foyer de cryptes aberrantes (FCA) d'un adénome tubuleux, d'un adénocarcinome et d'une métastase hépatique marquée à la cytokératine-19.

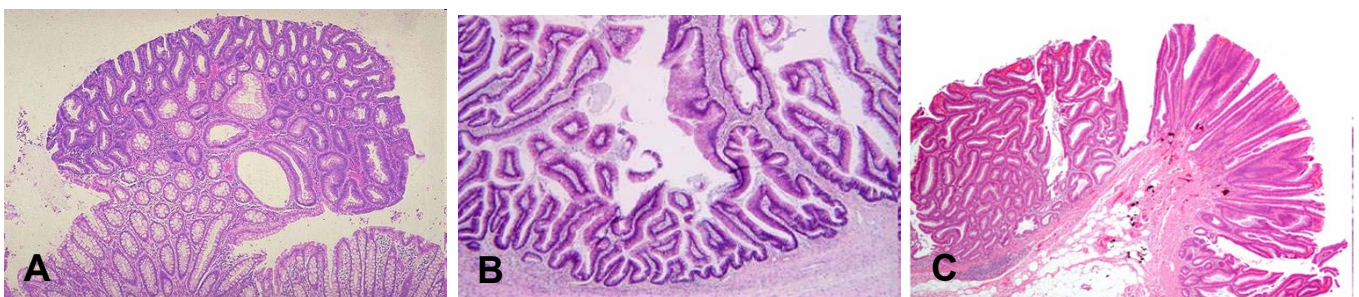


Figure 12: Différents types histologiques des adénomes. (A) Adénome tubuleux, (B) villosus et (C) tubulo-villosus.

élargissement de l'épithélium qui apparaît toujours plus foncé après coloration à l'hématoxyline/éosine (HE) (McLellan and Bird, 1988). Ces structures sont plutôt retrouvées dans le côlon distal (Nucci et al., 1997) et, bien que tous les FCA n'évolueront pas en adénomes, les foyers les plus larges ayant une forte dysplasie et des altérations génétiques sont à haut-risque de générer un adénome puis un CCR (Hurlstone and Cross, 2005).

b) Les polypes ou adénomes

La plupart des CCR sont des adénocarcinomes et se développent à partir d'un adénome, lésion néoplasique précoce définie par la présence d'un épithélium dysplasique. Les adénomes font partie des polypes du tube digestif, qui représentent un ensemble d'entités diverses : en effet, le terme de polype n'a qu'une signification macroscopique, correspondant à une excroissance tissulaire faisant protrusion dans la lumière intestinale. Sur le plan histologique, ces polypes peuvent être de nature épithéliale (adénomateux ou non adénomateux) ou non épithéliale (polype inflammatoire, tumeur mésoenchymateuse). Les polypes adénomateux « classiques » sont classés sur le plan histologique en 3 types: tubuleux, tubulo-villeux et vilieux (**Figure 12**). Le deuxième critère définissant un adénome est la dysplasie (de bas ou de haut grade) définie par des anomalies cellulaires, généralement un noyau plus gros, hyperchromatique et qui perd son positionnement basal le long de l'axe crypte-villosité témoin de la perte de polarité, et une perte de l'architecture normale du tissu épithélial. La taille (> 1 cm), la composante vilieuse et un haut degré de dysplasie sont associés à un plus haut-risque de transformation maligne (Takata et al., 2003). Parmi les polypes épithéliaux non adénomateux, le polype hyperplasique est le plus fréquent, caractérisé par une prolifération incontrôlée mais gardant une cytologie normale.

c) Les carcinomes

Les adénomes peuvent mettre 10 ans avant de générer un cancer et seulement 5% évolueront en **carcinome**. Sur le plan cytologique, au fur et à mesure de la progression tumorale, les cellules transformées perdent leur caractère différencié, le ratio de la surface noyau/cytoplasme est diminué et le nucléole est plus visible, témoignant d'une augmentation de l'activité cellulaire. Les cancers du côlon gauche représentent environ les deux-tiers des cancers du côlon contre un-tiers pour les cancers du côlon droit. Néanmoins, depuis les années 1980, il semble y avoir un glissement de l'incidence des cancers du côlon gauche vers les cancers du côlon droit en Europe (Stang et al., 2007) et aux Etats-Unis (Cress et al., 2006). 80% des adénocarcinomes sont des adénocarcinomes lieberkhünien de part leur ressemblance avec les glandes de Lieberkhün de la muqueuse colique normale et présentent un degré de différenciation variable. Les 20% restants sont des adénocarcinomes mucineux caractérisés par de larges plages de mucus.

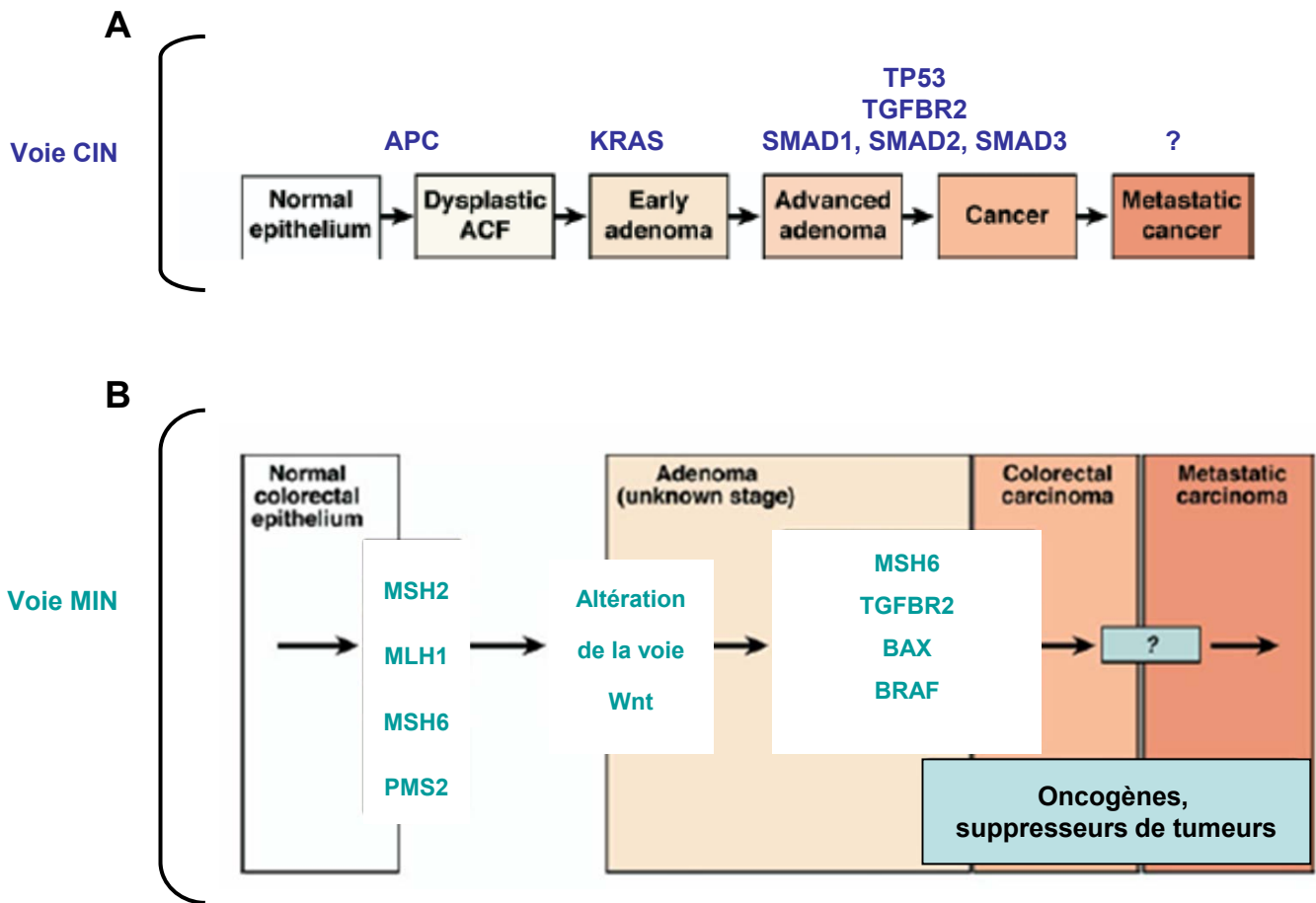


Figure 13: Altérations génétiques au cours de la progression des tumeurs de phénotype CIN (A) et MIN (B) (d'après Grady et Carethers, 2008).

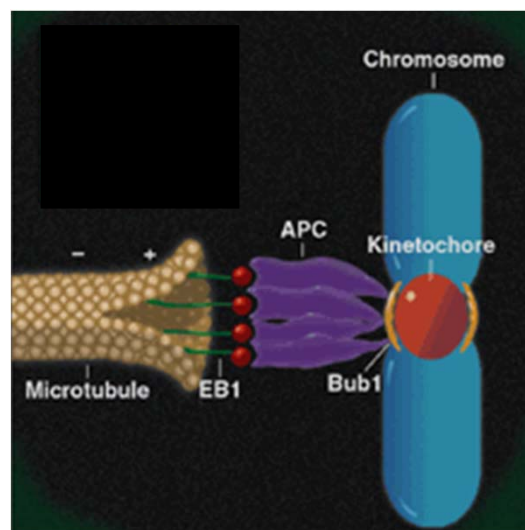


Figure 14: Complexe d'attachement EB1/APC. Lors de la transition métaphase-anaphase, l'attachement des kinétochores aux extrémités + des microtubules est contrôlé par le complexe senseur APC/EB1 qui empêche la progression mitotique tant que toutes les chromatides sœurs ne sont pas correctement attachées par un mécanisme dépendant de la fonction kinase de BUBR1.

III. Mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogenèse colique

1. Les phénotypes du CCR

Les CCR sont caractérisés par deux phénotypes dont le diagnostic est basé sur l'analyse de l'instabilité génomique par allélotypage : le phénotype CIN (*Chromosome Instable*) représentant 85% des CCR, et le phénotype MIN (*Microsatellite Instable*) représentant 15% des CCR. Les tumeurs MIN sont principalement retrouvées dans le côlon droit, et sont associées à une meilleure survie et une meilleure réponse au traitement, particulièrement pour les stades III ayant un envahissement ganglionnaire (Thibodeau et al., 1993; Mirabelli-Primdahl et al., 1999; Samowitz et al., 2001a). Un troisième phénotype a récemment été identifié, le phénotype méthylateur des îlots CpG (CIMP), d'origine épigénétique, correspondant à environ 20% des CCR et fréquemment associé au phénotype MIN, plus rarement au phénotype CIN, et plus souvent localisé dans le côlon droit (Toyota et al., 1999).

a) Le phénotype CIN et anomalies chromosomiques

Le phénotype majoritaire CIN se définit par des anomalies chromosomiques correspondant à la perte ou au gain de chromosomes ou de fragments de chromosomes (Höglund et al., 2001). Certains gènes, altérés dans le CCR, ont été identifiés comme participant à l'instabilité chromosomique (**Figure 13A**).

Par exemple, dans la séquence épithélium sain - adénome - carcinome, les événements les plus précoces sont les mutations des gènes APC dans plus de 80% des CCR sporadiques (Kinzler and Vogelstein, 1996) et KRAS, dans 35% des CCR (Rako et al., 2012). Bien que certaines études identifient la mutation du gène APC en 5q21 dès le stade FCA (Jen et al., 1994) et que d'autres ne l'identifient qu'au stade d'adénome (Takayama et al., 2001), il est maintenant clairement établi que les lésions précoces mutées pour APC ont une forte probabilité d'évoluer en carcinome. Cette évolution résulte de l'instabilité génomique induite par la mutation du gène APC. En effet, si une mutation du gène APC entraîne l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, incapable de neutraliser la β -caténine en bloquant sa dégradation par le protéasome, elle affecte également la stabilité des attachements centromères-microtubules au cours de la mitose. En effet, APC se lie à la protéine EB1 et aux extrémités croissantes des microtubules, et une fois attaché aux kinétochores, le complexe APC/EB1 permet la progression en anaphase en bloquant la fonction kinase de BUBR1 (Kops et al., 2005) (**Figure 14**). Ceci conduit à une mauvaise ségrégation des chromosomes suite à la mauvaise séparation kinétochore-microtubule durant l'anaphase ; cet effet est indépendant de la capacité de la protéine APC à dégrader la β -caténine (Fodde et al., 2001).

De plus, des mutations inactivant les gènes BUB1 et BUBR1, codant pour des protéines régulant le point de contrôle mitotique et la ségrégation des chromosomes, sont retrouvées dans les cancers CIN (Cahill et al., 1998). L'instabilité chromosomique cible en particulier des chromosomes comme le chromosome 18q sur lequel se trouve le gène DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) dont la perte aurait un rôle dans l'adhésion cellulaire, l'invasion et le développement de métastases (Shekarabi et al., 2005). En 18q, on retrouve également les gènes TGFBR2, SMAD2 et SMAD4 (Chittenden et al., 2008) dont la perte ou plus rarement des mutations, favoriserait le processus de carcinogenèse, de part leur rôle dans la prolifération cellulaire et l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Zavadil and Böttinger, 2005).

Parmi les altérations plus tardives, on trouve la mutation du gène TP53 localisé en 17p dans 45% des CCR tout stade confondu (Iacopetta, 2003), mutation qui altère le site de fixation de la protéine p53 à l'ADN, et inhibe donc son activité transcriptionnelle (Vousden and Lu, 2002). Ce gène suppresseur de tumeur (GST) code pour un facteur de transcription dont les fonctions essentielles sont d'intégrer le stress cellulaire et de réguler la mort cellulaire (apoptose/sénescence) ou l'arrêt du cycle cellulaire. La présence de telles mutations accroît l'instabilité génomique et la résistance à l'induction de la mort cellulaire.

A ce jour, les mécanismes moléculaires spécifiques du développement de métastases restent à préciser.

b) Le phénotype MIN

Le phénotype MIN se caractérise par une instabilité de microsatellites. En effet, ce phénotype résulte de l'altération des gènes du système de réparation MMR (*Mismatch Repair*) de l'ADN impliquant les gènes cibles MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 (Fishel et al., 1993; Bronner et al., 1994; Nicolaidis et al., 1994; Hendriks et al., 2004), même si moins fréquemment pour MSH6 et PMS2 (**Figure 13B**). La perte de fonction des gènes de réparation résulte soit de l'hyperméthylation biallélique du promoteur du gène MLH1, évènement décrit comme précoce de la cancérogenèse des tumeurs MIN sporadiques (Cunningham et al., 1998b) soit de mutations somatiques des gènes MLH1 et MSH2, également observées au stade d'adénome (Liu et al., 1995). Si les tumeurs MIN sont généralement diploïdes et présentent peu d'altérations chromosomiques, elles se caractérisent par un nombre important de mutations dans le génome dont des mutations dans les gènes de réparation eux-mêmes, accélérant l'accumulation des mutations. Ces gènes codent pour un complexe de protéines dont la fonction est de réparer les erreurs de réplication de la polymérase de l'ADN et de telles erreurs surviennent lors des réplifications de l'ADN particulièrement dans les séquences répétées des microsatellites. En l'absence de réparation post-réplivative efficace dans la tumeur, les erreurs persistent et se transmettent lors de la réplication suivante entraînant l'émergence et la persistance d'allèles de tailles différentes qui créent l'instabilité de microsatellites.

Anomalies moléculaires des tumeurs MIN

L'altération des gènes de réparation de l'ADN entraîne l'accumulation de mutations dans de très nombreux gènes ayant des séquences répétées dites microsatellites dans leur séquence codante. Certains gènes sont des gènes cibles de l'instabilité et ont un rôle important dans la carcinogenèse colique. Parmi ces gènes cibles, la mutation la plus fréquente est celle du récepteur TGF β de type II (TGFBR2) dans 90% des cancers MIN. La mutation entraîne une perte d'expression du TGFBR2 à la membrane et par conséquent une altération du contrôle de la croissance cellulaire dépendante du TGF β (Markowitz et al., 1995). Cet événement semble survenir à la transition adénome-carcinome car on l'observe essentiellement dans les adénomes de haut grade (importante dysplasie) et peu dans les adénomes de bas-grade (Grady et al., 1998). De plus, la mutation du gène BRAF, une tyrosine kinase de la voie des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), active de manière constitutive la signalisation des MAP kinases, et est retrouvée dans 35-40% des tumeurs MIN (Deng et al., 2004). Enfin, la mutation inactivant le gène BAX qui code un facteur pro-apoptotique, semble intervenir dans la progression des tumeurs MIN (Rampino et al., 1997).

La voie Wnt est également affectée dans les tumeurs MIN puisque le gène APC est muté dans la majorité des tumeurs MIN, comme c'est le cas dans les tumeurs CIN, bien que le spectre des mutations soit différent (Huang et al., 1996). Dans ce cas, les mutations du gène APC semblent être une conséquence de la déficience du système MMR puisque ces mutations apparaissent après la mise en place de la déficience de réparation.

Le gène codant pour le récepteur IGF1R (*Insulin-like Growth Factor Receptor 2*) est retrouvée muté dans les tumeurs MIN peu différenciées (Souza et al., 1996). La β -caténine est mutée uniquement dans les tumeurs de phénotype MIN et est plutôt associée aux tumeurs de stade 4 (Mirabelli-Primdahl et al., 1999). Par contre, la fréquence des mutations des gènes KRAS et TP53 est inversement corrélée à l'instabilité de microsatellite (Samowitz et al., 2001b), et les mutations de KRAS et de BRAF sont mutuellement exclusives (Rajagopalan et al., 2002).

Diagnostic du phénotype CIN et MIN des CCR

Un travail international réalisé en 1997 et reporté par Boland et al. (1998) a amené à proposer un panel minimal de 5 microsatellites pour spécifier le typage moléculaire des CCR afin de les classer en MSI-H (*MSI-High*, avec au moins 2 microsatellites instables), MSI-L (*MSI-Low*, avec 1 microsatellite instable) et MSS (*Microsatellite stable*, avec aucun microsatellite instable). Dans notre équipe, au sein de la plate-forme d'oncobiologie, chaque CCR réséqué est caractérisé pour son phénotype en analysant un panel de 16 microsatellites et si au moins 30% des microsatellites ont un profil MIN, la tumeur est considérée MIN.

c) Le phénotype CIMP

Plus récemment, un phénotype CIMP a été identifié (Toyota et al., 1999). Il correspond à une sous-population de CCR pour laquelle le promoteur de multiples gènes est méthylé avec comme conséquence l'arrêt de la transcription de ces gènes. L'analyse de la méthylation d'un panel de 5 gènes a permis de définir le phénotype CIMP qui, de plus, ont une mutation fréquente du gène MLH1 et, ont par conséquent des caractéristiques de phénotype MIN (Ogino et al., 2006). Contrairement aux tumeurs de phénotype CIN et MIN, les tumeurs CIMP ont un fort taux de mutation du gène BRAF (Ogino et al., 2006) et un gène KRAS non muté (van Rijnsoever et al., 2002). De plus, la perte d'expression du facteur de transcription CDX2 est significativement associée au phénotype CIMP et permet de prédire le phénotype CIMP avec une haute précision (Zlobec et al., 2011). L'ensemble de ces caractéristiques permet de définir le phénotype CIMP comme un phénotype à part entière, distinct des phénotypes CIN et MIN.

Diagnostic du phénotype CIMP

Le diagnostic CIMP s'établit sur la base de l'analyse quantitative de la méthylation des promoteurs d'un panel minimal de gènes participant à la carcinogenèse des CCR. Un panel de 5 gènes, dont les gènes codant pour P16 et MLH1, a été choisi pour évaluer le niveau de méthylation (Ogino et al., 2006). Si une tumeur possède au moins 4 loci sur 5 fortement méthylés, elle est considérée comme CIMP.

2. Formes héréditaires des CCR

Alors que 85% des CCR sont des cancers sporadiques, 15% sont d'origine héréditaire.

a) La polypose adénomateuse familiale (FAP)

La FAP, responsable de moins de 1% des CCR, est caractérisée par l'apparition de nombreux polypes (de > 100 à plusieurs milliers d'adénomes). La FAP est généralement associée à des mutations germinales du gène APC et est transmise de façon autosomique dominante. Il semblerait que selon la position de la mutation, on retrouvera plutôt des formes dites atténuées (AFAP) avec moins de polypes (entre 10 et 100), ou au contraire des formes profuses avec jusqu'à 4000 polypes (exemple de la mutation au codon 1309). Ces mutations germinales, combinées à des anomalies somatiques, entraînent le développement de CCR précocement à l'âge adulte et le risque de CCR est quasi de 100% pour les sujets non dépistés avant 50 ans (Half et al., 2009). D'autres types de FAP ont été décrites (Sampson et al., 2003) comme par exemple dans une sous population de patients qui présentent une mutation autosomique récessive dans le gène MUTYH codant pour une protéine du système BER (*Base excision repair*) de réparation de l'ADN. Bien que

cette mutation induit le développement d'une forme atténuée AFAP, le risque de développer un cancer est plus élevé que pour les FAP liées à la mutation d'APC.

b) Le syndrome de Lynch

Le syndrome de Lynch, appelé CCR héréditaire sans polypose ou HNPCC, se caractérise par un phénotype MIN et résulte donc de mutations germinales autosomiques dominantes des gènes du système de réparation MMR. Les gènes les plus ciblés étant les gènes MLH1, MSH2 et MSH6. Ce syndrome HNPCC se retrouve dans les CCR mais aussi dans des cancers de l'endomètre et de l'estomac et dans la plupart des cas, on retrouve une instabilité de microsatellites (Loukola et al., 2001). Des recommandations ont défini des critères tels que les critères d'Amsterdam (Vasen et al., 1991) et les critères de Bethesda (Rodriguez-Bigas et al., 1997) qui doivent être satisfaits pour diagnostiquer ce syndrome. Les critères d'Amsterdam révisés (Vasen et al., 1999) sont : (i) avoir au moins trois antécédents familiaux de CCR (et/ou d'un autre cancer associé à ce syndrome) dont l'un ayant un 1^{er} degré de parenté avec les 2 autres ; (ii) au moins un de ces trois CCR doit être survenu avant l'âge de 50 ans ; et (iii) au moins deux générations successives doivent être touchées.

3. Importance des altérations génomiques dans la progression tumorale

Pour les cancers coliques, l'évolution d'un adénome vers un carcinome est dirigée par une succession d'événements génétiques et épigénétiques. De nombreuses études ont confirmé l'hypothèse que la progression de l'adénome vers un carcinome, puis celle vers le développement de métastases, résultent de l'accumulation séquentielle d'altérations qui impliquent l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs.

De manière générale, il est admis que l'instabilité génomique est un événement précoce de la carcinogenèse colorectale et que le nombre des altérations génomiques (gain ou perte de chromosomes ou de fragments chromosomiques) augmente progressivement au fur et à mesure que la tumeur progresse à travers les différents stades (Fearon and Vogelstein, 1990; Ried et al., 1996; Hermsen et al., 2002; Grady, 2004). Parmi les anomalies génomiques observées, on trouve des mutations des gènes suppresseurs de tumeur APC et TP53 mais toutes les tumeurs ne portent pas ces mutations. D'autre part, une méta-analyse réalisée sur des données de CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) ne montre pas d'augmentation significative de la fréquence des altérations génomiques entre des tumeurs primaires et leurs métastases associées (Diep et al., 2006) alors que sur l'ensemble des 859 CCR de la méta-analyse, les auteurs observent une augmentation significative du nombre d'altérations génomiques entre les tumeurs primaires et des métastases non-associées. Au laboratoire, l'analyse par allélotypage d'une cohorte de 230 tumeurs primaires, tout stade confondu, montre que les tumeurs se clustérisent en trois groupes

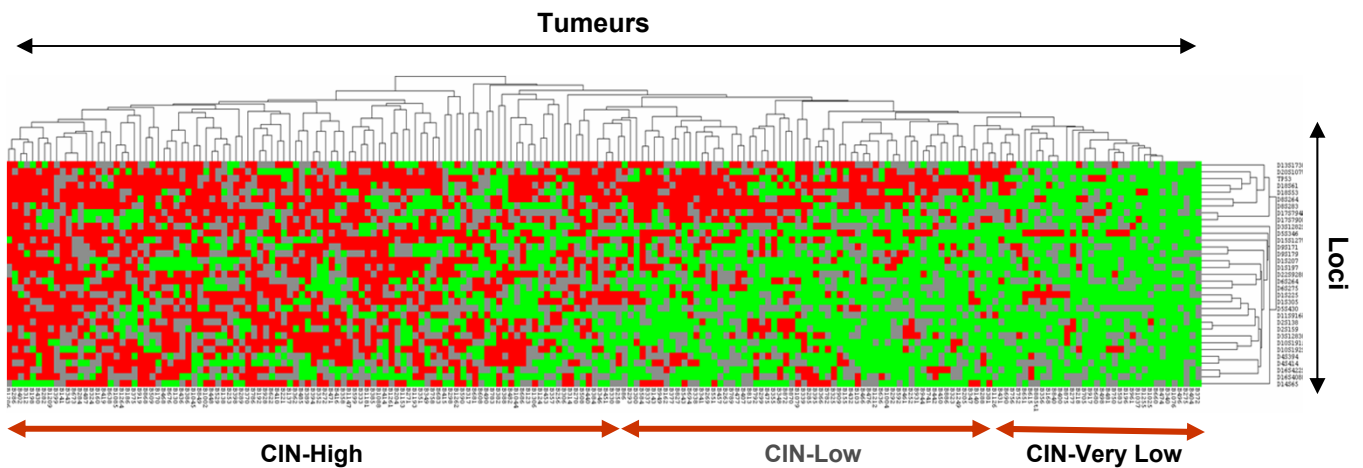


Figure 15: Classification des tumeurs coliques selon la fréquence en déséquilibres alléliques (d'après Weber et al., 2007). L'analyse par allélotypage de 33 loci (lignes) pour une cohorte élargie de 230 tumeurs primaires coliques (colonnes) a mis en évidence 3 sous-groupes CIN-High (CIN-H), CIN-Low (CIN-L) et CIN-Very Low (CIN-VL) en fonction d'une forte, une faible et une très faible fréquence de déséquilibres alléliques (carrés rouges), respectivement. Les carrés verts sont les loci non altérés et les carrés gris correspondent aux loci non informatifs.

en fonction de la fréquence d'altérations génomiques, forte (*CIN-High*), faible (*CIN-Low*) et très faible (*CIN-Very Low*) (Weber et al., 2007) (**Figure 15**) et de façon intéressante, il n'existe aucune corrélation entre l'accumulation d'altérations chromosomiques et la progression tumorale. En effet, des tumeurs de stade IV sont retrouvées dans le groupe *CIN-Very Low* à faible fréquence d'altérations, et à l'inverse, des tumeurs de stade précoce peuvent déjà être très altérées. De plus, des métastases hépatiques synchrones contiennent moins d'altérations que la tumeur primaire, suggérant que d'autres voies moléculaires de progression tumorale existent, en parallèle de la voie classiquement décrite par Fearon et Voegelstein al. (1990). Ces données ne réfutent donc pas le modèle d'accumulation séquentielle d'altérations génomiques au cours de la progression tumorale, mais suggèrent l'existence d'autres voies de carcinogenèse colique.

4. Les principales voies de signalisation impliquées dans le cancer

a) Voie Wnt/APC/ β -caténine

Voie canonique

La voie Wnt canonique fonctionne en régulant la quantité intracellulaire de la β -caténine. En effet, en l'absence du ligand Wnt (**Figure 16A**), la fraction cytoplasmique de la β -caténine est continuellement phosphorylée et dégradée par le complexe axine dans lequel sont associés plusieurs protéines dont l'axine, le gène suppresseur de tumeur APC, la GSK3 β (*glycogène synthase kinase 3 β*) et la caséine kinase 1 (CK1) (**Figure 17A**). La β -caténine se lie à ce complexe via l'axine et potentiellement via le domaine de répétition de 15 acides aminés (aa) d'APC, ce qui positionne son extrémité N-terminal en regard de la CK1 et de la GSK3 β (**Figure 17B**). Successivement, la β -caténine est phosphorylée par la CK1 sur la sérine (Ser) 45, puis par la GSK3 β sur la thréonine (Thr) 41, la Ser37 et la Ser33 (Kimelman and Xu, 2006). Ces phosphorylations induisent l'ubiquitination de la β -caténine, son interaction avec la β TRCP, une sous-unité de l'ubiquitine ligase E3, puis sa dégradation par le protéasome (**Figure 17C**).

A l'inverse, l'activation de la voie par le ligand Wnt détruit le complexe axine générant ainsi un pool stable de β -caténine cytosolique qui peut alors s'accumuler dans le noyau pour agir comme co-activateur de la transcription avec les facteurs de transcription TCF/LEF, de plusieurs gènes impliqués dans des fonctions favorisant la carcinogenèse (**Figure 16B**). Pour cela, la liaison du ligand Wnt avec son récepteur Frizzled (Fz) recrute le co-récepteur LRP5/6 (*low-density lipoprotein related receptor protein*) pour constituer le complexe d'activation Wnt/Fz/LRP5/6 de la voie. La protéine structurale Dishevelled (Dsh) est alors recrutée à la membrane, phosphoryle LRP5/6 et conduit au recrutement de l'axine puis à la libération de la β -caténine (Cliffe et al., 2003).

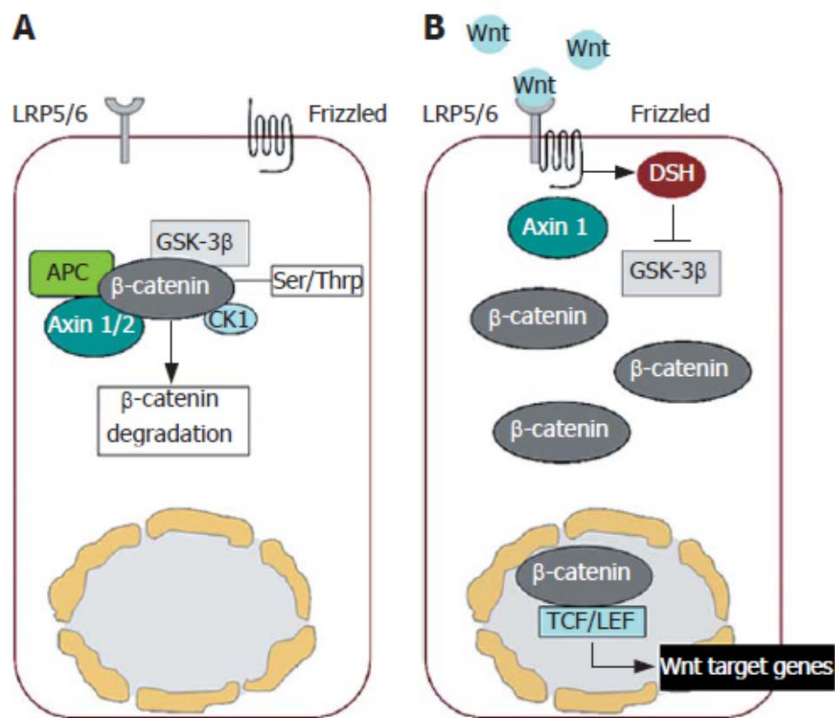


Figure 16: Voie Wnt/β-caténine. (A) En l'absence de ligand, la formation du complexe axine formé de l'axine, d'APC, et des kinases GSK3β et CK1 induit la dégradation de la β-caténine. (B) Suite à la fixation du ligand Wnt sur le récepteur Frizzled, le co-récepteur LRP5/6 est recruté et phosphorylé et inhibe le complexe axine, empêchant la dégradation de la β-caténine. L'accumulation cytoplasmique de la β-caténine permet sa translocation dans le noyau pour se complexer aux facteurs TCF/LEF et activer la transcription des gènes cibles.

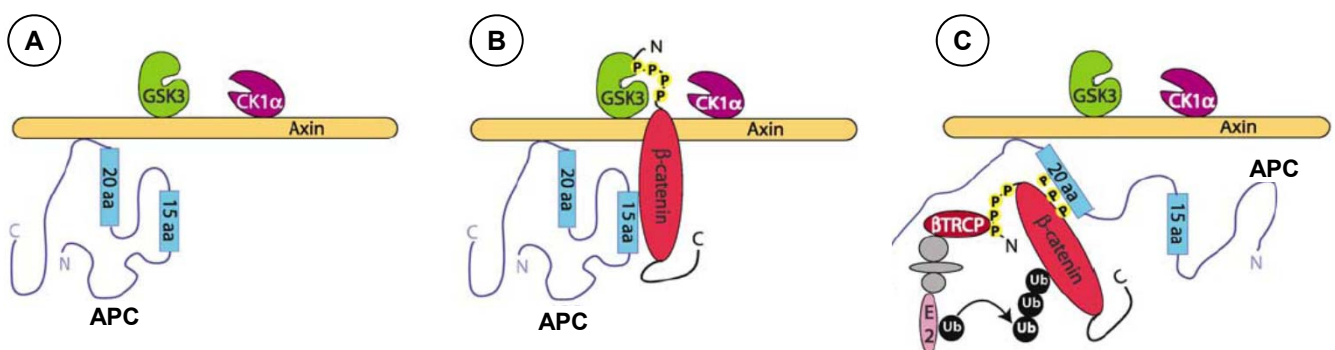


Figure 17: Complexe de dégradation de la β-caténine. (A) Le complexe axine contient l'axine, APC et les kinases GSK3β et CK1. (B) La β-caténine est incorporée dans le complexe en se liant à l'axine et au domaine de répétition de 15 acides aminés (aa) d'APC, et est phosphorylée par la CK1 puis par la GSK3β. (C) La sous-unité βTRCP de la E3 ubiquitine ligase est recrutée pour induire la dégradation de la β-caténine par le protéasome.

Mécanismes de régulation de la voie Wnt

L'état d'activation de la voie Wnt, via la fonctionnalité du complexe axine, peut être régulé par d'autres mécanismes que celui décrit ci-dessus. Les kinases GSK3 β et CK1 peuvent aussi phosphoryler l'axine (Yamamoto et al., 1999) et APC au niveau du domaine de répétition de 20 aas (Rubinfeld et al., 2001), ce qui augmente la stabilité du complexe de dégradation de la β -caténine. Par ailleurs, suite à l'activation de la voie Wnt, la phosphorylation de LRP5/6 peut aussi être assurée par les kinases GSK3 β et CK1 (Mao et al., 2001; Zeng et al., 2005). Ces kinases (GSK3 β et CK1) peuvent donc réguler à la fois positivement (phosphorylation de LRP5/6) et négativement (phosphorylation de la β -caténine) la même voie de signalisation. De la même manière, la protéine APC posséderait aussi des propriétés activatrices de la voie Wnt en inhibant l'axine via la partie N-terminale d'APC et donc indépendamment de sa liaison à la β -caténine (Takacs et al., 2008). Les phosphatases PP1 et PP2A déphosphorylent l'axine et la β -caténine, respectivement, inhibant directement la dégradation de la β -caténine (Luo et al., 2007; Su et al., 2008). Enfin, en cas de sur-expression de LRP5/6, ce récepteur est endocytosé par un processus dépendant de la cavéoline-1 et cette internalisation semble importante pour l'accumulation et la stabilisation de la β -caténine (Yamamoto et al., 2006). La voie Wnt peut aussi être régulée en amont par un mécanisme de rétrocontrôle négatif comme c'est le cas de la protéine sécrétée DKK1 (*Dickkopf 1*) qui inhibe la voie Wnt canonique en se liant au co-récepteur LRP5/6 (Bafico et al., 2001).

Voie non-canonique

La liaison de certains facteurs sécrétés au récepteur Fz va activer d'autres voies Wnt dites non-canoniques, indépendantes de la β -caténine et du co-récepteur LRP5/6. Les deux voies non-canoniques les plus décrites sont : la voie PCP (*Polar Cell Polarity*) activée principalement par les ligands Wnt11 et Wnt5 et la voie Wnt dépendante du calcium (Wnt/Ca²⁺) (Wallingford and Habas, 2005). Ces deux signalisations font intervenir un acteur commun à la voie canonique, la protéine Dsh, bien que les domaines protéiques impliqués ne soient pas les mêmes. Sous l'activation d'un signal Wnt ou d'un autre signal PCP, le recrutement et l'accumulation de plusieurs effecteurs à la membrane, dont Dsh, entraîne l'activation de la petite protéine G Rho ou Rac et aboutit à la réorganisation de l'actine. L'activation de la voie Wnt/Ca²⁺ quant à elle élève la concentration intracellulaire de calcium et par l'intermédiaire de la protéine kinase C (PKC), la petite protéine G cdc42 induit l'organisation des microtubules et promeut la polarité et la migration cellulaire (Schlessinger et al., 2007). Ainsi, il a été montré que Dsh est responsable de la stabilité des lamellipodes (Wiggin and Hamel, 2002) et joue un rôle essentiel dans la polarité et la migration directionnelle (Wallingford et al., 2000; Endo et al., 2005).

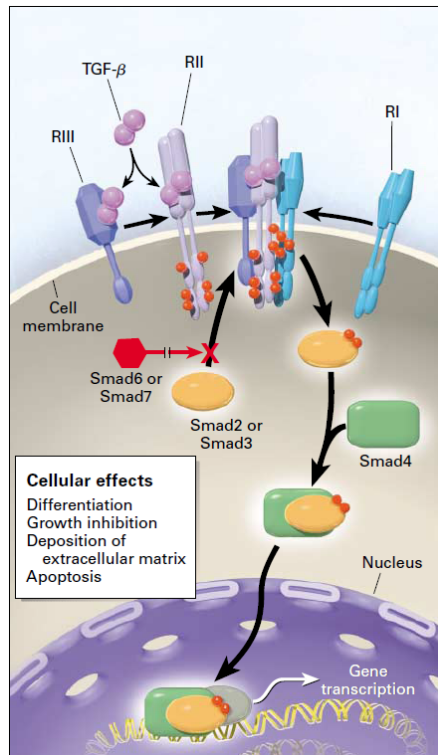


Figure 18: La voie du TGF- β . La cytokine TGF- β se lie directement au récepteur de type II (TGBR2), ou via le récepteur de type III (TGFBR3) et induit le recrutement et la phosphorylation du récepteur de type I (TGFBR1). La fonction kinase de TGFBR1 est alors active et phosphoryle l'effecteur SMAD2 (ou SMAD3) qui se lie à SMAD4. La translocation nucléaire du complexe SMAD2/3-4 conduit à la transcription des gènes cibles de la voie du TGF- β impliqués dans la différenciation, l'inhibition de la prolifération, la sécrétion de protéines de la matrice extra-cellulaire, et l'apoptose. Les effecteurs SMAD6/7 sont des régulateurs négatifs de la voie du TGF- β

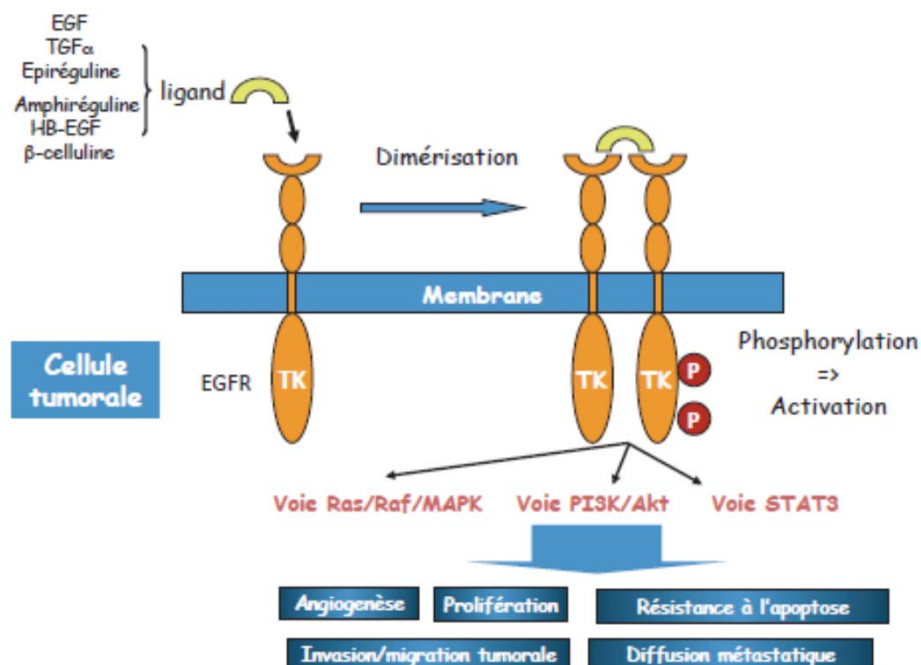


Figure 19: Activation du récepteur à l'EGF (EGFR) et des voies de signalisation intracellulaires. Lorsqu'un ligand comme l'EGF ou le TGF- β se fixe à l'EGFR, il induit sa dimérisation et la phosphorylation activatrice des résidus tyrosine. Les voies Ras/MAPK, PI3K/Akt et STAT3 alors enclenchées régulent divers processus dont l'angiogenèse, la prolifération, la résistance à l'apoptose, la migration et la dissémination métastatique.

Dérégulation de la voie Wnt dans les cancers

L'association entre la dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine et le cancer a été bien décrite, et particulièrement dans le CCR (Polakis, 2007). Généralement, une mutation du gène APC qui génère une protéine tronquée non fonctionnelle, ou la mutation du gène codant la β -caténine, conduit à l'absence de dégradation et donc à l'activation constitutive de la β -caténine et de la voie Wnt. L'activation aberrante des gènes cibles de cette voie (la liste est consultable à l'adresse : http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes) qui en résulte induit une prolifération excessive, notamment des cellules souches cancéreuses intestinales (Fuchs, 2009). La dérégulation de la voie Wnt dans le CCR est aussi associée à la TEM, à l'invasion tumorale et au développement de métastases (Huang and Du, 2008) et enfin, l'expression de la β -caténine est retrouvée dans le noyau des cellules au front d'invasion (Brabletz et al., 1998).

b) Voie du TGF (*Transforming Growth Factor*)- β

La super-famille des facteurs de croissance TGF- β régule de nombreux processus biologiques tels que le développement embryonnaire, la prolifération, la différenciation, la réparation tissulaire et l'angiogenèse. Le TGF- β peut interagir directement avec le récepteur de type II TGFBR2 à activité Ser/Thr kinase constitutive, ou via le TGFBR3 et induit le recrutement du TGFBR1 (**Figure 18**). La phosphorylation du TGFBR1 induit le recrutement et la phosphorylation des effecteurs R-SMAD (*Receptor-activated SMAD*): SMAD2 ou SMAD3. D'autres R-SMAD (SMAD1/5/8) sont recrutés après ligation des BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), appartenant aussi à la super-famille du TGF- β (Zwijnen et al., 2003). Les R-SMAD phosphorylés se lient au Co-SMAD (*Common-partner SMAD*), SMAD4 ou autre SMAD selon le ligand, et la translocation du complexe R-SMAD/Co-SMAD dans le noyau permet sa liaison avec d'autres facteurs activateurs ou répresseur de la transcription, dépendants du type cellulaire.

Dans une cellule normale le TGF- β induit un arrêt du cycle cellulaire en activant la transcription d'inhibiteurs de cdk (*cyclin-dependent kinase*), diminuant la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRB) et inhibant les facteurs pro-prolifératifs comme les E2Fs (Ravitz and Wenner, 1997). Le TGF- β est donc considéré comme un gène suppresseur de tumeur. Dans 83% des tumeurs du côlon CIN et MIN, au moins un élément de la voie du TGF- β est muté avec comme conséquence l'inactivation de la voie et l'installation d'une résistance des cellules tumorales au TGF- β (Grady et al., 1999). En retour, les cellules tumorales surproduisent et sécrètent le TGF- β qui agit sur le micro-environnement tumoral, notamment en stimulant la production de protéines de la matrice extra-cellulaire (MEC) par les fibroblastes, en induisant l'angiogenèse et en altérant l'adhérence des cellules stromales avec la MEC, ce qui augmente le potentiel invasif et métastatique (Siegel et Massague, 2003). De plus, le TGF- β est le premier inducteur de la TEM (Zavadil and Böttinger, 2005).

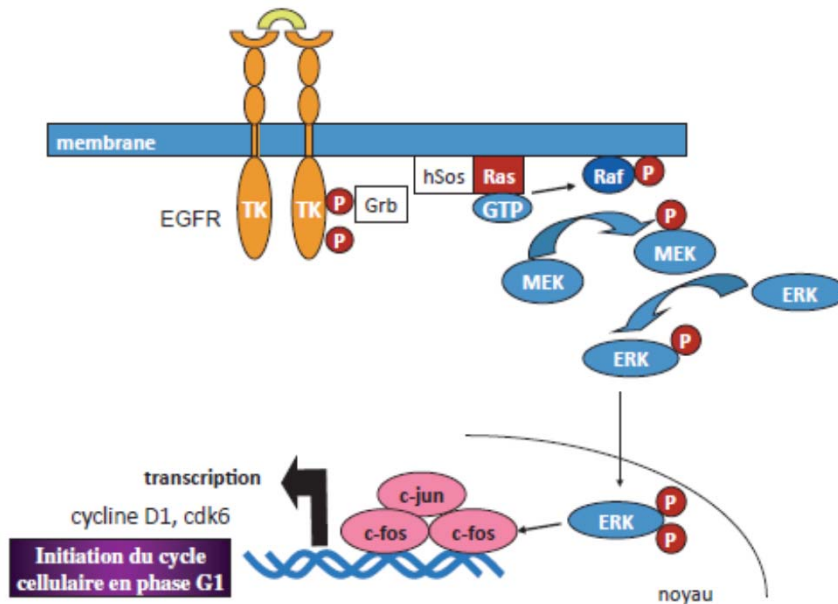


Figure 20: Voie Ras/MAPK. L'activation de la voie Ras/MAPK par l'intermédiaire du récepteur à l'EGFR induit l'activation du complexe Grb (*Growth Factor Binding protein*)/hSos pour la conversion de Ras-GDP en sa forme active Ras-GTP. La cascade de signalisation induit la phosphorylation de Raf puis de MEK et enfin la double phosphorylation de ERK qui entraîne sa translocation dans le noyau, et la transcription de gènes précoces pour l'initiation du cycle cellulaire.

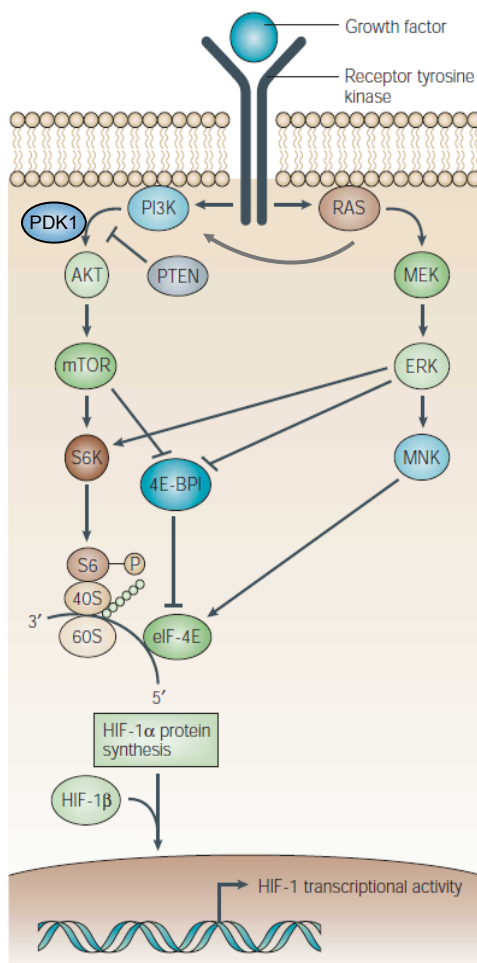


Figure 21: Voie PI3K/Akt/mTor. L'activation des récepteurs à activité tyrosine-kinase (RTK) active la kinase PI3K directement ou indirectement via Ras. PI3K activée convertit PIP2 en PIP3, réaction réversible par PTEN. PIP3 active Akt, directement ou indirectement via PDK1, qui active la voie mTOR. Akt active le complexe Raptor-mTOR (mTORC1) qui mène à la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 par la kinase S6K ou à l'activation de eIF4E via l'inhibition de 4E-BP1 pour stimuler la synthèse protéique. Entre autres, une des cibles de mTOR est le facteur de transcription HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 α) qui s'associe à HIF1 β pour activer la transcription de gènes cibles impliqués dans l'angiogenèse. La voie Ras/MAPK est aussi connectée à cette signalisation par les effecteurs ERK et MNK.

c) Voie Ras/MAPK

Les voies Ras/MAPK et PI3K/Akt sont principalement régulées par des récepteurs qui appartiennent à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), comme le récepteur à l'EGF (EGFR), à l'insuline (IGFR) ou au VEGF (VEGFR) (**Figure 19**). Avec d'autres facteurs de croissance, l'EGF et le TGF- α sont les principaux ligands de l'EGFR. Leur fixation induit l'homodimérisation de deux récepteurs EGFR (ou l'hétéro-dimérisation d'un EGFR avec un autre RTK, comme HER2), et conduit à la phosphorylation de résidus tyrosine dans le domaine intra-cellulaire du récepteur. La transduction du signal se fait par le recrutement de protéines à domaine SH2, pour activer les effecteurs des voies Ras/MAPK et PI3K/Akt.

L'activation de la voie des MAPK, ou ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) déclenchée par l'intermédiaire des RTK induit la conversion de la forme inactive Ras-GDP en forme active Ras-GTP par le complexe comprenant Grb2 (*Growth Factor Binding protein 2*) et hSos, un GEFs (*Guanine Exchange Factors*). Ras-GTP induit une cascade de phosphorylations activatrices de protéines kinases cytoplasmiques dont Raf, puis MEK (MAPK-ERK kinase), et enfin, la double phosphorylation de ERK entraînant sa translocation dans le noyau pour activer la transcription des gènes cibles (**Figure 20**). Ces gènes cibles, dits « gènes précoces », comme c-myc, c-jun et c-fos vont à leur tour activer la transcription d'un large panel de gènes impliqués particulièrement dans la prolifération et la survie comme la cycline D1 et cdk6 qui induisent l'entrée dans le cycle cellulaire.

d) Voie PI3K/Akt/mTOR

L'activation de la voie PI3K/Akt par l'insuline ou l'EGF conduit à la conversion du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) en phosphatidyl-inositol,3,4,5 triphosphate (PIP3) par la kinase PI3K hétérodimérique (sous-unités p85 et p110) (**Figure 21**). PTEN est l'enzyme qui assure la réaction inverse, pour convertir PIP3 en PIP2. L'activation de PI3K peut se faire directement via la sous-unité p85 ou indirectement via l'activation de Ras. PIP3 sert de ligand pour recruter Akt, aussi appelé PKB (*Protein Kinase B*), à la membrane et induire sa phosphorylation/activation par PDK1 (*Ser/Thr kinase PIP3-dependent kinase 1*). Akt est elle-même une Ser/Thr kinase qui va promouvoir des processus cellulaires clés tels que la prolifération, la survie, l'angiogenèse, la migration/invasion et le métabolisme du glucose (Manning and Cantley, 2007) en phosphorylant diverses protéines intra-cellulaires.

Une des cibles de l'activation de cette voie est mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) qui se trouve dans un complexe raptor-mTOR (mTORC1). Une fois activé par Akt, mTOR favorise la synthèse protéique via la kinase S6 (S6K) et son substrat (la protéine ribosomale S6), ou en inhibant le facteur d'initiation de la traduction 4E-BP1 (*eucaryotic initiation factor 4E-Binding Protein1*), activant le facteur d'initiation eIF4E. A côté du complexe mTORC1 qui est sensible à la

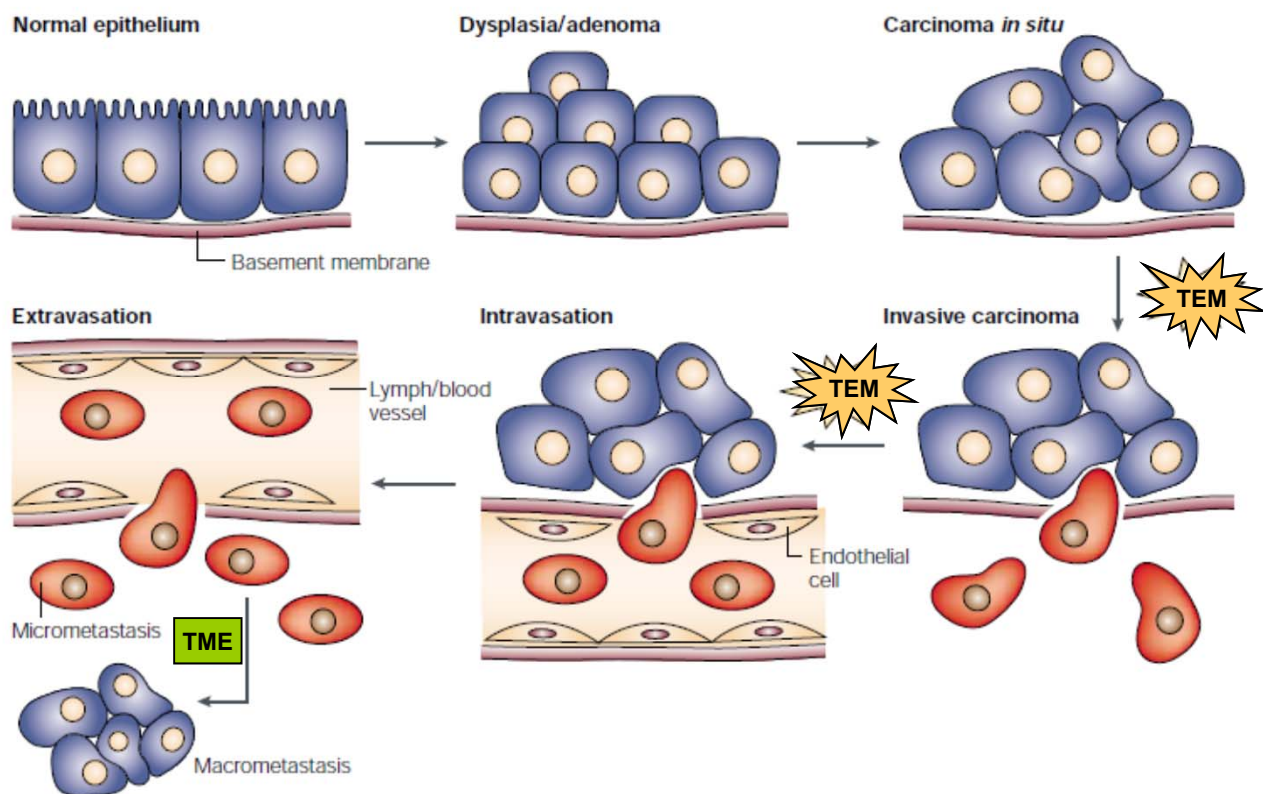


Figure 22: Etapes de la progression tumorale et de la dissémination métastatique. Dans l'épithélium normal, les cellules épithéliales sont organisées en une mono-couche de cellules polarisées qui reposent sur une membrane basale (MB). Les adénomes sont caractérisés par une prolifération aberrante des cellules épithéliales qui, au cours de la progression, vont perdre leur polarité pour devenir un carcinome *in situ*. Puis, elles subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) pour acquérir des caractéristiques de cellules invasives. Ces cellules entraînent la rupture de la MB pour accéder au stroma et les vaisseaux lymphatiques/sanguins par un phénomène d'intravasation (rupture de la lame basale vasculaire et passage au travers de cellules endothéliales). Enfin, les cellules sortent des vaisseaux par extravasation et atteignent les organes cibles pour développer des micrométastases ou des macrométastases suite à une transition mésenchymateuse-épithéliale (TME).

rapamycine (un inhibiteur de mTOR), on connaît le complexe rictor-mTOR (mTORC2) insensible à la rapamycine et qui joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette (Jacinto et al., 2004). Lorsque mTORC2 est activé par un RTK, il induit la phosphorylation de Akt, mécanisme qui pourrait intervenir dans la spécificité des substrats d'Akt (Jacinto et al., 2006). Des mécanismes de rétrocontrôle négatif permettent de réguler cette voie de signalisation : dans le cas d'une réponse à l'insuline, IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate-1*) peut être phosphorylé par mTORC1 et S6K, inhibant l'activation de PI3K (Veilleux et al., 2010). Une cible transcriptionnelle de la voie mTOR est le gène codant pour le facteur HIF1 α (*Hypoxia Inducible Factor 1 α*) qui joue un rôle clé dans l'angiogénèse induite par l'hypoxie intra-tumorale et constitue par conséquent une cible thérapeutique dans le cancer (Giaccia et al., 2004). La voie Ras/MAPK est aussi capable d'activer la protéine S6 et eIF4E.

La voie PI3K/Akt est souvent altérée dans les tumeurs humaines et résultent de mutations activatrices de PI3K comme dans 30% des tumeurs coliques (Samuels and Velculescu, 2004), ou de la perte de PTEN dans 20% des CCR de phénotype MIN (Goel et Arnold, 2004). L'activation aberrante de la voie PI3K/Akt favorise la croissance tumorale, l'angiogénèse et la dissémination métastatique (Jiang and Liu, 2009) et confère une résistance aux thérapies ciblant l'EGFR (Jhawer et al., 2008).

IV. La progression tumorale

1. Etapes principales de la progression tumorale

La formation d'une tumeur à partir d'un épithélium sain ainsi que la dissémination métastatique se déroulent par étapes successives. En premier lieu, les cellules épithéliales subissent des altérations de gènes, comme la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeur et le gain de fonction d'oncogènes, et aboutit à une prolifération cellulaire incontrôlée mais locale pour développer un adénome (**Figure 22**). Le processus de transformation maligne implique la désorganisation de l'architecture tissulaire due à une perte de polarité des cellules et aboutit à l'établissement de la tumeur primaire *in situ*, confinée à la couche épithéliale. Cette tumeur *in situ* acquiert d'autres altérations génétiques et épigénétiques pour disséminer localement. Cette invasion locale fait intervenir des processus cellulaires comme la perte de la cohésion tissulaire par la réorganisation des complexes jonctionnels, la modification des propriétés migratoires par la réorganisation du cytosquelette et la modification de l'activité protéolytique par l'augmentation de l'expression de protéases comme les métalloprotéases matricielles (MMPs) pour rompre la lame basale (LB). Ces modifications déterminent un processus plus général de dé-différenciation induisant la perte des caractéristiques épithéliales au profit de caractéristiques de cellules mésenchymateuses, la TEM (Thiery, 2002). Les cellules tumorales migrent vers et envahissent le tissu conjonctif en tant que cellules individuelles ou collectivement. Ces cellules forment un front

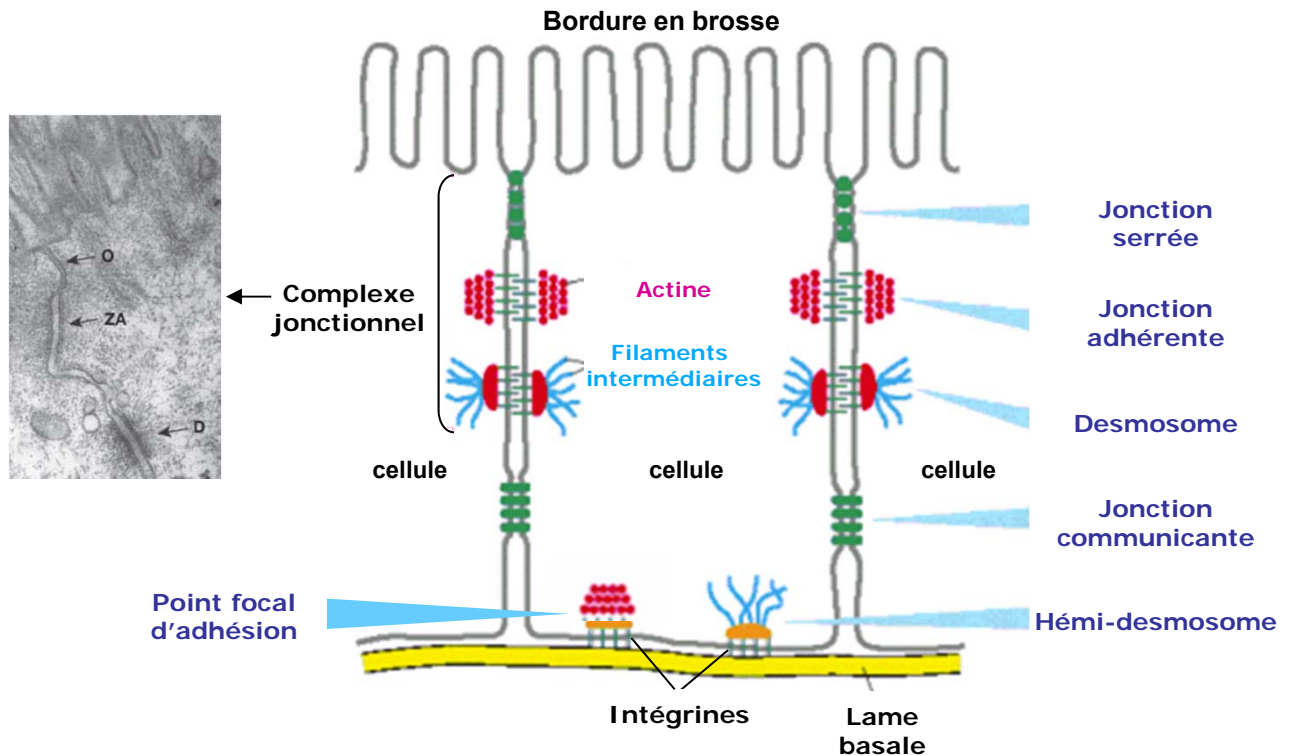


Figure 23: Jonctions cellule-cellule et cellule-matrice. Représentation schématique et image de microscopie électronique du complexe jonctionnel en position apicale, comprenant les jonctions serrées (O) et adhérentes (ZA) reliées au réseau d'actine, et les desmosomes (D) reliés aux filaments intermédiaires. Les cellules épithéliales présentent aussi des jonctions communicantes et leur interaction avec la lame basale se fait via les héli-desmosomes et les points focaux d'adhésion qui sont connectés aux filaments intermédiaires et à l'actine, respectivement, par des récepteurs membranaires comme les intégrines.

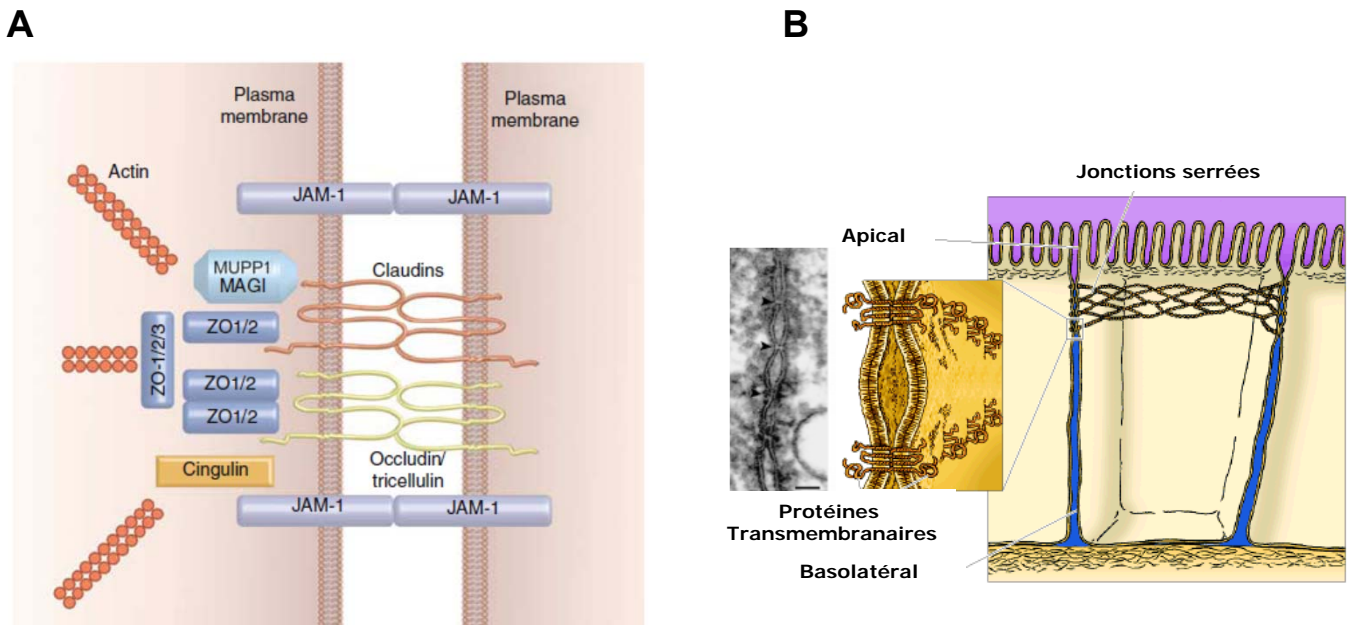


Figure 24: Jonctions serrées (ou zonula occludens). (A) Les jonctions serrées sont composées des protéines transmembranaires JAM1, claudines et occludines, reliées aux filaments d'actine par l'intermédiaire des protéines cytoplasmiques ZO-1, ZO-2, cinguline ou MUPP1/MAG1. (B) Les jonctions serrées forment une ceinture circonférentielle en position apicale, organisée en fibrilles anastomosées constituées de contacts focaux comme indiqué par des flèches (▶) sur l'image de microscopie électronique.

d'invasion et peuvent accéder aux vaisseaux lymphatiques et/ou sanguins par un phénomène appelé intravasation (rupture de la LB des vaisseaux et passage entre les cellules endothéliales) permettant leur transport à distance du site tumoral primaire. Ces cellules vont pouvoir atteindre des organes par extravasation, dégrader le stroma du tissu hôte pour rester à l'état de dormance ou développer des métastases en proliférant dans le tissu métastatique, en redéveloppant des caractéristiques de cellules épithéliales comme des propriétés d'adhésion inter-cellulaire et cellule-matrice, et en induisant l'angiogenèse.

2. Maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal

L'épithélium de revêtement intestinal est un épithélium simple prismatique composé d'une couche unique de cellules hautes polarisées, comme les entérocytes, qui présentent un plateau strié de microvillosités (bordure en brosse) au pôle apical pour l'absorption des nutriments, un cytoplasme riche en réticulum endoplasmique pour le métabolisme des lipides et un noyau au pôle basal. Cet épithélium, mécaniquement maintenu par différents types de contacts cellule-cellule, sert de barrière physique entre la lumière du tube digestif (pôle apical) et la muqueuse sous-jacente (pôle basal), pour contrôler la diffusion de solutés d'un pôle à un autre à travers l'espace inter-cellulaire.

En position apicale, on retrouve le complexe jonctionnel tripartite composé (i) des jonctions serrées (ou *zonula occludens*) qui contrôlent le transport paracellulaire de petits solutés ; (ii) des jonctions adhérentes (ou *zonula adherens*) qui forment une barrière mécanique, toutes deux liées au cytosquelette d'actine qui forme un anneau circonférentiel ; et (iii) des desmosomes qui constituent des points d'attachement pour les filaments intermédiaires (FI) (**Figure 23**). Les cellules épithéliales ont également des jonctions communicantes qui constituent des pores pour le passage de molécules de moins de 9 kDalton (kDa).

L'interaction des cellules avec la MEC est assurée par les héli-desmosomes, reliés aux FI, et par les points focaux d'adhésion reliés à l'actine. Les intégrines font le lien entre la cellule (FI ou actine) et les éléments de l'espace extra-cellulaire que sont les protéines de la LB ou de la MEC et les cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales ou cellules immunitaires).

a) Jonctions serrées

Les jonctions serrées sont les contacts les plus apicaux des cellules épithéliales et les plus occlusives avec un espace inter-cellulaire presque fermé, variant de 4-40 Ångström (Å) en fonction du tissu (Diamond, 1978). Ces jonctions sont composées de protéines transmembranaires, les claudines, les occludines et les JAMs (*Junctional Adhesion Molecules*) (**Figure 24**), qui sont reliées aux filaments d'actine par les protéines intra-cellulaires ZO-1, ZO-2 ou cinguline. Les claudines et occludines ont 4 domaines transmembranaires et deux boucles extra-cellulaires alors

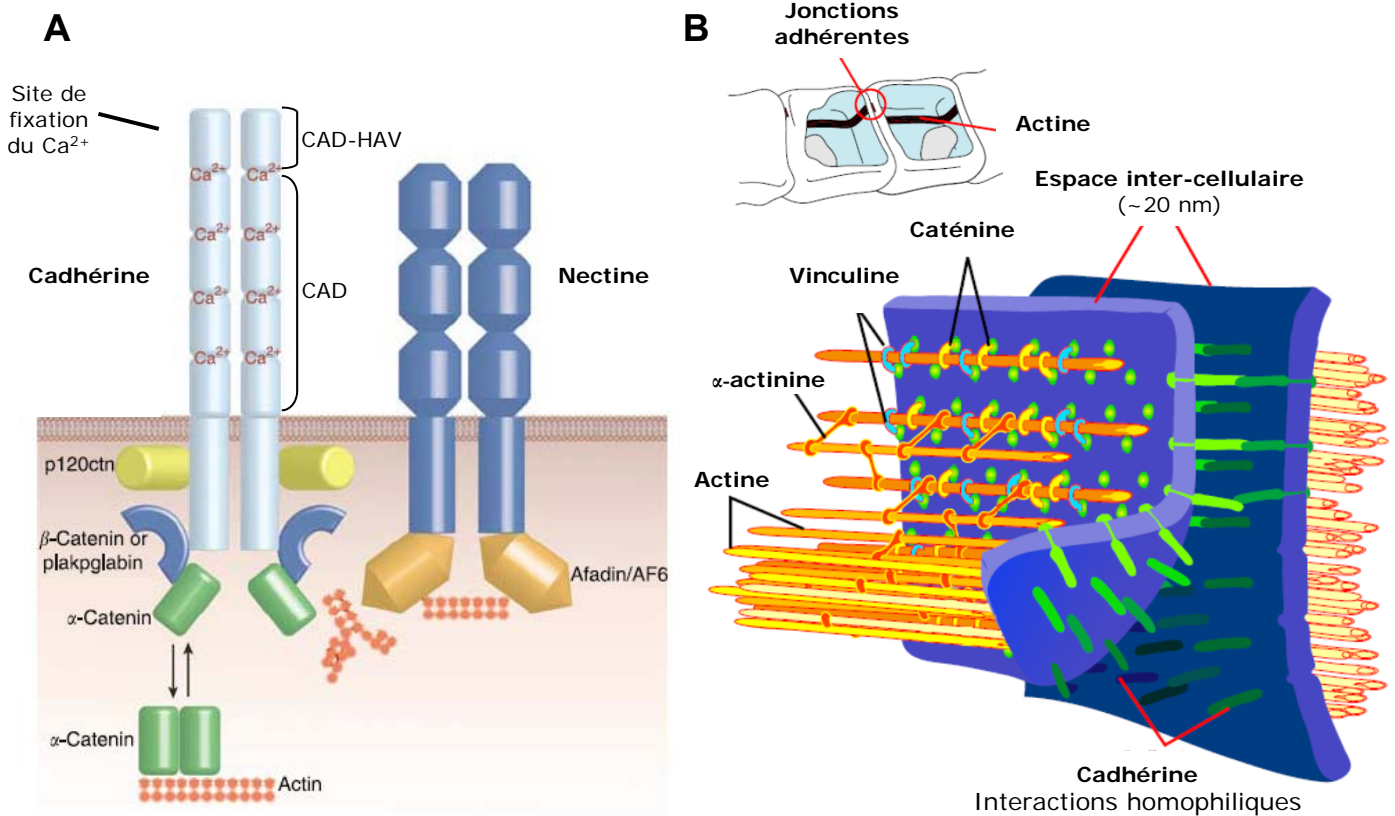


Figure 25: Jonctions adhérentes (ou *zonula adherens*). (A) Les jonctions sont constituées de cadhérines qui sont des protéines transmembranaires formant des interactions homophiliques calcium-dépendantes par les domaines CAD-HAV. Leur domaine extra-cellulaire est formé de 5 répétitions cadhérine (CAD) liées ensemble par le calcium, et d'un domaine CAD-Histidine-Alanine-Valine (CAD-HAV). Le domaine intra-cellulaire est relié aux filaments d'actine via les protéines p120caténine, β -caténine ou plakoglobine (ou γ -caténine) et α -caténine. Les jonctions adhérentes sont aussi représentées par le complexe nectine-AF6/afadine où la nectine comporte un domaine transmembranaire et 3 domaines extra-cellulaires de types immunoglobuline. Son domaine intra-cellulaire interagit avec l'afadine liant l'actine. (B) Les jonctions adhérentes forment un faisceau d'actine tout autour de la cellule épithéliale et forment un espace inter-cellulaire d'environ 20 nm.

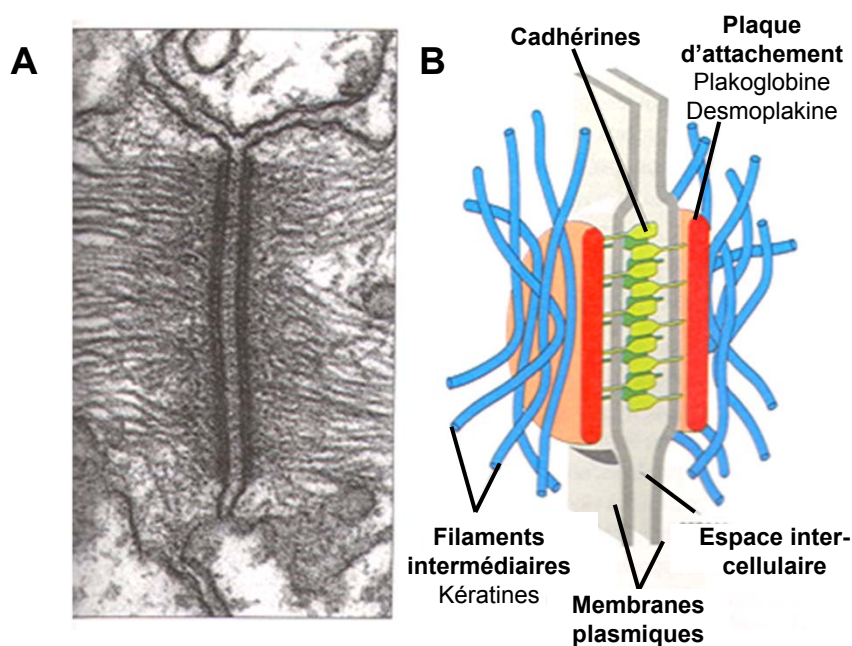


Figure 26: Les desmosomes. Image de microscopie électronique (A) et représentation schématique (B) d'un desmosome. Les desmosomes sont constitués de cadhérines reliées aux filaments intermédiaires par l'intermédiaire de la plaque d'attachement composée de protéines adaptatrices comme la plakoglobine et la desmoplakine.

que les JAMs ont un seul domaine transmembranaire et leur partie extra-cellulaire comporte 2 domaines de type immunoglobuline. Les jonctions serrées forment des fibrilles anastomosées tout autour de la cellule, formant ainsi une ceinture circonférentielle d'actine. Ces jonctions contrôlent activement le transport para-cellulaire selon la taille et la charge ionique des solutés, mais participent aussi à la polarisation des cellules en fonctionnant comme un obstacle pour la diffusion des protéines de la membrane plasmique et générant deux compartiments distincts entre les pôles apical et baso-latéral (Gumbiner, 1993).

La famille des claudines comprend 24 membres dont l'expression est organo- et tissu-spécifique (Tsukita et al., 2001). Selon les organes ou tissus, l'épithélium ne présente pas les mêmes propriétés de barrière puisque chacun exprime son propre panel de claudines au niveau des jonctions serrées. En effet, le charge et la taille des boucles extra-cellulaires des claudines sont spécifiques pour chaque type de claudines, et définissent la sélectivité des ions pour le passage para-cellulaire (Furuse and Tsukita, 2006). Il a été montré que la complexité/maturité des jonctions serrées, relative au nombre de fibrilles jonctionnelles, détermine la perméabilité électrique passive (Claude and Goodenough, 1973). Une méthode couramment utilisée pour évaluer la perméabilité d'un épithélium est de mesurer la résistance jonctionnelle trans-épithéliale (TER) (Claude, 1978).

b) Jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont positionnées juste sous les jonctions serrées et sont formées par deux types d'unités: le complexe classique cadhérine-caténine, et le complexe nectine-afadine, qui sont tous deux reliés au cytosquelette d'actine (**Figure 25**). Les membranes de deux cellules sont strictement alignées aux jonctions adhérentes avec un espace inter-cellulaire large d'environ 200 Å (Niessen, 2007).

Les cadhérines forment des interactions homophiliques calcium-dépendantes *cis* (au sein d'une même cellule) et *trans* (entre deux cellules adjacentes) via leur domaine CAD-HAV (Histidine-Alanine-Valine) à l'extrémité de leur domaine extra-cellulaire. Leur domaine intra-cellulaire est relié à la p120-caténine (p120^{ctn}) et à la β -caténine qui lie à son tour l' α -caténine. L' α -caténine interagit directement avec les filaments d'actine, ou indirectement via d'autres protéines liant l'actine comme la vinculine ou l' α -actinine. S'il est clairement établi que les cadhérines se lient entre elles par des interactions homophiliques, certaines études récentes suggèrent qu'elles peuvent aussi former des hétérodimères (Niessen and Gumbiner, 2002; Duguay et al., 2003). De plus, la *trans* interaction entre deux cadhérines serait plutôt déterminée par le niveau d'expression des cadhérine plutôt que par leur nature.

La nectine est un récepteur formé par 3 domaines de type immunoglobuline initialement identifié comme un partenaire de fusion du gène ALL-1 dans les leucémies myéloïdes aigues (Prasad et al., 1993). Dans les jonctions adhérentes, les nectines forment des *cis* homodimères

indépendants du Ca^{2+} mais les *trans*-interactions peuvent être homo- ou hétéro-philiques. Les dimères de nectines sont associés par leur domaine intra-cellulaire à la protéine afadine/AF-6 qui lie directement le réseau d'actine. Le complexe nectine-afadine semble jouer un rôle dans l'assemblage des cadhérines et donc dans la formation des jonctions adhérentes cadhérine-caténine (Martinez-Rico et al., 2005; Sato et al., 2006), mais aussi dans la formation des jonctions serrées puisqu'il induit le recrutement des JAMs, claudines et occludines en position apical des jonctions adhérentes (Takai and Nakanishi, 2003). Une autre fonction importante du complexe nectine-afadine est d'activer les GTPases Rac et cdc42 (Kawakatsu et al., 2005) qui gouvernent la formation des lamellipodes et des filopodes, respectivement (Nobes and Hall, 1995).

c) Les desmosomes

Les desmosomes sont constitués d'une plaque d'attachement cytoplasmique qui fait le lien entre les cadhérines transmembranaires (comme la desmogléine, desmocoline et E-cadhérine) et les filaments intermédiaires telles que les cytokératines (**Figure 26**). Ces jonctions étant généralement considérées comme des structures hautement stables, elles sont aussi soumises à une dynamique d'assemblage et de désassemblage impliquée dans la migration des cellules tumorales (Roberts et al., 2011). Plus particulièrement, durant la TEM, les desmosomes sont initialement dissociés par la protéine Slug induite par des facteurs de croissance (Savagner et al., 1997).

3. Jonctions inter-cellulaires et progression tumorale

a) Altération des jonctions cellule-cellule dans les cancers

De manière générale, lorsqu'une cellule tumorale acquiert un phénotype invasif, les protéines de jonctions adhérentes et serrées sont progressivement redistribuées et leur expression est dérégulée (Grünert et al., 2003).

Dans les tumeurs humaines, les claudines sont dérégulées dans plusieurs types tumoraux (Morin, 2005) à la fois au niveau de leur expression et de leur localisation sub-cellulaire. Dans le côlon, la claudine-1 a son expression augmentée, et sa localisation passe de la membrane dans le tissu normal au cytoplasme et au noyau dans les cellules tumorales et ces modifications sont associées à la progression tumorale (Dhawan et al., 2005). L'expression élevée et la perte de localisation membranaire de la claudine-1 sont associés au front d'invasion et à un mauvais pronostic (Resnick et al., 2004; Matsuoka et al., 2011). De la même manière, les protéines des jonctions adhérentes comme la E-cadhérine et la β -caténine ne sont plus exprimées à la membrane des cellules tumorales et sont internalisées, dans le cytoplasme et/ou dans le noyau (Matsuoka et al., 2011). Selon les études, les mécanismes responsables de l'internalisation des

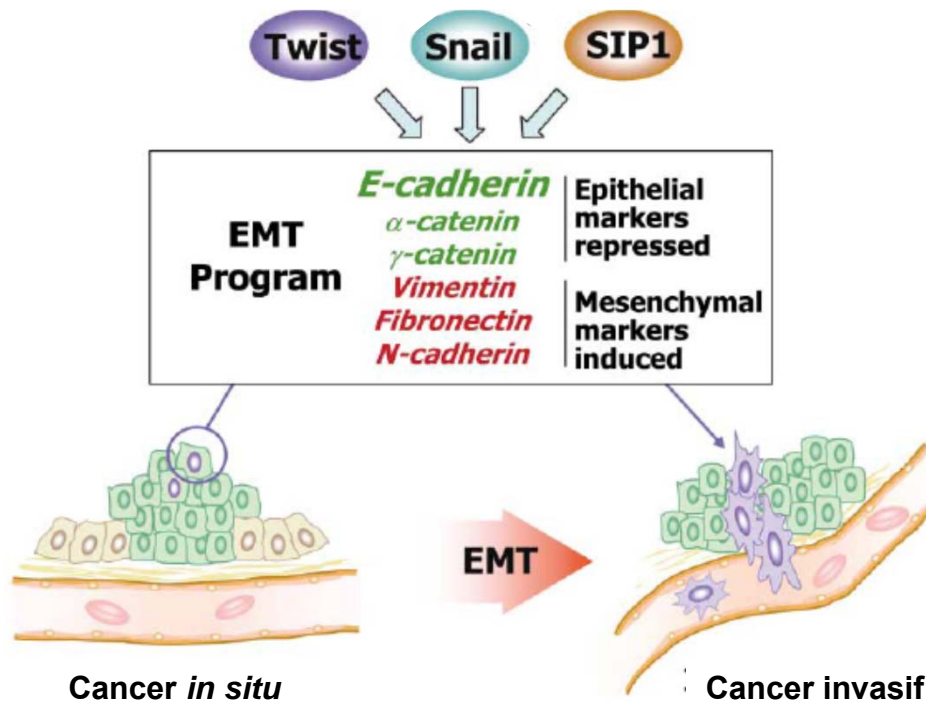


Figure 27: La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Le programme TME active la transcription des facteurs de transcription comme Twist, Snail et SIP1 (ZEB-1) qui répriment l'expression marqueurs épithéiaux comme la E-cadhérine et les α - et γ -caténines et activent l'expression de la vimentine, la fibronectine et la N-cadhérine. Cette transition est associée à l'étape de transition du cancer *in situ* à un cancer invasif.

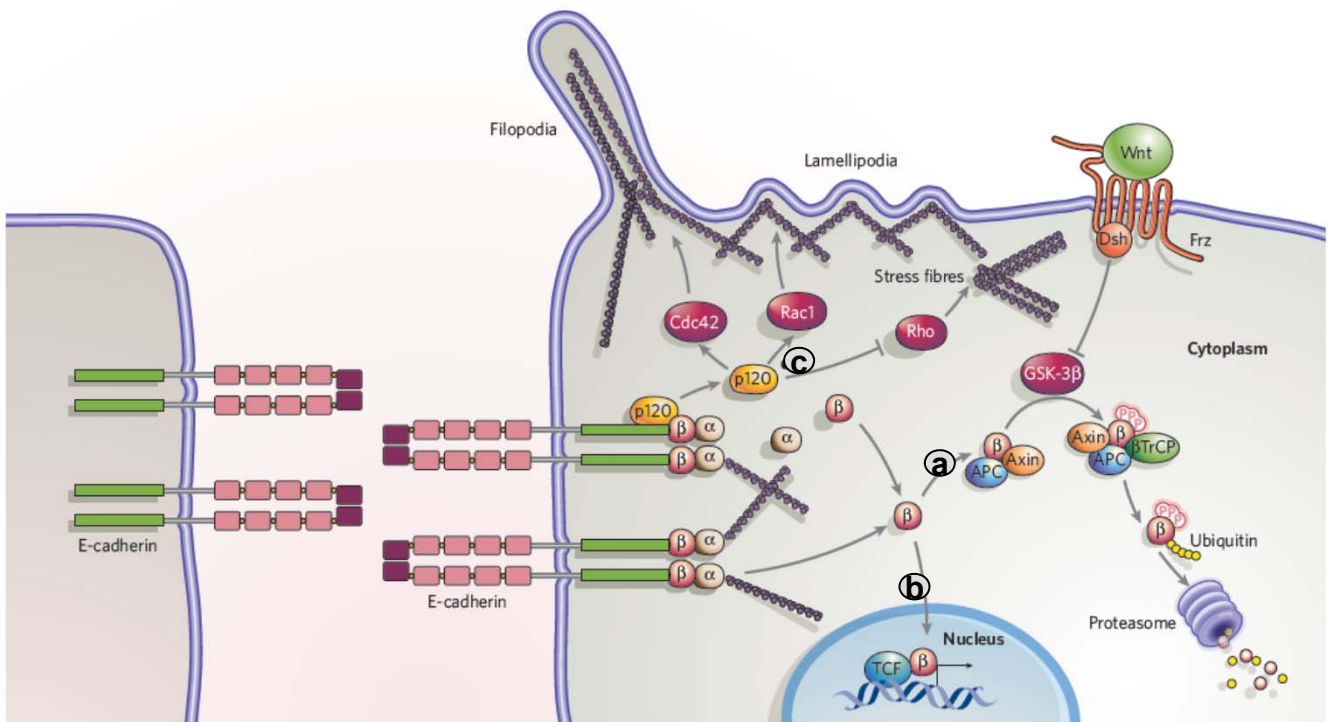


Figure 28: Relations entre les jonctions adhérentes, la voie Wnt et le remodelage du cytosquelette. (a) La β -caténine cytoplasmique est prise en charge par le complexe de dégradation par le protéasome. (b) Lorsque la voie Wnt est activée, cette dégradation est inhibée et la β -caténine est stabilisée. Sa translocation dans le noyau permet l'activation de la transcription des gènes cibles de la β -caténine. (c) Lorsque les jonctions adhérentes sont dissociées, la p120 caténine est libérée et active les GTPases cdc42 et Rac1 pour induire la formation de filopodes et lamellipodes, structures associées à la migration cellulaire, et la protéine Rho dans la formation des fibres de stress est inactivée.

protéines de jonctions adhérentes et serrées font intervenir une endocytose dépendante de la clathrine (Ivanov et al., 2004) ou de la cavéoline-1 (Nusrat et al., 2000; Hopkins et al., 2003; Shen and Turner, 2005).

b) Programme TEM

La conséquence de l'internalisation et dérégulation des protéines de jonctions est la dissociation de ces complexes jonctionnels induisant l'individualisation des cellules, qui, en coopération avec le programme de TEM, acquièrent les propriétés de migration nécessaire pour progresser dans le stroma tumoral (Christofori, 2006). La TEM peut être déclenchée par une stimulation extra-cellulaire comme les protéines de MEC (collagène, acide hyaluronique), des facteurs de croissance dont le TGF- β , le HGF, le FGF et l'EGF activant des RTK, mais aussi par la signalisation Wnt et l'activation des intégrines (Thiery and Sleeman, 2006). Ce programme est caractérisé par un réseau moléculaire complexe de multiples voies de signalisation interconnectées et aboutissant à l'induction de facteurs clés, comme le facteur de transcription Snail (SNAI1) et son homologue Slug (SNAI2) (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005), ZEB-1 et ZEB-2 (SIP1) (Comijn et al., 2001) et des facteurs à domaine bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) comme Twist (Kang and Massagué, 2004; Peinado et al., 2007) (**Figure 27**).

Une des fonctions principales de ces facteurs dans la TEM est la répression transcriptionnelle de la E-cadhérine, inversement corrélée à l'expression de la N-cadhérine (Frixen et al., 1991). La perte d'autres marqueurs épithéliaux comme les α - et γ -caténines associée à l'induction de marqueurs de type mésenchymateux comme la vimentine et la fibronectine (FN1) est liée au développement de métastases (Yang et al., 2004). Enfin, l'inhibition de la E-cadhérine peut se faire au niveau protéique par son clivage par la MMP3 (Radisky et al., 2005) et par sa phosphorylation (Fujita et al., 2002).

c) Jonctions adhérentes, voie Wnt/ β -caténine et migration

Outre les conséquences mécaniques de la perte de E-cadhérine dans les cellules invasives, la dissociation des jonctions adhérentes conduit à la libération de la β -caténine dans le cytoplasme et donc joue un rôle dans la voie Wnt/ β -caténine. En effet, la β -caténine est prise en charge dans un complexe de dégradation (**Figure 28A**), mais lorsque la voie Wnt est activée, la β -caténine est stabilisée et active la transcription des gènes cibles (**Figure 28B**). Par ailleurs, lorsque les jonctions adhérentes sont dissociées suite à la perte de la E-cadhérine, la protéine p120^{ctn} libérée active les petites protéines G cdc42 et Rac pour la formation des lamellipodes et filopodes, respectivement et inactive Rho et la formation des fibres de stress (Reynolds and Roczniak-Ferguson, 2004) (**Figure 28C**). De plus, la kinase GSK3- β du complexe de dégradation

Standard	Abbreviated
$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	111
$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	211
$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	121
$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	221
$\alpha 3A\beta 3\gamma 2$	332, or 3A32
$\alpha 3B\beta 3\gamma 2$	3B32
$\alpha 3A\beta 1\gamma 1$	311, or 3A11
$\alpha 3A\beta 2\gamma 1$	321, or 3A21
$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	411
$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	421
$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	511
$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	521
$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	213
$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	423
$\alpha 5\beta 2\gamma 2$	522
$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	523

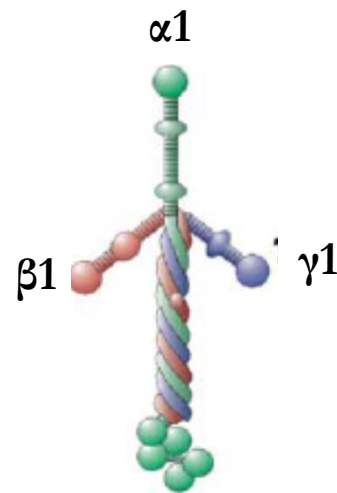


Figure 29: Nomenclature des 16 isoformes des laminines et représentation schématique de la laminine-111 (Aumailley et al., 2005).

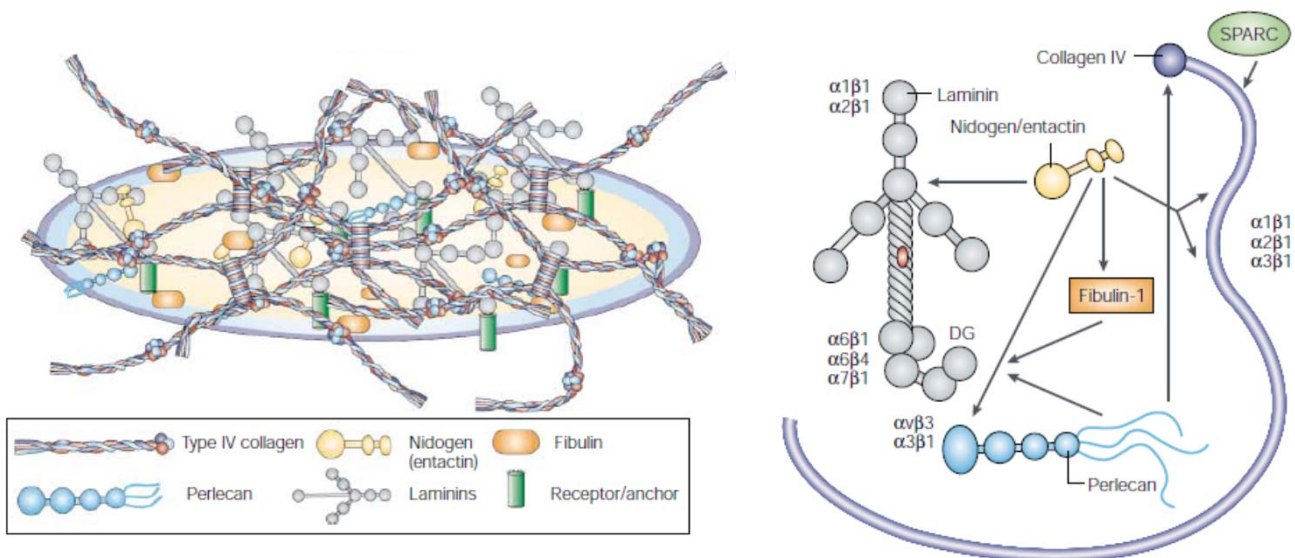


Figure 30: Représentation schématique de la membrane basale (MB). La MB est constituée du collagène de type IV et de polymères de laminines dans lequel s'enchevêtrent le perlecan, le nidogène et la fibuline. La MB est connectée aux cellules par des récepteurs type intégrines ou dystroglycan (DG). Tous ces composants interagissent entre eux, et se lient spécifiquement à certains isoformes des intégrines (e.g. $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$) ou au DG.

de la β -caténine est capable de phosphoryler Snail et donc d'inhiber la répression de la E-cadhérine (Zhou et al., 2004).

4. Adhérence des cellules à la MEC et progression tumorale

La MEC est présente à tous les niveaux de l'organisme, mais son abondance et sa composition varient selon les tissus : très abondante dans les tissus conjonctifs lâches, particulière dans les tissus osseux et cartilagineux, très pauvre entre les cellules épithéliales. La MEC sert de support d'attachement pour les cellules et joue un rôle dans la cohésion des tissus, leur résistance aux forces de tension/compression, le stockage de facteurs de croissance et la mobilité cellulaire.

Dans les tissus épithéliaux, à l'interface entre l'épithélium et le tissu conjonctif sous-jacent, la matrice extracellulaire s'organise en une membrane basale (MB). Elle sert de moyen d'ancrage aux cellules épithéliales; elle intervient comme filtre pour leur nutrition.

a) Composition de la MB intestinale

La membrane basale est formée par l'union de deux feuillets:

- lame basale (LB)
- lame réticulaire (lamina reticularis ou fibroreticularis)

La LB est un mince feuillet de protéoglycanes, de protéines de structure type collagène IV et élastine, des protéines d'adhérence comme la FN1 et les laminines (LN) et ces protéines sécrétées par les cellules épithéliales. La lame réticulaire est un feuillet de matériel extracellulaire sécrété par les cellules du tissu conjonctif sous-jacent qui contient des fibres de collagène de type I et III (aussi appelées fibres réticulaires).

Le collagène de type IV, en raison de sa propriété à s'auto-assembler en un réseau organisé est spécifique de la LB, alors que les types I et III forment des structures fibrillaires et sont retrouvés dans le stroma interstitiel sous-jacent avec d'autres protéines absentes de la LB comme la vitronectine ou la thrombine.

La famille des LN est formée de 16 isoformes (**Figure 29**) (Aumailley et al., 2005) qui peuvent être synthétisées à la fois par les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses (Lefebvre et al., 1999) et qui sont impliquées dans la progression tumorale et l'angiogenèse (Patarroyo et al., 2002).

Les éléments qui composent la MB sont reliés au cytosquelette par des récepteurs membranaires comme les intégrines ou les dystroglycanes (DG) (**Figure 30**) (Kalluri, 2003).

Les intégrines forment une famille de 24 hétéro-dimères formés par différentes combinaisons d'assemblage des 18 sous-unités α et 8 sous-unités β (van der Flier and Sonnenberg, 2001). Ils sont principalement les récepteurs du motif peptidique RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) (Ruoslahti, 1996). L'ensemble des molécules de la MB interagissent

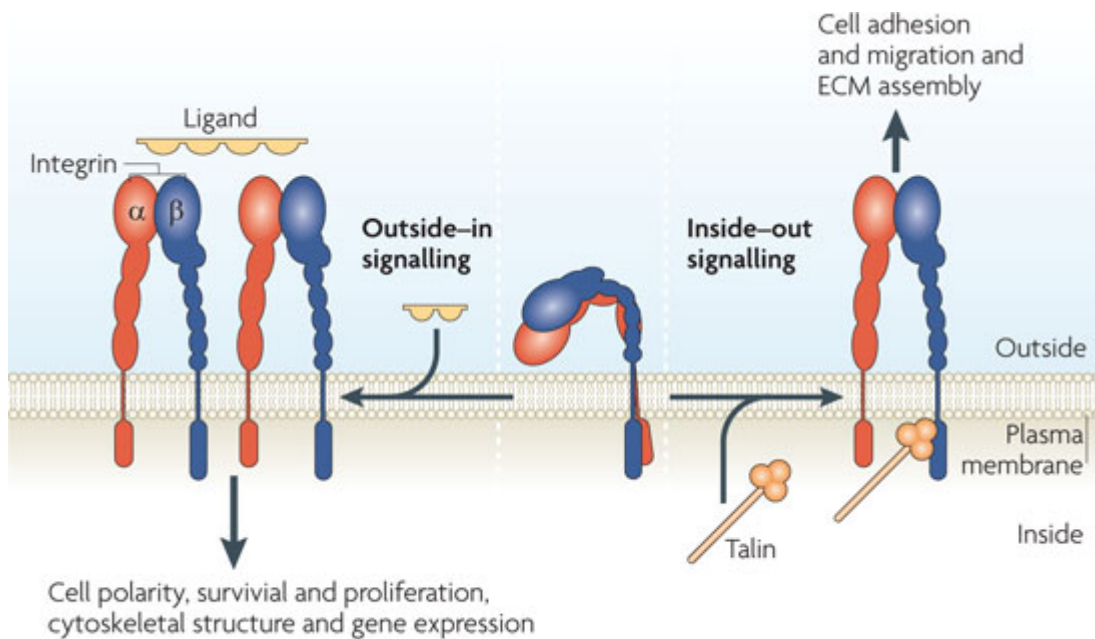


Figure 31: Signalisation bi-directionnelle des intégrines. L'activation des intégrines implique des mécanismes encore mal connus, et fait intervenir des molécules comme la taline pour induire un changement de conformation des hétéro-dimères et augmenter leur affinité pour la fixation d'un ligand. Ceci génère un phénomène d'agrégation des intégrines et induit un signal de type « *outside-in* » générant des signaux pour la polarité cellulaire, la survie/prolifération, l'assemblage du cytosquelette ou l'induction d'expression de gènes. Les intégrines induisent aussi une signalisation de type « *inside-out* » pour diriger des signaux vers l'extérieur de la cellule, influençant l'adhésion, la migration cellulaire et le remodelage de la matrice extra-cellulaire.

entre elles et les isoformes des intégrines interagissent chacun sélectivement avec les protéines de la MB (van der Flier and Sonnenberg, 2001; Patarroyo et al., 2002). Ces interactions définissent la spécificité de l'attachement des cellules à la matrice en fonction du profil d'expression des intégrines et des DG. Les intégrines servent aussi de molécules d'adhésion inter-cellulaire en interagissant avec des récepteurs des cellules adjacentes dont la E-cadhérine, des métalloprotéases et des intégrines elles-mêmes par interaction hétéro- et homo-philiques (van der Flier and Sonnenberg, 2001).

b) Signalisation des intégrines

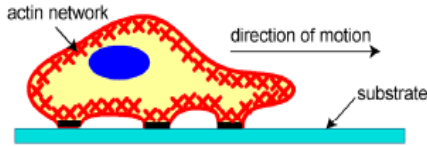
L'activation des intégrines peut générer deux types de signalisation : une signalisation qui transmet l'information de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (*outside-in*) et une signalisation de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (*inside-out*) (**Figure 31**) (Shattil et al., 2010). La signalisation « *outside-in* », classique des récepteurs membranaires, est stimulée par la fixation d'un ligand comme une protéine de la MEC, de facteurs solubles ou de récepteurs membranaires comme les intégrines elles-mêmes. La liaison ligand/récepteur induit un changement de conformation des intégrines et des signaux intra-cellulaires qui contrôlent la polarité cellulaire, la prolifération/survie, l'organisation du cytosquelette et l'expression de gènes. La signalisation « *inside-out* » est stimulée par l'interaction du domaine cytoplasmique des intégrines avec des activateurs intra-cellulaires dont des protéines associées au cytosquelette comme la taline liant l'actine ou des protéines adaptatrices comme la paxilline ou la kindline, et cette signalisation contrôle les forces d'adhésion, la migration cellulaire et le remodelage de la MEC. Toutefois, ces deux signalisations sont inter-connectées puisque par exemple la fixation d'un ligand induisant une signalisation « *outside-in* » peut aboutir *in fine* à une signalisation « *inside-out* ».

L'activation des intégrines suivie de l'agrégation de plusieurs hétéro-dimères est à l'origine de la formation de point focaux d'adhésion et des héli-desmosomes. Ces deux structures font parties des mécanismes d'adhésion jonctionnelle qui sont importants pour la migration cellulaire, processus important pour l'invasion tumorale.

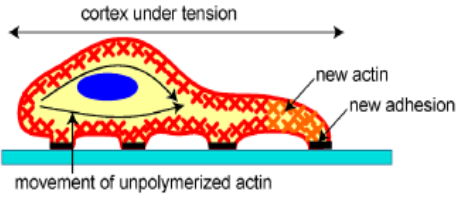
c) Migration cellulaire et jonctions cellule-matrice

Le modèle de migration cellulaire sur un support rigide décrit 3 étapes (Ananthakrishnan and Ehrlicher, 2007) (**Figure 32**). Premièrement, la cellule propulse et oriente la membrane plasmique située à l'avant dans la direction de la migration en organisant un nouveau cytosquelette. Deuxièmement, le bourgeon à l'avant adhère au substrat pendant que l'arrière de la cellule se détache du substrat. Enfin, les forces contractiles dues au réarrangement du cytosquelette d'actine/myosine poussent le corps de la cellule dans le sens de la migration. Au front d'invasion, les cellules en migration sont caractérisées par un nouveau réseau de filaments

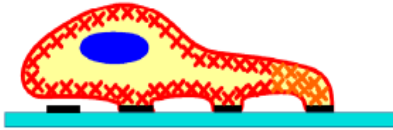
1) Protrusion of the Leading Edge



2) Adhesion at the Leading Edge



Deadhesion at the Trailing Edge



3) Movement of the Cell Body

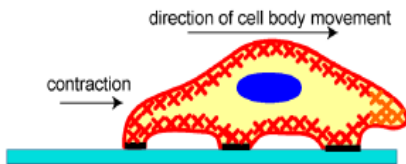


Figure 32: Modèle de migration cellulaire. La migration des cellules fait intervenir un remodelage du cytosquelette et de l'adhésion à la MEC. (1) A l'avant de la cellule, une protrusion de la membrane plasmique apparaît et (2) de nouveaux filaments d'actine polymérisent pour générer un nouveau point de contact avec le substrat. L'actine corticale est soumise à des forces de tension qui entraînent un détachement des points de contact à l'arrière de la cellule. (3) Le corps cellulaire est poussé vers l'avant par des forces contractiles (actine/myosine) générées à l'arrière de la cellule et conduit à la migration cellulaire directionnelle.

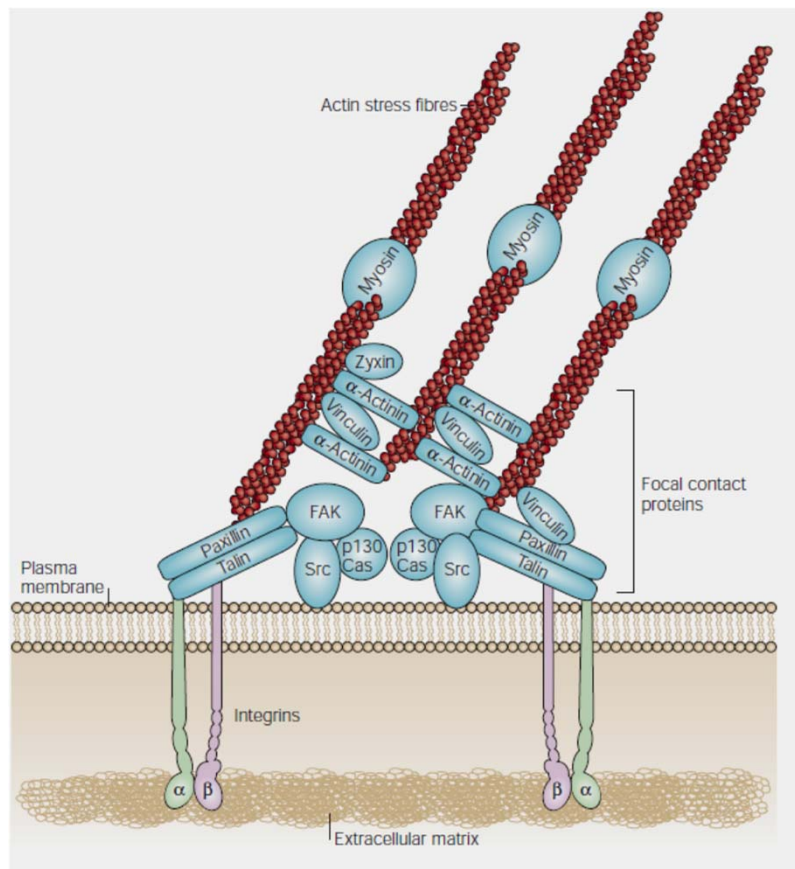


Figure 33: Intégrines et adhésions focales (Afs). Les adhésions focales sont des sites d'adhésion où les intégrines font le lien entre les protéines des AFs et les protéines structurales de la MEC. Les protéines intra-cellulaires sont des molécules associées au cytosquelette d'actine/myosine comme la taline, la vinculine, la zyxine et l' α -actinine et des molécules de signalisation comme la FAK, src et la paxilline.

d'actine induit par l'activation de la protéine Rho activée, et des extensions cytoplasmiques comme les filopodes et les lamellipodes dont la formation est gouvernée par d'autres petites protéines G de la famille Rho comme cdc42 et Rac respectivement (Nobes and Hall, 1995) activées par les intégrines (Price et al., 1998).

La migration cellulaire fait intervenir des structures cellulaires particulières, les adhésions focales (AFs), qui sont des sites où le domaine extra-cellulaire des intégrines interagit avec des molécules structurales de la MEC ou de la MB, et le domaine intra-cellulaire avec des protéines associées aux filaments d'actine dont la taline et la paxilline ainsi que des molécules de signalisation comme FAK (*Focal Adhesion Kinase*) (Mitra et al., 2005) (**Figure 33**). Les AFs dérivent de structures plus simples appelées complexes focaux retrouvés initialement à la périphérie des cellules en cours d'étalement et au front d'invasion des cellules en migration et deviennent des AFs grâce à l'activité tyrosine kinase induite par des facteurs de croissance pour activer FAK et la petite protéine G, Rho. Les AFs sont des structures dynamiques qui s'assemblent, se désassemblent et se recyclent durant la migration cellulaire, l'étalement cellulaire et la mitose. En réponse à l'activation des intégrines par la fixation d'un ligand associée à la stimulation de l'activité tyrosine kinase du récepteur, les AFs se forment en induisant l'agrégation des intégrines et l'organisation d'un nouveau réseau du cytosquelette (Miyamoto et al., 1995). Les protéines FAK et paxilline jouent un rôle dans l'assemblage/désassemblage dynamique des AFs (Mitra et al., 2005; Deakin and Turner, 2008). D'autre part, les héli-desmosomes qui sont des complexes multi-protéiques, permettent l'attachement des cellules épithéliales à la MEC sous-jacente et servent d'ancrage au cytosquelette de kératine (de Pereda et al., 2009). Ils sont localisés au pôle basal de la cellule et sont morphologiquement similaires aux desmosomes.

Les AFs et les hémidesmosomes sont donc des structures jonctionnelles pour l'adhésion des cellules à la matrice, et leur caractère dynamique (assemblage et désassemblage) joue un rôle majeur dans le contrôle de la migration des cellules sur un substrat solide, et donc dans l'invasion tumorale (Mercurio et al., 2001; Lipscomb and Mercurio, 2005).

d) Invasion et métalloprotéases matricielles

Lors du processus d'invasion, les cellules doivent digérer la MB pour disséminer. Généralement, les tumeurs sur-expriment des MMPs (Zucker and Vacirca, 2004) qui sont des métalloprotéases matricielles assurant la dégradation des protéines de la MEC dont le collagène, la FN1 et les protéoglycanes (Kessenbrock et al., 2010). Les MMPs forment une famille de 28 endopeptidases dépendante du zinc dont certaines sont solubles et d'autres, les MT-MMPs (*Membrane Type-MMP*), sont membranaires. Ces MT-MMPs sont capables d'activer les MMPs solubles ou de bloquer leurs inhibiteurs spécifiques TIMPs (*Tissue Inhibitors of MMP*) pour digérer la MB vasculaire, augmentant la perméabilité des vaisseaux et favorisant l'angiogenèse et la dissémination métastatique (Sounni et al., 2011).

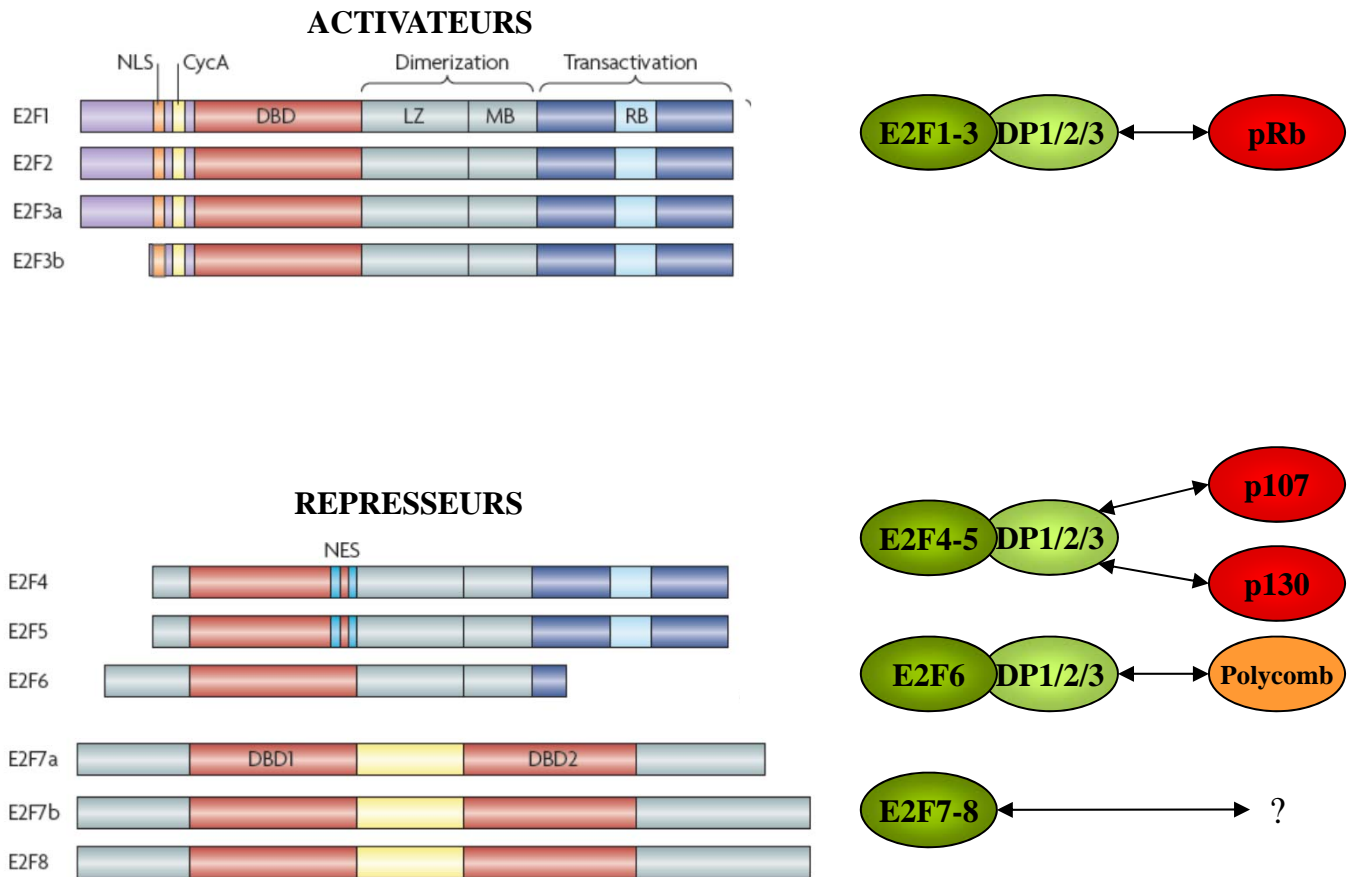


Figure 34: La famille des E2Fs. Les 8 membres de la famille E2Fs ont un domaine DBD (*DNA-Binding Domain*) de liaison à l'ADN de type « winged helix ». Les activateurs E2F1-3 forment des dimères avec les DP1/2/3 pour activer la transcription des gènes cibles impliqués, entre autres, dans la transition G1-S du cycle cellulaire et sont régulés par la liaison avec la poche protéine pRb. Les répresseurs E2F4-5 inhibent la transcription de gènes avec les poche protéines p107 et p130 et E2F6 avec le complexe polycomb. E2F7 et E2F8 sont des répresseurs indépendants des DP et des poche protéines. NLS (*Nuclear Localisation Domain*), signal de localisation nucléaire; NES (*Nuclear Export Signal*), signal d'exportation nucléaire; LZ, domaine leucine zipper; MB, domaine Marked Box; CycA, domaine de liaison à la cycline A.

Toutefois, si les MMPs ont été considérées comme une potentielle cible thérapeutique pour offrir de nouvelles perspectives pour le traitement des cancers métastatiques (Lee et al., 2004), la complexité de telles molécules thérapeutiques repose sur le fait qu'elles favorisent également la progression tumorale puisque les MMPs ont à la fois des propriétés angiogéniques et anti-angiogéniques (López-Otín and Matrisian, 2007).

V. E2F2 et la famille des facteurs E2Fs

1. La famille des E2Fs

La famille des E2Fs comprend 8 protéines classées en deux sous-groupes, les activateurs (E2F1-E2F3) et les répresseurs (E2F4-E2F8) de la transcription (**Figure 34**) (Chen et al., 2009). Les facteurs E2F1-6 fonctionnent en dimère avec les co-facteurs DP1, DP2, et plus récemment DP3 (Qiao et al., 2007), via les domaines LZ (*Leucine Zipper*) et MB (*Marked Box*). L'association E2Fs/DP apporte un deuxième site de fixation à l'ADN augmentant ainsi la stabilité de la liaison (Tao et al., 1997). Les complexes transcriptionnels E2F/DP se lient à l'ADN via le domaine « winged helix » DBD (*DNA Binding Domain*), domaine qui caractérise l'ensemble des membres de la famille E2F. De plus, l'activité transcriptionnelle des E2Fs est régulée par des « pocket protéines » dont la protéine du rétinoblastome pRb et les protéines p107 et p130 qui s'associent aux E2Fs lorsqu'elles sont hypophosphorylées. Pour les E2Fs activateurs, la liaison avec pRB masque le domaine de transactivation responsable de l'activation transcriptionnelle. Pour les répresseurs E2F4 et E2F5, les « pocket protéines » (plus souvent p107 et p130 que pRB) recrutent des complexes de répression pour bloquer la transcription de gènes cibles. Les E2F6-7 n'ont pas de « pocket protéines » et utilisent d'autres mécanismes de répression.

Les E2Fs activateurs contiennent en N-terminal un domaine CycA de fixation à la cycline A et une séquence de signal de localisation nucléaire (NLS) qui maintient leur localisation dans le noyau.

Le gène E2F3 génère deux isoformes E2F3a et E2F3b par deux promoteurs distincts (Leone et al., 2000) qui chacune contribuent à la prolifération et au développement de manière contexte-dépendante (Chong et al., 2009). E2F3a est absent ou peu exprimé en G0, et est fortement exprimé et activé en fin de phase G1. A l'inverse, E2F3b est exprimé pendant le cycle et en G0, et forme un complexe répresseur de la transcription en G0 et par conséquent est classé parmi les répresseurs.

Les facteurs répresseurs ont une séquence bipartite de signal d'exportation nucléaire (NES) dans le domaine DBD les rendant principalement cytoplasmique. Les répresseurs E2F3b, E2F4, E2F5 sont exprimés dans les cellules quiescentes et s'associent à des promoteurs cibles au cours de la phase G0. E2F-4 et 5 se lient préférentiellement à p107/p130. E2F-6 pourrait agir comme répresseur transcriptionnel des autres facteurs E2Fs (Trimarchi and Lees, 2002)

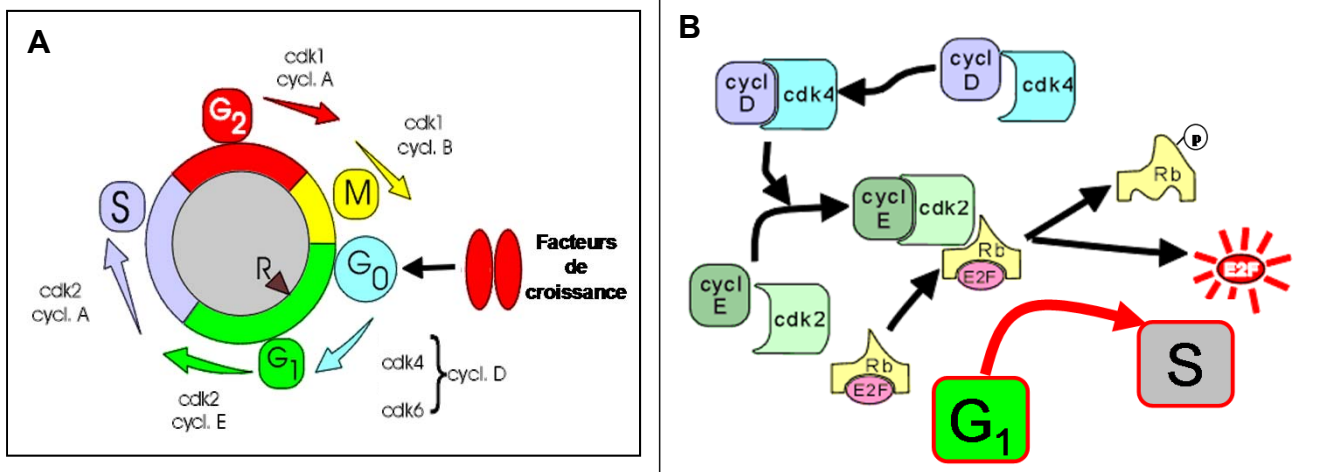


Figure 35: Le cycle cellulaire et les facteurs E2Fs. (A) Sous le stimulus de facteurs de croissance les cellules quiescentes en G0 entrent dans le cycle cellulaire en phase G1 (*Gap1*) et la progression dans les phases S (*DNA synthesis*), G2 (*Gap2*) et M (mitose) est régulée par les complexes cycline/cdk. (B) Durant la phase G1, le complexe cycline D/cdk4 permet la formation du complexe cycline E/cdk2 qui entraîne l'hyperphosphorylation de la protéine pRB, la libération des facteurs E2Fs, et aboutit à la transcription des gènes nécessaires à la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire.

G1/S cell cycle regulators

Cyclin A	<u>Inhibitors</u>
Cyclin E	p18Ink4c
B-myb	p19Ink4d
c-myb	Rb
Cdk2	p107
E2F1,2, 3a	p21
DP-1	p27
Cdc25a	
Cdk7	

G2/M cell cycle regulators

Cdc2	<u>checkpoint regulators</u>
Cyclin A	Bub1
Cyclin B1, B2	Cdc20
Ki-67	RanBP1
Stathmin	
importin 2	

Apoptosis

p73	ARF
Apaf-1	
caspase 3,7	
MAP3 kinase 5	

Nucleotide synthesis

thymidine kinase (tk)
thymidylate synthase (ts)
 ribonucleotide reductase
 RNR1, 2
 deoxycytidine kinase
dihydrofolate reductase (DHFR)

DNA repair

Brcal
 Rad51
uracil-DNA-glycosylase 2

Other

ID4
 c-fos
 HMG2,4
 NFATc1,c3

DNA replication

PCNA **histoneH2A**
DNA pol α and pol δ
 DNA primase
 DNA ligase
replication protein A2, A1
 replication factor C4
 topoisomerase II α
Cdc6, orcl
 Mcm2, 3, 4, 5, 6, 7
 Dbf4
 Flap endonuclease I

Development

Frizzled homologs 1,2,3
 Enhancer of zeste
 Homeobox A10,A7,A9, A13
 TGF (& homologs & receptors)

Repressed by E2F independent of Rb

uPA
 PAI-1

Figure 36: Les gènes cibles des facteurs E2Fs (DeGregori, 2002). Les E2Fs activent la transcription de gènes impliqués dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire, la synthèse de nucléotides, la réplication de l'ADN, le point de contrôle mitotique G2/M, la réparation de l'ADN, l'apoptose, le développement et d'autres molécules comme l'urokinase (uPA) dans l'adhésion cellulaire. Les gènes cibles indiqués en gras ont été identifiés par des expériences de mutation des sites de liaison des facteurs E2Fs.

indépendamment d'une « pocket protéine » et en interaction avec des protéines du complexe polycomb. Les facteurs E2F7 et E2F8 agissent comme des répresseurs, indépendamment de l'interaction avec les DP et de « pocket protéines ». Ils auraient un rôle de rétrocontrôle négatif, notamment de l'activité pro-apoptotique de E2F1 (Moon and Dyson, 2008). Le gène codant E2F7 génère aussi deux isoformes E2F7a et E2F7b produits par épissage alternatif (Di Stefano et al., 2003) et préférentiellement exprimées par les kératinocytes (Endo-Munoz et al., 2009).

2. Fonctions des E2Fs

a) Les E2Fs et le cycle cellulaire

Chez les mammifères, le cycle de division cellulaire est divisé en 4 phases distinctes (**Figure 35A**). La progression du cycle cellulaire est contrôlée par l'activation séquentielle des cdk par leurs sous-unités régulatrices, les cyclines. Les cdk sont exprimées à des taux stables pendant le cycle cellulaire alors que l'expression des cyclines est variable au cours du cycle cellulaire, et le niveau d'expression est essentiellement modulé par une régulation transcriptionnelle et la dégradation protéolytique. Le déroulement de la phase G1 est sous le contrôle des kinases cdk4 et cdk6 couplées à la cycline D pour activer la synthèse des protéines nécessaires à l'entrée et au déroulement de la phase S dont les cyclines A et E. La kinase cdk2 s'associe à la cycline E pour contrôler la transition du passage G1-S et à la cycline A pour contrôler le déroulement de la phase S. La kinase cdk1 s'associe à la cycline B pour contrôler le déroulement de la mitose.

L'expression des E2Fs activateurs est cyclique et maximale pendant la phase G1/S alors que l'expression des répresseurs est constante et maintenue dans les cellules quiescentes. C'est la balance entre répresseur et activateur qui régule la progression du cycle cellulaire (DeGregori, 2002).

Dans les cellules quiescentes, les E2F4 et E2F5 sont essentiellement associés à p130 puis à p107 dans les cellules en phase G1 précoce (Henley and Dick, 2012). Ils bloquent le cycle cellulaire en G1 en association avec des complexes répresseurs de transcription tels que des histones déacétylases, des méthyltransférases et des complexes de remodelage de la chromatine (Trimarchi and Lees, 2002). Durant la phase G1, les E2Fs activateurs sont séquestrés par pRB non phosphorylée et leur expression est progressivement augmentée. En parallèle, le complexe cycline D/ckd4-6 induit l'activation de cdk2 par son association à la cycline E et l'hyperphosphorylation de pRB. Cette phosphorylation amène un changement de conformation protéique permettant le relâchement du complexe E2F1-3/DP, l'export des « pocket protéines » p107 et p130 hors du noyau et l'initiation et le déroulement de la phase S pour la réplication de l'ADN (**Figure 35B**).

b) Gènes cibles et fonctions des E2Fs

Si la fonction la plus décrite associée aux E2Fs est la transcription de gènes impliqués dans la transition de la phase G1 à la phase S (cyclines A et E, cdk2, c-myc, les facteurs E2F1, E2F2 et E2F3 eux-mêmes) et des gènes de la réplication de l'ADN (les enzymes DNA ligase, DNA primase, les polymérases α et γ , topoisomères II, plusieurs facteurs de réplication), ils induisent aussi la transcription de gènes de réparation de l'ADN (BRCA1, Rad51 de la recombinaison homologue), de la synthèse de nucléotides (thymidylate synthétase, dihydrofolate réductase), de régulateurs des points de contrôle du cycle cellulaire (BUB1, Ki67, cdc20) (DeGregori, 2002) (**Figure 36**). De manière plus surprenante, mais aujourd'hui bien établie, les facteurs E2Fs activent également l'expression de gènes impliqués dans la régulation négative du cycle cellulaire, dont les « pocket protéines » pRB et p107 et des protéines de la voie du TGF et dans l'apoptose, dont p73 de la famille p53 de suppresseurs de tumeur, c-myc et consécutivement p14^{ARF} un inhibiteur de mdm2 et donc activateur de p53 (Elliott et al., 2001).

Les facteurs E2Fs sont les inducteurs de divers processus cellulaires importants. Evidemment, ils sont importants pour la progression du cycle cellulaire (Dyson, 1998; Nevins, 1998) mais à l'inverse, ils jouent également un rôle dans l'apoptose. En effet, E2F1 et E2F4 sont requis pour l'apoptose induite par c-myc alors que E2F2 et E2F3 sont essentiels pour la prolifération induite par c-myc (Leone et al., 2001). D'autres études impliquent aussi E2F2 dans l'induction de l'apoptose. Le développement de lymphomes induits par c-myc est inhibé par l'apoptose induite par E2F2 (Opavsky et al., 2007). E2F2 sert également de répresseur transcriptionnel de plusieurs cyclines, cdk1, chk1 et mcm2/6 et cdc6 pour réguler négativement le cycle cellulaire et maintenir un état de quiescence (Infante et al., 2008). Plus récemment, les E2Fs ont été impliqués dans l'angiogenèse induite par HIF1 α , par l'intermédiaire de micro ARN (miRNA) (Biyashev and Qin, 2011).

Par ailleurs, outre la transactivation ou la répression dépendante des « pocket protéines », les E2Fs peuvent réguler l'expression de leurs gènes cibles par d'autres mécanismes. En effet, E2F1 est capable de réprimer des gènes cibles par un mécanisme indépendant des « pocket protéines » mais encore inconnu, comme c'est le cas du gène codant l'urokinase, impliquée dans l'adhésion cellulaire (Koziczak et al., 2000). De plus, une étude récente a montré que E2F1 agit aussi au niveau post-transcriptionnel puisqu'il est capable de rajouter la coiffe méthylée en 5' de certains de leur ARN messager (ARNm) de ces gènes cibles, comme cdk2, mécanisme essentiel pour la stabilité des transcrits (Cole and Cowling, 2009).

3. Mécanismes de régulation de l'expression des E2Fs

Outre la régulation des E2Fs au niveau protéique par les «pocket protéines», d'autres mécanismes de régulation ont été décrits. L'expression transcriptionnelle de E2F2 est dépendante

du cycle cellulaire. En effet, l'activité du promoteur de E2F2 est faible dans les cellules quiescentes et en phase G1 précoce alors qu'elle est augmentée au cours de la phase G1, par c-myc (Sears et al., 1997). L'inhibition de la voie de signalisation HH (*Hedgehog*), impliquée dans l'initiation et la progression des tumeurs coliques, induit la sous-expression transcriptionnelle de E2F2 (Shi et al., 2010). Récemment, le rôle des miRNA a été mis en évidence dans la régulation des E2Fs. Par exemple, dans le cluster miR-17-92, un gène polycistronique codant pour 6 miRNAs (miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-20a et miR-92-1) impliqué dans le cancer (Mendell, 2008) et l'angiogenèse physiologique et pathologique (Biyashev and Qin, 2011), le miR-20a est capable de lier la région 3'-UTR (*UnTranslated Region*) des E2F1-3 (Sylvestre et al., 2007). La complexité des mécanismes de régulation des E2Fs par les miRNA repose sur le fait que, à l'inverse, les E2F1-3 sont aussi capables d'activer la transcription du cluster miR-17-92, suggérant un mécanisme d'auto-régulation, où une boucle de rétrocontrôle négatif fait intervenir miR-20a. D'autres miRNA ciblent aussi E2F2, dont miR-21 (Zhu et al., 2008) et miR-98/Let-7f (Bhat-Nakshatri et al., 2009), miR-34 (Tazawa et al., 2007), et Let-7a (Dong et al., 2010). Enfin, les autres E2Fs sont aussi régulés par des miRNA et induisent eux-mêmes le cluster miR-17-92, ainsi que deux autres clusters paralogues miR-106b-25 et miR-106a-363, impliqués dans les cancers humains (Emmrich and Pützer, 2010) (**Figure 37**).

4. E2Fs et cancer

a) Propriétés d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs des E2Fs

En raison du large panel de gènes cibles des facteurs E2Fs et de leurs fonctions dans des processus cellulaires majeurs comme le cycle cellulaire et l'apoptose, il n'est pas étonnant que les E2Fs portent à la fois des propriétés d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs (DeGregori and Johnson, 2006).

En effet, si un modèle de souris transgénique sur-exprimant E2F2 a montré une forte incidence de développement spontané de thymomes (Scheijen et al., 2004) suggérant un rôle d'oncogène, d'autres études attribuent un rôle de suppresseur de tumeur pour E2F2. Par exemple, l'inactivation du gène codant E2F2 ou le double knock-out (KO) E2F1^{-/-} E2F2^{-/-} (Zhu et al., 2001) dans un modèle murin induit une prolifération accrue de cellules hématopoïétiques (Murga et al., 2001). De plus, si l'induction de myc induit des lymphomes T, l'apparition de la malignité induite par myc est accélérée après inactivation d'un seul allèle du gène codant pour E2F2 (Opavsky et al., 2007). Cette étude a montré que la propriété de suppresseur de tumeur implique une apoptose induite par E2F2, hypothèse renforcée par la démonstration *in vitro* d'une récupération du potentiel apoptotique après réintroduction du gène E2F2 dans les cellules T.

Ces différences de fonctions oncogène/suppresseur de tumeur peuvent être expliquées par des effets dépendants du contexte génétique (Polager and Ginsberg, 2008; Swiss and Casaccia,

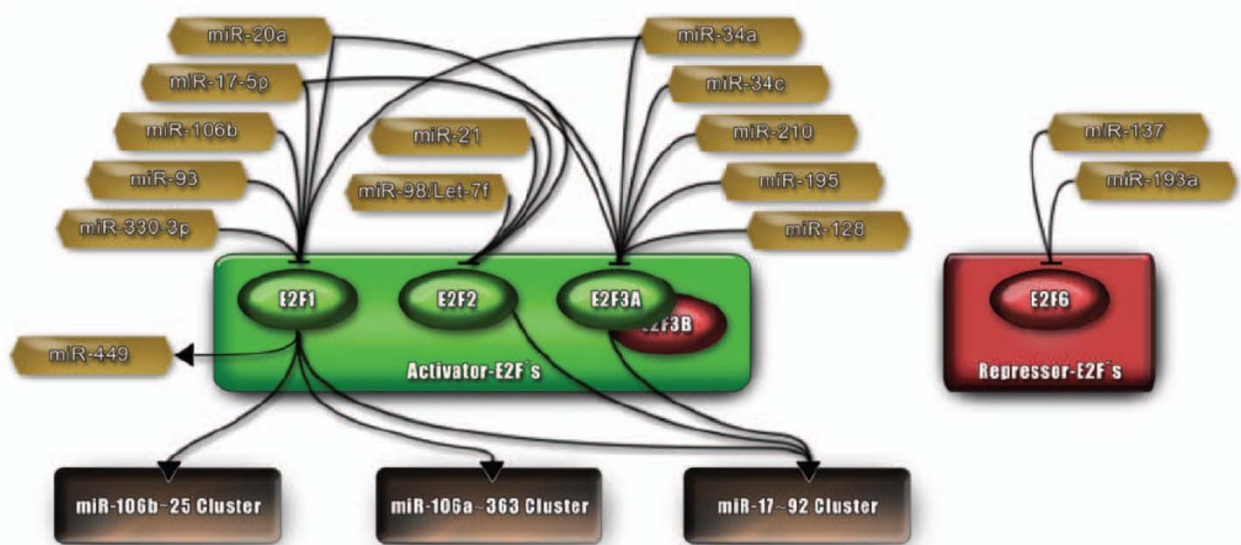


Figure 37: microARN et régulation des E2Fs (Emmrich et Putzer, 2010). Les facteurs E2Fs sont régulés par des miARN mais sont aussi capables à l'inverse de réguler eux-mêmes l'expression de miARN, notamment des clusters de miARN. L'expression de E2F2 est réprimée par les miR-20a, miR-17-5p, miR21 et miR98-Let7f et E2F2 induit l'expression du cluster miR-17-92 codant 6 miARN dont miR-20a et miR-17-5p, formant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif.

2010). Par exemple, si l'inactivation de E2F1 accélère la tumorigenèse dans des souris transgénique exprimant myc dans le compartiment épithélial (Rounbehler et al., 2002), l'inactivation de E2F1 dans des souris transgéniques exprimant myc dans les lymphocytes B supprime le développement de lymphome (Baudino et al., 2003).

b) E2F2 dans les cancers humains

Bien que la dérégulation des E2Fs ait été bien documentée dans les tumeurs humaines (Chen et al., 2009), peu d'études ont été consacrées à E2F2 en particulier. Une étude a montré que dans les ostéosarcomes, E2F2 est surexprimé dans 86% des tumeurs primaires et 80% des métastases (Tesser-Gamba et al., 2011). Dans les cancers ovariens, l'expression est corrélée au stade tumoral (Reimer et al., 2006) et est associée à une moins bonne OS et PFS (Reimer et al., 2007), suggérant un rôle dans la progression tumorale. Une analyse à l'aide de puces d'expression a mis en évidence une sur-expression, parmi 17 autres gènes, de E2F2 dans des cellules souches CD133⁺ issues de glioblastomes (Okamoto et al., 2007). Par contre, des altérations au locus 1p36 dans lequel se trouve le gène codant E2F2 ont été largement décrites dans les tumeurs humaines. De manière général, il s'agit de délétion ou de perte d'hétérozygotie, retrouvées dans les neuroblastomes (Janoueix-Lerosey et al., 2004; White et al., 2005) le cancer du sein (Bièche et al., 1999), de l'ovaire (Imyanitov et al., 1999), et du côlon (Muleris et al., 1990) dans lequel la délétion 1p36 est associée à la progression tumorale (Thorstensen et al., 2000) et à un faible pronostic de survie (Gerdes et al., 1995; Ogunbiyi et al., 1997; Kim et al., 2006).

VI. La famille des facteurs IDs et ID3

1. Mécanismes d'action

La famille des IDs (*Inhibitor of Differentiation/Inhibitor of DNA binding*) est composée de 4 membres (ID1-4) qui fonctionnent comme régulateurs dominants négatifs de la transcription de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire. Si l'expression des facteurs ID1 et ID3 est presque ubiquitaire, les facteurs ID2 et ID4 ont un profil d'expression plus restrictif (Riechmann et al., 1994).

Les quatre protéines IDs contiennent un motif de dimérisation hautement conservé connu sous le nom de hélice-boucle-hélice (HLH) qui permet son interaction avec d'autres protéines. Les principales cibles des IDs sont les facteurs de transcription de la famille bHLH qui contrôlent l'expression de gènes régulateurs de fonctions spécifiques et du cycle cellulaire. Ces bHLH possèdent un domaine de liaison à l'ADN, riche en acides aminés basiques et à proximité du motif de dimérisation HLH qui permet leur fixation à l'ADN en homo- ou hétérodimères. Cependant, les IDs ne possédant pas ce domaine basique de liaison à l'ADN, les hétérodimères

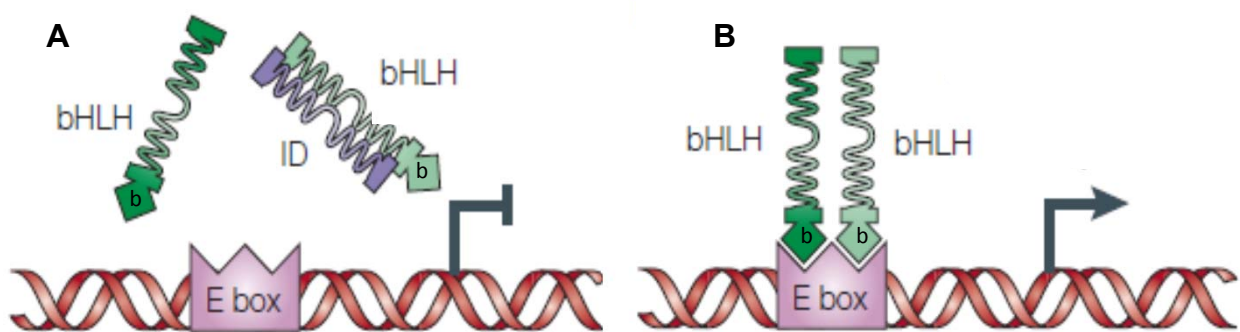


Figure 38: Mécanisme d'action dominant négatif des IDs. Les facteurs IDs (Inhibitor of Differentiation/Inhibitor of DNA binding) de la famille HLH (*Helix-Loop-Helix*) n'ont pas le domaine riche en aa basiques de liaison à l'ADN des facteurs bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*). (A) L'absence du domaine riche en aa basiques de liaison à l'ADN des facteurs IDs conduit à la formation de complexe ID/bHLH incapables de se lier à l'ADN. (B) Par contre, en l'absence d'IDs, les facteurs bHLH se dimérisent et peuvent se fixer sur les boîtes E et induire la transcription des gènes cibles.

formés entre les IDs et les facteurs bHLH ne peuvent pas se lier à l'ADN. Par ce mode d'action, les IDs sont considérés comme des dominants négatifs de la liaison des protéines bHLH à l'ADN (Benezra et al., 1990; Lasorella et al., 2001) (**Figure 38**).

2. Fonctions associées aux IDs

- **La différenciation** : la séquestration des facteurs bHLH par les IDs induit la répression de gènes impliqués dans le lignage spécifique de multiples types cellulaires dont les cellules épithéliales et musculaires, les cellules lymphocytaires B et les neurones (Wilson et al., 1991; Jen et al., 1992; Kreider et al., 1992; Jögi et al., 2002; Coppé et al., 2003).

- **La prolifération** : en plus de leur fonction canonique dans la différenciation, les IDs régulent négativement la sénescence (Zebedee and Hara, 2001) en activant les télomérases (Alani et al., 1999), en induisant la prolifération cellulaire par phosphorylation/inactivation de pRB par p16 (Nickoloff et al., 2000) ou par interaction directe avec pRB dans le cas d'ID2 (Iavarone et al., 1994; Lasorella et al., 1996), entraînant une sortie de quiescence et une activation du cycle cellulaire.

- **L'apoptose** : A l'inverse, les facteurs IDs présentent aussi des propriétés anti-prolifératives. En effet, la sur-expression de ID3 conduit à l'inhibition de la prolifération et à l'induction de l'apoptose dépendante de la caspase 3 et 9 dans des kératinocytes et les rend plus sensibles aux rayonnements ultra-violets (Simbulan-Rosenthal et al., 2006). De même la sur-expression d'ID3 induit l'apoptose dans des cellules cancéreuses pulmonaires (Li et al., 2012).

- **La réparation tissulaire** : ID3 est sur-exprimé dans les hépatocytes lors de la régénération tissulaire après une hépatectomie partielle (Wang et al., 2003).

- **L'angiogenèse physiologique et tumorale** : Les ID1 et ID2 sont exprimés dans les cellules endothéliales cérébrales (mésoderme) durant le développement, suggérant un rôle des IDs dans l'angiogenèse physiologique (Jen et al., 1997) mais les IDs sont aussi impliqués dans l'angiogenèse tumorale. En effet, la double invalidation des gènes codant pour ID1 et ID3 (ID1^{-/-}; ID3^{-/-}) est létale chez l'embryon et est associée à des défauts vasculaires cérébraux (Bader et al., 1998; Lyden et al., 1999). Un modèle viable de souris invalidée pour les deux allèles de ID3 et un seul allèle de ID1 (ID1^{+/-}; ID3^{-/-}) a été généré (Lyden et al., 2001); chez ces souris, les tumeurs développées à partir de cellules cancéreuses xénogreffées (cellules de lymphome, de cancer du sein ou du poumon), ont une croissance ralentie et un réseau vasculaire intra-tumoral anormal associé à une baisse d'expression de l'intégrine αV et de la MMP2, ainsi qu'à un défaut de recrutement de cellules myéloïdes dérivées de la moelle osseuse (BMDCs) au sein de la tumeur.

- **L'immunité et cancer** : L'invalidation de ID3 n'altère pas le développement de la souris, mais induit des défauts de l'immunité humorale, de la prolifération des lymphocytes B et de la maturation des thymocytes (Pan et al., 1999), favorise le développement d'un syndrome de l'auto-

immunité, le syndrome de Sjögren (Li et al., 2004) et induit le développement de lymphome T chez des souris ID3^{null} (Li et al., 2010).

3. Mécanismes de régulation

L'induction de la prolifération par ID3 ne dépend pas uniquement de sa capacité à séquestrer les facteurs bHLH. En effet, ID3 contient un site consensus en N-terminal ciblé par cdk2 qui, complexé à la cycline E ou la cycline A, phosphoryle ID3 au résidu Ser5 et lui permet de promouvoir l'entrée en phase S du cycle cellulaire (Deed et al., 1997). Ce mécanisme serait renforcé par un rétrocontrôle positif puisque phospho-ID3 est capable d'inhiber p21 et d'augmenter l'activité kinase des complexes cycline A/cdk2 et cycline E/cdk2 (Forrest et al., 2004). De plus, ID3 est induit par des facteurs tels que le VEGF dans l'angiogenèse (Lyden et al., 2001), le TCR (*T-cell Receptor*) via la voie des Ras/MAPK dans la maturation des thymocytes (Bain et al., 2001), par la voie Notch durant le développement du Xénope (Reynaud-Deonauth et al., 2002) et par des ligands de la super-famille du TGF comme le TGF β et les BMPs (Izumi et al., 2006; Shepherd et al., 2008). Enfin, le miRNA miR-29b est capable de cibler ID3 puisqu'une corrélation inverse entre l'expression de ID3 et du miR-29b a été mise en évidence dans des lignées cellulaires lymphoblastiques (Sarachana et al., 2010).

4. Dérégulations dans les cancers humains

Globalement, ID3 est sur-exprimé dans les tumeurs humaines et est associé à une faible différenciation, la vascularisation tumorale, l'invasion et un mauvais pronostic de survie. En effet, une sur-expression de ID3 est observée dans des tumeurs pulmonaires à petites cellules (Kamalian et al., 2008), dans des astrocytomes avec une corrélation entre le niveau d'expression de ID3 et le degré de vascularisation et l'indice de prolifération (Vandeputte et al., 2002), dans des tumeurs gastriques associée à une faible différenciation et une survie plus courte (Yang et al., 2011) et dans les tumeurs de la prostate associée à l'agressivité des tumeurs (score de Gleason) (Wang et al., 2010). Dans les tumeurs coliques, la sur-expression de ID3 corrèle avec l'expression immunohistochimique de p53, suggérant une relation entre l'expression de ID3 et l'inactivation de p53 par mutation (Wilson et al., 2001). De plus, ces mêmes auteurs ont montré une sur-expression de ID3 dans la muqueuse saine de souris invalidées pour p53, renforçant l'hypothèse que la perte de fonction de p53 est impliquée dans la sur-expression de ID3 dans des tumeurs coliques humaines. Par contre, ID3 est sous-exprimé dans les cancers de l'ovaire (Arnold et al., 2001) et de la thyroïde (Deleu et al., 2002).

VII. Thérapie des cancers colorectaux

1. Diagnostic

En cas de signes cliniques tels que des douleurs abdominales, troubles du transit et hémorragies, ou après un dépistage positif au test Hémocult[®], le diagnostic d'un cancer du côlon est établi par coloscopie. Cette dernière permet de localiser la lésion et de faire une biopsie pour une confirmation anatomo-pathologique. S'il y a suspicion de métastases, le patient réalise alors une échographie abdominale, une radiographie pulmonaire, et éventuellement le dosage du CEA (*Carcino-Embryonic Antigen*), un marqueur sanguin de métastases dans le CCR (Liu et al., 2012). Environ 25% des tumeurs présentent des métastases au diagnostic et 50% des tumeurs restantes en développeront par la suite (Landis et al., 1999; Van Cutsem and Oliveira, 2009).

2. Classification des tumeurs coliques

Les cancers colorectaux sont classifiés selon trois paramètres : la profondeur de l'envahissement de la tumeur dans la paroi du tube digestif (T1-4), l'envahissement ganglionnaire (N1-2) et l'atteinte des organes à distance (M1) (**Figure 39**). Les tumeurs sont alors classées par stade de I à IV, en fonction des paramètres TNM. Chaque stade est associé à une survie globale à 5 ans : plus de 85% de survie pour les stades I (T1 N0 M0) ; plus de 80% pour les stades IIa (T3 N0 M0) ; 72% pour les stades IIb (T4 N0 M0) ; 83% pour les stades IIIa (T1/2 N1 M0), 64% pour les stades IIIb (T3/4 N1 M0), 44% pour les stades IIIc (T1-4 N2 M0) ; et moins de 10% pour les stades IV métastatiques (n'importe quel T, n'importe quel N et M1) (O'Connell et al., 2004).

3. La technique du ganglion sentinelle

L'intérêt de la technique du ganglion sentinelle est de rechercher des micro-métastases ou des cellules tumorales isolées dans les premiers ganglions se trouvant sur la circulation lymphatique. La détection de micro-métastases par cette technique chez des patients ayant une tumeur initialement classée stade II, donc sans envahissement ganglionnaire déterminé par des techniques classiques (coloration histologique), permet de mieux classer ces patients et de leur faire bénéficier d'un traitement adjuvant, habituellement non indiqué pour les stades II. La technique consiste à injecter au moment de l'intervention chirurgicale, un colorant bleu qui va se concentrer rapidement dans les premiers ganglions. Ces ganglions sont prélevés et l'anatomo-pathologiste recherche alors par un immunomarquage de la cytokératine ou l'analyse moléculaire par qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) de la présence de micro-métastases. Environ 8 % des tumeurs de stade II peuvent être re-classées en stade III (Bilchik et

A

T	Tis : Carcinome in situ : tumeur restreinte à la muqueuse (+/- envahissement du chorien) T1 : Envahissement de la sous muqueuse T2 : Envahissement de la musculéuse T3 : Envahissement de la sous séreuse et/ou le tissu péri-rectal T4 : Envahissement des structures de voisinages
N	N0 : Pas d'envahissement ganglionnaire N1 : Envahissement de 1 à 3 ganglions régionaux N2 : Envahissement de 4 ganglions ou plus
M	M0 : Pas de métastases M1 : Présence de métastases à distance

B

Stades	T	N	M	Survie globale à 5 ans
I	T1/T2	N0	M0	>90%
IIa	T3	N0	M0	>80%
IIb	T4	N0	M0	72%
IIIa	T1/T2	N1	M0	83%
IIIb	T2/T3	N1	M0	64%
IIIc	any T	N2	M0	44%
IV	any T	any N	M1	<10%

Figure 39: Classification des cancers colorectaux. Classification TNM (UICC) et (B) gradation en stades (I à IV) associées à la survie globale à 5 ans prenant en compte les morts reliées au cancer uniquement (AJCC sixth edition, 1991-2000: 200 000 patients)

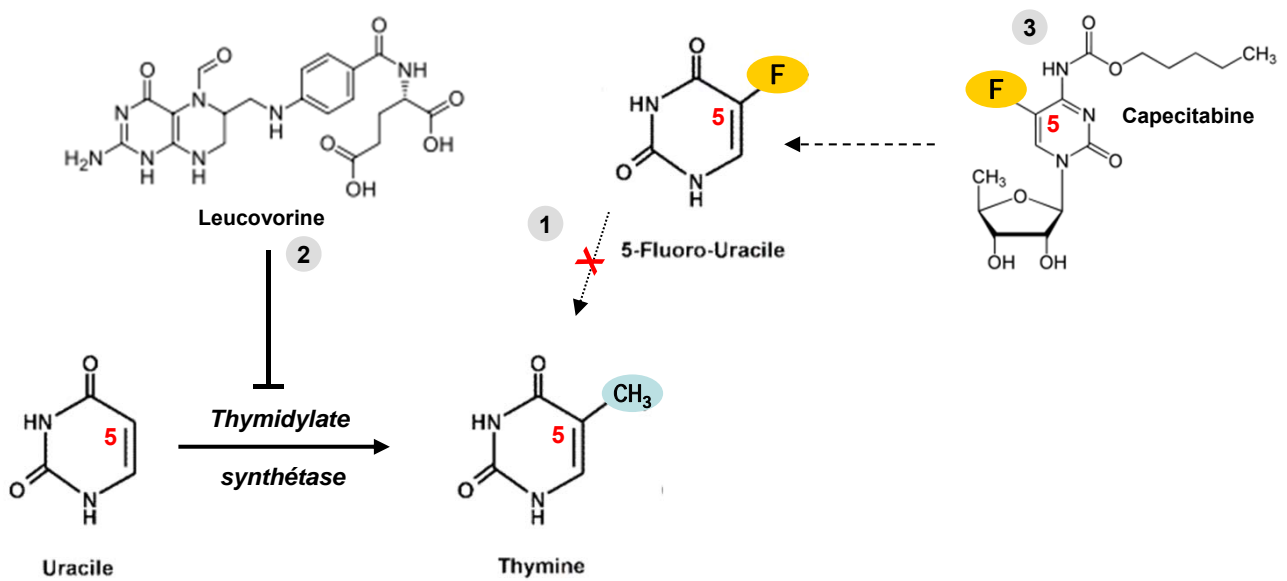


Figure 40: Le 5-Fluorouracile (5-FU) et ses dérivés. (1) Le groupement fluoré en position 5 du 5-fluorouracile (5-FU) empêche sa conversion en thymine. (2) Son association avec la leucovorine (LV) est synergique puisque celle-ci inhibe l'enzyme responsable de la méthylation de l'uracile en thymine, la thymidylate synthétase. (3) La capecitabine est une pro-drogue du 5-FU. Le blocage de la synthèse de thymine ainsi que l'incorporation du 5-FU dans l'ARN induit un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.

al., 2007). Néanmoins, le réel bénéfice thérapeutique de cette technique est encore actuellement controversé (van der Pas et al., 2011).

4. Modes d'actions des thérapies anti-cancéreuses

a) Chimiothérapie conventionnelle : drogues génotoxiques

Le 5-Fluorouracile (5-FU) est un antimétabolite, analogue de pyrimidine qui contient un groupement fluor en position 5 (**Figure 40**). L'uracile est à la fois une des bases qui composent l'ARN (sous forme d'uridine triphosphate UTP) et le précurseur de la thymine après méthylation par la thymidylate synthétase. La cellule tumorale va métaboliser le 5-FU et les produits formés vont empêcher leur conversion en thymine en bloquant la thymidylate synthétase. De plus, le 5-FU peut aussi s'incorporer dans l'ARN sous forme de F-UTP. L'inhibition de la synthèse de l'ADN induit un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. **La leucovorine (LV)**, ou acide folinique, a une action synergique au 5-FU puisqu'elle inhibe l'activité thymidylate synthétase. **La capecitabine** est une pro-droge du 5-FU administrée par voie orale.

L'oxaliplatine est un sel de platine à action alkylante sur les guanines, générant des ponts intra- et inter-brins qui inhibent la synthèse de l'ADN et sa transcription en ARN et induit donc la mort cellulaire.

L'irinotecan est une pro-droge dont le métabolite actif, le SN-38, est généré par hydrolyse. Il inhibe la topoisomérase I et génère des cassures double-brin qui bloquent la réplication de l'ADN et induisent la mort cellulaire (Creemers et al., 1994). Outre son action génotoxique, il a été montré au laboratoire que l'irinotecan est aussi capable de réprimer le facteur HIF1 α en réponse à l'hypoxie. En association avec à la rapamycine, il produit un effet anti-tumoral majeur *in vivo* sur la croissance de xénogreffes chez la souris nue et *in vitro* sur la viabilité cellulaire en hypoxie (Pencreach et al., 2009).

L'ensemble de ces molécules de chimiothérapie conventionnelle induit des dommages de l'ADN. L'adressage aux cellules cancéreuses est basé sur leur fait qu'elles ont une prolifération accrue et des mécanismes de réparation de l'ADN altérés. Néanmoins, l'action de ces molécules n'étant pas spécifique aux cellules tumorales, elles induisent aussi une toxicité pour les cellules saines, en particulier pour les cellules ayant un taux de prolifération élevé. Ceci est responsable du développement de nombreux et divers effets secondaires observés suite à ces traitements.

b) Thérapies ciblées

Dans le but de minimiser les effets secondaires chez les patients traités par chimiothérapie conventionnelle et d'améliorer le bénéfice thérapeutique, des thérapies dites « ciblées » sont aujourd'hui en développement. En effet, ces thérapies ciblées ont une plus forte spécificité vis-à-

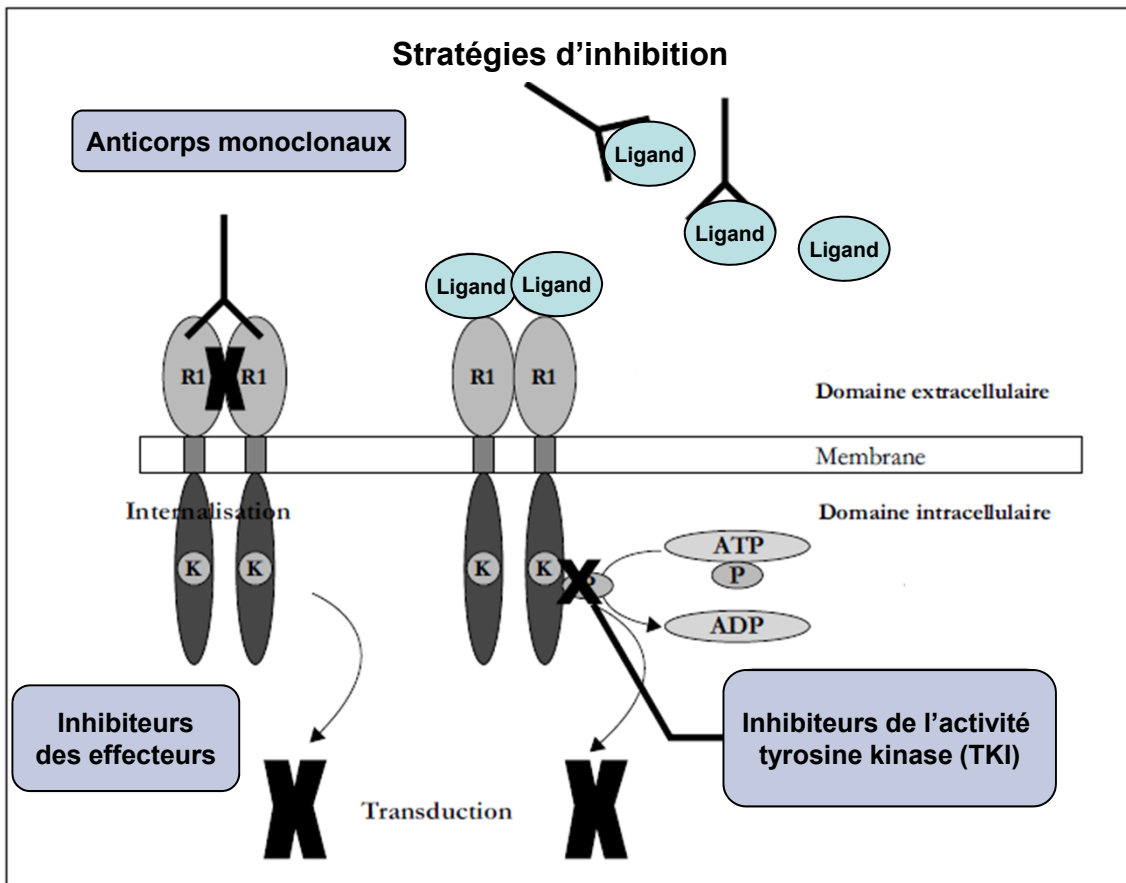


Figure 41: Stratégies d'inhibition de la voie du VEGF. L'inhibition de la voie du VEGF utilise des anticorps monoclonaux comme le bevacizumab (Avastin®), dirigés contre le ligand ou des anticorps dirigés contre le récepteur lui-même. Des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (TKI) sont aussi capables d'inactiver les récepteurs, ainsi que des effecteurs intra-cellulaires.

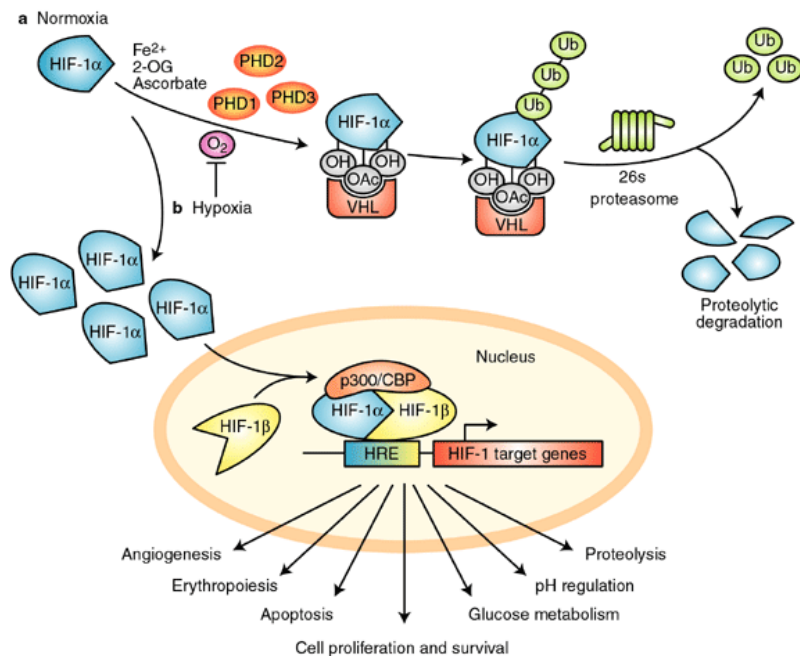


Figure 42: Régulation de HIF1α par la pression en oxygène. En présence d'oxygène et de fer, HIF1α est hydroxylé par une prolyl hydroxylase (PHD1/2/3) ce qui entraîne sa dégradation par la voie VHL (Von Hippel Lindau)/ubiquitine (Ub)/protéasome. En l'absence d'oxygène, HIF1α est stabilisé sous forme non hydroxylé, permettant sa translocation dans le noyau où le dimère HIF1α/β se forme pour activer la transcription des gènes cibles, dont des facteurs induisant l'angiogenèse et favorisant la glycolyse.

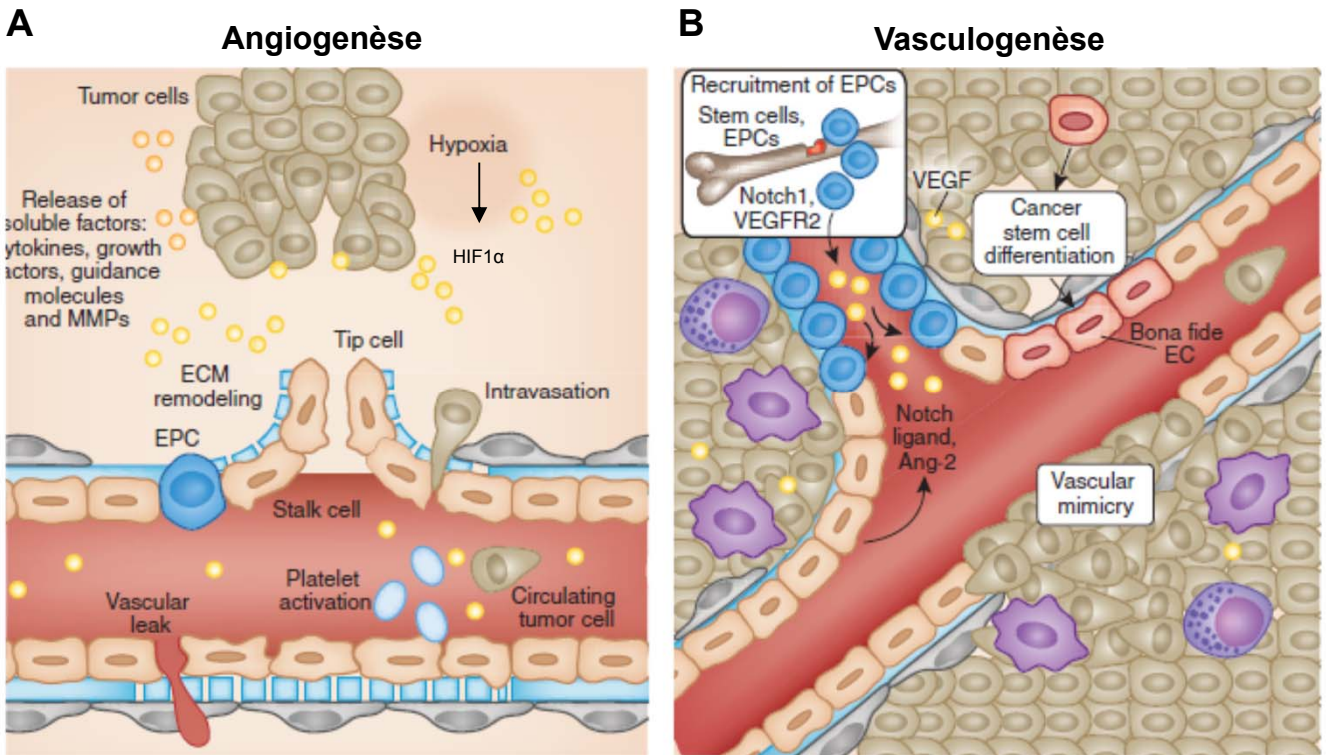


Figure 43: Mécanismes de néo-vascularisation tumorale. La vascularisation intra-tumorale a deux d'origines : (A) un processus d'angiogenèse utilisant des vaisseaux pré-existants qui bourgeonnent selon un phénomène de chimioattraction et (B) un processus de vasculogenèse impliquant le recrutement de cellules souches/progénitrices dérivées de la moëlle osseuse, la différenciation des cellules souches cancéreuses, ou le mimétisme vasculaire.

Lésions cibles	Autres lésions	Nouvelles lésions	Réponses globales
RC	RC	Non	RC
RC	Réponse incomplète/S	Non	RP
RP	Non-P	Non	RP
S	Non-P	Non	S
P	Toute réponse	Qui ou non	P
Toute réponse	P	Qui ou non	P
Toute réponse	Toute réponse	Qui	P

RC = réponse complète ; RP = réponse partielle ; S = stabilité tumorale ; Non-P = non-progression ; P = progression tumorale.

Figure 44: Réponse tumorale globale incluant toutes les combinaisons possibles de réponses tumorales sur les « lésions cibles » et les « autres lésions ».

vis des cellules tumorales, les protéines ciblées étant généralement sur-exprimées ou re-exprimées dans les tumeurs. Les thérapies ciblées agissent selon plusieurs stratégies : des anticorps monoclonaux peuvent bloquer directement le ligand ou bloquer le site de fixation du ligand au récepteur ; et les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (TKI) peuvent inactiver le récepteur ou un effecteur intra-cellulaire (Arora and Scholar, 2005) (**Figure 41**).

Les anticorps monoclonaux les plus développés à ce jour ciblent des voies oncogéniques telles que la voie de l'EGFR.

Le cetuximab (Erbix[®]), un anticorps chimérique (murin/humain), et **le panitumumab** (Vectibix[®]), anticorps humain, sont tous deux dirigés contre le récepteur à l'EGFR. Dans les cellules cancéreuses, la voie de l'EGF peut être constitutivement activée par des mutations des gènes codant pour l'EGF ou pour l'effecteur KRAS. C'est pourquoi, la fixation de ces anticorps à l'EGFR ne peut inactiver la voie que si le gène codant pour KRAS est non muté (Amado et al., 2008; Van Cutsem et al., 2009). En effet, les mutations de KRAS sont des mutations activatrices, responsables d'une activation constitutive des voies de signalisation de l'EGFR indépendamment de la fixation d'un ligand.

c) Les traitements anti-angiogéniques

L'angiogenèse tumorale

Lorsque les tumeurs atteignent une certaine taille (quelques millimètres de diamètre), elles subissent une baisse de la pression en oxygène (Folkman and Hanahan, 1991), ce qui amène les cellules tumorales à s'adapter à l'hypoxie en activant l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire. Cette adaptation caractérise l'effet Warburg qui entraîne une augmentation de la glycolyse au détriment de la phosphorylation oxydative du glucose (Kim et al., 2006) mais aussi la survie cellulaire et l'angiogenèse qui permet l'apport en oxygène et en nutriments, et favorise l'invasion et la dissémination métastatique.

La famille des prolyl hydroxylases sont les senseurs directs de l'hypoxie et vont réguler la stabilité de la protéine HIF1 α (Giaccia et al., 2004). En condition aérobie et en présence de fer, ces enzymes hydroxylent et induisent la dégradation de HIF1 α par la voie VHL/ubiquitine/protéasome (**Figure 42**) (Knudson et al., 1973). L'hypoxie inhibe ces enzymes et conduit à l'accumulation du facteur HIF1 α et sa translocation dans le noyau où il se lie au facteur HIF1 β pour activer la transcription des gènes cibles impliqués dans la réponse à l'hypoxie (Semenza, 2003), dont des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF. Outre sa régulation dépendante de l'oxygène, HIF1 α est aussi régulé au niveau transcriptionnel par les voies de signalisation oncogéniques PI3K/Akt/mTOR et Ras/MAPK (**Figure 21**).

Une grande variété de stimuli angiogéniques émane des cellules tumorales, mais aussi du micro-environnement tumoral. En effet, les cellules tumorales en hypoxie produisent et sécrètent

des facteurs de croissance solubles, des cytokines et des chimiokines qui créent un gradient de concentration pour favoriser la formation de nouveaux vaisseaux.

Deux types de processus amènent à la revascularisation de la tumeur : le processus d'angiogenèse proprement dit qui utilise les vaisseaux pré-existants (**Figure 43A**), et le processus de vasculogenèse qui implique la formation *de novo* de vaisseaux en recrutant des cellules progénitrices qui se différencieront en cellules endothéliales (**Figure 43B**) (Herbert and Stainier, 2011). L'angiogenèse se caractérise par un détachement des cellules endothéliales des cellules péri-vasculaire (péricytes) qui percent le stroma en direction du gradient de facteurs pro-angiogéniques. Le bourgeon vasculaire sera mûré et stabilisé par le recrutement de nouveaux péricytes (Carmeliet and Jain, 2011). La formation *de novo* des vaisseaux se fait par le biais du recrutement de cellules progénitrices endothéliales et des BMDCs (Rafii et al., 2003). D'autres mécanismes de vasculogenèse font intervenir la dé-différenciation des cellules tumorales pour se re-différencier en cellules endothéliales. Les cellules tumorales peuvent elles-mêmes faire partie mécaniquement de la paroi vasculaire, phénomène appelé mimétisme vasculaire (Zhang et al., 2007). Généralement, le réseau vasculaire est altéré avec une perméabilité augmentée qui favorise l'entrée des cellules tumorales invasives dans la circulation sanguine par le processus d'intravasation, et un flux sanguin irrégulier avec parfois une circulation à double sens (Weis and Cheresh, 2005).

Mécanismes d'action

Le bevacizumab (Avastin[®]), un anticorps humanisé ciblant le VEGF-A, un des plus importants facteurs de l'angiogenèse tumorale (McMahon, 2000) a été développé dans le but d'inhiber l'angiogenèse induite par le VEGF (Presta et al., 1997). Actuellement, le bevacizumab est le seul traitement indiqué dans le CCR (Ellis and Hicklin, 2008; Ebos and Kerbel, 2011). Les thérapies anti-VEGF agissent à la fois sur les cellules tumorales et sur les cellules stromales dont les cellules endothéliales. Elles inhibent l'angiogenèse et induisent la régression de la vascularisation déjà établie (Ellis and Hicklin, 2008). De plus, ils peuvent induire la normalisation du réseau vasculaire en limitant la perméabilité et la vasodilatation induite par le VEGF, rendant les vaisseaux plus fonctionnels et augmentant le flux sanguin (Jain, 2005; Duda et al., 2007). Ce processus peut améliorer la délivrance des molécules thérapeutiques au sein de la tumeur (De Bock et al., 2011).

Limite des molécules anti-angiogéniques

Bien que l'efficacité thérapeutique des anti-angiogéniques a été prouvée pour certains patients, un grand nombre de patients reste résistant au traitement (Burris and Rocha-Lima, 2008). De plus, certains patients bon répondeurs présentent une progression tumorale secondaire au traitement anti-angiogénique (Jain et al., 2006). Ces observations caractérisent deux types de résistances aux thérapies anti-angiogéniques : la résistance innée qui caractérise les tumeurs

intrinsèquement résistantes et la résistance acquise, faisant référence à des mécanismes d'adaptation ou d'échappement après une phase initiale de réponse (Bergers and Hanahan, 2008). Dans le cas de la résistance acquise, l'angiogenèse tumorale peut devenir indépendante du VEGF et d'autres facteurs angiogéniques comme le FGF, le PlGF (*Placental Growth Factor*) et les ephrines prennent le relai pour la réactivation de l'angiogenèse. En effet, le blocage du FGF (Casanovas et al., 2005) ou du PlGF (Fischer et al., 2008) empêche la progression tumorale induite secondairement par les anti-VEGF. De manière générale, les mécanismes de résistance reposent sur le fait que l'hypoxie induite par la régression de la néo-vascularisation suite au traitement anti-VEGF induit le facteur HIF1 α qui réactive les mécanismes pro-angiogéniques.

5. Critères cliniques pour évaluer l'efficacité d'un traitement anti-tumoral

Dans le cadre du développement de nouvelles drogues anti-cancéreuses, le bénéfice thérapeutique est évalué sur la base de la réponse tumorale selon des critères d'évaluation que sont la survie globale OS (*Overall Survival*), la survie sans progression PFS (*Progression Free Survival*) et le taux de réponse objective ORR (*Objective Response Rate*).

L'OS correspond au temps écoulé entre le début du traitement (ou randomisation) et la mort, quelle qu'en soit la cause. Dans certains cas, l'OS ne prend en compte que les morts liées au cancer. L'OS reste le critère le plus puissant pour déterminer un bénéfice clinique, basé sur le rapport risque/bénéfice. En général on utilise l'OS à 5 ans, c'est donc le % de patients qui sont encore en vie 5 ans après le diagnostic ou le traitement.

La PFS correspond au temps écoulé entre le début du traitement et une progression tumorale objective ou la mort. Elle évalue la période pendant laquelle des patients traités ont une stabilisation de la maladie. La PFS permet d'apprécier l'activité anti-tumorale potentielle de nouveaux agents anti-cancéreux, qui peuvent agir par un mécanisme d'action non cytotoxique. Contrairement à la survie globale, elle permet d'être évaluée avant la mort des patients.

L'ORR correspond à la proportion de patients avec une réduction de la taille de la tumeur sur une courte période de temps (quelques semaines). Pour ce critère, les patients inclus dans l'étude doivent avoir au moins une lésion mesurable (jusqu'à 10 lésions, représentatives de tous les organes envahis) appelée(s) « lésion(s) cible(s) ». Au début de l'étude, la taille des lésions cibles est mesurée et la somme des plus grands diamètres de chaque lésion servira de mesure de référence pour les mesures ultérieures. L'absence ou la présence d'« autres lésions » non-mesurables définie à chaque mesure des « lésions cibles » et l'apparition de nouvelles lésions sont prises en compte pour la réponse globale (**Figure 44**) (Duffaud and Therasse, 2000). Les réductions considérées par la FDA (*Food and Drug Administration*) sont généralement associées à une réponse partielle (réduction d'au moins 30% du diamètre de la tumeur) ou complète (disparition totale de la tumeur) et reflètent un effet thérapeutique direct.

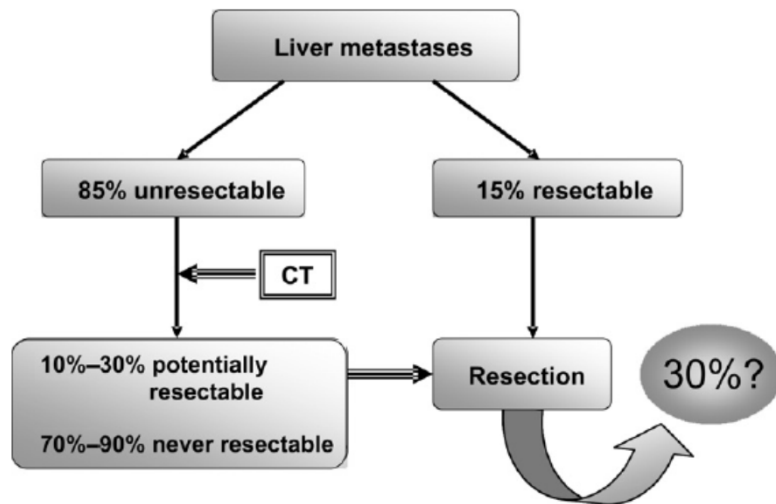


Figure 45: Résection des métastases hépatiques dans le cancer du côlon. Dans 85% des CCR de stade IV, les métastases hépatiques ne sont pas ré sécables. Un traitement de chimiothérapie néo-adjuvante permet de réduire la taille de ces métastases et 10-30% d'entre elles deviennent alors opérables. Néanmoins, le point critique pour la survie du patient est le volume de foie sain restant qui doit être au minimum de 30%.

6. Traitements des cancers non métastatiques

a) Traitement chirurgical

Une fois le diagnostic établi, le patient subit l'exérèse totale de la tumeur avec des marges de côlon sain, et le curage d'au moins 12 ganglions lymphatiques locorégionaux. Cependant, si ce traitement chirurgical est curatif, il reste un fort risque de récurrence particulièrement pour les patients auxquels a été enlevée une tumeur de stade III avec envahissement ganglionnaire, ou une tumeur de stade II ayant un envahissement T4, ou un état peu différencié, une infiltration vasculaire sanguine et/ou lymphatique, un taux élevé de CEA, une invasion.

b) Chimiothérapie adjuvante

La chimiothérapie adjuvante post-opératoire est indiquée pour éliminer les cellules tumorales résiduelles, réduire le risque de récurrence et augmenter l'OS. Le protocole FOLFOX, associant le 5-FU, la LV et l'oxaliplatine, est actuellement le protocole standard pour le traitement post-chirurgical des tumeurs de stades III. Il est recommandé pour les tumeurs de stades II à haut risque. Historiquement, vers la fin des années 1990s, l'association 5-FU/LV avait montré une amélioration de la survie globale des CCR à haut risque (O'Connell et al., 1997). Plus récemment, l'essai MOSAIC (Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-FU/LV in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer) en Europe et l'essai NSABP C-07 aux Etats-Unis a montré que l'addition de l'oxaliplatine au 5-FU/LV (protocole FOLFOX) augmente la PFS chez les patients ayant eu une résection d'une tumeur au stade II/III (André et al., 2004; Kuebler et al., 2007). Par contre, la suite de l'analyse de l'étude américaine a montré que seuls les patients âgés de moins de 70 ans bénéficient d'une augmentation significative de l'OS avec l'oxaliplatine (Yothers et al., 2011), en accord avec une précédente étude montrant l'influence de l'âge (70 ans) sur le bénéfice des traitements adjuvants (Jackson McCleary et al., 2009). D'autre part, le protocole XELOX (ou CAPOX) ajoutant la capecitabine (XELODA®) à l'oxaliplatine, augmente la PFS des patients de stade III et fournit une option supplémentaire pour le traitement adjuvant de ces patients (Haller et al., 2011).

7. Traitements des cancers métastatiques

a) Traitement chirurgical

En plus de l'exérèse de la tumeur primaire, les métastases hépatiques ou pulmonaires confinées peuvent être résectionnées. Néanmoins, bien que cette résection permette d'augmenter la survie à 5 ans de 25-40% contre 0-5% pour les patients non opérables (Fong et al., 1997; Choti et

al., 2002; Nordlinger et al., 2007), seulement ~15-20% des métastases sont résécables (Adam, 2003).

b) Traitement néo-adjuvant

Parfois, une chimiothérapie pré-opératoire (néo-adjuvante) peut réduire la taille des métastases initialement non résécables et rendre leur ablation possible (Folprecht et al., 2005). Néanmoins, seule une faible proportion (10-30%) de patients traités avec une chimiothérapie néo-adjuvante deviendront opérables (Nordlinger et al., 2007). De plus, le critère le plus critique pour la survie de ces patients reste le volume de foie sain restant après résection. Il doit être au minimum de 30% pour éviter une défaillance hépatique, et la présence de plages tumorales dans les marges de résection est associée à un taux de récurrence de 70% (Hughes et al., 1986) (**Figure 45**).

Un exemple prometteur de chimiothérapie néo-adjuvante est la combinaison cetuximab et FOLFIRI, bien tolérée en première ligne de traitement, qui a permis la résection de métastases hépatiques chez un quart des patients impliqués dans l'étude (Raoul et al., 2009).

c) Chimiothérapie adjuvante

Comme pour le traitement des tumeurs non métastatiques, le traitement palliatif des CCR de stade IV utilise la combinaison 5-FU/LV (de Gramont et al., 1997a). Deux approches complémentaires au 5-FU/LV ont été développées et se développent encore actuellement : les chimiothérapies conventionnelles dont l'irinotecan, l'oxaliplatine, et la capecitabine à activité cytotoxique, et les thérapies ciblées dont le cetuximab et le panitumumab qui ciblent une voie oncogénique et le bevacizumab, un anti-angiogénique.

L'association de l'irinotecan au 5-FU/LV (FOLFIRI) a été recommandée en première ligne de traitement des CCR métastatiques ((Köhne et al., 2005; Taïeb et al., 2005) alors que les protocoles FOLFOX (de Gramont et al., 1997b, 2000) et FOLFIRI (Cunningham et al., 1998a; Rougier et al., 1998; Saltz et al., 2000) augmentent la PFS et l'OS des cancers métastatiques en seconde ligne pour des tumeurs réfractaires au 5-FU. Néanmoins, le traitement séquentiel FOLFOX puis FOLFIRI (ou dans l'ordre inverse) n'a pas montré de bénéfice par rapport au protocole FOLFIRI qui reste le protocole standard de première ligne dans les CCR métastatiques (Fischer von Weikersthal et al., 2011).

Le cetuximab et le panitumumab augmentent la PFS des CCR métastatiques mais leur efficacité dépend du statut non muté du gène KRAS (Van Cutsem et al., 2007, 2009; Amado et al., 2008). Le bevacizumab permet également d'améliorer l'OS et la PFS dans le traitement en seconde ligne des CCR métastatiques (Giantonio et al., 2007) mais pas pour les tumeurs de stade II/III (Allegra et al., 2011). Une méta-analyse a validé l'efficacité thérapeutique d'un traitement associant bevacizumab et chimiothérapie conventionnelle, bien qu'il semble nécessaire de traiter

les patients jusqu'à la progression de la maladie pour observer un effet sur l'OS (Cao et al., 2009). En effet, une étude n'a pas pu traiter les patients jusqu'à la progression tumorale à cause des effets secondaires, et seule la PFS, et non l'OS, était significativement augmentée (Saltz et al., 2008).

Les recommandations pour l'utilisation du cetuximab, du panitumumab et du bevacizumab pour les patients atteints d'un CCR métastatique ont été revues par Edwards et al. (2012). Pour les tumeurs EGFR-positives KRAS-non mutées, le cetuximab est recommandé en mono-thérapie ou en combinaison avec l'irinotecan après l'échec d'une première ligne de thérapie basée sur l'irinotecan et l'oxaliplatine. Le panitumumab est recommandé en mono-thérapie après l'échec d'une première ligne de thérapie basée sur les fluoropyrimidines, l'irinotecan et l'oxaliplatine. Pour finir, le bevacizumab est recommandé en combinaison avec une chimiothérapie basée sur les fluoropyrimidines en première et deuxième ligne de traitement.

VIII. Aminopeptidase-N/CD13, une nouvelle cible thérapeutique

1. Structure de CD13

CD13, ou aminopeptidase N, codé en 15q25-26 par le gène ANPEP contenant 20 exons (Lerche et al., 1996), est une glycoprotéine transmembranaire de type II de ~160kDa avec un large domaine extra-cellulaire de 926 aas contenant un atome de zinc (Zn^{2+}), une région transmembranaire de 32 aas et une courte queue cytoplasmique de 9 aas (Riemann et al., 1999) (**Figure 46**). CD13 s'organise en homodimère hautement glycosylé (environ 20% de son poids total) avec au moins 5 sous-populations de CD13 existant selon le site de glycosylation et la composition en oligosaccharides (O'Connell et al., 1991; Norén et al., 1997). CD13 est une métallopeptidase dépendante du zinc, son domaine extracellulaire comprenant une séquence pentapeptide (HELAH, en position aas 388 à 392) nécessaire à la liaison du zinc et à l'activité catalytique (Devault et al., 1988; Ashmun et al., 1992). Une forme soluble dépourvue des 58 aas N-terminaux et ayant une activité enzymatique intacte a été détectée dans le lait maternel, dans le sérum (Watanabe et al., 1998) et dans les fluides intra-tumoraux (van Hensbergen et al., 2002). Cette forme soluble aurait un rôle de dominant négatif de la forme membranaire de CD13 (Mina-Osorio et al., 2008). Bien que les mécanismes impliqués dans la production de cette forme soluble ne soient pas connus, on peut imaginer qu'elle soit sécrétée par les cellules ou libérée par clivage de la forme membranaire.

2. Mécanismes d'action de CD13

A ce jour, trois fonctions ont été identifiées pour CD13 : une fonction enzymatique, une fonction de récepteur, et une fonction de signalisation. Si certains processus cellulaires régulés par

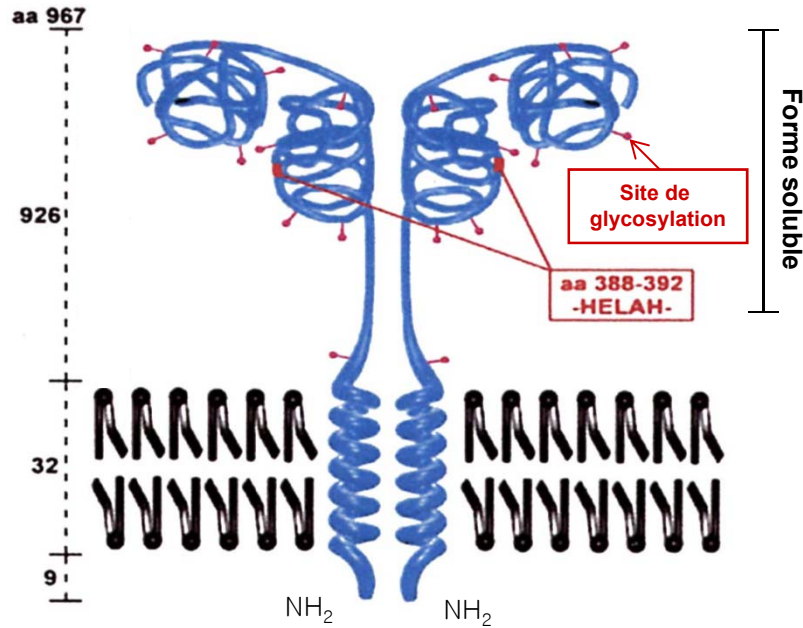


Figure 46: Structure de l'aminopeptidase N/CD13. CD13 est une protéine transmembranaire qui comprend un large domaine extra-cellulaire de 926 aas contenant 10 sites de glycosylation, un domaine transmembranaire de 36 aas et une courte queue cytoplasmique de 9 aas en N-terminal. Les aas 388 à 392 constituent le domaine HELAH sur lequel se fixe l'atome de zinc, nécessaire pour l'activité catalytique de l'enzyme.

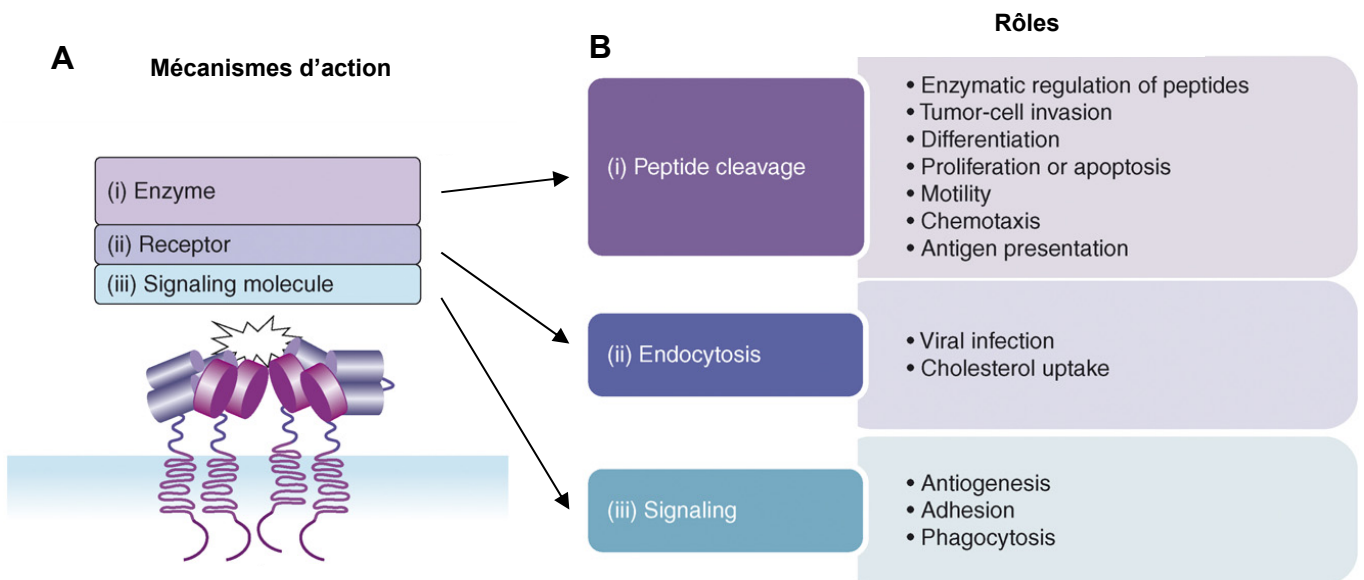


Figure 47: Fonctions associées aux 3 mécanismes d'action de CD13. CD13 agit en tant qu'enzyme, récepteur et molécule de signalisation. Ces trois mécanismes d'action sont interconnectés et sont impliqués dans la régulation enzymatique de peptides, l'invasion tumorale, la différenciation, la prolifération/apoptose, la motilité, le chimiotaxisme, la présentation d'antigène, l'infection virale, la consommation de cholestérol, l'angiogenèse, l'adhésion inter-cellulaire et la phagocytose.

CD13 ne font intervenir qu'une seule de ces fonctions, la plupart résultent de la coopération de 2 ou des 3 de ces fonctions (**Figure 47**). Afin de préciser la contribution de la fonction enzymatique dans les fonctions induites par CD13, différents anticorps monoclonaux de CD13 ont été testés. Ces anticorps peuvent être classés en fonction de leur forte (WM-15), modérée (dont MY-7) ou faible (dont SJ-ID1) capacité à inhiber l'activité enzymatique (Favaloro, 1991).

a) CD13, une aminopeptidase

L'activité exopeptidase de CD13 catalyse le clivage des aas hydrophobes N-terminaux de petits peptides (Gee and Kenny, 1985), et préférentiellement les aas neutres tels que l'alanine, la phénylalanine, la tyrosine et la leucine (Hooper, 1994). Néanmoins, comme CD13 ne peut cliver que de petits peptides, il requiert parfois la coopération d'autres protéases pour métaboliser ces substrats (Proost et al., 2007).

b) CD13, un récepteur

Outre sa fonction enzymatique, CD13 agit également comme récepteur et, suite à la fixation d'un ligand sur son domaine extra-cellulaire le complexe CD13/ligand est internalisé. Ce mécanisme d'endocytose utilise les cavéoles, invaginations membranaires riches en cholestérol, sphingomyéline et cavéoline et est utilisé par le coronavirus pour son entrée dans la cellule hôte (Nomura et al., 2004). De plus, CD13 permet l'absorption du cholestérol au niveau de la bordure en brosse intestinale puisqu'il a été montré que CD13 est la cible de l'Ezetimibe, un inhibiteur de l'endocytose du cholestérol par les cavéoles, indépendamment de la fonction enzymatique (Kramer et al., 2005).

c) CD13, un régulateur de signalisation

Enfin, CD13 agit en tant que molécule de signalisation qui peut être à la fois dépendante ou indépendante de la fonction enzymatique (Santos et al., 2000). Cependant, à cause de sa courte région intra-cellulaire, sans motif connu, il est peu probable que la fonction de signalisation soit intrinsèque à CD13 et il est suggéré que CD13 coopère avec des protéines « auxiliaires » pour réguler la transduction des signaux extra-cellulaires (MacIntyre et al., 1989; Mina-Osorio and Ortega, 2004).

3. Fonctions régulées par CD13

Si les fonctions régulées par CD13 sont très diverses et participent à des processus cellulaires clés comme la prolifération/différenciation, l'apoptose et l'invasion tumorale (Mina-Osorio, 2008), elles dépendent généralement du type cellulaire dans lequel CD13 est exprimé.

a) Expression de CD13 dans les différents types cellulaires

CD13 est considéré comme un marqueur de la lignée myéloïde avec une expression dans les monocytes, les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques (Look et al., 1989). Toutefois, certaines études viennent nuancer ce postulat puisque Taussig et al., (2005) ont montré que CD13 est également exprimé par des cellules souches hématopoïétiques (Taussig et al., 2005). De même, CD13 est exprimé par d'autres types cellulaires comme par les cellules épithéliales de la bordure en brosse rénale et intestinale ou par des fibroblastes (Semenza, 1986). CD13 est aussi exprimé à la surface des cellules endothéliales de vaisseaux angiogéniques alors qu'il est absent du réseau vasculaire sain (Pasqualini et al., 2000; Bhagwat et al., 2001). Deux types de promoteurs ont été mis en évidence, donnant deux transcrits de taille différente mais conduisant à une même protéine. Un des promoteurs génère un transcrit de 3,7 kb qui est spécifique de la lignée myéloïde et des fibroblastes et l'autre génère un transcrit plus petit de 3,4 kb qui est spécifiques des autres types cellulaires (Shapiro et al., 1991).

b) Substrats de CD13 selon le type cellulaire

Dans la bordure en brosse intestinale, CD13 assure la dégradation finale des petits peptides préalablement hydrolysés par des protéases gastriques et pancréatiques (Turner, 1986). Dans les membranes synaptiques du système nerveux central, son activité enzymatique inactive des neuropeptides comme les enképhalines et les endorphines (Matsas et al., 1985). Dans les cellules mésangiales rénales, un type particulier de péricytes, CD13 est responsable de la conversion de l'angiotensine III en l'angiotensine IV dans le système rénine-angiotensine-aldostérone, en clivant l'arginine en N-terminal (Chansel et al., 1998). De plus, CD13 est exprimé dans les cellules musculaires lisses vasculaires où il métabolise l'angiotensine systémique (Ward et al., 1990), et dans les cellules musculaires lisses aortiques, CD13 hydrolyse des peptides comme les bradykinines, impliqués dans la vasodilatation (Fortin et al., 2005). Par conséquent, CD13 contrôle la pression sanguine et joue un rôle protecteur vis-à-vis de l'hypertension artérielle (Danziger, 2008). Dans les cellules du lignage myéloïde, CD13 est impliqué dans le chimiotactisme puisqu'il cible des cytokines comme les interleukines IL- α , IL- β et IL-2 (Hoffmann et al., 1993) et des chimiokines comme CXCL11 (Proost et al., 2007). La dégradation de CXCL11 par CD13, qui nécessite une première troncation des 2 aas N-terminaux par la dipeptidylpeptidase

(DPP) IV, réduit les capacités de CXCL11 à attirer les lymphocytes et les cellules NK (*Natural Killer*) au site tumoral ou inflammatoire, et inhibe la migration des cellules endothéliales dans l'angiogenèse (Proost et al., 2007). Par ailleurs, CD13 est capable de digérer des protéines de la matrice extra-cellulaire, dont le nidogène (Menrad et al., 1993) et le collagène IV (Saiki et al., 1993) et cette fonction est associée au potentiel invasif de cellules métastatiques qui sur-expriment CD13.

c) CD13 et adhésion inter-cellulaire

CD13 est également impliqué dans l'adhésion inter-cellulaire homotypique et hétérotypique. En effet, CD13, exprimé dans les mélanomes mais non par les mélanocytes sains, est retrouvé à la membrane en étroite interaction avec la matrice extra-cellulaire, et l'inhibition de l'activité enzymatique de CD13 par la bestatine, bloque les propriétés invasives d'une lignée métastatique de mélanome (Menrad et al., 1993). Une autre étude utilisant un anticorps monoclonal n'affectant pas l'activité enzymatique de CD13 a induit l'agrégation homotypique de monocytes (Mina-Osorio et al., 2006) et le mécanisme sous-jacent dépend de la galectine-3, un substrat de CD13 (Mina-Osorio et al., 2007). Enfin, l'expression de CD13 peut être induite dans les lymphocytes suite à une interaction avec des cellules endothéliales, épithéliales, fibroblastiques ou des monocytes (Riemann et al., 1997; Kehlen et al., 2000). De même, CD13 a été impliqué dans des interactions hétérotypiques entre les monocytes et les cellules endothéliales pour participer à la migration trans-endothéliale de cellules inflammatoires (Mina-Osorio et al., 2008).

d) CD13 et néo-angiogenèse

L'expression de CD13 exclusivement par les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux a été mise en évidence par des expériences de criblage de peptides exprimés à la surface de phages capable de cibler une tumeur. Le phage portant le peptide NGR (asparagine-glycine-arginine) a montré une sélectivité pour les cellules endothéliales tumorales *in vivo*, et CD13 a été identifié comme son récepteur (Pasqualini et al., 2000). Ces mêmes auteurs ont montré que CD13 est exprimée uniquement à la surface des cellules endothéliales associées à un processus angiogénique comme dans les vaisseaux tumoraux ou du corps jaune, mais est absent de tous les vaisseaux de tissus normaux. Une autre étude a montré que l'expression de CD13 est induite par l'hypoxie et plusieurs facteurs angiogéniques comme le VEGF, le bFGF et le TNF α . De même, le ciblage de CD13 par des inhibiteurs bloque la morphogenèse endothéliale (Bhagwat et al., 2001). Enfin, des souris invalidées pour le gène ANPEP codant CD13 n'ont présenté aucune anomalie de développement ni de problème à l'âge adulte alors que dans un modèle de rétinopathie induite par une déprivation en oxygène, ces souris présentent une sévère déficience de la néo-vascularisation

rétinienne, confirmant l'implication de CD13 uniquement dans l'angiogenèse associée à une pathologie (Rangel et al., 2007).

e) CD13, marqueur de cellules souches cancéreuses

Récemment, CD13 a été identifié comme un marqueur de cellules souches cancéreuses (CSC) dans une lignée cellulaire cancéreuse hépatique et dans des tumeurs de patients et l'inhibition de CD13 entraîne la suppression des capacités d'auto-renouvellement et de dormance de ces CSCs (Haraguchi et al., 2010).

f) CD13 et stress cellulaire

CD13 pourrait réduire la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) induites par des traitements générant des dommages à l'ADN (chimiothérapie génotoxique, radiothérapie), et conférer des propriétés anti-apoptotiques (Haraguchi et al., 2010).

g) CD13 et invasion tumorale

Si toutes ces fonctions suggèrent l'implication de CD13 dans les processus tumoraux, le rôle de CD13 dans l'invasion tumorale a été démontré par différentes approches. Des données *in vitro* ont montré que le facteur angiogénique bFGF favorise le processus d'invasion de cellules de mélanomes via l'induction de CD13 (Fontijn et al., 2006). Par ailleurs, CD13 induit la migration de cellules endothéliales (Mina-Osorio et al., 2008) grâce à sa fonction de récepteur et de régulateur des signaux conduisant à la formation de filopodes par cdc42 (Petrovic et al., 2007).

4. Expression dans les tumeurs humaines

L'expression de CD13 est altérée dans plusieurs types de cancers. De manière générale, l'expression et l'activité enzymatique de CD13 sont augmentées et associées à une néo-angiogenèse (Tokuhara et al., 2006), à une perte de différenciation (Kehlen et al., 2003), au développement de métastases (Kawamura et al., 2007) et à un mauvais pronostic de survie, comme dans le cancer colique (Wickström et al., 2011). Néanmoins, une analyse transcriptionnelle réalisée sur une population danoise a montré une corrélation inverse entre le niveau d'expression de CD13 et la progression de tumeurs coliques (Birkenkamp-Demtroder et al., 2002).

5. Cible thérapeutique

a) CD13 en tant que cible thérapeutique

De part la diversité de ses fonctions, CD13 est considéré comme une importante cible thérapeutique. A ce jour, plusieurs inhibiteurs ont été développés, que ce soit des inhibiteurs naturels comme la bestatine (Ubenimex[®]) ou des antibiotiques comme l'actinonine (Bauvois and Dauzonne, 2006). L'efficacité de la bestatine pour inhiber l'angiogenèse a été démontré dans des xénogreffes orthotopiques de mélanome (Aozuka et al., 2004). D'autre part, l'effet anti-métastatique d'une inhibition de CD13 affecte à la fois les cellules endothéliales et les cellules tumorales via une inhibition de la migration (Saitoh et al., 2006). Enfin, la combinaison d'un inhibiteur de CD13 comme la bestatine avec un anti-métabolique comme le 5-FU, entraîne une diminution de la croissance d'hépatocarcinomes xénogreffés de façon plus efficace qu'en monothérapie (Haraguchi et al., 2010).

b) Le système CD13/NGR pour la délivrance des drogues thérapeutiques

Plusieurs études ont montré que le motif peptidique NGR est un ligand de CD13 qui cible les cellules vasculaires tumorales de manière hautement sélective (Pasqualini et al., 2000). Si CD13 est exclusivement exprimé à la surface des cellules endothéliales tumorales, mais pas à la surface des cellules endothéliales normales, CD13 est toutefois exprimé par d'autres types cellulaires. Curnis et al. (2002) ont montré que les cellules épithéliales, myéloïdes et lymphocytaires normales expriment des isoformes de CD13 différents de ceux exprimés à la surface des cellules au sein de la tumeur et qui ont une affinité plus faible pour le NGR. Par conséquent, cette différence d'affinité explique pourquoi le NGR est capable de cibler spécifiquement les cellules endothéliales tumorales exprimant CD13, sans affecter les cellules saines.

Le couplage de diverses molécules thérapeutiques (comme les composés cytotoxiques à base de sels de platine, la doxorubicine (un inhibiteur des topoisomérase de type II), le TNF α) au peptide NGR, a été développé comme approche thérapeutique pour cibler un site tumoral. A ce jour, plusieurs de ces associations font l'objet d'essais cliniques de phase I et II (Wickström et al., 2011).

OBJECTIFS

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Au sein de l'équipe d'accueil, le groupe dirigé par le Dr Dominique GUENOT travaille autour de deux axes de recherche : la recherche de marqueurs moléculaires de progression et le développement de nouvelles combinaisons de drogues thérapeutiques pour le traitement du cancer du côlon.

Mon travail s'est orienté vers la mise en place d'approches *in vivo* et *in vitro* ayant deux objectifs :

- **l'identification de marqueurs moléculaires permettant de comprendre les mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression tumorale. Dans ce contexte, j'ai étudié en particulier, les conséquences de la perte d'expression des gènes E2F2 et ID3 sur des paramètres connus pour participer à la progression tumorale, comme la prolifération, la migration et la dissémination des cellules.**

- **proposer des nouvelles stratégies thérapeutiques qui prendront en compte l'hétérogénéité intra- et inter-tumorale, puis identifier les mécanismes moléculaires ciblés par les drogues. Dans ce contexte, je me suis intéressée à une potentielle cible thérapeutique, l'aminopeptidase N ou CD13, décrite pour participer à la néo-angiogenèse via la morphogenèse des tubes capillaires.**

CHAPITRE I

CHAPITRE I : Etude fonctionnelle des facteurs de transcription E2F2 et ID3 comme marqueurs de progression tumorale dans le cancer colique humain

RATIONNEL DE L'ETUDE

Une analyse du génome à grande échelle utilisant la technique de CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) sur puces oligonucléotidiques a été réalisée sur une cohorte d'adénomes et de tumeurs coliques et a mis en évidence, parmi d'autres altérations chromosomiques, la délétion de la région p36.12 du chromosome 1 dans 23% des adénomes et 47% des carcinomes coliques humains de phénotype CIN (*Chromosome Instable*). Dans cette zone se trouvent peu de gènes dont la fonction est connue. Parmi ces gènes, le facteur de transcription E2F2 a été retenu en raison de son implication dans la voie pRB/E2F qui régule la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Dans la littérature, les gènes E2Fs sont décrits, *in vitro* et *in vivo*, comme ayant des propriétés oncogéniques et de suppresseurs de tumeur, selon le type cellulaire et le contexte génétique. Dans le côlon gauche spécifiquement, nous avons montré par une analyse de *Kaplan-Meier*, que la délétion génomique de E2F2 est un facteur de bon pronostic de survie sans progression par rapport aux patients ayant une tumeur sans délétion. Cependant, si l'expression du transcrite codant E2F2 est également diminuée dans les tumeurs coliques humaines, nous n'avons pas trouvé de corrélation directe entre la perte génomique, la sous-expression transcripionnelle et protéique. Ces observations ont fait l'objet d'un premier article (**Publication n° 1** : Nicolet C et al., en soumission). Afin de mieux cerner l'implication des gènes ciblés par la micro-délétion en 1p36.12, une analyse a été étendue au facteur de transcription ID3 dont le gène est le voisin direct de E2F2.

OBJECTIFS

Sur la base de ces observations, deux objectifs ont été définis pour mon doctorat :

- 1) Evaluer l'impact fonctionnel *in vitro* de la sous-expression transitoire des 2 gènes E2F2 et ID3 ciblés par la micro-délétion sur les capacités prolifératives et invasives d'une lignée de cellules coliques humaines
- 2) Evaluer l'impact *in vivo* de cellules sous-exprimant stablement ces gènes, sur la croissance et le potentiel métastatique chez la souris immunodéprimée

RESULTATS

PUBLICATION 1

Résultats principaux

L'analyse génomique globale réalisée sur 110 adénomes et 58 carcinomes du côlon distal a mis en évidence une micro-délétion de 0,7 Mpb sur le chromosome 1 au locus p36.12. La délétion d'un gène localisé dans la région délétée, E2F2, a été validée par qPCR sur une cohorte élargie de 183 tumeurs distales et proximales de phénotype CIN. Une analyse multivariée par le modèle de Cox a montré que cette délétion génomique est un facteur indépendant de bon pronostic de la survie sans progression des patients. De façon intéressante, l'incidence de la délétion augmente entre le stade d'adénome et les stades précoces (Tis-II) pour ensuite diminuer de façon importante dans les stades métastatiques (III et IV).

Afin de mieux caractériser la délétion, une approche de *Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments* (QMPSF) a montré qu'un seul des deux allèles est délété, et le séquençage que l'allèle restant n'est pas muté. L'analyse semi-quantitative par RT-qPCR a montré une diminution de l'expression du transcrit E2F2 qui n'est significative que dans les tumeurs issues du côlon distal. D'autre part, l'expression des gènes E2F1 et E2F3 ne permet pas de compenser la perte du gène E2F2. Enfin, dans certaines tumeurs pour lesquelles il n'y a pas de corrélation entre le statut génomique délété et une perte transcriptionnelle, la perte d'expression du gène E2F2 n'est pas due à une méthylation des îlots CpG du promoteur du gène ; par contre la sur-expression de deux miRNA, miR-106b et miR-34a connus pour réguler l'expression du gène E2F2 pourrait expliquer la baisse d'expression dans ces tumeurs.

Par conséquent, la micro-délétion en 1p36.12, comportant entre autres, le gène E2F2, participerait à la progression des tumeurs aux stades précoces de la carcinogenèse mais, à des stades plus tardifs, protégerait de la dissémination métastatique.

Impact of E2F2 gene loss in human chromosome unstable colon carcinomas

Céline Nicolet^{1#}, Manon Voegelin¹, Eric Guérin^{1,2}, Laetitia Marisa³, Agnès Neuville^{1,4} Jean-Michel Flaman⁵, Cécile Brigand⁶, Marie-Pierre Gaub^{1,2} and Dominique Guenot^{1*}.

¹ Inserm, U682, Strasbourg; UMR-S682, Université Louis Pasteur, Faculté de Médecine, Strasbourg, F-67200 France;

² Laboratoire de Biologie Moléculaire et Biochimie, CHRU Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, F-67200 France

³ Programme Cartes d'Identité des Tumeurs, Ligue Nationale Contre Le Cancer, Paris, France

⁴ Service d'anatomo-pathologie, CHRU Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, F-67200 France

⁵ Inserm, U614, Faculty of Medicine, Department of Genetics, University Hospital Rouen, F-76183 France

⁶ Service de chirurgie digestive, CHRU Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, F-67200 France

Present address: IRCM - U896 INSERM, Université de Montpellier 1, Montpellier, France

*** To whom correspondence should be addressed:**

Phone: 03 88 27 53 62

Fax: 03 88 27 53 62

Mail : dominique.guenot@inserm.fr

Abstract

Genome-wide analysis identified a micro-deletion in chromosome 1p36.11-12 in human proximal and distal colon adenomas and carcinomas. This 0.7-Mbp-long region encodes the transcription factor E2F2, part of the E2F family of genes, which act downstream of growth factor signalling cascades and play a central role in cell growth and proliferation. The 1p36.11-12 deletion was observed in 23% and 47% of adenomas and carcinomas, respectively, and an accompanying decrease in copy number of the E2F2 gene was demonstrated. QMPSF analysis identified the loss of one copy of the gene, while exon sequencing and promoter methylation investigations did not detect any alterations of the remaining copy. Measurement of E2F2 transcript in carcinomas indicated a significant decrease in expression in distal carcinomas only. However, this decrease was independent of the genomic status ($p=0.5$). For tumors with unaltered gene copy number but reduced transcript expression, we found a significant overexpression of the mir-126a and mir-34a. On the other hand, expression of the transcripts of two other members of the E2F family, E2F1 and E2F3a, suggested that no compensatory mechanism operated between the three family members. Analysis of prognostic outcome based on the 1p36.11-12 deletion and E2F2 gene copy number showed that patients with the deletion in distal carcinomas showed a lower rate of recurrence and better overall survival than patients with proximal carcinomas displaying normal E2F2 gene levels (Log Rank Test: $p=0.025$). Multivariate analysis with a Cox proportional hazards regression test showed deletion of E2F2 as an independent prognostic factor for progression-free survival ($p=0.027$).

In conclusion, the genomic deletion of E2F2 could provide prognostic value in human distal colon carcinomas.

Key words: cell cycle – transcription factors – miRNA

Introduction

Colon cancers (CC) are classified as displaying either the microsatellite instability phenotype (MIN), which results from alterations of mismatch repair genes, or the chromosomal instability phenotype (CIN), which largely presents as aneuploidy [1]. Tumourigenesis in CIN CC has been extensively studied and can be viewed as a multi-step process, with each step representing specific gene mutations and/or epigenetic changes [2]. Numerous studies have supported the hypothesis that the progression from adenoma to carcinoma results from the accumulation of genetic alterations involving activation of oncogenes and inactivation of tumour suppressor genes. A comprehensive meta-analysis of these studies comprising a total of 859 cancers enabled the assignment of specific gain and loss events to specific tumour progression and Dukes' stages [3].

Despite the current understanding of the molecular and cellular mechanisms underlying the adenoma-carcinoma progression and the metastasis process, the vast majority of genetic factors that predispose an individual to CC remain unknown. The lack of prognostic markers might be due to analyses of tumour collections that do not discriminate between CIN and MIN phenotype samples or between different anatomical locations, as well as a result of inter- and intra-tumour heterogeneity. Thus, identification of biomarkers of progression remains a major focus in CC research.

In the present work, the genomic profiles of alterations linked to the adenoma-carcinoma transition and/or the metastasis process were analysed using a pan-genomic Comparative Genomic Hybridization array (aCGH). This approach permitted the detection of genomic deletions and amplifications at a high level of resolution [4] in adenomas and colon carcinomas, all of which displayed the CIN phenotype. Among the alterations identified, a micro-deletion at the 1p36.11-12 region was observed in both adenomas and carcinomas, suggesting that genes located at this site might be involved in CC carcinogenesis.

Previous studies have shown that about 50% of colorectal carcinomas display a full deletion of 1p [5-8] or a local deletion at the 1p36 band, which has been more specifically identified as an early event [9] and is associated with aneusomy [10], poor prognosis [11-12] and metastasis [13-14]. The functional importance of distal 1p in colorectal tumourigenesis was demonstrated by Tanaka et al. Their study introduced a chromosome fragment containing 1p34-36 into human colon carcinoma cells implanted into athymic nude mice and observed that this fragment led to suppression of tumorigenicity [15]. Among the genes present within the 1p36.11-12 region, a gene that might be relevant to carcinogenesis is E2F2, a transcription

factor that controls transcription of genes implicated in DNA replication, differentiation, and cell cycle progression [16].

The E2F family is comprised of eight different members (E2F1-8) and can be divided into activating (E2F1-3a) and repressing (E2F3b-8) E2Fs. The protein activity of E2Fs is dependent on their dimerisation with DP proteins, as well as their interaction with the pocket proteins pRb, p107 or p130 [17]. Despite the wealth of data about E2F, there remains a disagreement as to the actual role of these factors in carcinogenesis, as they can act as either oncogenes or tumour suppressor genes [18]. E2F2 mutant mice show defects in the proliferative properties of haematopoietic cells, with an increase in antigen dependent proliferation of T cells that leads to leukaemia and autoimmune lupus-like disease [19-20]. On the other hand, overexpression of E2F2 induces quiescent cells to enter the cell cycle and develop oncogenic activity in primary murine fibroblasts [21-22].

This study shows that the genomic loss of E2F2 within the 1p36.11-12 deleted region occurs as early as the adenoma stage. Further, we show that the rate of E2F2 loss increases during transition to carcinoma and that this loss protects against metastasis spreading and relapse, as the deletion was associated with overall disease-free survival.

Materials and Methods

Tissue collections

Human samples of 110 colon adenomas, 183 colon carcinomas and their matched normal mucosa from proximal and distal origins were obtained from patients who underwent surgery at the University Hospital of Strasbourg, under the institutional review of the French Ethics Committee. Patients were recruited between 1997 and 2007. The anatomic-pathological characteristics of the tumours are described in **Table 1**. None of the patients received preoperative chemotherapy. Clinical staging and the percentage of tumour cells were assessed by an experienced histopathologist and complete clinical data for 36 months, including outcome, were collected for 90 patients. Genomic DNA was extracted from liquid-nitrogen-frozen samples using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen).

aCGH

For the aCGH experiment, 110 proximal and distal adenomas and 58 distal carcinomas of all clinical stages were studied as previously described (selected from the 186 carcinomas and

containing the 39 carcinomas previously studied by aCGH (23). To ensure sufficient sensitivity, only samples containing more than 40% tumour cells were selected.

The statistical analysis was performed using the Circular Binary Segmentation Algorithm (24) and the False Discovery Rate (FDR) method (25) as previously described (23).

Real time relative quantitative PCR

DNA copy numbers of E2F2 gene, relative to the reference gene β -globin (HBB), were determined using the LightCycler PCR system (Roche Molecular Biochemicals) and the dsDNA-binding dye SYBR Green I (FastStart DNA Master Mix SYBR Green I, Roche Diagnostics). The primers used were: E2F2 forward 5'- gggtcctttcttcttcagc-3'/E2F2 reverse 5'- gttgttcttggccttcttgc-3'/HBB forward 5'-acacaactgtgttcactagc-3'/ HBB reverse 5'- caactcatccacgttcacc-3'. The PCR reaction was performed as already described (23). Target cDNA expression was quantified using the comparative Ct method.

Sequencing

Carcinomas with (n=21) and without (n=14) deletions of E2F2 and the associated normal mucosal samples were sequenced. A PCR amplification of E2F2 gene exons 1 to 8 was performed using sense and anti-sense primers (**Supplementary Table 3**). PCR reactions were performed using 50 ng of genomic DNA in a final volume of 50 μ l with 50 μ M of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U of Gold Taq DNA polymerase (Applied Biosystems), PCR buffer 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.3/50 mM KCl) and 0.2 μ M of each primer. The touchdown PCR consisted of 5 cycles of 93°C for 1 min, 65°C for 30 s, and 72°C for 1 min 30 s, followed by 5 cycles with a hybridisation step at 60°C then 58°C and to finish 30 cycles with a hybridisation step at 55°C. The initial denaturation step consisted of 10 min at 94°C and the final extension consisted of 10 min at 72°C. The DNA amplification products were separated by gel electrophoresis, purified using a Microcon PCR filter unit kit (Microcon®, Millipore) and were then directly sequenced in both directions using the BigDye sequencing kit v3.1 and a 3100 automated sequencer, following the manufacturer's instructions (Applied Biosystems).

RT-QPCR

First, 2 μ g of total RNA from 44 tumours (18 proximal and 26 distal tumours) and 36 normal mucosa (16 proximal and 20 distal) were reverse transcribed into cDNA using AMV reverse transcriptase (Fynnzymes) in a total volume of 30 μ l (Table 1). Quantitative-PCR analysis

was performed using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) in 10 μ l final volume, using the LightCycler 1.0 PCR system (Roche Molecular Biochemicals) with the Light Cycler Faststart DNA Master HybProbe master mix. Each gene expression assay consists of a FAM dye-labelled Taqman MGB probe (250 nM) and two PCR primers (900 nM each) specific to E2F1, E2F2, E2F3a (Hs00153451_m1 for E2F1, Hs00231667_m1 for E2F2, Hs00605457_m1 for E2F3a). For each sample, 1.5 μ l of cDNA was analysed for expression of the target genes, compared to the housekeeping gene TBP (Human TBP Endogenous Control Gene Expression Assay, Applied Biosystems), with cycling conditions as follows: denaturation at 95°C for 8 min followed by 45 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 45 s. Target cDNA expression was quantified using the comparative Ct method and all analyses were performed at least twice.

miRNA expression

miRNA expression was analyzed in tumors and paired normal mucosa from patients with CIN distal colon carcinoma already characterized for their genomic and transcriptional status of E2F2 by quantitative PCR and RT-QPCR as described above. Thirteen tumors with a normal number of gene copy and a down-regulation of E2F2 expression were chosen for this analysis. miRNA expression was assessed using the miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen). Briefly, 2 μ g of miRNA were selectively poly-adenylated and retro-transcribed using the miScript II RT Kit with oligo-dT primers which have a 5' universal tag sequence. PCR was performed in a 10 μ l final volume containing 5 μ l of 2x Quantitect SYBR Green PCR Master Mix, 1 μ l miScript Universal Primer (reverse primer targeting the 5' universal tag sequence), 1 μ l of forward primers allowing the specific amplification of miR-106a (MS00003395), miR34-a (MS00003318), miR-24 (MS00006552) and miR-29b (MS00006566), and 2 μ l of cDNA diluted at 1/15^e. After 13 min at 95°C, the PCR consisted of 45 cycles of 95°C for 15 s, 55°C for 20 s and 72°C for 20 s followed by melting curve analysis. All quantifications were done in duplicate and normalized with respect to the endogenous U1A small nuclear RNA (RNU1A) (MS00013986). Target cDNA expression was quantified using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ cycle threshold method.

Statistical analysis

Associations between the different alterations were tested by Pearson's Chi2 test or Fisher's exact test. Event-free survival was determined as the interval between surgery and the detection of the first relapse / event or the patient's death. Event-free survival attributable to

E2F2 genomic status for patients carrying a carcinoma in the proximal or distal part of the colon was plotted using Kaplan Meier estimates and compared to the Log-rank test. Only *p* values lower than 0.05 were regarded as statistically significant. To assess the independence of the predictive value of E2F2 genomic status, the Cox proportional hazards model with a stepwise backward method was used with adjustment for confounding variables. The final model included the localisation of the tumour (proximal *vs.* distal), the sex (female *vs.* male), the age at surgery, the global alteration frequency determined by allelotyping (High *vs.* Low *vs.* Very-Low (26), E2F2 genomic status (deleted *vs.* normal), E2F1 genomic status (amplified *vs.* normal), APC genomic status (altered *vs.* normal) and TP53 genomic status (altered *vs.* normal). All statistical analyses were performed with the Statistical Package for Social Sciences software (SPSS for Windows version 11.5).

To evaluate under- or over-expression of genes in tumour samples, a moderated *t*-test (R package Limma [27]) was performed between tumour and mucosal data, and *p*-values were corrected for multiple testing by the Benjamini & Hochberg method (25). To define under- and over-expression status for samples of E2F2 gene, values were discretised as follows: if the given probeset log₂ intensity of the sample was superior/inferior to the median log₂ intensity of mucosal samples ± 1.5 mad (median absolute deviation), the gene was considered up/down-regulated in the sample.

RESULTS

D) 1p36.11-12 genomic micro-deletion

Data from CGH array

A total of 110 adenomas, from both proximal and distal origins, and 58 CIN colon carcinomas of distal origin were used to investigate chromosomal aberrations via aCGH analysis (**Table 1**). Among numerous aberrations (data not shown), a 0.7 Mb long micro-deletion at the 1p36.11-12 genomic region was identified as statistically significant in 25 of the 110 adenomas (23%, $p < 0.001$, FDR 5%) and 27 of the 58 carcinomas (47%, $p < 0.001$, FDR 5%). Approximately 10 genes have been mapped to this particular genomic region (**Supplementary Table 1**) and among these genes, several are involved in cellular machinery, and one of these, E2F2, is of particular interest. Those adenomas harbouring the deletion were mostly low-grade tubular and tubulovillous adenomas from distal regions of the colon. Considering only the 1p36.11-12 deleted carcinomas, all clinical stages were represented,

with 50% of the samples representing early stage tumours (13/26; stages 0/I/II) and 44% representing late stage tumours (14/32; stages III/IV).

Data from real time PCR

To evaluate involvement of the E2F2 gene in carcinogenesis, E2F2 gene copy number was evaluated by real time quantitative PCR (QPCR) on a cohort of 183 CIN colon carcinomas. This sample set contained 84 proximal and 99 distal carcinomas (including the aCGH cohort, **Table 1**). All carcinomas containing the 1p36.11-12 deletion detected by the aCGH analysis displayed a decrease in E2F2 gene copy number, as compared to the HBB gene copy number. Overall, the decrease in E2F2 gene copy number was observed in 72 of the total 183 carcinomas (39%). No localisation was observed to be predominant, as 32 of the 84 proximal carcinomas (38%) and 40 of the 99 distal carcinomas (40%) displayed decreased E2F2 gene copy numbers ($p=0.561$, **Table 2**). Moreover, no specific clinical stage could be assigned to the deletion ($p=0.799$). Interestingly, although the proportion of carcinomas bearing the E2F2 deletion increased from 18% in proximal and 27% in distal adenomas to a maximum of 50% in stage II in proximal and 58% in stage I in distal carcinomas, this incidence decreases importantly in latter stages to achieve 38% in proximal and 34% in distal carcinomas (**Figure 1**).

II) Prognostic relevance of the E2F2 genomic deletion

Because of the decreased occurrence of E2F2 deletion as the disease progresses, we evaluated the possible prognostic relevance of the E2F2 genomic deletion on patient event-free survival after exclusion of metastatic stages (stages Tis/I/II/III only). Clinical follow up data were available for 55 proximal and distal carcinomas and survival was analysed by the Kaplan-Meier method. As shown in **Figure 2**, the E2F2 genomic deletion was significantly associated with better event-free survival for patients with distal, but not proximal, CIN colon carcinomas (Log Rank Test: $p=0.025$; Cox regression model: hazard ratio (HR)=0.134, 95% confidence interval (CI)=0.023-0.794, p value=0.027).

Thus the genomic deletion of E2F2 could provide prognostic value in human distal colon carcinomas.

III) Analysis of the E2F2 gene

QMPSF

The aberration identified by the aCGH analysis and confirmed by QPCR did not provide information concerning loss of one or two copies of the gene. Thus, we performed QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments; **Supplementary methods**) specific to exons 1 and 3 of the E2F2 gene on 25 carcinoma samples to further investigate this deletion. Two other genes located close to E2F2, RPS6KA1 (3 Mb away from E2F2) and PIK3CD (14 Mb away from E2F2), were also studied to more precisely evaluate the size of the deleted region. As controls, analysis of NEK2, a gene located on 1q, and PHF3 and TBP, genes located on chromosome 6q, were used to normalise tumour and normal mucosa profiles. The QMPSF analysis demonstrated that one copy of the E2F2 gene was deleted in the tumours (**Figure 3**) and that the smallest deleted region observed contained the E2F2 gene but not the RPS6KA1 or PIK3CD genes.

E2F2 gene sequencing

To explore whether the remaining copy of the E2F2 gene was mutated, we sequenced the 8 exons of the gene. To that end, 21 carcinomas with E2F2 deletions, 14 carcinomas without deletions and all associated normal mucosa were sequenced. No mutations were identified in the tumours, independent of the status of the E2F2 gene.

It is noteworthy that a G/T polymorphism located in exon 4 was observed in 23 of the 35 carcinomas (**Supplementary methods**). This polymorphism leads to a change in the amino acid sequence: Q226H. We analysed the polymorphism distribution in a control disease-free population (n=225), colon adenomas (n=128) and CIN colon carcinomas of all clinical stages (n=277) using a melting curve approach. In the control cohort, 27% were G/G, 25% were T/T and 48% were G/T heterozygous samples. The same proportions of G/G, T/T and G/T samples were found in adenomas and carcinomas, independent of the tumour location (p=0.005 for each localisation). In the 165 carcinomas analysed for the E2F2 gene polymorphism, no correlation was found with E2F2 genomic status (deleted or not, p=0.256) or with clinical stage and disease-free survival (p=0.255).

IV) Genetic context associated with E2F2 genomic deletion

Allelotyping of 33 microsatellites was used to identify the genomic alterations that could be associated with the E2F2 deletion (**Supplementary methods**). We performed a 2-way hierarchical unsupervised clustering analysis of the allelotyping data on normal and deleted

carcinomas. No specific associations between the E2F2 deletion and other alterations were identified. When E2F2 is normal (**Supplementary Figure 1A**), TP53 and APC-targeting loci clustered with loci targeting chromosomes 18p+q (D18S53-61), 8p (D8S264-283) and 13q (D13S173), as previously described (26) but when E2F2 is altered, the APC-associated locus did not cluster with the loci cited above, nor did it cluster with the TP53 locus (**Supplementary Figure 1B**). Carcinomas were sub-clustered into three main groups according to their genomic global alteration frequencies, referred to as CIN-High, Low and Very Low as already shown (26). These sub-types were equally represented in both normal and deleted E2F2 groups.

V) Correlation between DNA copy number and transcript expression

As the biological properties of the E2F family members have to be evaluated at the level of transcript or protein expression rather than at the copy number level, the relationship between DNA copy number and gene expression was explored. Thus, to know whether the loss of one of the E2F2 alleles could impact the transcript expression, E2F2 mRNA levels were estimated by Affymetrix arrays and Taqman probes (RT-QPCR) 74 carcinomas (Table 1) and 90 normal mucosa (16 proximal – 20 distal – 54 undefined). No difference in the basal expression level was observed between proximal and distal normal mucosa (**Figure 4A**). The data on carcinomas obtained from the Affymetrix (**Supplementary methods**) and RT-QPCR studies are summarised in Table 3. Expression of E2F2 was decreased in carcinomas, as measured by both the Affymetrix technique and RT-QPCR but the down-regulation was only significant in distal carcinomas, as compared to normal mucosa (**Figure 4B**; $p=0.003$). Nonetheless, no correlation could be established between the decrease in E2F2 gene copy number and the decreased expression of the transcript (**Figure 5**; $p=0.5$, Mann-Whitney test). Because the genomic status of E2F2 provides prognostic value in distal carcinomas, we looked for a correlation between the transcript expression level and the clinical stage, according to proximal or distal localisation whatever the genomic status. No correlation was found between the expression, localisation, or the clinical stages by either approach. Therefore, the level of the E2F2 transcript cannot be considered as an appropriate prognosis marker for the 1p36.11-12 locus deletion.

To exclude the possibility that loss of E2F2 activity could be compensated by other members of the E2Fs family, expression of E2F1 and E2F2a were measured by RT-QPCR. No difference in the basal expression levels of E2F1 and E2F3a were observed between proximal and distal normal mucosa (data not shown) but a significant increase in the expression of

E2F1 was found in proximal and distal carcinomas whereas an elevated expression of E2F3a was significant in proximal carcinomas only (**Supplementary Figure 2**). However, the loss of E2F expression doesn't lead to significant compensation by other family members at the level of the transcript expression within the same tumor (data not shown).

VI) Other mechanisms for E2F2 mRNA decreased expression

In order to identify molecular mechanisms leading to a reduced E2F2 mRNA expression which could not be related to a decreased gene copy number, E2F2 promoter methylation was evaluated in 14 carcinomas. Sequencing of the E2F2 promoter-susceptible region did not evidence the presence of any promoter methylation (**Supplementary methods**; data not shown).

Similarly, as several miRNAs are up- or downregulated in colon cancer through controlling the expression of key signaling molecules, we explored the potential correlation between the expression of mi-RNAs targeting the E2F2 gene (miR106a, 34a, 24, 29b) and the decreased E2F2 mRNA expression level. According to RT-QPCR analysis, miR-34a and miR-106a expressions were significantly increased in 9/13 and 8/13 carcinomas respectively, as compared to the adjacent normal mucosa (**Figure 6**). On the other hand, no significant changes were observed for miR-24 and miR-29b. These results suggest that miR-34a and miR-106a could inhibit the E2F2 expression in the colon carcinomas that had normal gene copy number but a decreased transcript expression.

DISCUSSION

In this study, a micro-deletion at the 1p36.11-12 locus was identified in adenomas and carcinomas displaying the CIN phenotype. The micro-deleted region contains several genes, among which the transcription factor E2F2. Interestingly, the incidence of deletion estimated by the E2F2 study, increased with the transition from adenoma to carcinoma, but declined for distal carcinomas at the metastatic stage. Multivariate analysis showed that deletion of E2F2 in colon distal carcinomas is a good indicator for better overall survival. The deletion retained its prognostic significance even following adjustments for other known factors such as age, carcinoma localisation, stage, APC, TP53 status and global genomic alteration frequency. The majority of colorectal cancers evolve as a consequence of chromosomal instability causing chromosomal losses or gains. Chromosomal regions deleted with high frequency include regions of varied length on the short arm of chromosome 1, which occur in 30-80% of colorectal carcinomas (28). Thus, one or more genes on 1p may contribute to colorectal

carcinogenesis. The role of the genomic 1p36 region in carcinogenesis has been experimentally demonstrated by classic cytogenetics and by molecular biology techniques. Tanaka et al. demonstrated that in COKFu cell lines established from a colorectal tumour, the introduction of a normal 1p36 region suppresses *in vitro* cell tumourigenicity (15). Moreover, a constitutional anomaly of the 1p region in some neuroblastomas (29) and in breast cancers (30) favours the involvement of this region in human colorectal carcinogenesis. While several studies have shown clear evidence of a deletion of the 1p arm in CC, the issue is further complicated by the observation that many aberrations span large chromosomal regions containing multiple genes (31) including many that are not directly related to cancer. Large-scale technologies, such as CGH and FISH, have been used to observe the 1p deletion. However, these technologies provide poor resolution, and none of these studies have focused specifically on the 1p36.11-12 segment. In this study, the use of a CGH array displaying 35 kb resolution identified a micro-deletion of 0.7 Mb, allowing for identification of the specific genes affected. Several of these genes are involved in cellular machinery, such as TCEA3 (Transcription elongation factor 3) and RPL11 (L11 ribosomal protein gene). Others are involved in the proliferation and differentiation of somatic cells, including T lymphocytes and epithelial cells. These genes could participate, along with E2F2, in the process of carcinogenesis. There is growing evidence in the literature that de-regulated E2F activity plays a pivotal role in tumourigenesis and correlates with poor prognosis. Indeed, E2F2 was found to be elevated in ovarian cancer cell lines and in ovarian cancers, and this high expression was specifically associated with histopathologic grade 3 tumours. Further, survival analyses showed that low expression levels of E2F2 are significantly associated with favourable disease-free and overall survival (32). On the contrary, allelic loss of a microsatellite marker at 1p36 was independently found to be associated with shorter disease-free and overall survival for patients with colorectal cancer (11). Similarly, using several microsatellite markers at different locations on 1p, another study showed that AI was a better indicator of bad prognosis in breast cancer and colorectal cancer than other variables (33). These findings are in opposition with the data presented in this paper. However, in the above study, there was no clear indication of tumour localisation and patients with metastatic carcinomas were included in the survival study. Moreover, the micro-deletion we observed with the aCGH analysis was validated by quantitative PCR specific for the E2F2 gene, while virtually all published CGH studies did not validate chromosome segment deletions by quantitative gene copy number measurements. However, when considering the biological

processes involving the E2F2 factors, it is not surprising that they may exhibit both oncogenic and tumour-suppressive activities.

The functional consequences of genomic abnormalities on gene expression are not obvious. Indeed, while extra copies of chromosome arms induced a 2-fold increase over normal expression for only 3.8% of transcripts (34), changes in the copy number of contiguous genes along large segments of chromosomes were associated with changes in gene expression in colorectal cancer (35). Consistent with the later results, several studies in different types of solid tumours, including breast (36-37), prostate (38), and head and neck squamous cell carcinomas (39), concluded that alterations in DNA copy number directly influence the expression of multiple genes. For carcinomas in which the loss of E2F2 expression is not associated to a loss of gene copy number, neither mutation of the second allele nor the methylation of the gene promoter, at least in the sites analyzed, could lead to the loss. However, the discovery of miRNAs almost two decades ago established a new paradigm of gene regulation through regulation of key steps of cell differentiation and Development, by suppressing gene expression in a sequence specific manner (40). Additionally, the control of gene expression by miRNAs is a process seen in virtually all cancer cells. The present study has examined the expression of several miRNAs known to be altered in colorectal tissues (41) and we found that the levels of miR-34a and 106a are overexpressed while that of miR-24 and 29b remained unchanged as compared to the matching normal mucosa. Although, miR-24 overexpression has been shown to be associated to a reduced E2F2 expression in leukemia cell lines (42), it remained unaltered in a human colorectal stage I and II tumors while the expression of the miR-106a was up-regulated, supporting the idea that this miRNA may participate to the human colorectal cancer growth (41). On the other hand, further analyses of global gene expression microarray indicated that miR-34a functions as a potent suppressor of cell proliferation through modulation of E2F signalling in colon cancer cells (43) and miR-34a responsive genes are highly enriched for those that regulate cell cycle progression, cellular proliferation (E2F), apoptosis (BCL2), DNA repair, and angiogenesis (44).

In conclusion, our work supports the likely importance in carcinogenesis of individual gene such as E2F2 that is deleted in cancer and maps to sites of chromosomal deletion. It remains an open question as to what extent changes in the expression of other genes such as ID3, which is in close vicinity to E2F2 on 1p36.11-12, could also influence colon cancer progression. Further research is required to reveal how the putative E2F2 oncogene regulates tumorigenic signalling pathways though we believe that this gene may serve as prognostic marker for better disease-free survival.

Fundings

This work was supported by Inserm, the Institut National du Cancer (INCA, ACI 2004) and the Ligue Régionale contre le Cancer. C. Nicolet was a recipient of a Region Alsace/Inserm grant program.

Acknowledgements

We thank Florence Ackermann (CHRU, Strasbourg, France), Mathilde Arrive, Nathalie Hamelin and Sylvie Delacour (CHRU, Strasbourg, France) for their excellent technical assistance.

References

1. Geigl, J.B. *et al.* (2008) Defining 'chromosomal instability'. *Trends Genet.* **24**, 64-69.
2. Fearon, E.R. *et al.* (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759-767.
3. Diep CB, Kleivi K, Ribeiro FR *et al.* The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta-analysis of copy number changes. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; **45**: 31-41
4. Pinkel D, Albertson DG. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet* 2005; **37 Suppl**: S11-17
5. Muleris M, Salmon RJ, Dutrillaux B. Cytogenetics of colorectal adenocarcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; **46**: 143-156
6. Konstantinova LN, Fleischman EW, Knisch VI *et al.* Karyotype peculiarities of human colorectal adenocarcinomas. *Hum Genet* 1991; **86**: 491-496
7. Couturier-Turpin MH, Esnous C, Louvel A *et al.* Chromosome 1 in human colorectal tumors. Cytogenetic research on structural changes and their significance. *Hum Genet* 1992; **88**: 431-438
8. Bardi G, Johansson B, Pandis N *et al.* Cytogenetic analysis of 52 colorectal carcinomas--non-random aberration pattern and correlation with pathologic parameters. *Int J Cancer* 1993; **55**: 422-428
9. Di Vinci A, Infusini E, Peveri C *et al.* Deletions at chromosome 1p by fluorescence in situ hybridization are an early event in human colorectal tumorigenesis. *Gastroenterology* 1996; **111**: 102-107
10. Di Vinci A, Infusini E, Peveri C *et al.* Correlation between 1p deletions and aneusomy in human colorectal adenomas. *Int J Cancer* 1998; **75**: 45-50

11. Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Gagliardi G et al. Prognostic value of chromosome 1p allelic loss in colon cancer. *Gastroenterology* 1997; **113**: 761-766
12. Kim MY, Yim SH, Kwon MS et al. Recurrent genomic alterations with impact on survival in colorectal cancer identified by genome-wide array comparative genomic hybridization. *Gastroenterology* 2006; **131**: 1913-1924
13. Thorstensen L, Qvist H, Heim S et al. Evaluation of 1p losses in primary carcinomas, local recurrences and peripheral metastases from colorectal cancer patients. *Neoplasia* 2000; **2**: 514-522
14. Ghadimi BM, Grade M, Mönkemeyer C et al.. Distinct chromosomal profiles in metastasizing and non-metastasizing colorectal carcinomas. *Cell Oncol* 2006; **28**: 273-281.
15. Tanaka K, Yanoshita R, Konishi M et al. Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 1p36 region. *Oncogene* 1993; **8**: 2253-2258
16. Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 11-20
17. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998; **12**: 2245-2262
18. Johnson DG. The paradox of E2F1: oncogene and tumor suppressor gene. *Mol Carcinog* 2000; **27**: 151-157
19. Murga M, Fernandez-Capetillo O, Field SJ et al. Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity* 2001; **15**: 959-970
20. Zhu JW, Field SJ, Gore L et al. E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 8547-8564
21. Johnson DG, Cress WD, Jakoi L et al. Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc Natl Acad Sci U SA* 1994; **91**: 12823-12827
22. DeGregori J, Leone G, Miron A et al. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**: 7245-7250
23. Nicolet C, Guérin E, Neuville A et al. Evidence for various 20q status using allelotyping, CGH arrays, and quantitative PCR in distal CIN colon cancers. *Cancer Lett* 2009; **282**:195-204
24. Lai WR, Johnson MD, Kucherlapati R, Park PJ: Comparative analysis of algorithms for identifying amplifications and deletions in array CGH data. *Bioinformatics* 2005, **21**(19): 3763-3770

25. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J.R.S.S. Series b (Methodological)* 1995; **57**: 289-300
26. Weber JC, Meyer N, Pencreach E et al. Allelotyping analyses of synchronous primary and metastasis CIN colon cancers identified different subtypes. *Int J Cancer* 2007; **120**: 524-532
27. Wettenhall JM, Smyth GK: limmaGUI. A graphical user interface for linear modeling of microarray data. *Bioinformatics* 2004, 20:3705-3706
28. Gerdes H, Chen Q, Elahi AH et al. Recurrent deletions involving chromosomes 1, 5, 17, and 18 in colorectal carcinoma: possible role in biological and clinical behavior of tumors. *Anticancer Res* 1995; **15**: 13-24
29. Laureys G, Speleman F, Opdenakker G et al. Constitutional translocation t(1;17)(p36;q12-21) in a patient with neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1990; **2**: 252-254
30. Genuardi M, et al. Distal deletion of chromosome 1p in ductal carcinoma of the breast. *Am J Hum Genet* 1989; **45**: 73-82
31. Albertson DG, Collins C, McCormick F et al. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 2003; **34**: 369-376
32. Reimer D, Sadr S, Wiedemair A et al. Clinical relevance of E2F family members in ovarian cancer--an evaluation in a training set of 77 patients. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 144-151
33. Ragnarsson G, Eiriksdottir G, Johannsdottir JT et al. Loss of heterozygosity at chromosome 1p in different solid human tumours: association with survival. *Br J Cancer* 1999; **79**: 1468-1474
34. Platzer P, Upender MB, Wilson K et al. Silence of chromosomal amplifications in colon cancer. *Cancer Res* 2002; **62**: 1134-1138
35. Tsafrir D, Bacolod M, Selvanayagam Z et al. Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; **66**: 2129-2137
36. Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S et al. Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res* 2002; **62**: 6240-6245
37. Pollack JR, Sorlie T, Perou CM et al. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U SA* 2002; **99**: 12963-12968
38. Phillips JL, Hayward SW, Wang Y et al. The consequences of chromosomal aneuploidy on gene expression profiles in a cell line model for prostate carcinogenesis. *Cancer Res* 2001; **61**: 8143-8149

39. Masayeva BG, Ha P, Garrett-Mayer E et al. Gene expression alterations over large chromosomal regions in cancers include multiple genes unrelated to malignant progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 8715-8720
40. Bartel,D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–233.
41. Monzo,M. *et al.* (2008) Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell Res.***18**, 823-833.
42. Lal,A. *et al.* (2009) miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell.* **35**, 610-25
43. Tazawa,H. *et al.* (2007) Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**, 15472-1547.
44. Chang,T.C. *et al.*(2007). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell.* **26**, 745–752.

TABLES

Table 1: Anatomico-pathological characteristics of adenomas and carcinomas. * Patients with clinical events (metastasis – relapse – death related to colon cancer)

Adenomas	CGH n=110	Carcinomas	Q-PCR n=183	CGH n=58	Affymetrix n=48	RT-QPCR n=44	Patients with clinical data n=90
Mean Age (Range)	67(20-88)	Mean Age (Range)	69 (34-94)	68 (40-88)	67 (37-93)	70 (48-91)	67 (34-87)
Male : Femelle	80:30	Male : Femelle	109:74	35:23	30:18	29 :15	54:36
<i>Localisation</i>		<i>Localisation</i>					
Proximal colon	50	Proximal colon	84	-	17	18	41
Distal colon	60	Distal colon	99	58	31	26	49
<i>IUCC classification</i>		<i>IUCC classification</i>					
Villous	1	In situ (Tis)	40	3	2	-	5(0*)
Hyperplasia	8	I	21	9	8	4	12(2*)
Tubulovillous	31	II	35	14	12	12	15(3*)
Tubular	70	III	34	10	8	9	23(7*)
		IV	53	22	18	19	35(30*)
<i>Grade</i>							
High	24						
Low	78						

Table 2: E2F2 deletion (n deleted/n total) evaluated by specific QPCR according to the clinical stage. PC: Proximal Colon; DC: Distal Colon.

Site	Adenomas	Carcinomas Stage Tis	Carcinomas Stage I	Carcinomas Stage II	Carcinomas Stage III	Carcinomas Stage IV	Carcinomas All stages
PC	18% (9/50)	27% (6/22)	33% (3/9)	50% (8/16)	44% (7/16)	38% (8/21)	38% (32/84)
DC	27% (16/60)	39% (7/18)	58% (7/12)	42% (8/19)	39% (7/18)	34% (11/32)	40% (40/99)
PC and DC	23% (25/110)	33% (13/40)	48% (10/21)	46% (16/35)	41% (14/34)	36% (19/53)	39% (72/183)

Table 3: Decreased expression of E2F2 mRNA as evaluated from Affymetrix and RT-QPCR Taqman technologies.

Localisation	Technique	E2F2
Proximal colon	<i>Affymetrix</i>	29% (5/17)
	<i>RT-QPCR</i>	50% (9/18)
Distal colon	<i>Affymetrix</i>	42% (13/31)
	<i>RT-QPCR</i>	65% (17/26)
Proximal and distal colon	<i>Affymetrix</i>	38% (18/48)
	<i>RT-QPCR</i>	59% (26/44)

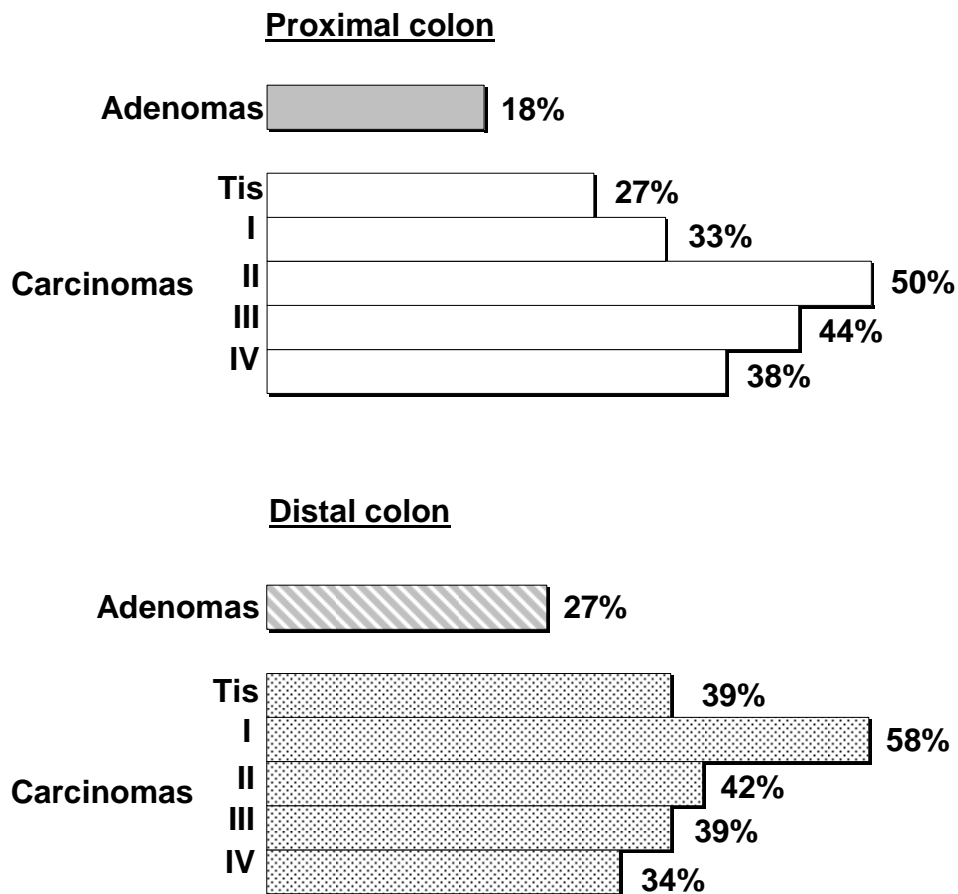


Figure 1. Frequency of E2F2 deletion. E2F2 deletion in adenomas (n=110) and carcinomas (n=183) was evaluated by specific qPCR according to the clinical stages and the tumor location in the proximal or distal colon.

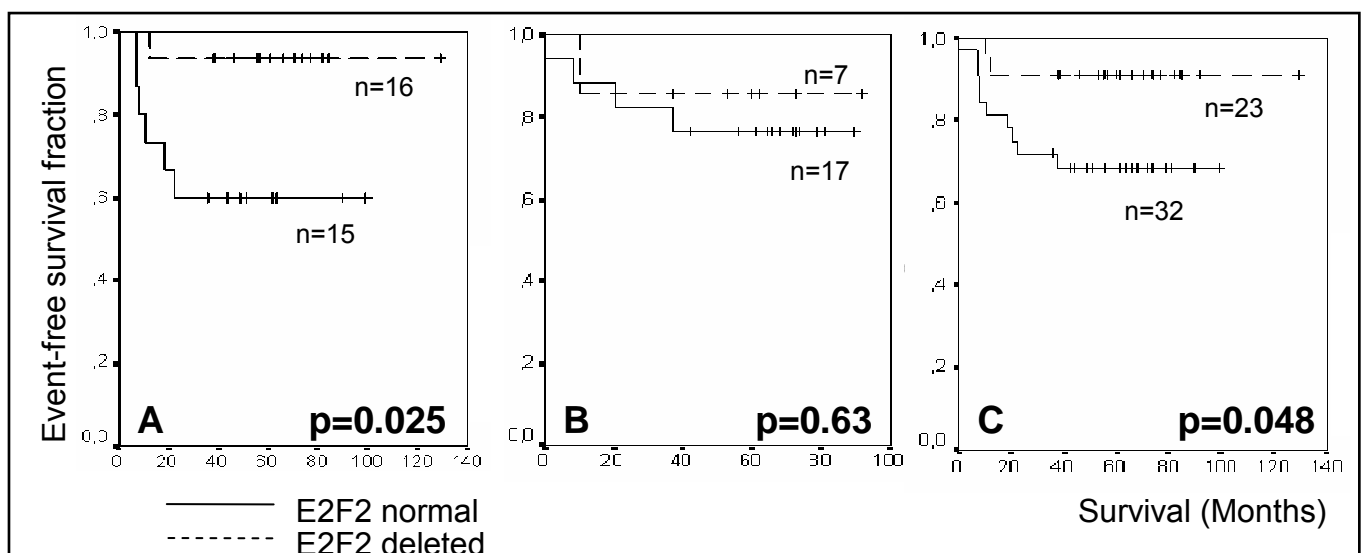


Figure 2. Curves for event-free survival were computed using the Kaplan and Meier method and were compared by the log rank test. (A) Distal carcinomas without stage IV (n=31). **(B)** Proximal carcinomas without stage IV (n=24). **(C)** Proximal and distal carcinomas without stage IV (n=55).

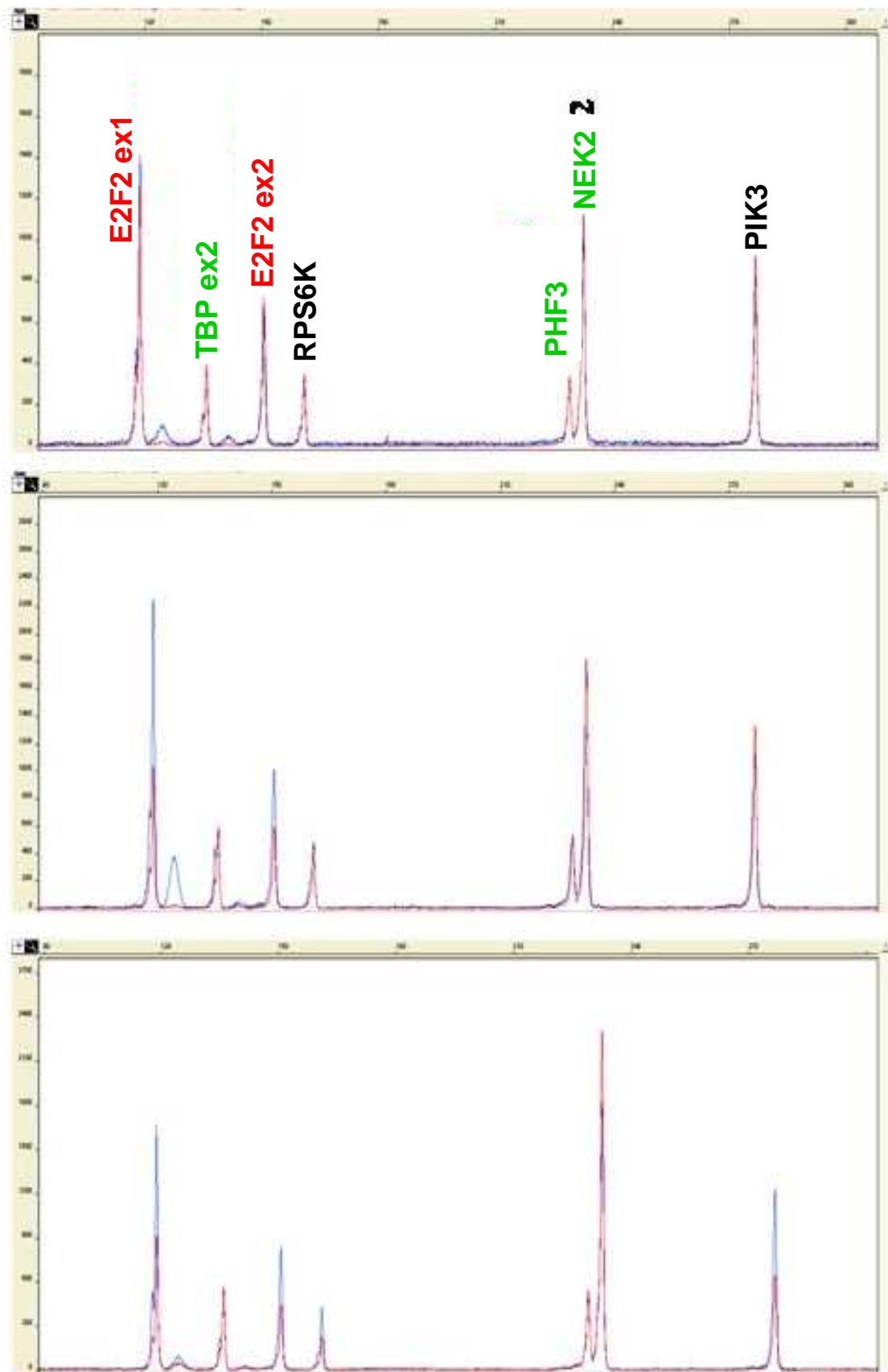


Figure 3. QMPSF-based kinogram in primary colon cancer. The QMPSF profile generated from malignant tissue (*red*) was superimposed on that obtained from distant non-malignant tissue (*blue*) by adjusting the 3 control amplicons indicated in *green text* to the same height. Each peak corresponds to a target gene. The heights of red and blue peaks corresponding to specific target genes were then compared. The *y-axis* displays fluorescence intensity and the *x-axis* indicates the amplicon size in base pairs. (A) Tumour showing no alteration. (B) Tumour showing a deletion of E2F2. (C) Tumour showing a deletion of gene copy number affecting E2F2, PI3K and RPS6K.

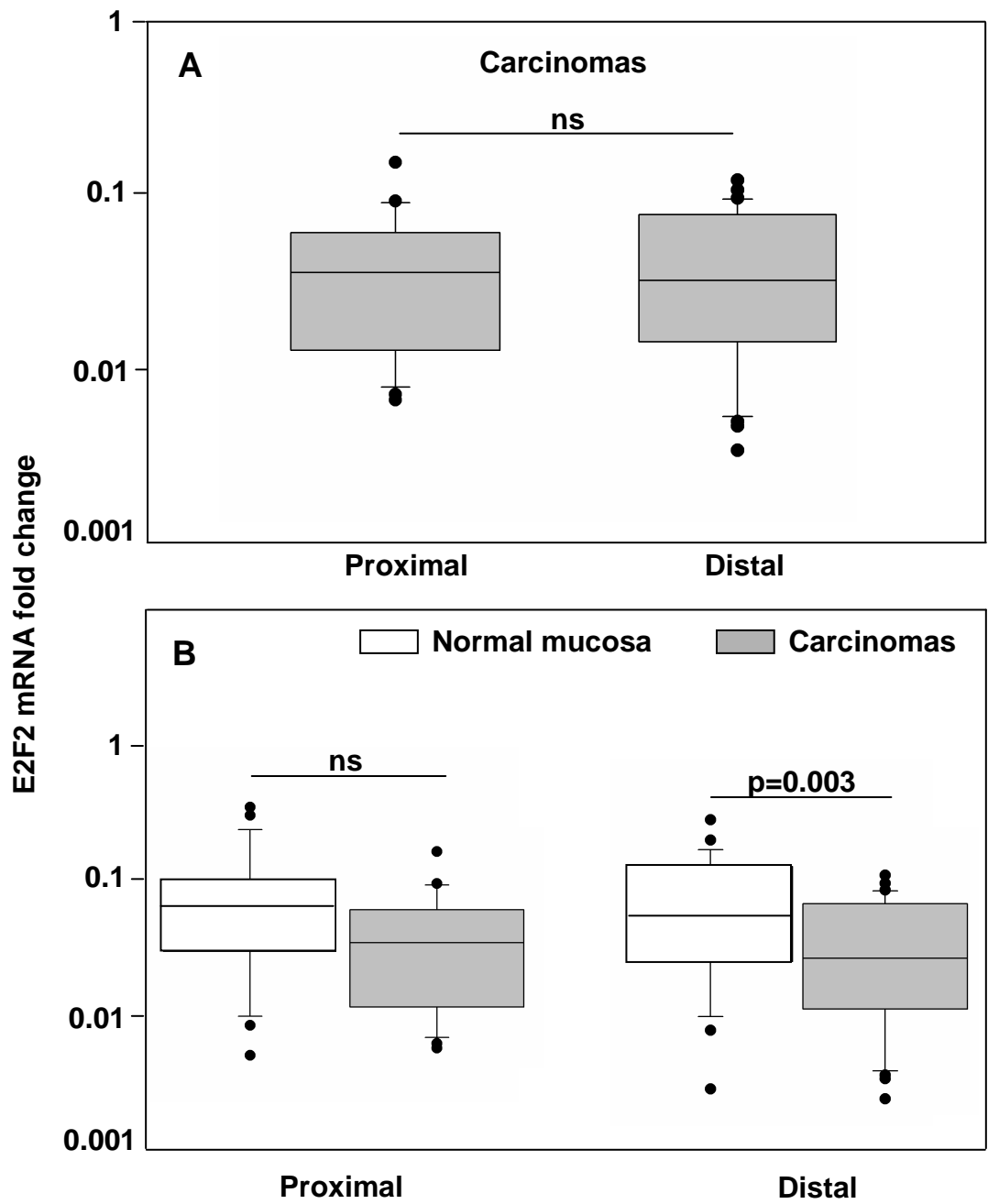


Figure 4. Expression of E2F2 gene assessed by RT-QPCR. (A) Comparison between proximal and distal expression in human carcinomas. (B) Comparison between normal colon mucosa and the matched carcinomas from proximal and distal origin.

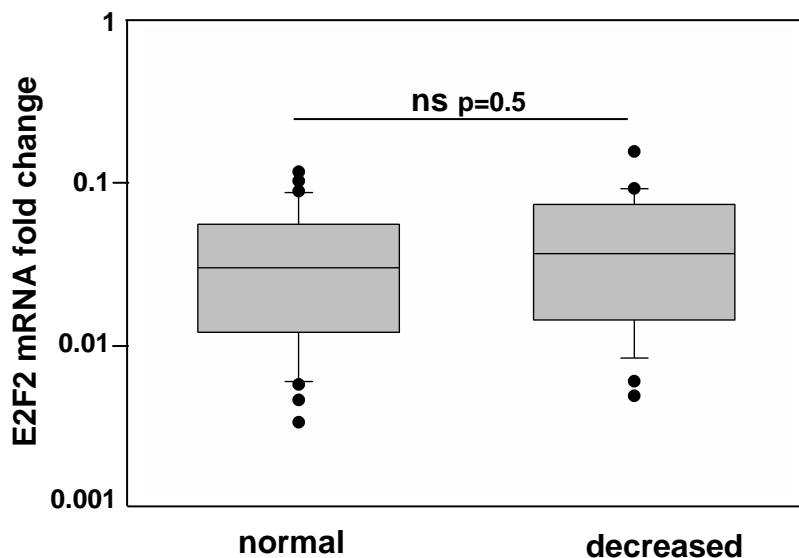


Figure 5. Correlation between genomic and transcriptomic E2F2 status. Expression of E2F2 gene, as assessed by RT-QPCR, in carcinomas that had a normal or decreased E2F2 gene copy number, as assessed by QPCR, n=44.

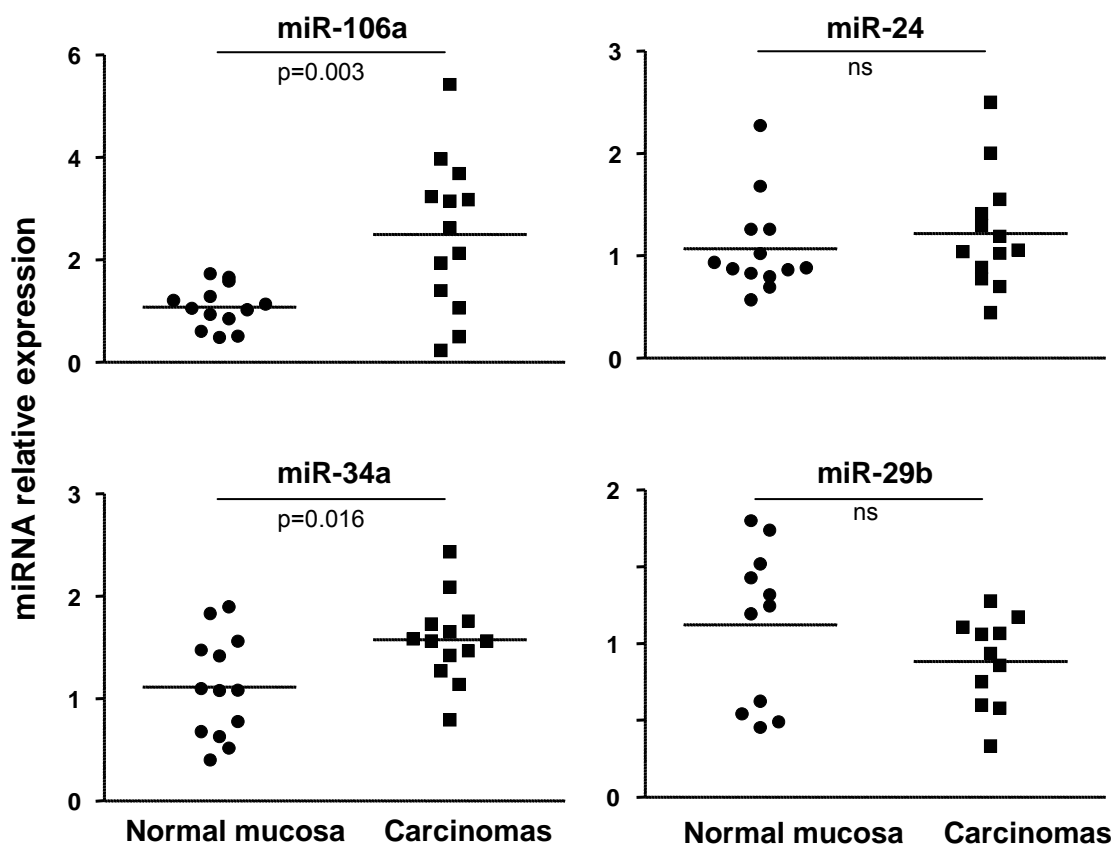


Figure 6. miR-24, 29b, -4a and -106a expression in colon carcinomas. Comparison of the mi-RNA expressions between normal colon mucosa and matched carcinoma. Thirteen carcinomas were chosen not to be deleted at 1p36.11-12 but down-regulated for E2F2 expression. The ligne corresponds to the mean value.

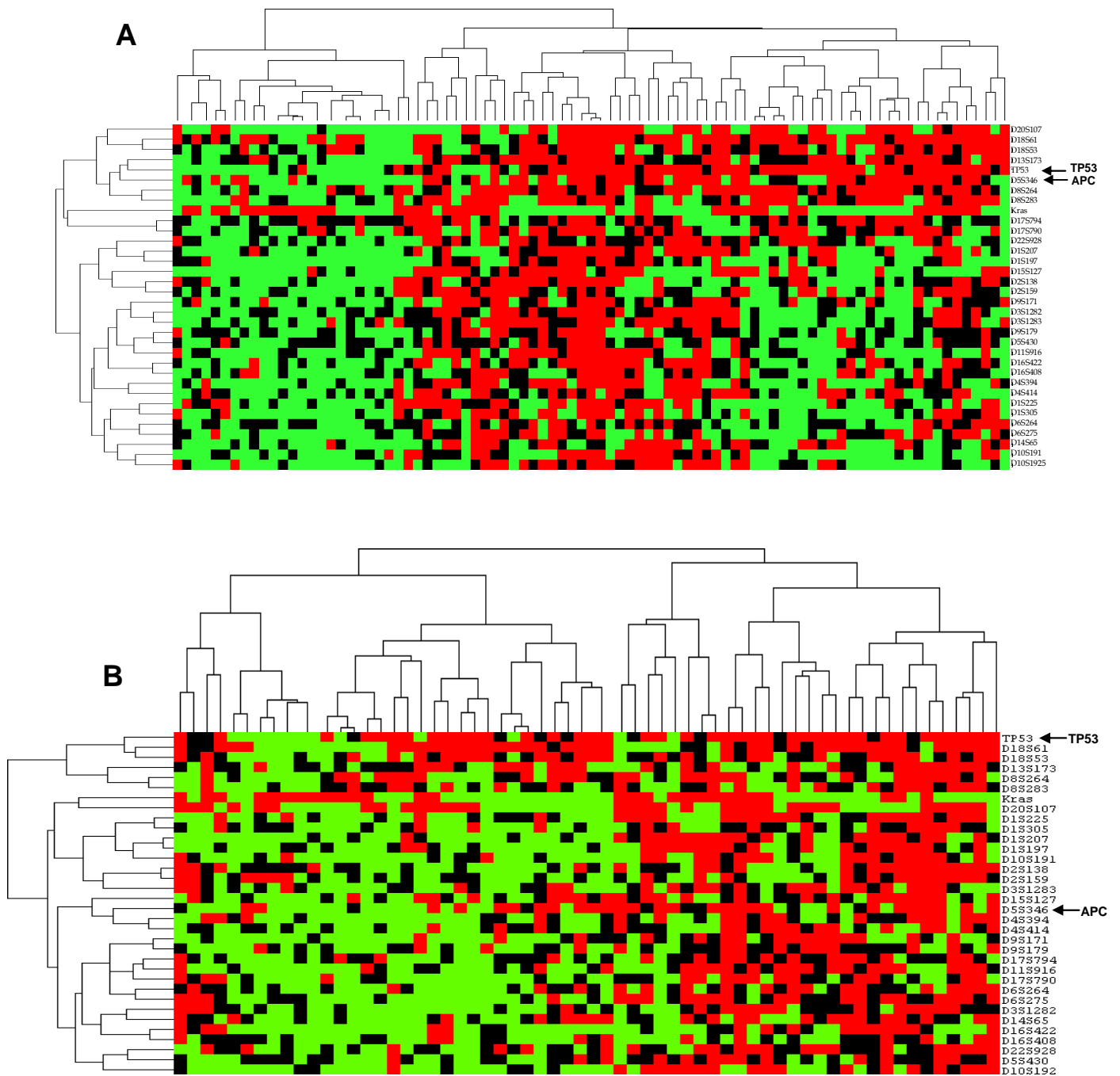


Figure S1. Two-way unsupervised hierarchical clustering of the allelotyping data according to the E2F2 gene status. (A) normal E2F2 gene copy number, n=87; (B) decreased E2F2 gene copy number, n=62. Allelic imbalance (red); normal locus (green); non informative locus (dark). The vertical columns correspond to the tumors; horizontal lines correspond to the microsatellites. Loci associated to the APC (D5S346) and TP53 (TP53) genes are indicated.

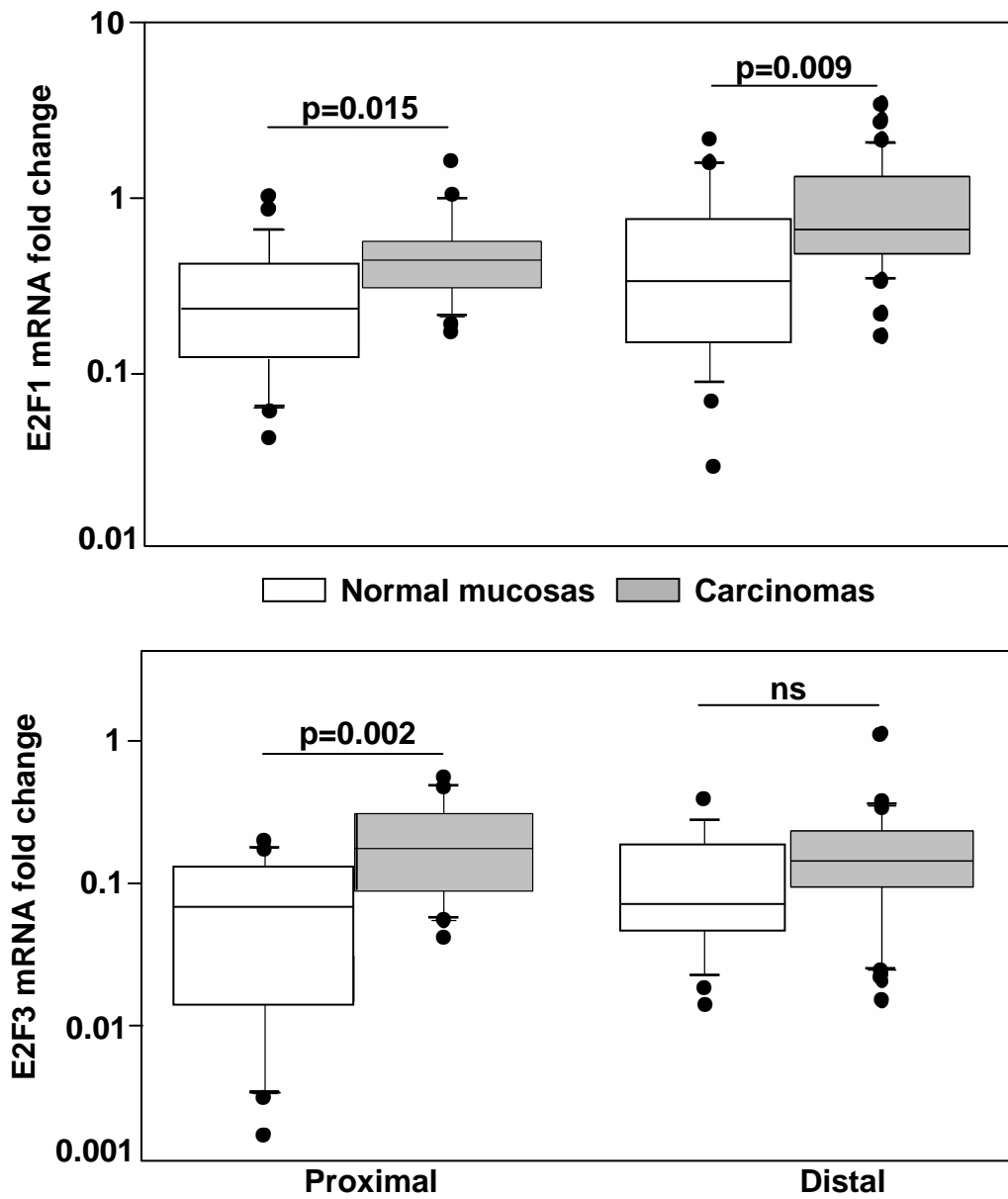


Figure S2. Expression analysis for E2F1 and E2F3a assessed by RT-QPCR. Comparison between normal mucosa and matched carcinomas (n=44) and between proximal (n=18) or distal location (n=26).

Supplementary Table 1: Genes mapped at the deleted 1p36.11-12 locus and their biological functions

Gènes	Description
HNRNPR	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
ZNF436	Zinc finger protein 436
TCEA3	Transcription elongation factor A (SII), 3
DDEFL1	Development and differentiation enhancing factor-like 1
E2F2	E2F transcription factor 2
ID3	Inhibitor of DNA-binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein
RPL11	Ribosomal protein L11
TCEB3	Transcription elongation factor B (SIII)
LYPLA2	Lisophospholipase II
GALE	UDP-galactosidase-4-epimerase
HMGCL	Hydroxymethyl-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase
FUCA1	Fucosidase, alpha L-1
CNR2	Cannabinoid receptor 2
PNRC2	Proline-rich nuclear receptor coactivator 2
FUSIP1	FUS interacting protein 1

Supplementary Table 2: Primers for QMPFSF

Name	Sequence	Amplicon size (bp)	Localization
E2F2-Ex1F	tccattggcggcttccc	156	1p36
E2F2-Ex1R*	cccttgccagcatagcgagtaa	156	1p36
E2F2-Ex3F	gactgggtccctttcttctca	253	1p36
E2F2-Ex3R*	tgtgttcttggccttcttgc	253	1p36
PIK3CD-Ex4F	ccagacagcggagcagcaa	280	1p36,2
PIK3CD-Ex4R*	tgggtcgcacaaaggagtcaaa	280	1p36,2
RPS6KA1-Ex17F	caaggctcatgtcattcttccc	165	1p36.11
RPS6KA1-Ex17R*	gcatcagctctgtcaccaggtac	165	1p36.11
NEK2-Ex1-F	gggcttctccatccaggtc	236	1q32.2
NEK2-Ex1-R*	agggtagggtcccacgtcac	236	1q32.2
TBP-Ex2-F	tgtgctggagatgctctagg	139	6q27
TBP-Ex2-R*	gtaaggtggcaggctgttgtt	139	6q27
PHF3-F	atcctgctgcttctgcttcc	230	6q12
PHF3-R*	ttgctgccttttctctggt	230	6q12

*Primers with FAM extension

Supplementary Table 3: Primers for E2F2 sequencing

Exon	Sense primer (5'-3')	antisense primer (5'-3')	Amplicon size
1	cgtgtgaaaggcggcagca	ctacctgctccactcaaact	430
2	gaggtggctgctaagtgg	aagacagacaagcctacctac	371
3	gtgggtgggtgaaagggtgg	ccgccctgccactcaca	419
4 - 5	accactgattccacaacca	gaggctgcgggtgggagga	543
6	ttcagaggcttaggagagg	tctgccatttctgcccaagc	370
7	gtttgagcttgacccatg	atgtgtggggtaggatgac	435
8	caggctaaggagagagaag	gagaccccatgccctgag	504

Supplementary Table 4: Primers for E2F2 promoter methylation study

E2F2 Gene	Sense primer (5'-3')	antisense primer (5'-3')
Couple 1	gaaagatttaaggattagagag	aaccctcccctcctaacc
Couple 2	ggtgtcagaggtttggggag	cccgaacccttacaaca

Supplementary methods

Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments (QMPSF)

Short genomic fragments (120–300 bp) of 6 target loci corresponding to E2F2 exons 1 or 2 (1p36.12), RPS6KA1 (1p36.11), PIK3CD (1p36.22), and 3 control amplicons, NEK2 (1q32.3), TBP (6qter) and PHF3 (6q12), were simultaneously PCR amplified in a single tube, using dye-labelled primers corresponding to the unique sequences (**Supplementary Table 2**). PCR reactions were performed using 40 ng of genomic DNA in a final volume of 25 µl with 0.16 mmol/l of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mmol/l MgCl₂, 1 U of Thermoprime Plus DNA polymerase (ABgene), 5% DMSO, 5 mM TEAA and 0.5–1.6 µmol/l of each primer, one primer of each pair carrying a 6-FAM label. The PCR consisted of 26 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 60 s, and 72°C for 30 s, preceded by an initial denaturation step of 3 min at 94°C and followed by a final extension of 5 min at 72°C. One µl of the PCR product was resuspended in a mix containing 1.25 µl of deionised formamide, 0.5 µl of GeneScan-500 Rox (PE Applied Biosystems), and 1 µl of loading buffer. After denaturation for 3 min at 90°C, 2 µl of each sample was loaded on an Applied Biosystems model 3100 automated sequencer (PE Applied Biosystems). The data were analysed using the Genescan software (PE Applied Biosystems). For each patient, the QMPSF pattern generated from tumour DNA was superimposed on the pattern generated from non-malignant tissue DNA after adjustment of control amplicons to the same heights. For each targeted genomic region, the copy number ratio was determined by dividing the normalised peak height obtained from the tumour tissues by the height observed for non-malignant tissues. The QMPSF analyses were performed at least twice on 25 colon samples

Detection of the E2F2 exon 4 polymorphism

We performed LightCycler PCR followed by fluorescent melting curve analysis (FMCA) to detect the E2F2 exon 4 polymorphism (Roche Molecular Biochemicals) using a hybridisation probe format, followed by FMCA with the following set of primers, anchor and sensor probes [TIB Molbiol]; forward primer: 5'- agctgatgaacacggag -3' , reverse primer: 5'- ggaagaacagatgccagac -3', sensor hybridisation probe: 5'-LCRed640-ctctggatgagctgtcca-P-3', anchor hybridisation probe: 5'-tcagtcaggtgctgaagctcagagagc-FL-3'. PCR was performed in a 10 µl final volume with 50 ng of DNA, 1 µl of 10× LightCycler DNA master hybridisation probes (Roche Molecular Biochemicals), MgCl₂ 2 mM, 1 µM of each primer and 0.2 µM of hybridisation probe. After 10 min at 95°C, the reaction mix was subjected to

45 cycles: 8 sec at 95°C, 45 sec at 55°C and 6 sec at 72°C. After 20 sec at 95°C and 60 sec at 45°C, post-amplification FMCA was performed by gradually heating the samples at a rate of 0.25°C/sec from 45 to 95°C. Fluorescence melting peaks were generated by plotting the negative derivative of fluorescent signal corresponding to the temperature (-dF/dT). “G/G” and “T/T” haplotype melting temperatures (T_m) were 65 and 53.5°C, respectively.

Microsatellite analyses

DNA extracted from the 110 adenomas and 186 carcinomas were amplified by fluorescent PCR using a panel of 33 microsatellites (MS) targeting 18 chromosomes as described previously [34]. In order to exclude tumours with an MSI-H phenotype, the panel of five MS recommended by the U.S. National Cancer Institute (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, and D17S250) was included in the analysis.

Affymetrix

First, 3 µg of total RNA from 48 tumour samples, following stringent quality control criteria (CIT program protocol, <http://cit.ligue-cancer.net>), were amplified and labelled following the manufacturer's one-cycle target labelling protocol (<http://www.affymetrix.com>) and hybridised to HG-U133 plus 2.0 Affymetrix GeneChip arrays (Affymetrix; GeneChip Fluidics Station 400). The chips were scanned with the Affymetrix GeneChip Scanner 3000 and raw intensities were extracted using image analysis software GCOS 1.4.

Two public datasets containing 54 mucosal tissues samples from the GEO public dataset GSE8671 (n=32 [53]) and GSE4107 (n=22 [54]) were used as references for differential expression analysis.

Raw data were normalised in batch using the robust multi-array average method (RMA [55]) implemented in the R package *affy*.

Methylation Analysis

Extracted genomic DNA was modified chemically with sodium metabisulphite using the EpiTect Bisulfite kit (Qiagen). The bisulfite-modified DNA was amplified using primer pairs as indicated in **Supplementary Table 4** and sequencing PCR was performed using the touch-down method, as described above with the same PCR conditions. The final products were purified and sequenced as described above.

PUBLICATION 2

Résultats principaux

Etant donné l'augmentation de l'incidence de la délétion en 1p36.12 pendant les stades précoces puis la diminution importante dans les stades tardifs métastatiques, nous avons émis l'hypothèse que la micro-délétion participerait à la progression des tumeurs aux stades précoces de la carcinogenèse mais, à des stades plus tardifs, protégerait de la dissémination métastatique.

Après avoir montré que la micro-délétion en 1p36.12 altère également le nombre de copie du gène ID3 et son expression dans les tumeurs coliques humaines, nous avons cherché à déterminer l'impact fonctionnel de la perte de E2F2 et ID3 sur les propriétés prolifératives et invasives de cellules tumorales coliques, à la fois *in vitro* et *in vivo*. La technologie des ARN interférents transfectés dans les cellules cancéreuses coliques Caco-2/TC7 a montré que la perte de E2F2 et ID3 inhibe le potentiel de migration et d'adhérence à différentes molécules de la MEC et que la perte d'expression de plusieurs isoformes des intégrines dans ces cellules entraînerait la perte d'adhérence. D'autre part, la localisation de plusieurs protéines de jonctions inter-cellulaires, dont la E-cadhérine et la β -caténine des jonctions adhérentes et la claudine-1 des jonctions serrées, est modifiée dans les cellules en migration qui sous-expriment E2F2 et ID3, expliquant le ralentissement de la migration dans ces cellules. De façon générale, une délocalisation des protéines des jonctions cellulaires reflète une diminution de la cohésion du feuillet épithélial, ce qui a été confirmé par microscopie électronique à balayage. La baisse de l'activité de la petite protéine GTPase Rac1, responsable de la formation des lamellipodes ainsi qu'à la baisse de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, explique le ralentissement de la migration cellulaire. Enfin, une lignée colique exprimant stablement des shRNA dirigés soit contre E2F2 soit ID3 a été générée à partir de la lignée colique HT29. Les cellules shE2F2 sous-exprimant E2F2 et xénogreffées en sous-cutané chez la souris nue ont une croissance tumorale accélérée, alors qu'en injection intraspénique, les cellules shE2F2, et dans une moindre mesure les cellules shID3, perdent leur capacité à développer des métastases hépatiques.

En conclusion, ces données indiquent que la perte d'expression du gène E2F2 participe à la progression des tumeurs coliques humaines mais que des cellules dépourvues de ce facteur perdent la capacité de disséminer à distance. Ces effets sont également observés pour le facteur de transcription ID3, quoique de façon moins importante.

The role of the E2F2 and ID3 transcription factors in colon tumour growth and cellular dissemination

Manon Voegelin^{1,2}, Céline Nicolet^{1,3}, Monique Dontenwill⁴, Sophie Martin⁴,
Dominique Guenot^{1,2}

Authors affiliations :

¹ EA 4438 Physiopathologie et Médecine Translationnelle, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

² Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France

³ Present address : IRCM - U896 INSERM, Université de Montpellier 1, Montpellier, France

⁴ Université de Strasbourg, LBP, CNRS UMR 7213, Illkirch, France

Address for correspondence : Dominique Guenot, EA 4438, 3 Avenue Molière, 67098 Strasbourg Cedex, France. Phone: 33-388-27-53-62; Fax: 33-388-26-35-38; E-mail; dominique.guenot@inserm.fr.

Key words : colon – invasion – xenograft – cell cycle - deletion

ABSTRACT

A previous comparative genomic hybridisation array-based study from our laboratory identified a micro-deletion at 1p36.12 in human colon carcinomas. This region contains the E2F2 and ID3 genes, which are known to regulate the cell cycle and cell differentiation, respectively. The incidence of this deletion increased with tumour progression but decreased at the metastatic stage. Therefore, to assess the role of the deletion in tumour growth and metastatic activity, we evaluated the functional consequences of the loss of these genes both *in vitro* in human colon cancer cells that were transiently depleted of either E2F2 or ID3 and *in vivo* in E2F2- and ID3-silenced HT29 cells that were implanted either subcutaneously or intra-splenically. We found that *in vitro*, the loss of E2F2 or ID3 expression was associated with decreased rates of adhesion and migration as a result of the relocalisation of junctional proteins, decreased Rac-1 GTPase activation, decreased integrin expression and decreased β -catenin transcriptional activity. Consistent with data from colon cancer patients, the knockdown of E2F2, and to a lesser extent, ID3 resulted in a decreased incidence of metastasis in a xenograft tumour model. Although the mechanistic basis of the metastasis suppressor function of E2F2 and ID3 remains obscure, these results suggest that the loss of E2F2 or ID3 expression decreases the invasive potential of human colon cancer cells by modulating the localisation and expression of invasion-related proteins.

ABBREVIATIONS

CC: Colorectal cancer

CIN: Chromosome Instability

MIN: Microsatellite Instability

CIMP: CpG island methylator phenotype

qRT-PCR : quantitative retro-transcription polymerase chain reaction

SD : Standard deviation

shRNA : small hairpin RNA

siRNA : small interfering RNA

INTRODUCTION

Advanced colorectal cancer (CC) is associated with poor prognosis, and surgical resection remains the best available treatment. However, recurrence and metastasis after surgical resection are the major causes of mortality. A molecular model of preferential sequence of genomic alterations all along tumour progression has been proposed [1]. However, despite our current knowledge of the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of CC, no biological parameter has been found to predict the progression of a tumour. CC still lacks clinically validated molecular markers for tumour evolution, possibly because of the heterogeneity between patients [2] and collected samples. Indeed, the phenotypes (i.e., chromosome instability [CIN], microsatellite instability [MIN], and CpG island methylator phenotype [CIMP]) and the tumour localisation (i.e., proximal, distal, rectal) have not been systematically specified and independently analysed, although they should be considered as separate entities [3]. In addition, rectal tumours are often mixed with colon tumours, although the patients generally receive radiotherapy prior to surgery. Nonetheless, several comparative genomic hybridisation (CGH) array analyses have highlighted multiple genomic alterations potentially involved in the development of colon cancer [4]. A complete amplification of the 20q arm has been found in 82% of distal CIN colon cancers in association with p53 allelic imbalance [5], and gains of 8q24 and 20q have been associated with the colon adenoma-to-carcinoma transition [6]. Together with 8q24 gain, loss of 9q34 has been correlated with metastatic lesions [7, 8].

To assess the molecular alterations involved in colon cancer progression and metastasis development, we analysed a homogeneous cohort of proximal and distal human CIN colon adenocarcinomas using CGH arrays. A micro-deletion targeting chromosome 1 at the 1p36.11-12 locus was found in 23% of the adenomas, suggesting an early role in carcinogenesis, and in 49% of the carcinomas of all clinical stages (personal communication). The incidence was higher in the left colon, as previously observed [9]. Interestingly, the incidence of the deletion at 1p36 found in 60% of early stage carcinomas (Tis and I stages; UICC classification), decreases at the late metastatic stage IV (34%), particularly in tumours of the left colon.

Over the past two past decades, a genomic deletion (or loss of heterozygosity) at the 1p36 locus has been reported in several tumour types, including neuroblastomas [10,

11] and breast [12], ovarian [13], and colon carcinomas [9, 14]. In colon cancer, deletion of 1p36 has been associated with poor prognosis [15]. Although other data support the hypothesis that the loss of 1p36 might be important during early colorectal carcinogenesis [9, 16], its involvement in the development of metastases remains controversial, as no significant association has been found between the loss of heterozygosity at 1p36 and clinicopathologic features including tumor stages [16]. Biological variations including the number of rectal, right-sided or left-sided tumours might explain the observed variation.

We therefore hypothesised that the 1p36 micro-deletion might not only contribute to the initiation and progression of colon carcinomas but also prevent the tumour cells from dissemination.

Within the micro-deleted region, among other genes with currently unknown functions, two transcription factors E2F2 and ID3 were identified. It is known that the E2F2 transcription factor regulates cellular processes, including cell cycle entry and progression, apoptosis, DNA repair, and differentiation [17] and that ID3 inhibits lineage-specific gene expression and differentiation in multiple cell lineages, including epithelial cells [18]. The ID family of transcription factors are also negative regulators of cell senescence [19], and involved in tumor angiogenesis as previous work has shown that ID3^{-/-} mice exhibited abnormal tumour vascularisation in a xenograft model [20].

However, E2F2 and ID3 expression in human tumours remain poorly characterised. E2F2 overexpression has been detected in epithelial ovarian tumours, and its expression is associated with poor prognosis [21]. The expression of E2F2 in lung metastases of osteosarcoma was higher in patients which relapsed compared with patients without relapse after metastasis resection [22]. Increased ID3 expression has been found in a majority of solid human tumours, including small cell lung, gastric and prostate tumours, and it is often associated with poorly differentiated tumours, aggressiveness and a poor prognosis [23, 24].

Based on *in vitro* and *in vivo* studies, E2F2 and ID3 exhibit either oncogenic or tumour suppressive properties, depending on the genetic context and the cell type [25, 26]. Moreover, little is known regarding the relationship between E2F2-regulated genes and invasive potential, but recent studies have indicated that the ectopic expression of E2F2 increases cellular adhesion to laminin, as well as invasion that was mediated by the increased expression of the β 4 integrin [27].

In our cohort of patients with colon adenocarcinomas, the expression of E2F2 and ID3 was found to be down-regulated compared with normal colon mucosal tissue (submitted for publication). Therefore, we analysed the functional impact of E2F2 or ID3 silencing on the cancer-associated properties of a colon cancer cell line *in vitro* using small interference RNAs (siRNAs). To determine the effects of the down-modulation of these genes *in vivo*, we also generated HT29 stable colon cancer cell lines in which E2F2 or ID3 were stable silenced by small hairpin RNAs (shRNAs). E2F2 or ID3 silencing diminishes the *in vitro* metastatic properties of the Caco-2/TC7 colon cancer cell line, including its migratory and adhesive properties. Additionally, whereas the stable silencing of E2F2 accelerated the growth of subcutaneously implanted HT29 xenografts, this silencing prevented liver metastasis when the E2F2-deficient HT29 cells were injected into the spleen. Taken together, these data support the hypothesis that the deletion of 1p36.11-12, and thereby the loss of E2F2 and ID3, simultaneously confers both tumourigenic potential and a protective barrier against metastatic dissemination.

RESULTS

Silencing of E2F2 but not ID3 impaired colon cancer cell proliferation

The 1p36.12 locus, which encompasses the E2F2 and ID3 genes, was found to be deleted in colon carcinomas. To evaluate the functional impact of E2F2 and ID3 silencing in human colon cancer cells, Caco-2/TC7 cells were transfected with siRNAs specific for E2F2 (siE2F2) or ID3 (siID3), and the silencing efficiency was validated via qRT-PCR 5 days after transfection (**Figure W1A**). To assess the impact of down-regulation of E2F2 or ID3 on human colon cancer cell growth, we performed MTS proliferation assays 2 days after siRNA transfection. After 4 days of proliferation, we observed a significant decrease in the proliferation index in siE2F2-treated cells compared with control siRNA-treated cells (**Figure 1A**; $p < 0.05$). ID3 down-regulation had no effect on proliferation. The trypan blue exclusion method confirmed these results, with a 22% reduction in the number of viable siE2F2-treated cells 3 days after transfection (**Figure 1B**: $p < 0.01$) and no difference in the number of viable siID3-treated cells ($p = 0.3$). These results demonstrate the negative impact of E2F2 knockdown on cell proliferation.

E2F2 and ID3 silencing decreased colon cancer cell migration

Of the several properties associated with metastatic potential, migration is a function required during the dissemination of cancer cells. The impact of the down-regulation of E2F2 or ID3 on the migratory potential of cells was evaluated *in vitro* in cells in which proliferation was blocked using mitomycin. Depletion of either E2F2 or ID3 resulted in a significant, 40% decrease in migration when compared with control cells (**Figure 2A**; $p < 0.01$). An identical inhibition of migration was obtained for cells that were allowed to proliferate (data not shown), suggesting that the migration was affected regardless of proliferation block. In addition, inhibition of migration was accompanied by morphological changes. Along the entire leading edge, the control cells exhibited cytoplasmic protrusions, including lamellipodia. However, in siE2F2-treated and siID3-treated cells, the leading edges appeared more linear and less ruffled with no apparent lamellipodia formation (**Figure 2B**). These results demonstrate that knockdown of E2F2 or ID3 reduces the migratory capacity of cells and is associated with decreased lamellipodia formation.

E2F2 and ID3 silencing decreased colon cancer cell adhesion and integrin expression

The adhesive properties of cells in which E2F2 or ID3 was knocked down were evaluated on different substrates. Cell adhesion was decreased in the siE2F2-treated and siID3-treated cells by 27% and 15% on fibronectin, by 37% and 58% on laminin-111, and by 30% and 20% on plastic, respectively (**Figure 3**; $p < 0.05$), whereas no difference was observed on collagen I. To determine the molecular mechanisms underlying the observed decrease in adhesion, the expression of several integrins involved in cell-matrix interactions was analysed using qRT-PCR and western blotting. Whereas $\alpha 3$ integrin expression was not altered following silencing of either E2F2 or ID3 (data not shown), the silencing of E2F2 and ID3 repressed all $\beta 1$, $\beta 4$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ integrin expression at the mRNA and protein levels (**Figure 4A**). Only integrin αV was not repressed by ID3 silencing. Similar results were observed at the protein level (**Figure 4B**).

E2F2 and ID3 silencing modified the architecture of the cell-cell junction

Using phase contrast microscopy, morphological changes were observed in siE2F2-treated and siID3-treated cells. In confluent regions, the cell-cell junctions of control

cells are easily observable, but they are undetectable in the siE2F2-treated and siID3-treated cells (**Figure 5A**). Further observation using electron microscopy showed that the cell monolayer appeared as a cracked sheet with large gaps at the cell-cell contacts in control cells (**Figure 5B and C**). By contrast, in siE2F2-treated cells, the cell sheet appeared smooth and intact with closed and continuous cell-cell junctions that were distinguishable only at the brush border. In siID3-treated cells, most of observed cell-cell contacts were closed, and only few cells had open junctions. In addition, in sub-confluent regions, no lamellipodia-like structures were observed at the leading edges in the migrating siE2F2-treated and siID3-treated cells compared with the control cells (**Figure 6**), consistent with the results from the wound-healing assays (**Figure 2B**). Thus, electron microscopy revealed changes in the morphology of siE2F2-treated and siID3-treated cells that was characteristic of static cells rather than migrating cells.

E2F2 and ID3 silencing altered the cytoskeletal organisation and the localisation of junction proteins

The subcellular localisation of proteins involved in the architecture of cell-cell junctions was assessed via immunofluorescence. Strong expression of β -catenin, a structural protein of adherens junctions, was observed at the cytoplasmic membrane of control confluent cells, whereas migrating cells exhibited only weak membrane labelling accompanied by nuclear β -catenin staining (**Figure 7 and Figure W2**). However, both confluent and migrating siE2F2-treated and siID3-treated cells exhibited high membrane β -catenin expression but no detectable nuclear β -catenin expression. Moreover, APC, a component of the adherens junctions, is also differentially localised in confluent or migrating control cells: confluent cells exhibited diffused labelling in the nucleus and the cytoplasm whereas migrating cells had only nuclear APC. However, in migrating siE2F2-treated and siID3-treated cells, APC was diffusely localised in the cytoplasm or even localised to the plasma membrane, similar to its localisation in confluent cells.

E-cadherin is a transmembrane component of adherens junctions and is connected with intracellular β -catenin via actin filaments. E-cadherin is also part of desmosomes when connected with intermediate filaments. In migrating control cells, E-cadherin was expressed in the cytoplasm, with perinuclear immunofluorescent spots appearing tangled within cytokeratin (CK)-19 filaments, and formed a highly

organised cytoskeletal network (**Figure 8**). In addition, control cells exhibited E-cadherin accumulation at junctions between two adjacent migrating cells and formed attachment plaques for the anchorage of CK-19 filaments. Membrane E-cadherin staining was weak in migrating control cells and appeared in cells that were progressively distal from the leading edge. In siE2F2-treated and siID3-treated cells, even migrating cells exhibited strong membrane staining with a small number of perinuclear spots in siID3-treated cells. Although the CK-19 staining was weak in siE2F2-treated and siID3-treated cells, there was a highly immunoreactive network of condensed CK-19 filaments all around cell clusters at the invasive front.

Claudin-1 is a transmembrane protein found in the zonula occludens. In control conditions, Claudin-1 was nuclear, although migrating cells occasionally exhibited spot-like structures in the cytoplasm, particularly at the nuclear periphery (**Figure 9**). Membrane staining was rare and exclusively detected in the central zones of cell clusters. However, in siE2F2-treated and siID3-treated cells, Claudin-1 was predominantly detected at the plasma membrane and in the nucleus, only few perinuclear spots observed in migrating cells.

Paxillin, a focal adhesion-associated adaptor protein, is connected to actin fibres to form focal adhesions. In control migrating cells, paxillin was associated with actin-rich focal adhesions that were particularly developed at the leading edge of the cells, where the actin fibres formed a loose belt at the migration front (**Figure 10**). Conversely, siE2F2-treated and siID3-treated cells were characterised by a marginal and compact actin belt that was perpendicular to the direction of migration.

E2F2 and ID3 silencing inhibited RAC activation

Cytoskeletal reorganisation is required for the formation of cytoplasmic structures involved in cell migration, and the Rho family of small GTPases are key proteins in this process. To investigate the potential impairment of Rho GTPase activation due to reduced E2F2 or ID3 expression, we assessed Rac1/2/3 activity. As expected, siE2F2-treated and siID3-treated cells exhibited 42% ($p < 0.001$) and 24% ($p < 0.01$) inhibition of Rac activity, respectively (**Figure 11A**). This result suggests that the silencing of E2F2 and ID3 blocks Rac GTPase activity, resulting in altered actin rearrangement required for lamellipodia formation and consequently decreased migration and adhesion.

E2F2 and ID3 silencing decreased β -catenin activity

To demonstrate that the loss of nuclear β -catenin in migrating E2F2-silenced and ID3-silenced cells was associated with decreased β -catenin transcriptional activity, a luciferase reporter assay was used. As expected, silencing of E2F2, but not of ID3, resulted in a 22% reduction in β -catenin transcriptional activity (**Figure 11B**). However, silencing of ID3 did not alter β -catenin transcriptional activity. Taken together, the loss of nuclear localisation of β -catenin and APC, along with the decreased β -catenin activity, suggests that the loss of E2F2 expression impaired the Wnt/APC/ β -catenin pathway.

E2F2 silencing increased *in vivo* tumour growth but impaired metastasis

To assess the impact of E2F2 or ID3 silencing *in vivo*, HT29 cell lines that stably expressed an shRNA directed against either E2F2 or ID3 or a scrambled non-specific sequence were generated, and the down-regulation of each mRNA transcript was assessed via qRT-PCR (**Figure W1B**). Silencing of E2F2 significantly increased the mean tumour volume of subcutaneously implanted xenografts (1807 mm³ for shE2F2-expressing cells vs. 1232 mm³ for control shRNA-expressing cells; $p < 0.05$) (**Figure 12A and Figure W3A**), whereas the silencing of ID3 had no effect (978 mm³; $p = 0.27$). The loss of E2F2 or ID3 expression in the xenografts was validated via qRT-PCR at the end of the experiment (**Figure W3B**). Using the intra-splenic model of metastasis, three of six mice injected with control shRNA-expressing cells developed macroscopic liver metastases after 10 weeks, whereas only one of five mice injected with shE2F2-expressing cells and one of six mice injected with shID3-expressing cells developed liver metastases (**Figure 12B**). Quantification of human Alu sequences in the mouse liver allowed the detection of microscopic metastases in four of six mice injected with the control shRNA-expressing cells, one of five mice injected with the shE2F2-expressing cells, and three of six mice injected with the shID3-expressing cells (**Figure 12C**). These results demonstrate that cells lacking E2F2 (and to a lesser extent ID3) expression exhibited a reduced capacity to metastasise compared with E2F2- or ID3-sufficient cells.

DISCUSSION

In the present study, the silencing of E2F2 or ID3 in colon cancer cell lines resulted in decreased *in vitro* cellular migration and adhesion, which was associated with the

altered subcellular localisation of junctional proteins and with a diminished *in vivo* capacity to colonise and metastasise to the liver. The reduced migratory and invasive capacity following reduction of E2F2 or ID3 expression strongly supports the involvement of these genes in the dissemination of colon carcinoma cells.

The migration of tumour cells requires extensive interactions with the surrounding extracellular matrix (ECM) that are managed by focal adhesion contacts. Focal adhesions are multi-protein complexes that connect the ECM to the intracellular actin [31] and tubulin [32] networks via integrins. Integrins are essential for cell migration and invasion, not only because they directly mediate adhesion to the extracellular matrix but also because they regulate intracellular signalling pathways that control cytoskeletal organisation, force generation and survival [33]. Interestingly, an up-regulation of the expression of the $\beta 4$ integrin subunit was reported in primary tumors of the human colon [34] strongly supporting the notion that the $\alpha 6\beta 4$ integrin is an important player in the migration and invasion of colon cancer cells. Our study demonstrates that the decreased integrin expression in E2F2- or ID3-silenced cells probably resulted in their reduced adhesion and migration.

Switching between adhesive and non-adhesive states requires extensive cytoskeletal rearrangements and involves several proteins in the adherens and tight junctions. The major components of tight junctions are the proteins of the Claudin family, whereas adherens junctions are comprised predominantly of E-cadherin and β -catenin, which are also key molecules involved in the Wnt signalling pathway.

In the present study, E-cadherin, β -catenin and Claudin-1 were found to be mostly localised to the cell membrane in confluent control cells but became intracellular with a perinuclear or nuclear localisation in migrating cells. Such altered subcellular localisations have been previously associated with tumour progression and invasion in several cancers, including colon cancer [35, 36].

E2F2 or ID3 depletion resulted in decreased Rac GTPase activity, abrogating the formation of lamellipodia that were otherwise observed at the leading edge of migrating control cells (**Figure 2B and 6**). Lamellipodia provide the force that propels the cell forward during the migration. Rac 1 activity is necessary for lamellipodia formation via actin polymerisation and extension [37], and Rac1 depletion has been shown to suppress focal adhesion formation in carcinoma cells [38]. At the leading edge of the cell, focal adhesions are formed in lamellipodia during migration and consist of integrins and adaptor proteins (such as paxillin). The focal adhesions

provide a structural and signalling link between the ECM and the actin cytoskeleton. A recent study has shown that repressing paxillin expression in the HCT-8 colon cancer cell line inhibited the proliferation, migration and invasive capacity of the cells [39]. In accordance with this observation, we observed that the mRNA expression of paxillin is decreased in siE2F2- treated and siID3-treated cells (data not shown). Other studies have suggested that paxillin plays a role in the acquisition and maintenance of the malignant phenotype [40].

During carcinogenesis, the expression of E-cadherin and β -catenin is not consistently reduced; rather, the proteins are often redistributed within subcellular compartments. Whereas membrane-localised/cytoplasmic β -catenin plays a role in maintaining cell adhesion by binding to the intracellular domain of E-cadherin, nuclear β -catenin activates the transcription of genes that contribute to cell growth and invasion [41]. Moreover, the nuclear accumulation of β -catenin, as observed in the migrating control cells in this study, has been previously shown to be associated with poor survival in colorectal cancer [42]. In the present study, silencing of E2F2 or ID3 resulted in the localisation of both E-cadherin and β -catenin to the plasma membrane and leading edge of the cells, supporting that the hypothesis that the invasive potential of these migrating cells is lost. Consistent with the relocalisation of β -catenin to the membrane in siE2F2-treated and siID3-treated cells, decreased transcriptional activity of β -catenin was detected using the Topflash reporter assay.

As a component of tight junctions, Claudin-1 mediates physical adhesion and paracellular transport, and in tumours, alterations in tight junctions often result in increased paracellular leakage, as has been demonstrated in early neoplastic progression in the colon [43]. In our study, Claudin-1 was found in the nucleus and/or cytoplasm in migrating control cells, and this localisation pattern has been described previously and is associated with tumour aggressiveness [44]. Moreover, nuclear Claudin-1 was recently identified as a probable target of β -catenin/Tcf signalling [45], and its localisation could be correlated with nuclear β -catenin, as demonstrated in the migrating control cells in this study. However, in siE2F2-treated and siID3-treated cells, Claudin-1 was also localised to the plasma membrane—a localisation pattern that is more typical of non-tumour cells—thereby diminishing the capacity of the cells to migrate. Recently, perinuclear Claudin-1 was found to be localised in early endosomes and was associated with the disruption of tight junctions [46]. Although the importance of dysregulated Claudin-1 localisation is not fully understood, the

altered localisation of Claudin proteins may lead to a loss of cell polarity [47], diminished cell adhesion [48], and an invasive phenotype [49].

Taken together, these data strongly support our conclusion that the junctional function of β -catenin, E-cadherin and Claudin-1 is altered in cells deficient in E2F2 or ID3 and is associated with decreased invasive properties. As confirmed using electron microscopy, less mature junctions (i.e., large extra-cellular spaces) were observed in migrating control cells, but more cohesive cell-cell contacts were observed in E2F2-deficient and ID3-deficient cells.

The APC tumour suppressor gene, which is responsible for β -catenin degradation, negatively regulates the Wnt/ β -catenin signalling pathway and was recently shown to be associated with the actin-based cytoskeleton [50]. Moreover, APC has been shown to stimulate membrane ruffling and lamellipodia formation [51] and to interact with an effector of Rac1 at the leading edge of migrating cells [52]. These data demonstrate that APC regulates cytoskeletal dynamics, cell polarity and is essential for cell movement.

A study by Brocardo et al. previously demonstrated that APC functions as a “sensor” system that responds to the loss of cell-cell contacts (e.g., in migrating cells) by translocating to the nucleus and returning to the cytoplasm upon full restoration of the contacts (e.g., in confluent cells) [53]. Indeed, in the cells examined in our study, nuclear APC was observed only in migrating control cells but not in static confluent cells or in siE2F2-treated or siID3-treated cells, which exhibited reduced migration. Conversely, Henderson et al. (2000) proposed that APC shuttles between the nucleus and cytoplasm and regulates the nuclear accumulation of β -catenin by transporting it either to the cytoplasm for degradation or to other functionally relevant locations, such as the adherens junctions [54].

Our *in vitro* studies indicate that the loss of E2F2 or ID3 expression alters the subcellular localisation of proteins involved in adherens and tight junctions, resulting in reduced adhesion and migratory capacity. Following the decreased expression of E2F2 or ID3, the protein expression of Claudin-1 was increased, whereas no changes in the protein level of E-cadherin and β -catenin were observed (data not shown). Although the loss of E-cadherin expression is considered to be the initial step in the epithelial-mesenchymal transition, altered protein localisation may precede it in migrating cells [55].

The extent of cancer metastasis depends on the interaction of the metastatic cells with host factors, including the organ microenvironments that critically influence the growth of metastatic cells. Thus, to determine the potential impact of E2F2 or ID3 deficiency on tumour growth and/or metastatic dissemination *in vivo*, control, E2F2-deficient, or ID3-deficient cells were either implanted subcutaneously or injected intra-splenically into nude mice. The cells were tumourigenic at both injection sites, but hepatic metastases were found only in the mice intra-splenically injected with control, E2F2- and ID3-sufficient cells. Whereas E2F2 depletion had opposite effects on cell proliferation in the *in vitro* and *in vivo* experiments, this may have resulted from the interaction of the tumour cells with the host microenvironment in the *in vivo* model. In summary, the data reported here indicate that the E2F2 transcription factor, and to a lesser extent, the ID3 transcription factor can promote the invasion of colon carcinoma cells.

MATERIEL AND METHODS

Cell culture

The Caco2-derived cell clone, TC7 [28], was grown under 5% CO₂, 95% atmospheric air in DMEM supplemented with 1 g/l glucose, 20% foetal calf serum, 1% non-essential amino acids, 1% penicillin, 1% streptomycin, and 0.1% gentamicin (Gibco, France).

Primers and antibodies

The E2F2, ID3, ITGA6, ITGB4 and TBP primers for quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) were purchased from Qiagen (E2F2: QT00045654; ID3: QT01673336; ITGA6: QT00025725; ITGB4: QT00049147; TBP: QT00000721; PBGD: QT00014462). The other primers were synthesised by Invitrogen (**see Table 1** for sequences).

For immunofluorescence, the following primary antibodies were used: mouse monoclonal anti- β -catenin (1:200, BD Transduction Laboratories, 610153), rabbit polyclonal anti-APC (1:100, Santa Cruz, N-15, sc-895), rabbit polyclonal anti-Claudin-1 (1:200, Zymed Laboratories, 51-9000), rabbit monoclonal anti-cytokeratin-19 (1:100, DB Biotech, E16, DB 103-1), mouse monoclonal anti-E-cadherin (1:1000, BD Bioscience, 610182), and rabbit monoclonal anti-paxillin (1:250, Epitomics, AC-

0096RUO). The following secondary antibodies were used: Alexa Fluor 488–conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes Invitrogen, A11034), Alexa Fluor 488–conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes Invitrogen, A11029) and Cy3-conjugated AffiniPure Goat anti-rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, 111-165-003). For western blot analysis, the following antibodies were used: rabbit polyclonal anti-integrin β 1 (1:1000, 9EG7, a gift from Dr. Vestweber), goat polyclonal anti-integrin α 2 (1:200, Santa Cruz, sc-6586), rabbit polyclonal anti-integrin α 5 (1:4000, Millipore, AB1928), rabbit polyclonal anti-integrin α V (1:1000, Millipore, AB1930), rabbit polyclonal anti-GAPDH (1:10000, Millipore, MAB374) and HRP-conjugated secondary antibodies (1:10,000, Promega).

siRNA reverse transfection

Prior to seeding the cells, siRNA was added to a 6-well plate (0.1 nmol; Hs_E2F2_4: SI00375410, Hs_ID3_10: SI04431714, Qiagen, France) and incubated with Lipofectamine (Invitrogen, Life Technologies France) for 20 min. Cells (3×10^5 cells per well) were added to the RNAi duplexes and collected after 2 days for validation of gene silencing and functional analyses. A non-specific, non-targeting siRNA was used as a control treatment (Eurogentec, France SASU).

***In vitro* proliferation, migration and adhesion assays**

Proliferation was assessed using an MTS-based CellTiter 96 Cell Proliferation Assay, as recommended by the manufacturer (Promega, France). Briefly, 2 days after siRNA transfection, the cells were seeded at 7.5×10^3 cells/well in a 96-well plate, and viable cells were quantified after a 4-day period. Cell proliferation was also evaluated via direct cell counting using the trypan blue exclusion method.

Migratory potential was assessed using Ibidi cell-culture inserts (Biovalley, France), as recommended by the manufacturer. Briefly, 2 days after siRNA transfection, cells were seeded at 4×10^5 cells/ml into two compartments (28×10^3 cells/compartment). When confluence was reached (T0), the cells were pre-treated with 20 μ g/ml mitomycin (Sigma, M4287) in serum-free medium supplemented with 0.1% BSA to block proliferation before removing the insert, creating a 500- μ m cell-free gap. The area between both patches of cells was measured in each dish in four different fields at the T0 and T24 time points. Migration was defined as the surface colonised by

cells between both cell patches, and the results are presented as the percentage of migration compared with control cells.

Cell adhesion assays were performed in 96-well plates. Each well was coated with 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectin, 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ laminin-111, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ collagen I or PBS overnight at 4°C and blocked with 1% BSA for 1 h. The wells were seeded with 50×10^3 cells, and the plates were incubated for 2.5 h at 37°C. The adherent cells were fixed with 70% ethanol and stained with 0.1% crystal violet. The incorporated dye was solubilised in 10% acid acetic and quantified by measuring the absorbance at 595 nm.

Rac activation assay

Rac activation (Rac1/2/3) was measured using the G-LISA Rac Activation Assay Kit (Cytoskeleton, Tebu-Bio France). Briefly, 4 days after siRNA transfection, 45×10^4 cells were seeded in a 35 mm dish and lysed 24 h later, as recommended by the manufacturer. The lysates (37.5 μg protein) were incubated on 96-well plates that contained a Rac-GTP-binding protein. Bound Rac-GTP was detected using a Rac-specific primary antibody (1:200) and an HRP-conjugated secondary antibody (1:100). The positive control was control Rac protein, and the negative control was lysis buffer. The resulting signals were measured at 490 nm, and the levels of Rac-GTP in the siRNA-treated cells were normalised to the control cells.

β -catenin transcriptional activity

β -catenin transcriptional activity was measured 5 days after siRNA transfection. On day 3, the cells were trypsinised and re-seeded into 24-well plates (1.5×10^5 cells in 1 ml/well). The cells were transfected the following day with 200 ng pGL3-Basic Vector (Promega, E1741), 50 ng pGFP, 50 ng pRL, and 50 ng of a *Renilla* luciferase-expressing plasmid (Promega, E6881) using 1 μl Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668) per well. Twenty-four hours later, the cells were lysed in 100 μl of PLB for 30 min with agitation, and 20 μl of lysate was used for the measurement of the firefly and *Renilla* luciferase activities using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, E1960) as recommended by the manufacturer.

Immunofluorescence

Cells were plated in a LabTek II Chamber Slide System (8-well glass slide, Thermo Scientific, Nalgene Nunc International Corporation) and allowed to grow for 2 days before fixation for 30 min in 4% paraformaldehyde (PAF) in PBS. Cells were blocked for non-specific binding using 0.5% Triton/0.5% NGS in PBS or in 0.1% Triton/0.5% NGS in PBS for 30 min. The primary antibodies were added to the blocking buffer and incubated with the fixed cells overnight at 4°C. After three washes in PBS, the cells were incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. The cells were subsequently incubated in DAPI (1:30,000) for 5 min and washed. Next, the slides were mounted in anti-fading solution, and images were captured using a Zeiss Axio Imager.Z2 (Apotome) system. For the negative controls, the primary antibodies were omitted.

Western blotting

Western blotting experiments were performed as described previously [29]. Briefly, 3 days after transfection, cells were lysed for 30 min on ice in ice-cold lysis buffer containing 1% Triton-X100, 1:100 phosphatase inhibitor cocktails I and II (Sigma, P2850 and P5726) in PBS, and 1:100 protease inhibitor cocktail (Sigma, P8380). Proteins (20 µg) were separated via SDS-PAGE (BioRad) and transferred to PVDF membranes (Amersham). Following antibody probing, the proteins were visualised via enhanced chemiluminescence.

Real-time RT-PCR

mRNA expression was evaluated using relative qRT-PCR with an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (7500 software v2.0.5) and QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen France). RNA was extracted using Trizol (Invitrogen), as recommended by the manufacturer, and was treated with 1 µl DNase I (Amplification Grade; Invitrogen Life Technologies, France). Reverse transcription of 2 µg RNA was performed using AMV reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, France) and oligo(dT) primers. PCR was performed using HotStart Taq polymerase as follows: an initial denaturation at 95°C for 15 min followed by 40 cycles of 94°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s (the primer sequences are listed in **Table 1**). The specificity of the PCR products was assessed using a melting curve. All quantification was performed in duplicate in at least three independent

experiments and normalised to the endogenous TBP housekeeping gene. Target cDNA expression was quantified using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method.

Generation of stable cell lines

BOSC23 cells (30×10^4) were seeded in 6-well plates in antibiotic-free medium and transfected with plasmids (0.5 μg pLP1, 0.25 μg pLP2, 0.25 μg pLP3, 1 μg pLKO.1-shRNA [the shRNA sequences are listed in **Table 1**], and 50 ng pGFP [for verification of the transfection efficiency]) the following day using 7 μl of Lipofectamine 2000 (Invitrogen 11668). Three days after transfection, the supernatant containing viral particles was cleared of cells and cell debris using a 45- μm filter, mixed with polybrene (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and HEPES (20 mM), and used to infect HT29 cells. To increase infection efficiency, the cells were centrifuged for 90 min at 2,500 rpm. Two days after infection, the transduced cells were selected using 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin, and gene silencing was verified for 5 passages using qRT-PCR. For *in vivo* experiments, the cells were used at passage 3.

In vivo xenograft experiments

Female 4-week-old athymic nude mice (nu/nu) were purchased from Janvier and maintained under pathogen-free conditions in facilities approved by the French Ethics Committee and under the supervision of authorised investigators. The mice were anaesthetised using isoflurane, and 1×10^6 HT29 shRNA cells resuspended in 100 μl DMEM were injected subcutaneously into two points per flank of each mouse (a total of four tumours per animal; three mice per group). Three times a week for 4 weeks, the weight of each mouse and the tumour sizes were measured. At the end of the experiment, the mice were euthanised via cervical dislocation, and tumour samples were collected for immunohistochemistry and molecular analyses. For metastatic experiments, the spleen was exposed via a small abdominal incision, and 1×10^6 cells resuspended in 50 μl DMEM were injected intra-splenically. Seven to 10 weeks after injection, the liver was collected when the mice became moribund due to primary splenic tumours and/or metastases. Liver metastases were observed macroscopically and microscopically, and deep metastases were analysed via detection of human tumour cells by quantitative Alu PCR, as described below.

Scanning electron microscopy

Cells were fixed for 2 h in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) and post-fixed for 1 h in 1% osmic acid in cacodylate buffer. The cells were dehydrated in a series of graded ethanol solutions, 50:50 ethanol:hexamethyldisilazane, and finally in 100% hexamethyldisilazane. The specimens were metallised by gold sputtering using a Balzers “Ions Sputter” SCD 040 and were observed using a Hitachi S800 scanning electron microscope.

Quantitative Alu PCR

Briefly, genomic DNA was extracted from liquid nitrogen–frozen samples using phenol/chloroform. Real-time PCR was performed as described previously [30]. Specifically, primate-specific Alu repeat sequences were amplified using 6 ng of extracted genomic DNA as a template and the QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen France) for quantification. PCR was performed using HotStart Taq polymerase as follows: initial denaturation at 95°C for 15 min followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 63°C for 30 s, and 72°C for 30 s (the primer sequences are listed in **Table 1**). The samples were normalised based on the APC gene with primer sequences recognising both the mouse murine and human gene (exon 10). Each assay included a negative control (liver DNA from a nude mouse that did not receive any human cells) and a positive control (DNA extracted from human HT29 cells). Experiments with mixed human and mouse DNA showed a logarithmic correlation between the amount of human DNA and the $\Delta\Delta Ct$ (**Figure W4**). The presence of liver metastases corresponded to the detection of at least 30 pg of human DNA (0.5% of total DNA).

Statistical analyses

All *in vitro* experiments had mean values and standard deviations (SD) from at least three independent experiments performed in triplicate and were statistically analysed using non-parametric Mann Whitney *U* tests (GraphPad Prism 5 software). The *in vivo* xenograft experiments were analysed using parametric unpaired *t*-test after normality was determined via the Shapiro-Wilk test.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Elisabeth Martin, Nathalie Hamelin and Madeleine Jaillet for technical assistance, the Etablissement français du sang (EFS, Strasbourg France), N. Boehm and R. Bury (Institut d'Histologie, Faculté de Médecine, Strasbourg, France), Olivier Lefebvre for the generation of the stable cell lines, and the IFR 37 (Strasbourg, France) for the acquisition of the electron microscopy images. This work was supported by the Université de Strasbourg, Inserm, the Ligue Régionale contre le Cancer and Alsace contre le Cancer.

REFERENCES

- [1] Fearon ER, and Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767.
- [2] Weber J-C, Meyer N, Pencreach E, Schneider A, GuÃ©rin E, Neuville As, Stemmer C, Brigand Cc, Bachellier P, Rohr S, *et al.* (2007). Allelotyping analyses of synchronous primary and metastasis CIN colon cancers identified different subtypes. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* **120**, 524-532.
- [3] Pocard M, Salmon RJ, Muleris M, Remvikos Y, Bara J, Dutrillaux B, and Poupon MF (1995). [Two colons--two cancers? Proximal or distal adenocarcinoma: arguments for a different carcinogenesis]. *Bulletin Du Cancer* **82**, 10-21.
- [4] Diep CB, Kleivi K, Ribeiro FR, Teixeira MR, Lindgjaerde OC, and Lothe RA (2006). The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta-analysis of copy number changes. *Genes, Chromosomes & Cancer* **45**, 31-41.
- [5] Nicolet C, Guerin E, Neuville A, Kerckaert JP, Wicker N, Bergmann E, Brigand C, Kedinger M, Gaub MP, and Guenot D (2009). Evidence for various 20q status using allelotyping, CGH arrays, and quantitative PCR in distal CIN colon cancers. *Cancer Lett* **282**, 195-204.
- [6] Hermsen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciutto A, Roemen G, Arends J-W, Williams R, Giaretti W, *et al.* (2002). Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* **123**, 1109-1119.
- [7] Ghadimi BM, Grade M, Liersch T, Langer C, Siemer A, Fuzesi L, and Becker H (2003). Gain of chromosome 8q23-24 is a predictive marker for lymph node positivity in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **9**, 1808-1814.
- [8] Ghadimi BM, Grade M, Monkemeyer C, Kulle B, Gaedcke J, Gunawan B, Langer C, Liersch T, and Becker H (2006). Distinct chromosomal profiles in metastasizing and non-metastasizing colorectal carcinomas. *Cellular Oncology: The Official Journal of the International Society for Cellular Oncology* **28**, 273-281.
- [9] Thorstensen L, Qvist H, Heim S, Liefers GJ, Nesland JM, Giercksky KE, and Lothe RA (2000). Evaluation of 1p losses in primary carcinomas, local

- recurrences and peripheral metastases from colorectal cancer patients. *Neoplasia (New York, N.Y.)* **2**, 514-522.
- [10] Janoueix-Lerosey I, Novikov E, Monteiro M, Gruel Ng, Schleiermacher G, Llorion Ba, Nguyen C, and Delattre O (2004). Gene expression profiling of 1p35-36 genes in neuroblastoma. *Oncogene* **23**, 5912-5922.
- [11] White PS, Thompson PM, Gotoh T, Okawa ER, Igarashi J, Kok M, Winter C, Gregory SG, Hogarty MD, Maris JM, *et al.* (2005). Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene* **24**, 2684-2694.
- [12] Bieche I, Khodja A, and Lidereau R (1999). Deletion mapping of chromosomal region 1p32-pter in primary breast cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer* **24**, 255-263.
- [13] Imyanitov EN, Birrell GW, Filippovich I, Sorokina N, Arnold J, Mould MA, Wright K, Walsh M, Mok SC, Lavin MF, *et al.* (1999). Frequent loss of heterozygosity at 1p36 in ovarian adenocarcinomas but the gene encoding p73 is unlikely to be the target. *Oncogene* **18**, 4640-4642.
- [14] Muleris M, Delattre O, Olschwang S, Dutrillaux AM, Remvikos Y, Salmon RJ, Thomas G, and Dutrillaux B (1990). Cytogenetic and molecular approaches of polyploidization in colorectal adenocarcinomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **44**, 107-118.
- [15] Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Gagliardi G, Swanson PE, Birnbaum EH, Fleshman JW, Kodner IJ, and Moley JF (1997). Prognostic value of chromosome 1p allelic loss in colon cancer. *Gastroenterology* **113**, 761-766.
- [16] Matsuzaki M, Nagase S, Abe T, Miura K, Shiiba K, Sunamura M, and Horii A (1998). Detailed deletion mapping on chromosome 1p32-p36 in human colorectal cancer: identification of three distinct regions of common allelic loss. *International Journal of Oncology* **13**, 1229-1233.
- [17] DeGregori J, and Johnson DG (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Current Molecular Medicine* **6**, 739-748.
- [18] Coppe J-P, Smith AP, and Desprez P-Y (2003). Id proteins in epithelial cells. *Experimental Cell Research* **285**, 131-145.
- [19] Zebedee Z, and Hara E (2001). Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene* **20**, 8317-8325.
- [20] Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, *et al.* (1999). Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* **401**, 670-677.
- [21] Reimer D, Sadr S, Wiedemair A, Stadlmann S, Concin N, Hofstetter G, Muller-Holzner E, Marth C, and Zeimet AG (2007). Clinical relevance of E2F family members in ovarian cancer--an evaluation in a training set of 77 patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 144-151.
- [22] Tesser-Gamba F, Petrilli AS, de Seixas Alves MT, Filho RJG, Juliano Y, and Toledo SRC (2011). MAPK7 and MAP2K4 as prognostic markers in osteosarcoma. *Human Pathology*.
- [23] Wang K, Li X-j, Yin H-l, Zhou H-b, Chen F-f, Wang H, and Ma H-h (2011). [Expression of ID3 protein in prostate cancer and its clinicopathological significance]. *Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology* **17**, 410-413.

- [24] Yang H-Y, Liu H-L, Liu G-Y, Zhu H, Meng Q-W, Qu L-D, Liu L-X, and Jiang H-C (2011). Expression and prognostic values of Id-1 and Id-3 in gastric adenocarcinoma. *The Journal of Surgical Research* **167**, 258-266.
- [25] Perk J, Iavarone A, and Benezra R (2005). Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nature Reviews. Cancer* **5**, 603-614.
- [26] Johnson DG, and Degregori J (2006). Putting the Oncogenic and Tumor Suppressive Activities of E2F into Context. *Current Molecular Medicine* **6**, 731-738.
- [27] Yoon S-O, Shin S, and Mercurio AM (2006). Ras stimulation of E2F activity and a consequent E2F regulation of integrin alpha6beta4 promote the invasion of breast carcinoma cells. *Cancer Research* **66**, 6288-6295.
- [28] Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, and Rousset M (1994). Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *Journal of Cell Science* **107**, 213-225.
- [29] Martin S, Cosset EC, Terrand J, Maglott A, Takeda K, and Dontenwill M (2009). Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of [alpha]5[beta]1 integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749, an [alpha]5[beta]1 integrin antagonist. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1793**, 354-367.
- [30] Schneider T, Osl F, Friess T, Stockinger H, and Scheuer WV (2002). Quantification of human Alu sequences by real-time PCR--an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clinical & Experimental Metastasis* **19**, 571-582.
- [31] Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Rothkegel M, RÄ¼diger M, Schlä¼ter K, Stanke G, and Winkler J (1995). The molecular architecture of focal adhesions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **11**, 379-416.
- [32] Horwitz AR, and Parsons JT (1999). Cell migration--movin' on. *Science (New York, N.Y)* **286**, 1102-1103.
- [33] Aplin AE, Howe AK, and Juliano RL (1999). Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 737-744.
- [34] Ni H, Dydensborg AB, Herring FE, Basora N, Gagne D, Vachon PH, Beaulieu JF: Upregulation of a functional form of the beta4 integrin subunit in colorectal cancers correlates with c-Myc expression (2005). *Oncogene* **24**, 6820-6829.
- [35] Lugli A, Zlobec I, Minoo P, Baker K, Tornillo L, Terracciano L, and Jass JR (2007). Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis. *Histopathology* **50**, 453-464.
- [36] Matsuoka T, Mitomi H, Fukui N, Kanazawa H, Saito T, Hayashi T, and Yao T (2011). Cluster analysis of claudin-1 and -4, E-cadherin, and beta-catenin expression in colorectal cancers. *Journal of surgical oncology* **103**, 674-686.
- [37] Nobes CD, and Hall A (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- [38] Guo F, Debidda M, Yang L, Williams DA, and Zheng Y (2006). Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 18652-18659.

- [39] Jun Q, Zhiwei W, Lilin M, Jing K, and Qichao N (2011). Effects of paxillin on HCT-8 human colorectal cancer cells. *Hepato-Gastroenterology* **58**, 1951-1955.
- [40] Azuma K, Tanaka M, Uekita T, Inoue S, Yokota J, Ouchi Y, and Sakai R (2005). Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene* **24**, 4754-4764.
- [41] MacDonald BT, Tamai K, and He X (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell* **17**, 9-26.
- [42] Wong SCC, Lo ESF, Lee KC, Chan JKC, and Hsiao WLW (2004). Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 1401-1408.
- [43] Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, Carp NZ, Klurfeld DM, and Mullin JM (1999). Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* **20**, 1425-1431.
- [44] Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou S-R, Schmidt C, Neff J, Washington MK, and Beauchamp RD (2005). Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 1765-1776.
- [45] Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, and Furukawa Y (2001). Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncology Research* **12**, 469-476.
- [46] Asaka M, Hirase T, Hashimoto-Komatsu A, and Node K (2011). Rab5a-mediated localization of claudin-1 is regulated by proteasomes in endothelial cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **300**, C87-96-C87-96.
- [47] Tsukita S, Furuse M, and Itoh M (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **2**, 285-293.
- [48] Matsuda M, Kubo A, Furuse M, and Tsukita S (2004). A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *Journal of Cell Science* **117**, 1247-1257.
- [49] Leotlela PD, Wade MS, Duray PH, Rhode MJ, Brown HF, Rosenthal DT, Dissanayake SK, Earley R, Indig FE, Nickoloff BJ, *et al.* (2007). Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene* **26**, 3846-3856.
- [50] Moseley JB, Bartolini F, Okada K, Wen Y, Gundersen GG, and Goode BL (2007). Regulated binding of adenomatous polyposis coli protein to actin. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 12661-12668.
- [51] Kawasaki Y, Tsuji S, Sagara M, Echizen K, Shibata Y, and Akiyama T (2009). Adenomatous polyposis coli and Asef function downstream of hepatocyte growth factor and phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 22436-22443.
- [52] Watanabe T, Wang S, Noritake J, Sato K, Fukata M, Takefuji M, Nakagawa M, Izumi N, Akiyama T, and Kaibuchi K (2004). Interaction with IQGAP1 Links APC to Rac1, Cdc42, and Actin Filaments during Cell Polarization and Migration. *Developmental Cell* **7**, 871-883.
- [53] Brocardo MG, Bianchini M, Radrizzani M, Reyes GB, Dugour AV, Taminelli GL, Gonzalez Solveyra C, and Santa-Coloma TA (2001). APC Senses Cell-

Cell Contacts and Moves to the Nucleus upon Their Disruption. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **284**, 982-986.

- [54] Henderson BR (2000). Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates [beta]-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* **2**, 653-660.
- [55] Kalluri R, and Weinberg RA (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation* **119**, 1420-1428.

Table 1: Primers and shRNA sequences

	Primer sequences (5'-3')
ITGAV Forward	AGGTGCCTACGAAGCTGAGC
ITGAV Reverse	AAGGCTTCATTGTTTCGGACA
ITGA5 Forward	GGGCAGCAGGACAGGGTTAC
ITGA5 Reverse	GCCTTGCCAGAAATAGC
ITGB1 Forward	CAAATTGTGGGTGGTGCACA
ITGB1 Reverse	TGGAGGGCAACCCTTCTTT
ITGA2 Forward	GATTGTAGCAACATCCCAGAC
ITGA2 Reverse	GAAGATGTTTGTCTATTTTCAGTGG
ALU Forward	ACGCCTGTAATCCCAGCACTT
ALU Reverse	TCGCCAGGCTGGAGTGCA
APC Forward	TTTGGCCACAGGTGAAATGGT
APC Reverse	TGGCCCGAGCCTCTTACTGC
	shRNA sequences (5'-3')
E2F2 Forward	CCGGGCAGACAGTGATTGCCGTCAACTCGAGTTGACGGCAATCACTGTCTGCTTTTTG
E2F2 Reverse	AATTCAAAAAGCAGACAGTGATTGCCGTCAACTCGAGTTGACGGCAATCACTGTCTGC
ID3 Forward	CCGGTCAGCTTAGCCAGGTGAAATCTCGAGATTTCCACCTGGCTAAGCTGATTTTTG
ID3 Reverse	AATTCAAAAATCAGCTTAGCCAGGTGAAATCTCGAGATTTCCACCTGGCTAAGCTGA
Scramble Forward	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTGTTTTTG
Scramble Reverse	AATTCAAAAACAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTG

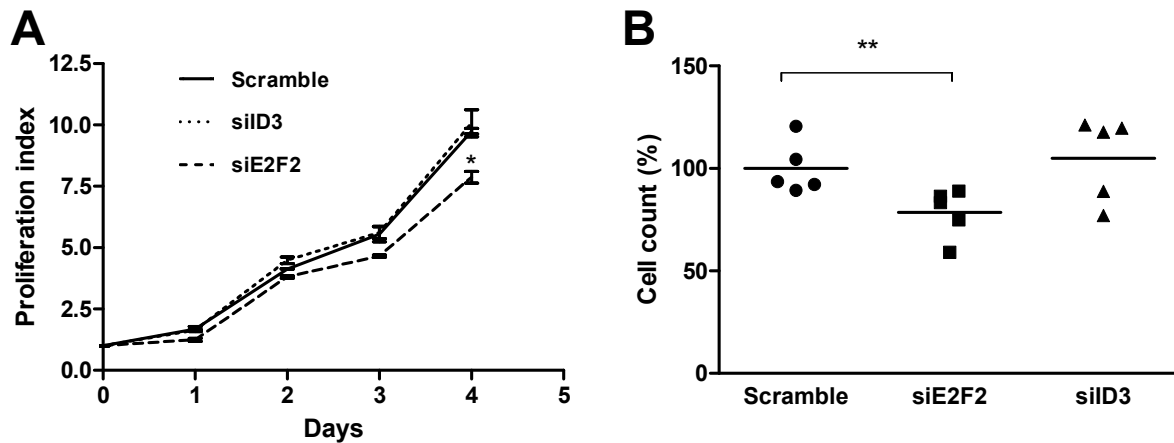


Figure 1: siRNA-mediated silencing of E2F2 and ID3 expression inhibits cell proliferation. (A) Cells were analysed via MTS assay 48 h after transfection for 4 days. The proliferation index decreased in siE2F2-treated cells ($p=0.02$) but not in siID3-treated cells. The data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) The trypan blue exclusion method also shows a decrease in the number of viable siE2F2-treated cells 3 days after transfection. Treatment with siID3 had no effect on the number of viable cells.

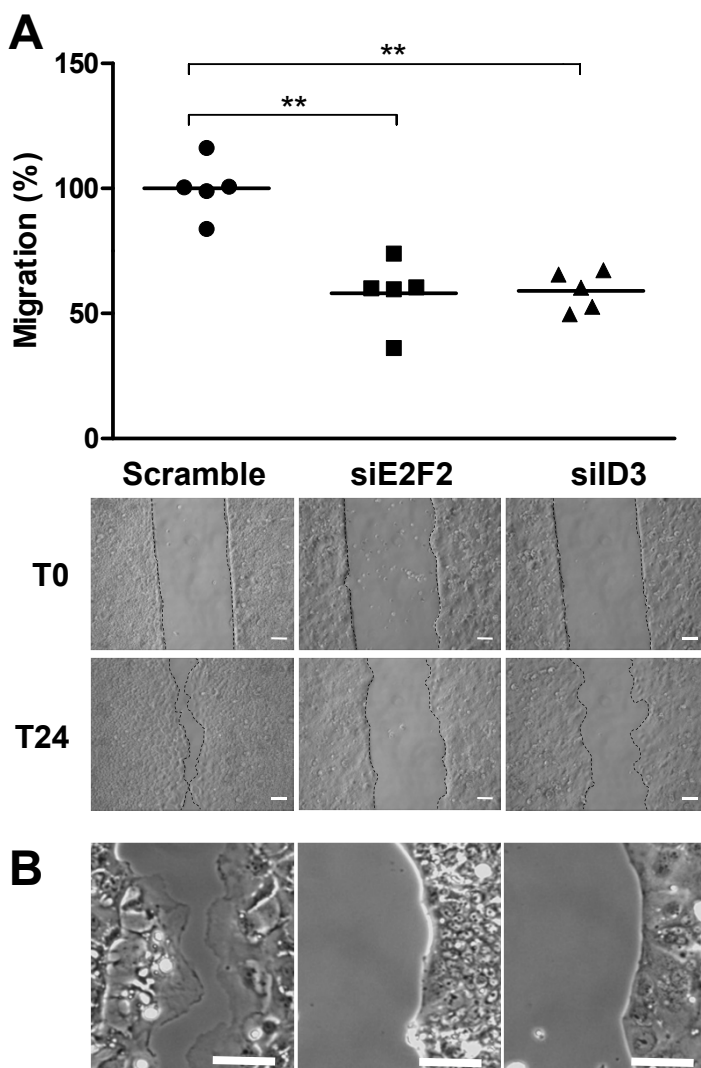


Figure 2: Silencing of E2F2 or ID3 alters cell migration and lamellipodia formation. (A) Cells were seeded 2 days after transfection into Ibidi cell-culture inserts and allowed to reach confluence prior to mitomycin treatment. The cells were photographed at 0 and 24 h after removal of the insert, and cell migration is presented as the percentage of migration compared with that of control cells after 24 h. (B) The morphological changes in siE2F2-treated and siID3-treated cells at the leading edge included less lamellipodia formation. Scale bar, 100 μ m. The data are presented as the mean \pm SD of five independent experiments. * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

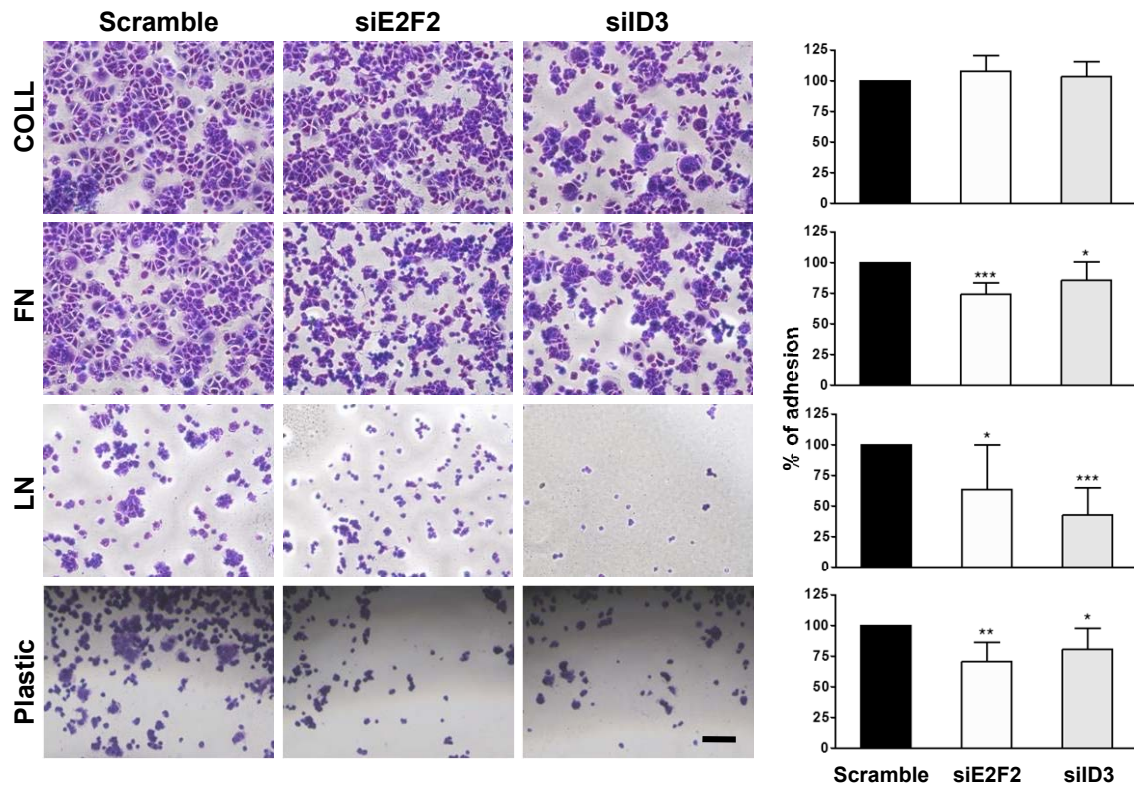


Figure 3: Silencing of E2F2 or ID3 inhibits adhesion on fibronectin, laminin-111 and plastic. Cell adhesion on different substrates was assessed 4 days after transfection. The cells were allowed to adhere for 2.5 h, fixed, and stained with crystal violet. No difference in adhesion was observed on collagen I, whereas silencing of E2F2 or ID3 decreased adhesion on fibronectin, laminin-111 and plastic. The data are presented as the mean \pm SD of six independent experiments. Scale bar, 100 μ m. * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

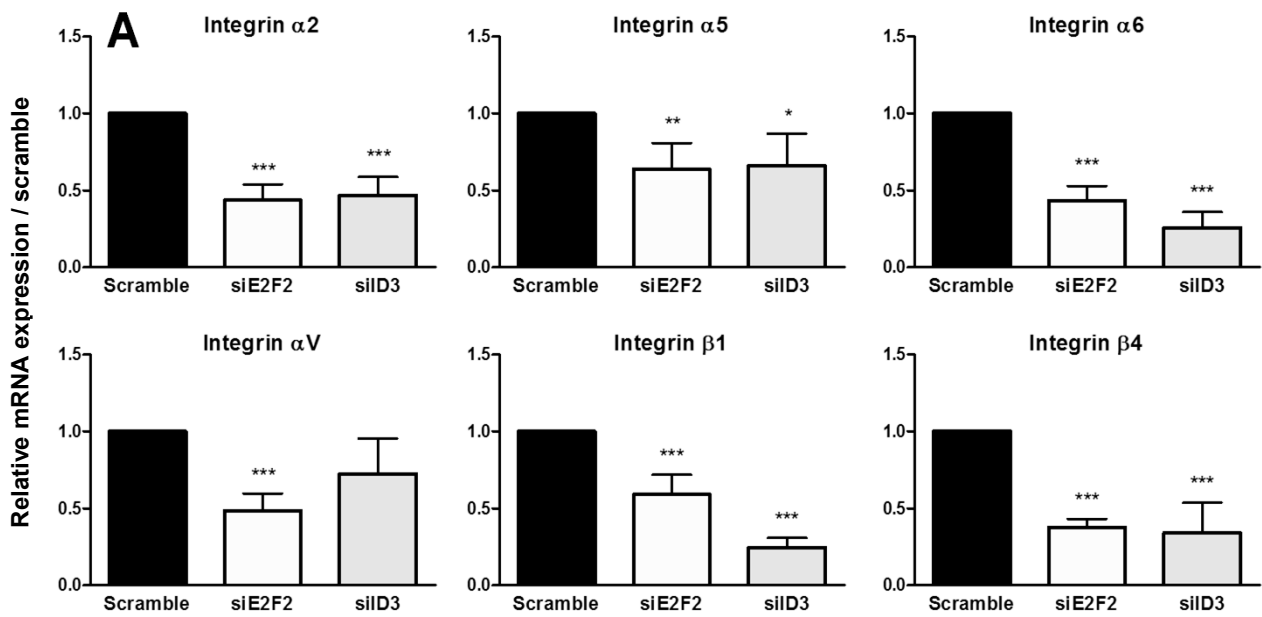
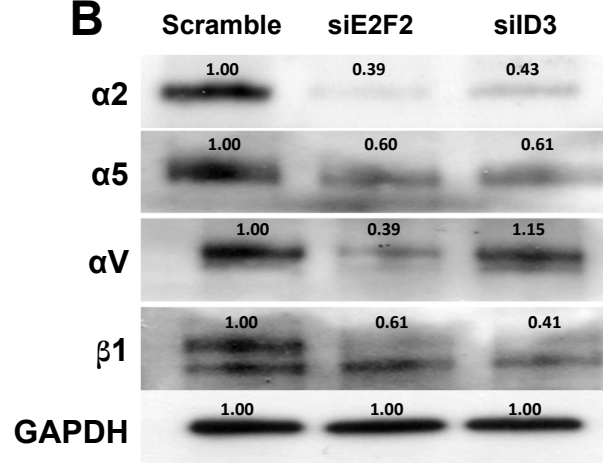
A**B**

Figure 4: Silencing of E2F2 and ID3 reduces the expression of integrins. Integrin expression was evaluated using (A) qRT-PCR and (B) western blot analyses. At both the mRNA and protein levels, siE2F2-treated cells expressed less α2, α5, α6, αV, β1 and β4 integrins, whereas siID3-treated cells expressed less α2, α5, α6, β1 and β4 integrins, but αV integrin expression in the siID3-treated cells was identical to the control cells. The data are presented as the mean ± SD of four independent experiments. * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

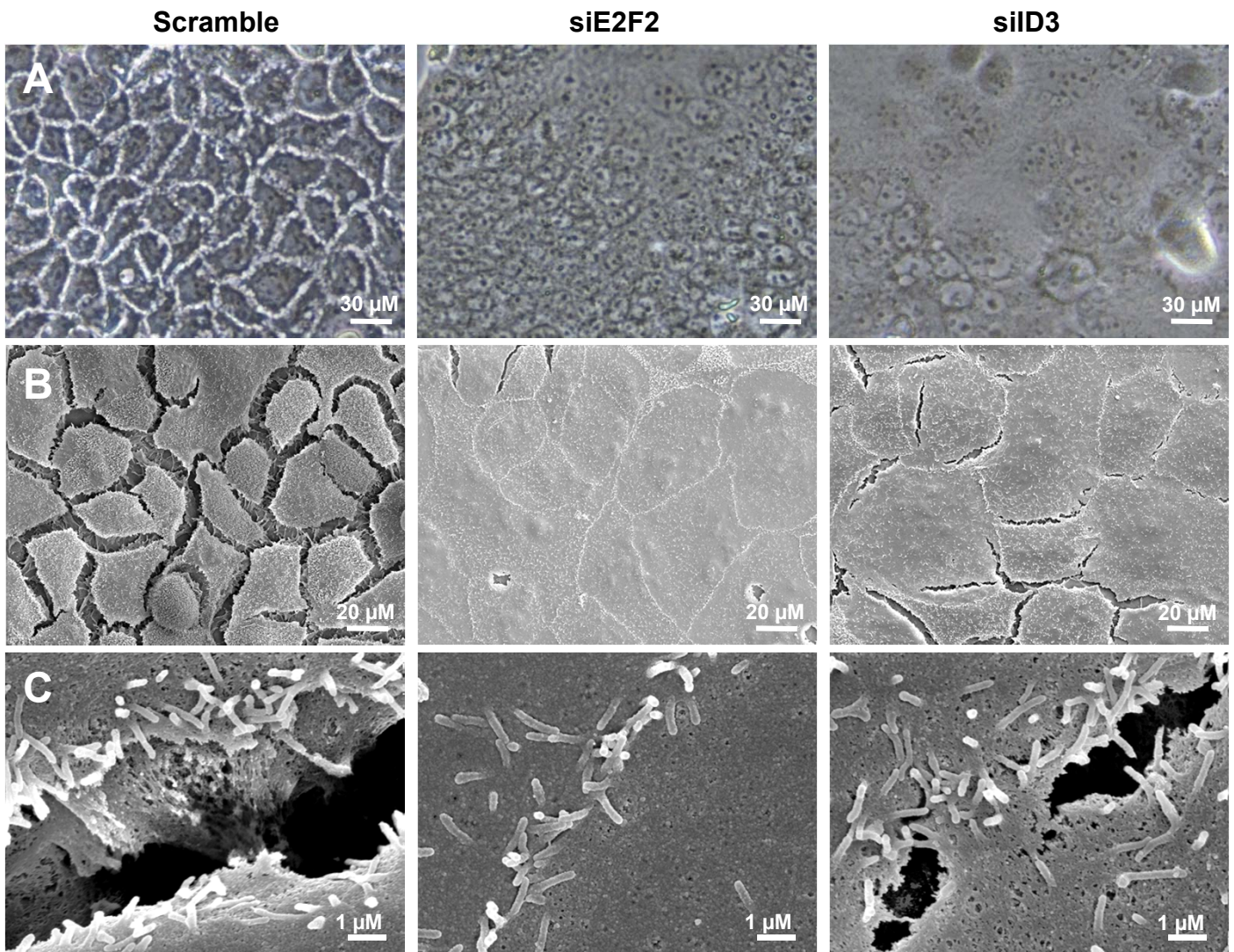


Figure 5: siE2F2-treated and siID3-treated cells exhibit highly cohesive cell-cell junctions, whereas control cells exhibit open junctions. (A) The cells were examined using phase contrast microscopy 5 days after transfection. (B and C) Confluent cells were prepared for scanning electron microscopy, and images were captured at (B) 1,200× and (C) 25,000× magnification.

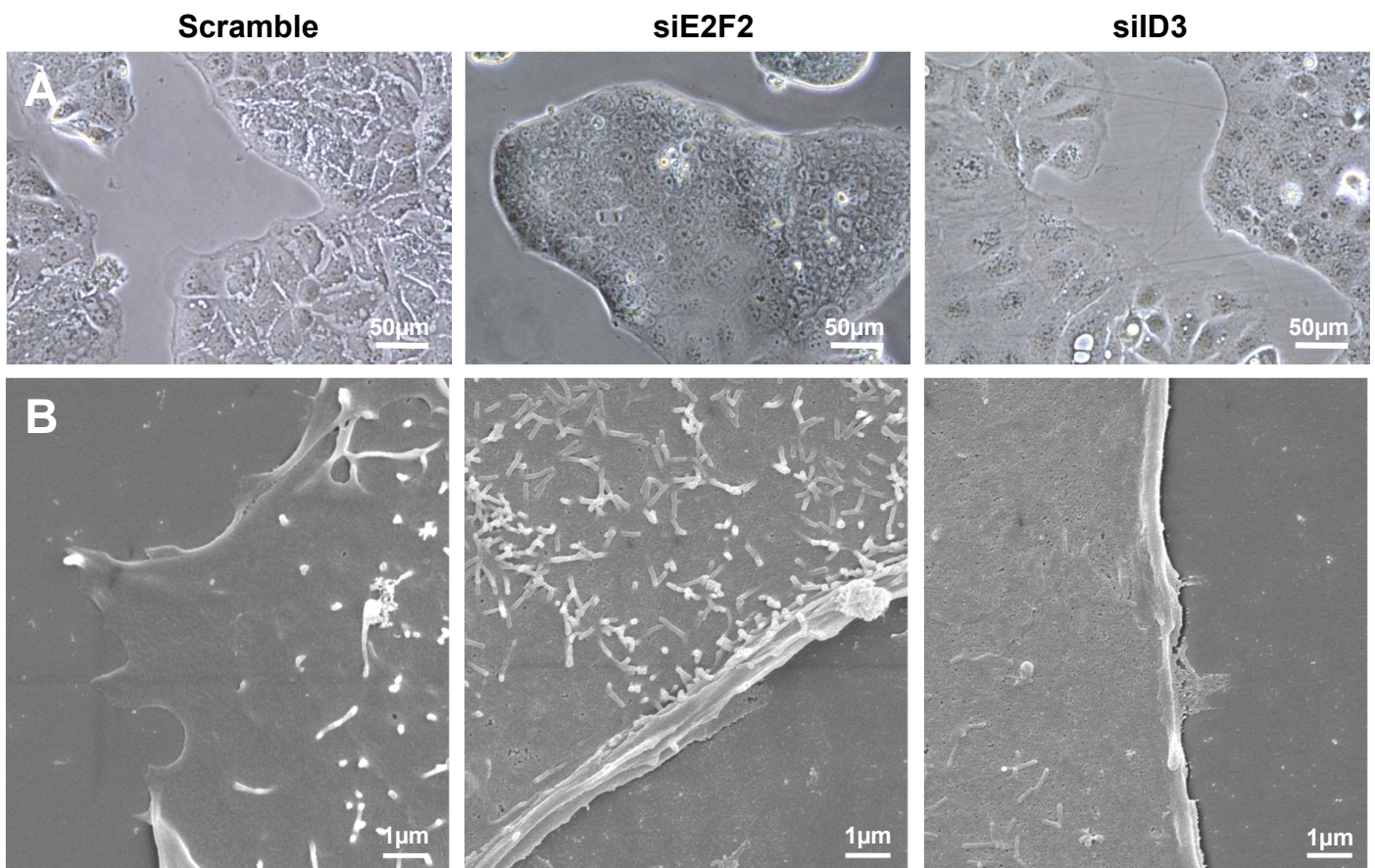


Figure 6: Morphological features of migrating siE2F2-treated and siD3-treated cells. (A) The cells were examined using phase contrast microscopy 3 days after transfection. (B) Sub-confluent cells were prepared for scanning electron microscopy, and images were captured at 10,000 \times magnification.

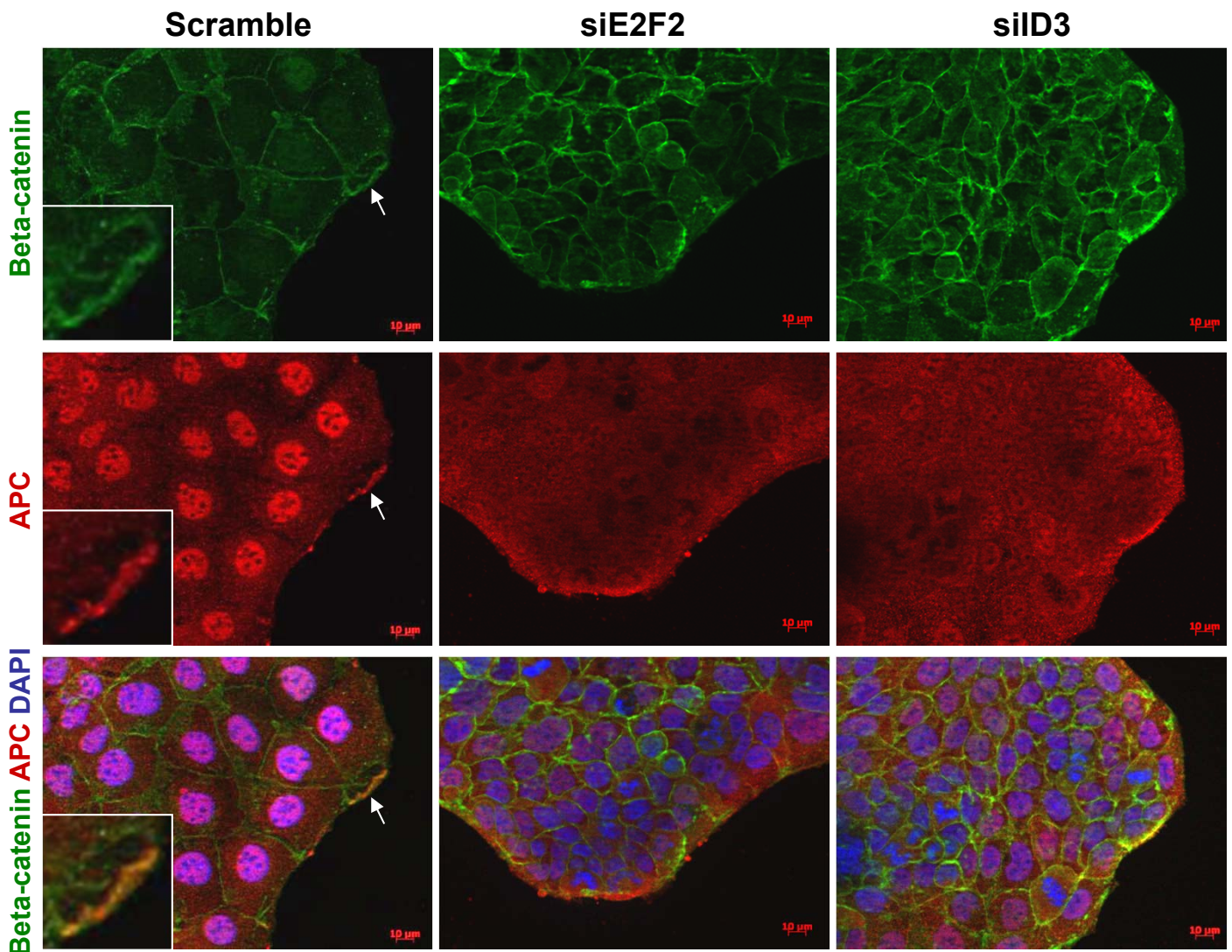


Figure 7: The localisation of β -catenin and APC is altered in migrating siE2F2-treated and siD3-treated cells. Caco-2/TC7 cells were analysed using immunofluorescence for β -catenin (red) and APC (green) 6 days after siRNA transfection. In migrating cells, nuclear expression of β -catenin is found in the control cells but not in the siE2F2-treated and siD3-treated cells, which both exhibited predominantly plasma membrane-localised β -catenin. APC is co-localised with β -catenin in the nucleus and at the plasma membrane (white arrow) in migrating control siRNA-treated cells but not in siE2F2-treated or siD3-treated cells, which exhibited diffused cytoplasmic expression of APC.

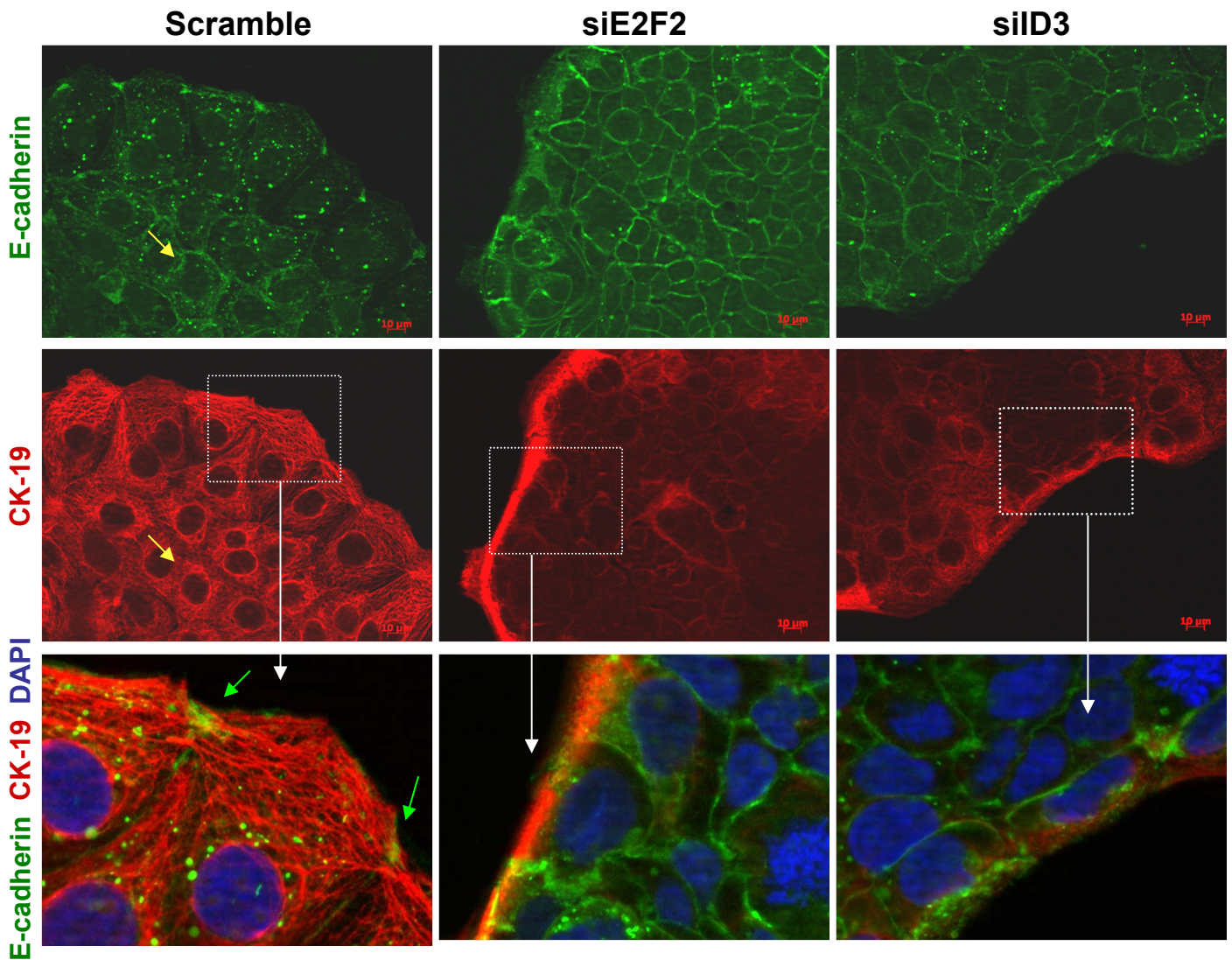


Figure 8: Altered localisation of E-cadherin and CK-19 in migrating siE2F2-treated and siLD3-treated cells. Caco-2/TC7 cells were analysed using immunofluorescence for CK-19 (red), E-cadherin (green) and DAPI (blue) 6 days after siRNA transfection. In control siRNA-treated cells, membrane-localised E-cadherin is found in the central zones (yellow arrow) and is lost in cells at the invasive front. Cytoplasmic spots are observed around the nucleus. CK-19 is organised as a highly developed and complex network. E-cadherin attachment plaques for anchoring CK-19 filaments are observed at the leading edge (green arrow). However, in siE2F2-treated and siLD3-treated cells, E-cadherin is found at the cell membrane, even in migrating cells, and branch points with CK-19 are not found at the leading edge. Instead, CK-19 filaments accumulate as compact and dense sheaths around cell clusters.

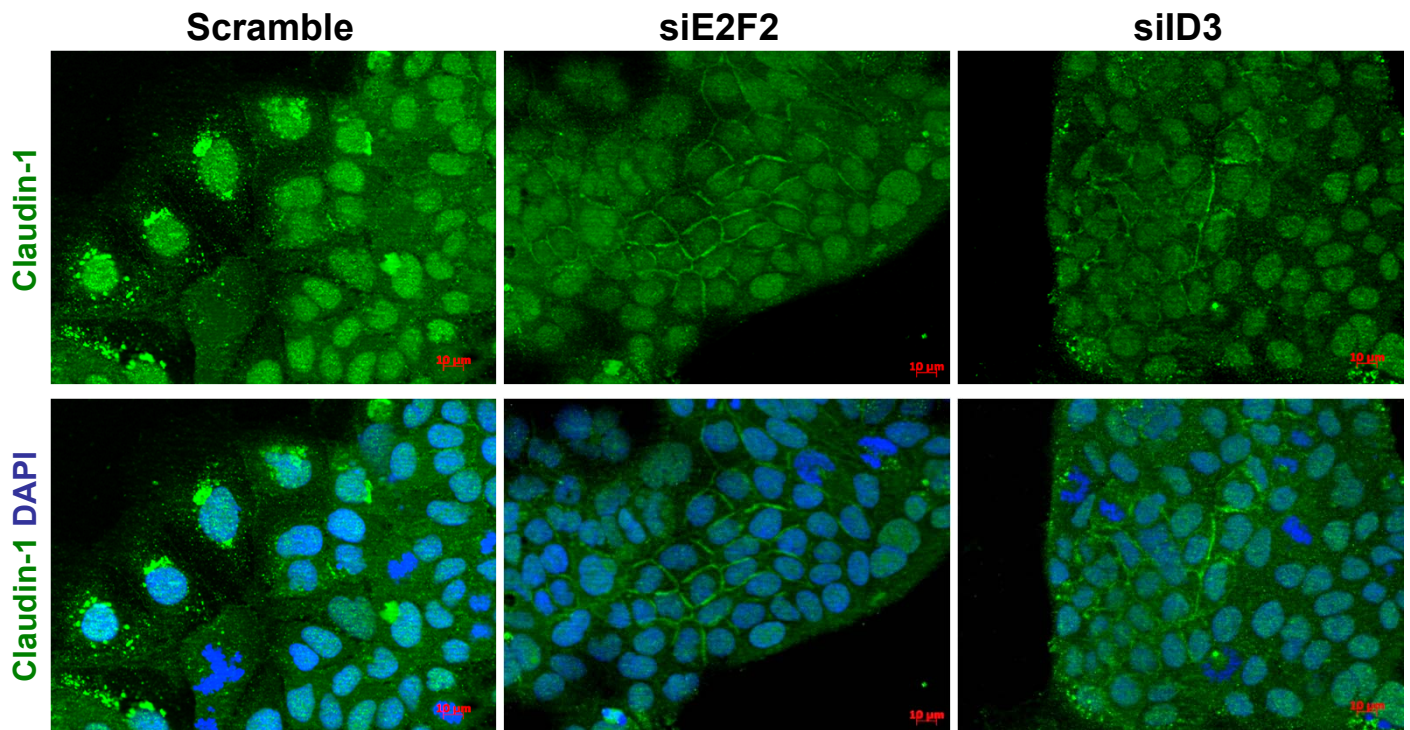


Figure 9: Claudin-1 localisation in siE2F2-treated and siD3-treated cells. Caco-2/TC7 cells were analysed using immunofluorescence for Claudin-1 (green) and DAPI (blue) 6 days after siRNA transfection. In the control cells, Claudin-1 is predominantly expressed as spot-like structures in the cytoplasm that are accompanied by nuclear staining. Only the most confluent regions at the central parts of the cell clusters exhibited membrane-localised Claudin-1. In siE2F2-treated and siD3-treated cells, Claudin-1 is found at the membrane and in the nucleus in both sub-confluent and confluent cells, although fewer or no cytoplasmic spots are present.

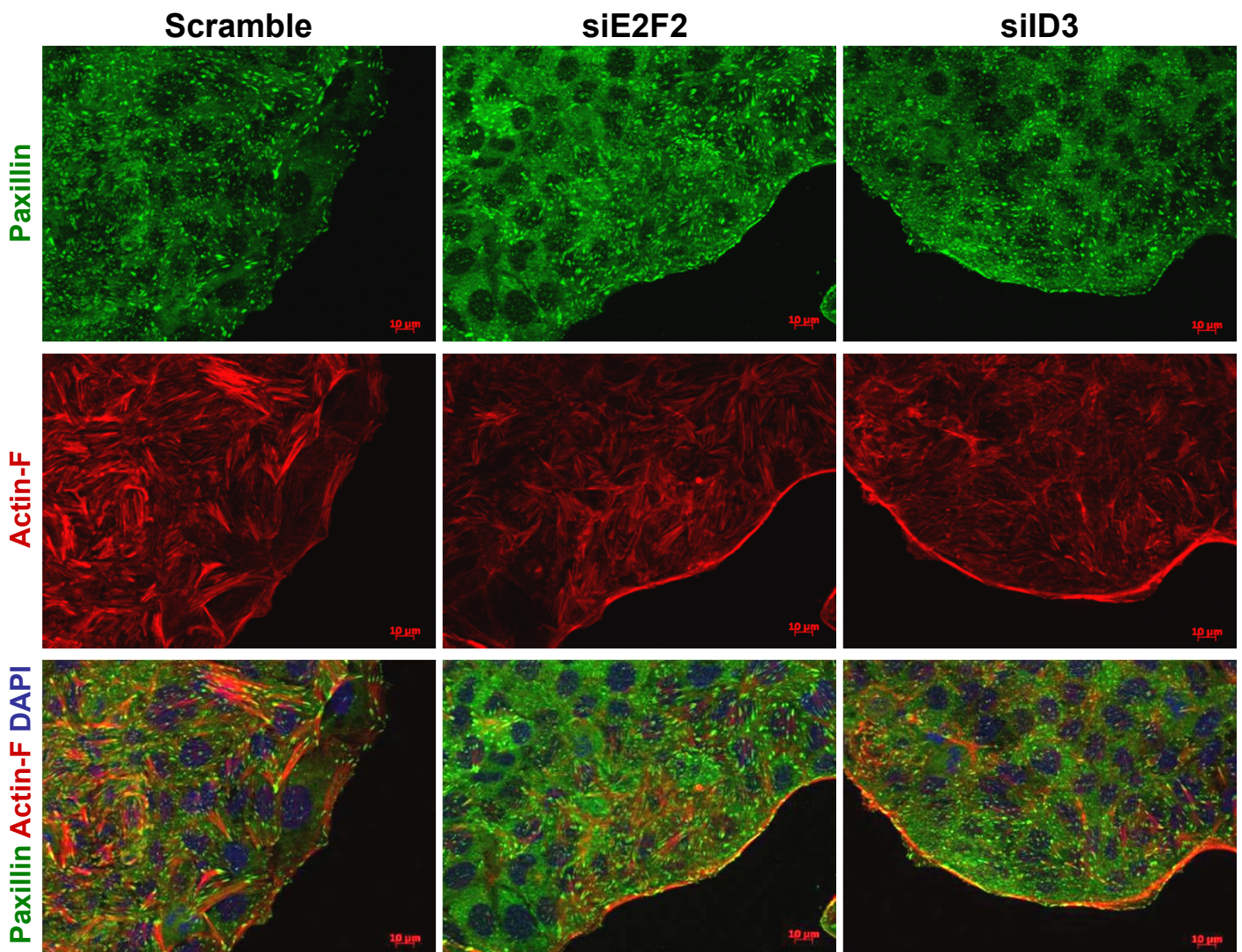


Figure 10: Paxillin and filament actin form focal adhesions at the leading edges in migrating control cells but not in migrating siE2F2-treated and siD3-treated cells. Caco-2/TC7 cells were analysed using immunofluorescence for paxillin (green), phalloidin-TRITC (F-actin) and DAPI (blue) 6 days after siRNA transfection. In the control cells, the paxillin-containing focal adhesions linked with actin stress fibres are organised at the leading edge of the migrating cells. However, in siE2F2-treated and siD3-treated cells, the actin filaments form a compact and continuous belt around the cell clusters.

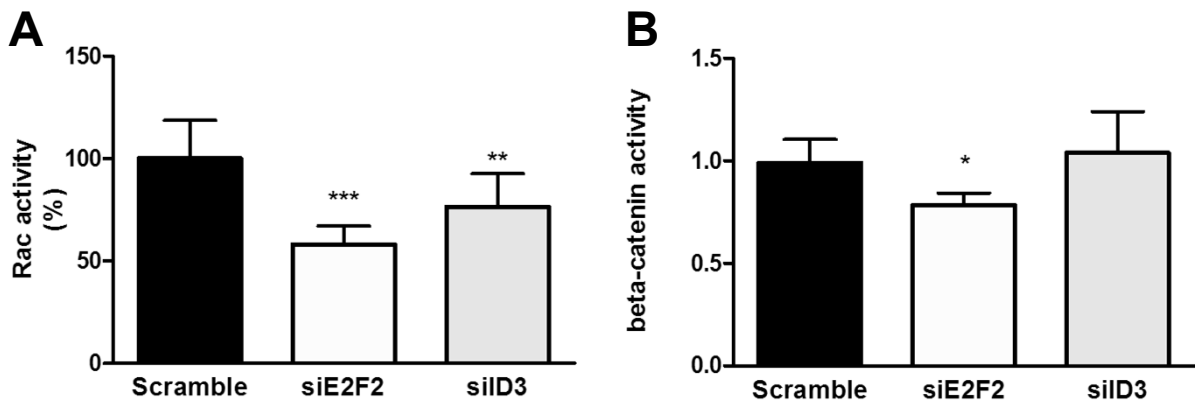


Figure 11: Rac activity and β -catenin transcriptional activity are decreased in siE2F2-treated cells but not in siID3-treated cells. (A) Rac activity was assessed by quantifying the amount of active GTP-bound form of Rac present in cell extracts. Caco-2/TC7 cells were seeded 3 days after siRNA transfection and analysed for Rac-GTP activity 24 h later. Rac activity was inhibited by 42% and 24% in the siE2F2-treated and siID3-treated cells, respectively. (B) Caco-2/TC7 cells were transfected with luciferase reporter plasmids 4 days after siRNA transfection, and luciferase activity was assessed 24 h later. β -catenin transcriptional activity decreased by 22% in the siE2F2-treated cells but not in the siID3-treated cells. The data are presented as the mean \pm SD of five independent experiments. * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

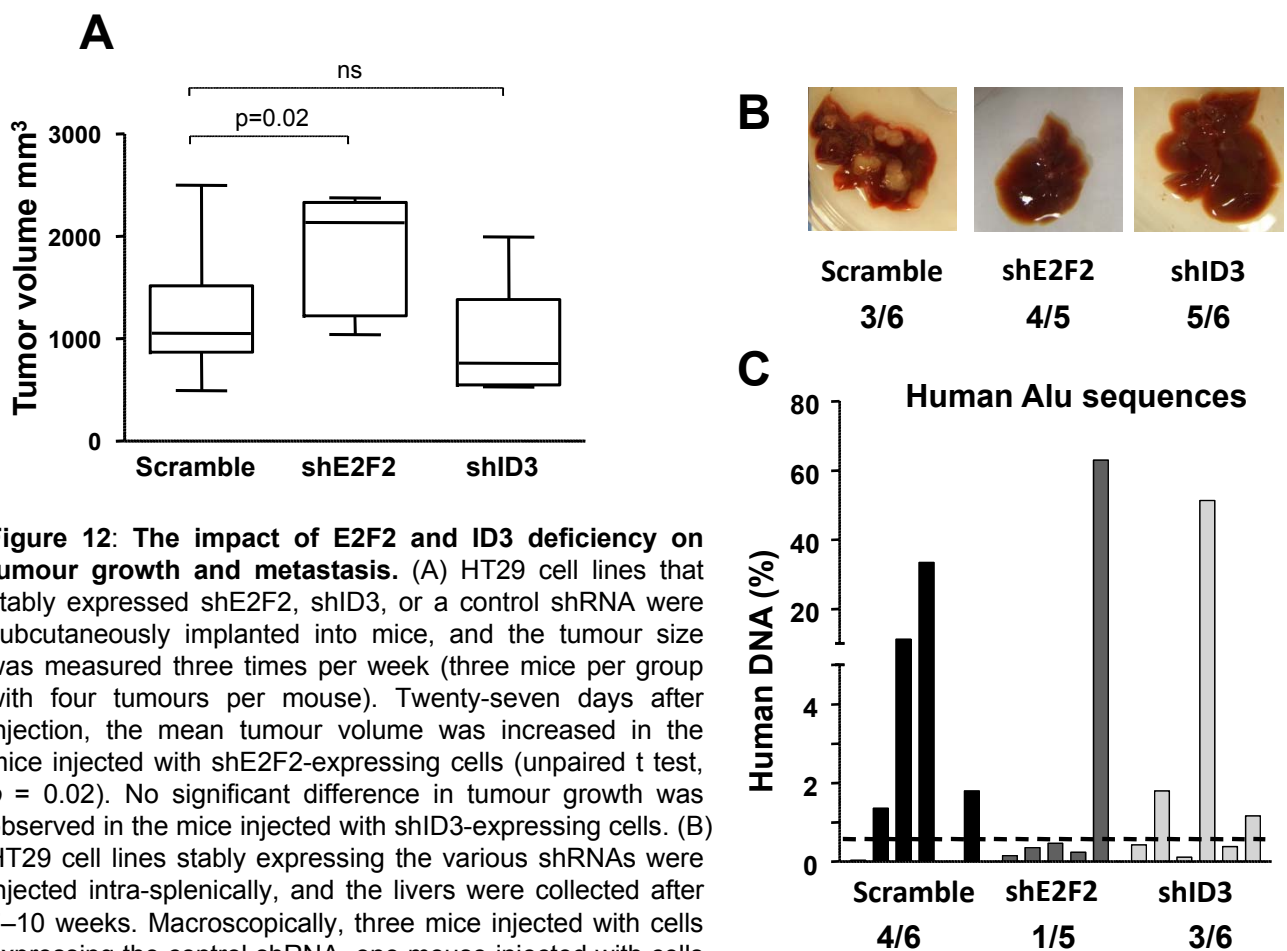


Figure 12: The impact of E2F2 and ID3 deficiency on tumour growth and metastasis. (A) HT29 cell lines that stably expressed shE2F2, shID3, or a control shRNA were subcutaneously implanted into mice, and the tumour size was measured three times per week (three mice per group with four tumours per mouse). Twenty-seven days after injection, the mean tumour volume was increased in the mice injected with shE2F2-expressing cells (unpaired t test, $p = 0.02$). No significant difference in tumour growth was observed in the mice injected with shID3-expressing cells. (B) HT29 cell lines stably expressing the various shRNAs were injected intra-splenically, and the livers were collected after 7–10 weeks. Macroscopically, three mice injected with cells expressing the control shRNA, one mouse injected with cells expressing shE2F2, and one mouse injected with cells expressing shID3 presented with liver metastases. (C) Based on the quantification of human Alu sequences, four mice with cells expressing the control shRNA, one mouse injected with cells expressing shE2F2, and three mice injected with cells expressing shID3 had liver metastases.

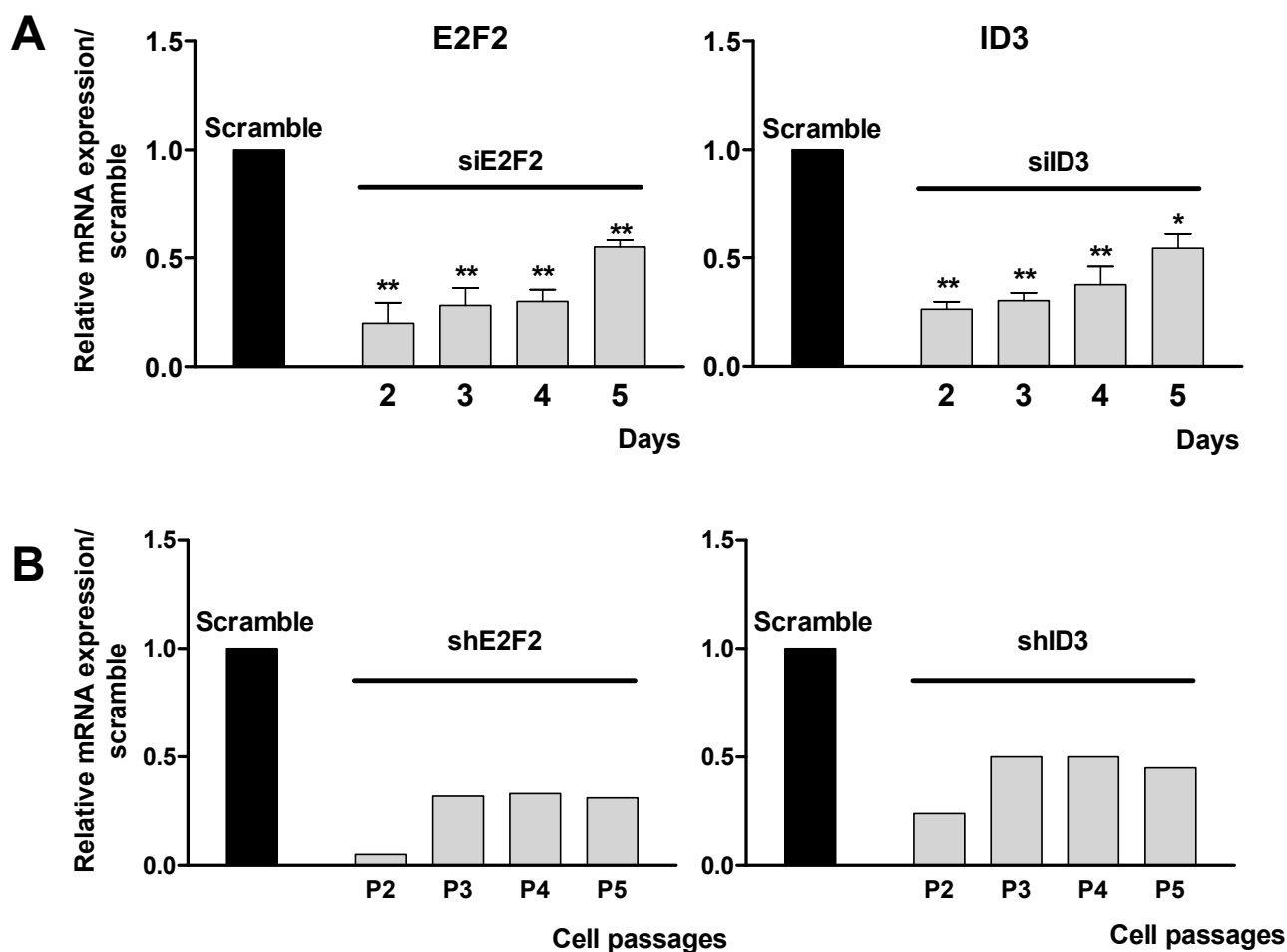


Figure W1: Efficacy of transient (siRNA) and stable (shRNA) inhibition of E2F2 and ID3 expression. (A) siRNA-transfected Caco-2/TC7 cells were analysed for E2F2 and ID3 mRNA expression using qRT-PCR 2, 3, 4 and 5 days after siRNA transfection. Two days after transfection, the E2F2 and ID3 mRNA expression level was decreased by 80% and 73%, and after 4 days, the expression levels were decreased by 70% and 63%, respectively. At day 5, the expression of E2F2 and ID3 was decreased by 45%. The data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) HT29 cell lines stably expressing various shRNAs were generated by infection with shRNA-expressing lentiviruses and selected using puromycin. Cells at passages 2 to 5 after selection were analysed for E2F2 and ID3 mRNA expression using qRT-PCR.

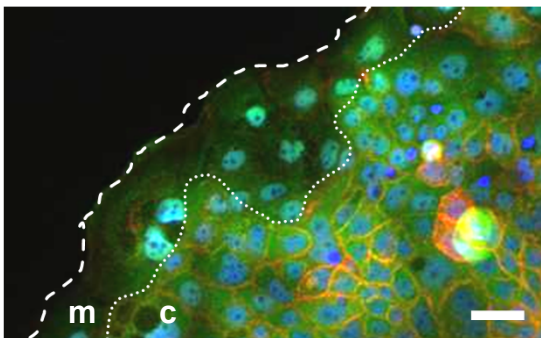
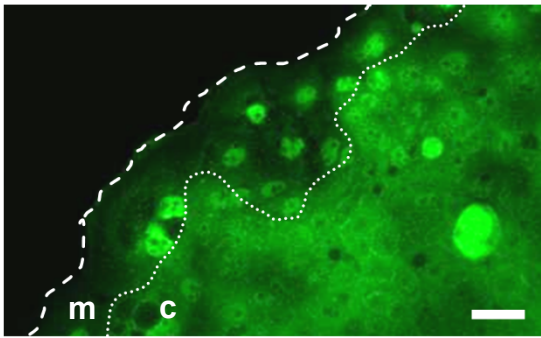
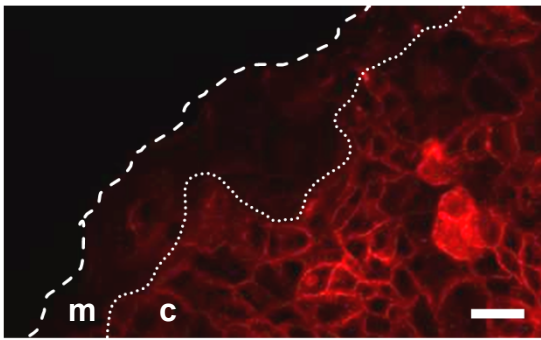


Figure W2: Differential expression of β -catenin and APC in confluent and migrating cells. In control cells, β -catenin (red) and APC (green) exhibited different expression patterns depending on the confluency or migration of the cells. Membrane-localised β -catenin is found in confluent regions (c) but less or not in peripheral migrating cells at the invasive front (m, between the dotted lines). APC expression was cytoplasmic or membrane-localised in the confluent regions, whereas it was mostly nuclear in migrating cells. Scale bar: 50 μ m.

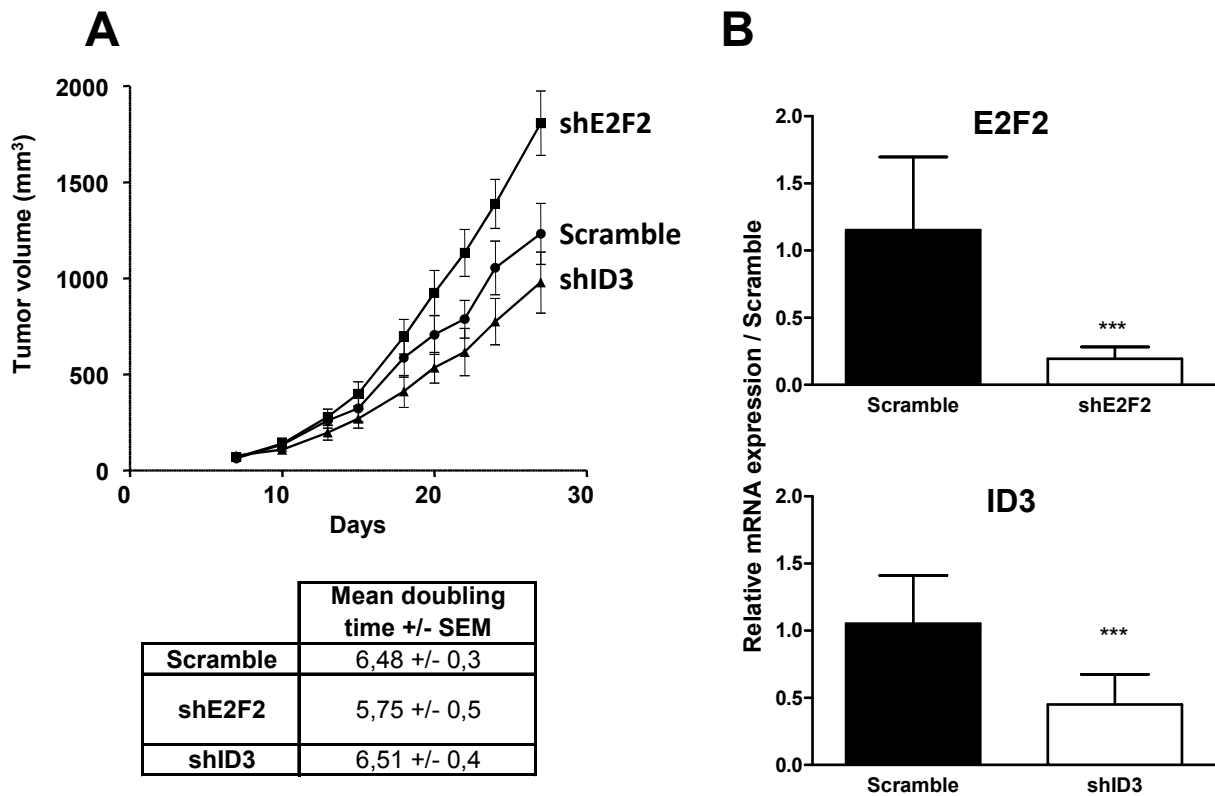


Figure W3: Subcutaneous HT29 tumour growth is enhanced following E2F2 depletion. (A) The tumour volume (mm³) was measured three times per week and is presented as the mean \pm SEM and the doubling time was calculated for each tumour via linear regression (exponential growth equation, GraphPad). The mean doubling time of the tumours derived from shE2F2-expressing group decreased when compared with the tumours derived from the control shRNA-expressing cell (5.75 and 6.48 days, respectively). However, this trend was not statistically significant ($p = 0.16$). The mean doubling time of the tumours derived from the shID3-expressing tumours was similar to that of the control tumours. (B) Tumour samples were collected at the end of the experiment (27 days after injection) and analysed for E2F2 and ID3 mRNA expression using qRT-PCR. Reduced expression of E2F2 (80% inhibition) and ID3 (60% inhibition) was maintained in the shE2F2-expressing and shID3-expressing tumours, respectively. The data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

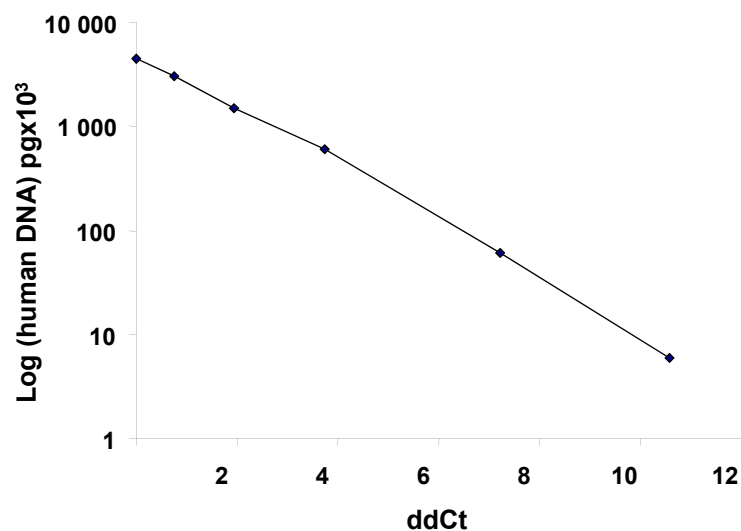


Figure W4: Detection of ALU sequences in mixing experiments of human and mouse DNA. Human Alu sequences were quantified in samples containing different quantities of human DNA (60 pg, 600 pg, 1.5 ng, 3 ng and 4.5 ng) in mouse DNA (6 ng of total DNA per well) using qPCR. Normalisation was performed with primers recognising both human and mouse (h+m) APC (exon 10). The $\Delta\Delta C_t$ (Alu primers vs. (h+m) APC primers) is presented as the function of the log of the quantity of human DNA.

ELEMENTS COMPLEMENTAIRES

I. Matériels et méthodes

1. Construction des vecteurs lentiviraux pour la sous-expression de E2F2 et ID3

a) Choix des shRNA et du vecteur d'expression

Les séquences des shRNA sont celles fournies par Sigma-Aldrich (E2F2 : TRCN0000013800 ; ID3 : TRCN0000017306 ; Scramble : SHC002).

Le vecteur d'expression est le vecteur lentiviral pLKO.1-TRC (10878, Addgene) contenant un « stuffer », une séquence de 1.9kb qui sera coupée par restriction enzymatique puis remplacée par la séquence codant le shRNA pour former un vecteur de 7.1kb (**Annexe 1**). Les vecteurs pLP1, pLP2, et pLP/VSVG (K4975-00, Invitrogen) fournissent les séquences en *trans* pour les protéines de structure et de réplication nécessaires à la production du virus infectieux non-répliatif.

b) Construction des vecteurs pLKO.1

Le vecteur LKO.1 est d'abord digéré par les enzymes AgeI et EcoR1 pour libérer le « stuffer » puis déposé sur gel à 0.8% d'agarose dans le but d'extraire le plasmide linéarisé de 7.1kb avec le kit *NucleoSpin® Extract II*. Les shRNA ont été hybridés selon le protocole suivant : 95°C pendant 4min pour tout dénaturer, 70°C pendant 10min, puis descendre progressivement à 45°C (60min = 0.41°C/min) puis à 25°C (45min = 0.44°C/min). La ligation des couples de shRNA dans le plasmide linéarisé a été assurée par la ligase T4. Des bactéries chimiocompétentes XL1 Blue ont été transformées par le produit de ligation puis sélectionnées sur boîte ampicilline pour réaliser une mini-prep. Les produits de mini-prep ont été criblés par deux doubles digestions enzymatiques (XhoI / NcoI et NdeI / HincIII) pour vérifier l'insertion du shRNA. Après amplification par midi-prep, les constructions ont été validées par séquençage avec les amorces suivantes :

pLKO.1 sens	CAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGA
pLKO.1 anti-sens	CCAAAGTGGATCTCTGCTGTC

2. Génération de la lignée stable HT29 sur-exprimant stablement E2F2

a) Choix du vecteur d'expression

Pour sur-exprimer E2F2, nous avons initialement testé un plasmide commercial (Catalog No. : EX-F0378-M09, Genecopoeia) contenant l'ADNc de E2F2 suivi de l'étiquette c-myc sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus (CMV) (**Annexe 2**). Pourtant, ce vecteur n'a pas permis de générer des lignées stables sur-exprimant E2F2 dans les cellules cancéreuses SW480 et Caco-2/TC7, malgré une très large sur-expression transitoire dans ces cellules. Par ailleurs, comme la protéine c-myc (67kDa) a une taille similaire à la protéine E2F2 (~60-65kDa), l'utilisation d'un anticorps anti-c-myc (clone 9E10, sc-40, Santa Cruz) ne permet pas de discriminer par la taille la forme endogène de l'étiquette c-myc fusionnée à E2F2. Le choix de l'étiquette c-myc n'était donc pas approprié pour détecter E2F2 par western blot.

C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser le vecteur rétroviral pQCXIP (631516, Clontech) (**Annexe 3**) dans lequel a été inséré l'ADNc de E2F2 à partir du plasmide pReceiver, auquel a été ajoutée une étiquette hémagglutinine (HA). Le vecteur pCL Ampho (don du Dr F. Alpy, IGBMC, Illkirch, France) contient les séquences nécessaires à la production du virus infectieux non-répliquatif.

b) Amplification de l'ADNc de E2F2 et addition des sites de restriction

L'ADNc de E2F2 a été amplifié à partir du plasmide pReceiver par PCR avec la RedTaq Polymérase (SIGMA) et les amorces sens et anti-sens contenant en 5' les sites de restriction BamH1 et EcoR1, respectivement :

Sens	5' - GGATCC ACC ATGCTGCAAGGGCCCCGG - 3'
Anti-sens	5' - GAATTCTCATT AAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA GCCGCC ATTAATCAACAGGTCCCCAAG - 3'

L'amorce sens contient en 5' le site de restriction de BamH1 (**G/GATCC**) et les 18 premiers nucléotides de l'ADNc (**en bleu**), séparés par un codon ACC spécifiant la Thréonine :

L'amorce anti-sens contient en 5' le site de restriction de EcoR1 (**G/AATTC**), suivi de deux codons stop (**TCATT**A), de l'étiquette HA, puis des 22 derniers nucléotides de l'ADNc (**en bleu**) séparés par deux codons GCC spécifiant la Glycine.

Le produit d'amplification de PCR a été déposé sur un gel à 1% d'agarose pour vérifier sa taille (1371 nucléotides).

c) Insertion dans le vecteur de clonage pCRII

Le produit de PCR a été inséré dans le vecteur pCRII (K2050-01, Invitrogen) pour transformer des bactéries chimiocompétentes XL1 Blue (**Annexe 4**). La sélection des bactéries sur kanamycine a permis de repiquer 10 clones pour réaliser une mini-prep. Puisque 2 sites de restriction EcoR1 se trouvent de part et d'autre du site d'insertion du produit de PCR dans le vecteur pCRII, une digestion enzymatique avec EcoR1 a été réalisée sur l'ADN de la mini-prep avant de le déposer sur gel à 1% d'agarose pour cribler les clones. Sur les 10 clones, 1 clone positif (avec une bande correspondant à la taille de l'ADNc de E2F2) a été choisi pour réaliser la midi-prep puis pour valider l'ensemble de la séquence de l'ADNc par séquençage avec les amorces suivantes :

Amorces	Séquence
Sens 1	TCAGAGTGGATGGCCTCCCA
Sens 2	ATCTCAAGAGCACCCAAGGGC
Anti-sens 3	CTTCTTGCGGATGAGCTGGAT

d) Insertion dans le vecteur d'expression pQCXIP

La séquence du cDNA ainsi que de l'étiquette HA ayant été validée, une digestion enzymatique a été réalisée sur l'ADN de la midi-prep avec BamH1 et EcoR1 pour extraire l'ADNc-HA. Le produit de digestion a été déposé sur gel, et la bande correspondant à l'ADNc-HA a été purifiée avec le kit *NucleoSpin[®] Extract II*, puis l'ADNc-HA a été inséré dans le vecteur d'expression pQCXIP par ligation. Enfin, le plasmide pQCXIP a été amplifié puis validé par séquençage.

e) Génération d'une lignée stable E2F2+

Les cellules BOSC23 sont dérivées des HEK293 et contiennent une partie de l'information nécessaire à la production du virus, l'autre partie étant apportée par le vecteur pCL-Ampho. Ces cellules sontensemencées à 300 000 cellules/puits d'une plaque 6-puits la veille de leur co-transfection avec 1µg du vecteur pQCXIP-E2F2-HA ou du vecteur vide (Mock) et 25µg du vecteur pCL-Ampho avec 7µl de Lipofectamine. A 48h, le surnageant contenant les particules virales et filtré sur un filtre de 45 µM, est additionné de Polybrène (5µg/ml) et d'HEPES (20mM) puis déposé sur les cellules HT29ensemencées la veille. Les cellules sont centrifugées pendant 90 min à 2500 rpm. Deux jours après infection, les cellules sont sélectionnées avec 2 µg/ml de puromycine. La sur-expression a été validée par RT-qPCR selon les mêmes conditions que celles décrites dans la publication n°2, et par western blot avec l'anticorps anti-HA (clone 3F10, Roche) utilisé au 1/2000.

3. Analyse transcriptionnelle des gènes de la TEM

Dans le but de préciser les mécanismes moléculaires responsables de la baisse de migration, d'adhésion et du développement de métastases, nous avons analysé la transcription de 84 gènes impliqués dans la TEM en utilisant des plaques 96-puits sur lesquelles sont déjà hybridées les amorces spécifiques des gènes (Human EMT RT² Profiler™ PCR Array, SABiosciences, Qiagen) (**Annexe 5**). Pour cela, les ARN extraits des cellules Caco-2/TC7 par la méthode du Trizol[®] 3 jours après transfection ont été purifiés sur colonne selon le protocole *RNA Cleanup* du *MiniKit RNeasy* (#74104, Qiagen) avant d'être rétro-transcrits et analysés par RT-qPCR pour l'expression de E2F2 et ID3 selon le même protocole que celui décrit dans la publication n°2, puis pour l'expression des 84 gènes de la plaque TEM selon les instructions du fournisseur. L'expression des résultats utilise la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en prenant en compte 5 gènes de références.

4. Double inhibition de l'expression de E2F2 et ID3

Pour inhiber les deux gènes simultanément, les cellules Caco-2/TC7 ont été co-transfectés selon le même protocole que celui décrit dans la publication n°2 avec 0.1 nmol (50nM) de chaque siRNA, ou avec 0.2 nmol de Scramble (100nM). Cinq conditions ont toujours été réalisées en parallèle : Scramble (50nM), siE2F2 (50nM), siID3 (50nM), Scramble (100nM), siE2F2/siID3 (100nM).

II. Résultats

Pour compléter les résultats présentés dans la publication n°2, j'ai réalisé des expériences permettant de compléter les observations sur l'impact de la délétion des gènes E2F2 et ID3. Pour cela, j'ai quantifié l'expression du gène ID3 dans des carcinomes coliques humains. De plus, l'expression de la cavéoline-1, protéine membranaire spécifique des cavéoles, qui sont des microdomaines membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides et impliquées dans le processus de migration dans la lignée Caco2/TC7, a été analysée dans ces cellules sous-exprimant E2F2 ou ID3. D'autre part, l'impact de la délétion de E2F2 et ID3 sur des gènes connus pour participer au processus de TEM dans la carcinogenèse a été évalué par une analyse transcriptionnelle par puce PCR sur une plaque contenant 83 gènes. De même, puisque la micro-délétion en 1p36.12 cible le gène E2F2 mais aussi ID3, j'ai étudié les effets d'une double transfection siE2F2/siID3 dans les cellules Caco-2/TC7 sur la prolifération, l'adhésion et la migration cellulaires.

Enfin, je me suis intéressée à l'effet d'une sur-expression de E2F2 sur les capacités prolifératives de cellules HT29 sur-exprimant stablement la protéine E2F2 et xéno greffées chez la souris nue.

1. Expression transcriptionnelle de ID3 dans les tumeurs coliques

Le niveau d'expression transcriptionnelle de ID3 a été déterminé selon la même méthode (Taqman) de RT-qPCR et dans les mêmes conditions que celles détaillées dans la publication n°1. Parmi les échantillons étudiés, 36 tissus sains, dont 16 côlons proximaux et 20 côlons distaux, et 46 carcinomes, dont 19 proximaux et 27 distaux, ont été analysés et quantifiés par rapport au gène de référence TBP.

Le niveau d'expression du transcrit ID3 dans les tissus sains proximaux et distaux est quatre fois supérieur au niveau d'expression du gène de référence TBP et est comparable dans les deux parties du côlon (test statistique de Mann-Whitney, $p=0,305$) (**Figure 48**). De façon générale, dans les carcinomes proximaux et distaux, la quantité de transcrit ID3 est diminuée de façon significative par rapport au tissu sain ($p=0,005$ et $p=0,01$ respectivement) et le niveau d'expression d'ID3 est identique pour les deux localisations ($p=0,823$).

Le gène ID3, contigu au gène E2F2, est soit normal, soit délété. Pour les carcinomes ayant le gène délété, l'expression du transcrit est diminuée. Pour les carcinomes ayant le gène normal, le transcrit est sur-exprimé, ce qui suggère des mécanismes de régulation transcriptionnelle.

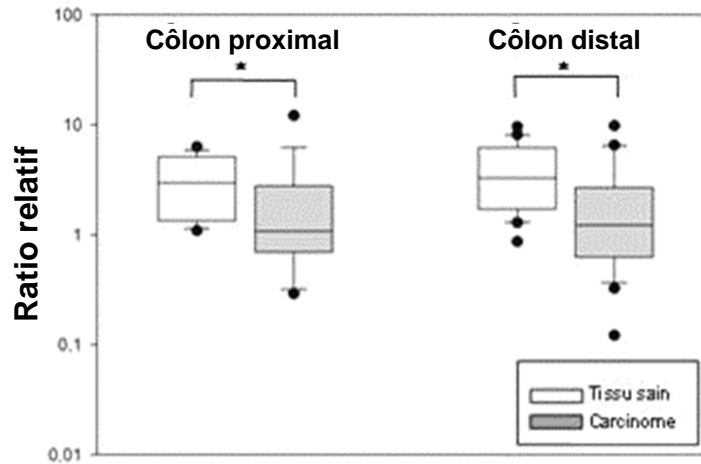


Figure 48: Expression transcriptionnelle de ID3 dans les tissus sains et les carcinomes du côlon proximal et distal. L'expression dans les carcinomes est significativement diminuée par rapport aux tissus sains, indépendamment de la localisation. * $p < 0.05$.

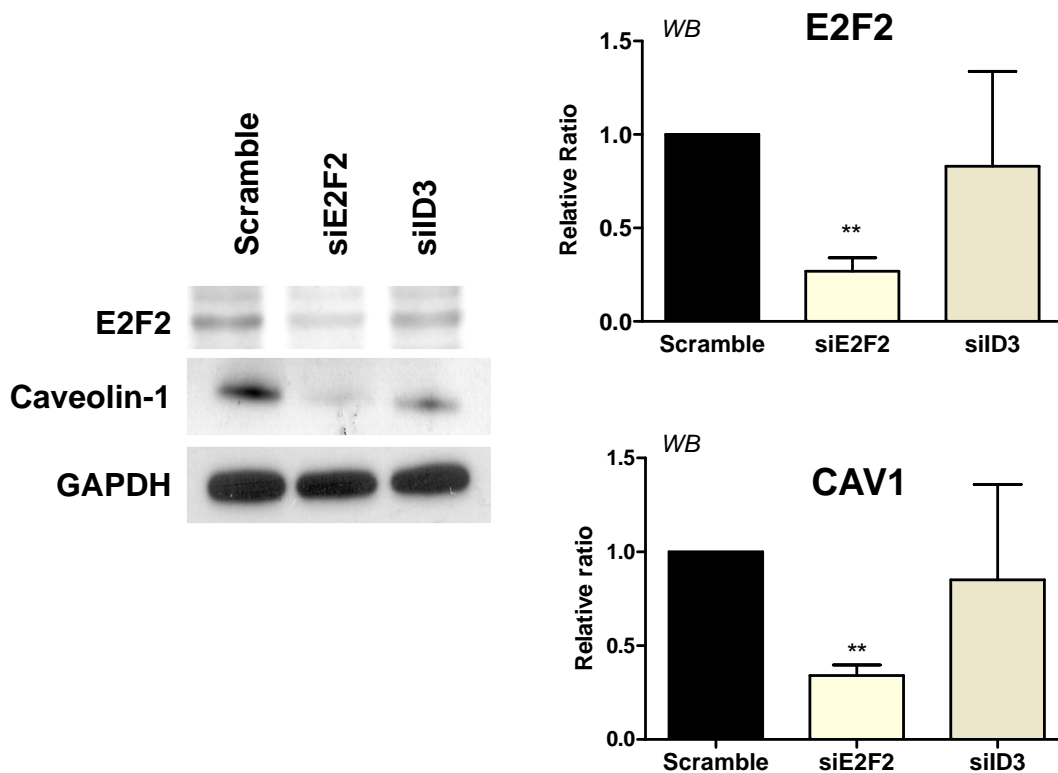


Figure 49: Expression de la cavéoline-1. Les expressions de la cavéoline-1 et de E2F2 ont été analysées par western blot à J3 après transfection. L'expression de la cavéoline-1 est diminuée dans les cellules siE2F2. Les histogrammes représentent la moyenne des ratios relatifs au Scramble ($n = 2 \pm SD$). ** $p < 0.01$

2. Sous-expression de E2F2 et ID3 *in vitro* (Caco-2/TC7)

a) Rôle de la cavéoline-1

L'expression protéique de la cavéoline-1, une protéine majeure de la membrane plasmique des cavéoles d'endocytose, a été analysée par western blot dans les cellules Caco-2/TC7 siE2F2 et siID3. La cavéoline-1 est 3 fois moins exprimée dans les cellules siE2F2 que dans les cellules contrôle (**Figure 49**) ($p < 0.01$). La sous-expression de ID3 n'a pas d'effet sur l'expression de la cavéoline-1.

b) Analyse transcriptionnelle de 83 gènes relatifs à la TEM

L'expression de 83 gènes relatifs à la TEM a été analysée dans les cellules Caco-2/TC7 siE2F2 et siID3 en utilisant la plaque « TEM » sur laquelle les amorces sont pré-hybridées dans les puits. Parmi les gènes analysés se trouvent des gènes codant des protéines impliquées dans la TEM dont des MMPs, des molécules de la MEC (la FN1, les collagènes, SPARC), des intégrines, la N-cadhérine, et des protéines sous-exprimées dont la E-cadhérine, mais également des protéines impliquées dans des processus associés à la TEM comme la différenciation, la morphogénèse, la prolifération, la migration, l'adhésion, l'organisation du cytosquelette ainsi que des protéines de signalisation (voie Wnt, Notch, protéines G, RTK) (**Annexe 5**). Globalement, peu de gènes sont dérégulés, et il s'agit principalement de gènes sous-exprimés (**Figure 50**). En effet, 11 et 6 gènes sont sous-exprimés et 1 et 3 gènes sur-exprimés dans les cellules siE2F2 et siID3, respectivement, en prenant en compte les dérégulations de minimum un facteur FC (*Fold Change*) > 2 ou < -2 .

Parmi les gènes sous-exprimés, certains sont communs à l'inhibition de E2F2 et ID3. La moésine (MSN), qui fait partie du complexe ezrine/radixine/moésine-merline, est presque totalement inhibée dans les cellules siE2F2 ($FC > 25$) et 3 fois moins exprimée dans les cellules siID3 ($FC = 3$). Les expressions de FN1 et SPARC, des protéines de la MEC, et de l'antagoniste du récepteur à l'interleukine 1 (IL1RN), une molécule anti-inflammatoire, sont diminuées à des niveaux comparables dans les cellules siE2F2 et siID3 (FC entre minimum 3.5 et maximum 6) et enfin, l'expression du facteur de transcription GSC (Goosecoid homeobox) impliqué dans la différenciation et le développement, est diminuée dans les cellules siE2F2 ($FC = 3.2$) et siID3 ($FC = 2.2$). La vimentine est inhibée de 2 fois et de 1.7 fois dans les cellules siID3 et siE2F2, respectivement.

Par contre, d'autres gènes sous-exprimés sont spécifiques à l'inhibition de E2F2 comme la MMP9 (collagénase de type IV) ; la caldesmone-1 (CALD1), dont la protéine lie l'actine et régule la contraction cellulaire ; la MAP1B, impliquée dans l'assemblage des microtubules ; et le ligand WNT11 de la voie Wnt non canonique PCP ayant un rôle dans la migration cellulaire.

Symbols	Descriptions	FC (siE2F2)	FC (siD3)
MSN	Moesin	-27,89	-3,13
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	-7,37	-1,45
IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist	-5,85	-4,80
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	-5,54	-4,04
FN1	Fibronectin 1	-4,40	-3,48
GSC	Goosecoid homeobox	-3,21	-2,23
MAP1B	Microtubule-associated protein 1B	-2,80	1,25
CAV2	Caveolin 2	-2,71	-1,73
MST1R	Macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)	-2,64	-1,71
WNT11	Wingless-type MMTV integration site family, member 11	-2,07	-1,35
CALD1	Caldesmon 1	-2,04	-1,08
ERBB3	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	-1,86	-1,89
F11R	F11 receptor	-1,84	-1,51
ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	-1,83	-1,17
AHNAK	AHNAK nucleoprotein	-1,81	-1,30
VIM	Vimentin	-1,79	-2,06
BMP1	Bone morphogenetic protein 1	-1,71	-1,58
SNAI1	Snail homolog 1 (Drosophila)	-1,71	-1,17
MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	-1,66	-1,34
EGFR	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	-1,62	1,03
CAMK2N1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	-1,58	-1,63
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor	-1,56	-1,02
OCLN	Occludin	-1,55	-1,19
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1	-1,54	1,15
FZD7	Frizzled homolog 7 (Drosophila)	-1,53	-1,00
KRT7	Keratin 7	-1,48	-1,38
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	-1,44	-1,30
PPPDE2	PPPDE peptidase domain containing 2	-1,41	-1,44
TGFB2	Transforming growth factor, beta 2	-1,39	1,46
TSPAN13	Tetraspanin 13	-1,35	-1,21
WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B	-1,34	1,07
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	-1,30	-1,03
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	-1,29	-1,29
ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	-1,29	-1,10
TCF4	Transcription factor 4	-1,27	1,29
CTNBN1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	-1,25	1,03
DSP	Desmoplakin	-1,24	-1,00
TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	-1,21	-1,24
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	-1,16	1,17
JAG1	Jagged 1 (Alagille syndrome)	-1,12	-1,22

Symboles	Descriptions	FC (siE2F2)	FC (siID3)
SNAI2	Snail homolog 2 (Drosophila)	-1,11	2,76
FGFBP1	Fibroblast growth factor binding protein 1	-1,10	-1,23
SIP1	Survival of motor neuron protein interacting protein 1	-1,09	-1,00
PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	-1,09	1,09
SNAI3	Snail homolog 3 (Drosophila)	-1,09	1,02
ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	-1,08	1,14
KRT19	Keratin 19	-1,08	-1,15
TGFB3	Transforming growth factor, beta 3	-1,05	1,04
SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	-1,05	1,34
FOXC2	Forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)	-1,04	1,13
ILK	Integrin-linked kinase	-1,00	-1,13
NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)	1,02	1,06
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	1,04	1,11
STEAP1	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	1,04	1,11
NODAL	Nodal homolog (mouse)	1,05	1,35
PTP4A1	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	1,06	1,12
ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2	1,06	1,10
GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta	1,07	1,06
TMEFF1	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1	1,08	1,21
SPP1	Secreted phosphoprotein 1	1,16	1,12
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	1,18	1,19
SMAD2	SMAD family member 2	1,19	1,23
DSC2	Desmocollin 2	1,19	1,16
COL3A1	Collagen, type III, alpha 1	1,21	1,77
NUDT13	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 13	1,24	1,34
KRT14	Keratin 14	1,25	1,25
VCAN	Versican	1,27	1,51
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	1,27	-1,30
BMP7	Bone morphogenetic protein 7	1,29	-1,09
IGFBP4	Insulin-like growth factor binding protein 4	1,34	-1,57
RGS2	Regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	1,36	1,01
VPS13A	Vacuolar protein sorting 13 homolog A (S. cerevisiae)	1,40	1,54
TCF3	Transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)	1,50	1,01
COL5A2	Collagen, type V, alpha 2	1,51	1,62
MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	1,60	2,53
PLEK2	Pleckstrin 2	1,61	1,22
TMEM132A	Transmembrane protein 132A	1,78	1,77
TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	3,95	3,42
CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	-1,21	1,89
COL1A2	Collagen, type I, alpha 2	-1,06	3,05
SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10	1,17	1,33
ESR1	Estrogen receptor 1	1,99	1,94
GNG11	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	-2,15	2,47
TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)		

Figure 50: Résultats de l'analyse transcriptionnelle des gènes de la transition épithélio-mésenchymateuse « TEM ». L'expression de 83 gènes a été analysée dans les cellules Caco-2TC7 siE2F2 et siID3. Le ratio FC (Fold Change) correspond à la sur-expression (FC>2, rouge) et à la sous-expression (FC<-2, vert foncé) des gènes cibles dans les cellules siE2F2 et siID3 par rapport aux cellules contrôles. Le calcul prend en compte les 5 gènes de référence. Les cases oranges et vert clair correspondent à des variations d'expression moins importantes (1.5<FC<2). Les cases grises correspondent à des gènes dont l'expression n'est pas quantifiable dans les conditions d'amplification en raison d'une courbe de fusion avec plusieurs pics et/ou d'une expression trop faible (Ct>35 cycles).

A l'inverse, parmi les gènes sur-exprimés, seul TFPI2 (*Tissue Factor Pathway Inhibitor 2*) est commun à l'inhibition de E2F2 et ID3. La MMP3 (la stromélysine 1) et SNAI2 (Slug) sont uniquement sur-exprimée dans les cellules siID3 (FC = 2.5 et FC = 2.8, respectivement).

Certaines de ces dérégulations ont été validées par RT-qPCR comme la sous-expression de SPARC, FN1 et VIM dans les cellules siE2F2 et siID3 (données non montrées).

3. Double inhibition de siE2F2 et siID3 dans les Caco-2/TC7

a) Efficacité de transfection

La double transfection siE2F2/ID3 induit une sous-expression de E2F2 similaire à celle obtenue avec la transfection simple. Par contre, l'efficacité d'inhibition de ID3 est significativement améliorée de 65% à plus de 90% dans les cellules inhibées pour les deux gènes ($p=0.017$), ce qui suggère un rôle de E2F2 dans la régulation de ID3 (**Figure 51**).

b) Impact sur l'adhésion et la migration

Les effets observés sur l'adhésion et la migration après la double inhibition siE2F2/siID3 sont similaires à ceux observés lors de l'inhibition de l'un ou l'autre des gènes (**Figure 52**). La sous-expression des deux gènes E2F2 et ID3 n'a donc pas d'effet additif ou synergique sur l'altération des processus associés à l'invasion tumorale.

4. Impacts *in vivo* de la sur-expression de E2F2 (HT29-E2F2+)

a) Validation du modèle

Après la sélection avec la puromycine, l'expression transcriptionnelle et protéique de E2F2 a été analysée par RT-qPCR et par western blot et montre que la protéine E2F2 est 3 fois plus exprimée dans les cellules HT29-E2F2+ que dans les cellules HT29-Mock (**Figure 53A**).

b) Croissance tumorale

Pour analyser l'impact de la sur-expression de E2F2 sur la croissance tumorale, les cellules HT29-E2F2+ et HT29-Mock ont été injectées en sous-cutanée dans les souris nues. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes (**Figure 53B et C**). Toutefois, l'analyse de l'expression de E2F2 dans les tumeurs issues des cellules HT29-E2F2+ ne montre pas de sur-expression par rapport aux tumeurs issues des cellules HT29-Mock (**Figure 53D**). Par conséquent il n'est pas possible de conclure quant à l'absence d'effet de la sur-expression.

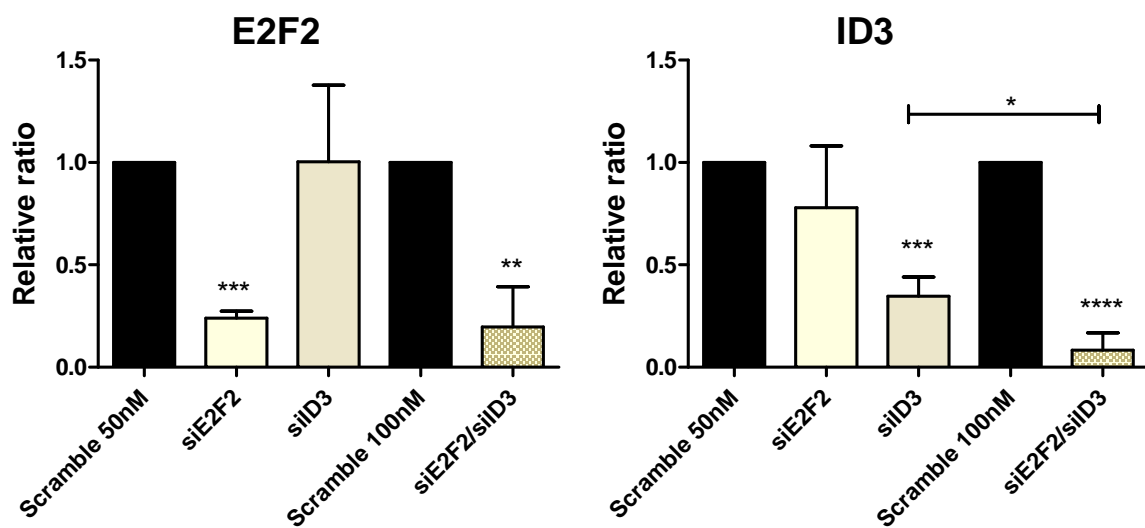


Figure 51: Efficacité de la double inhibition E2F2/ID3 par des siRNA. L'expression de E2F2 et ID3 a été analysée par RT-QPCR 3 jours après transfection des cellules Caco-2/TC7 avec les siRNA dirigés contre E2F2, ID3, ou les deux. Les cellules siE2F2 et siID3 sont comparées aux cellules transfectées avec 50 nM de siRNA contrôle (Scramble) et les cellules doublement transfectées siE2F2/siID3 sont comparées aux cellules transfectées avec 100 nM de Scramble. (n=2 ± SD). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

A

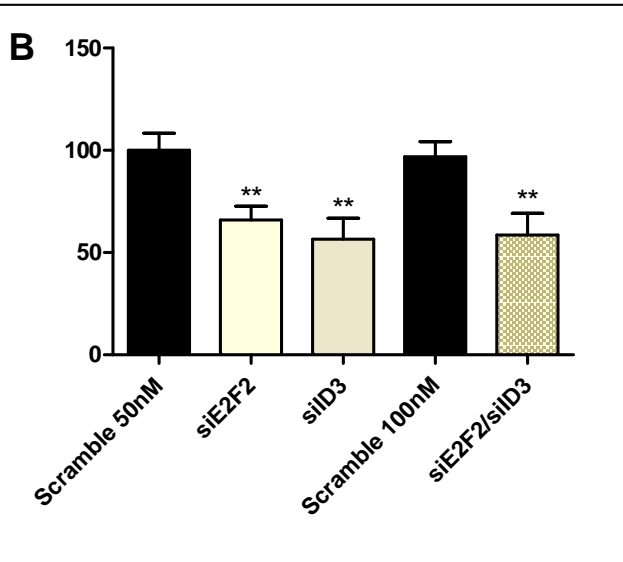
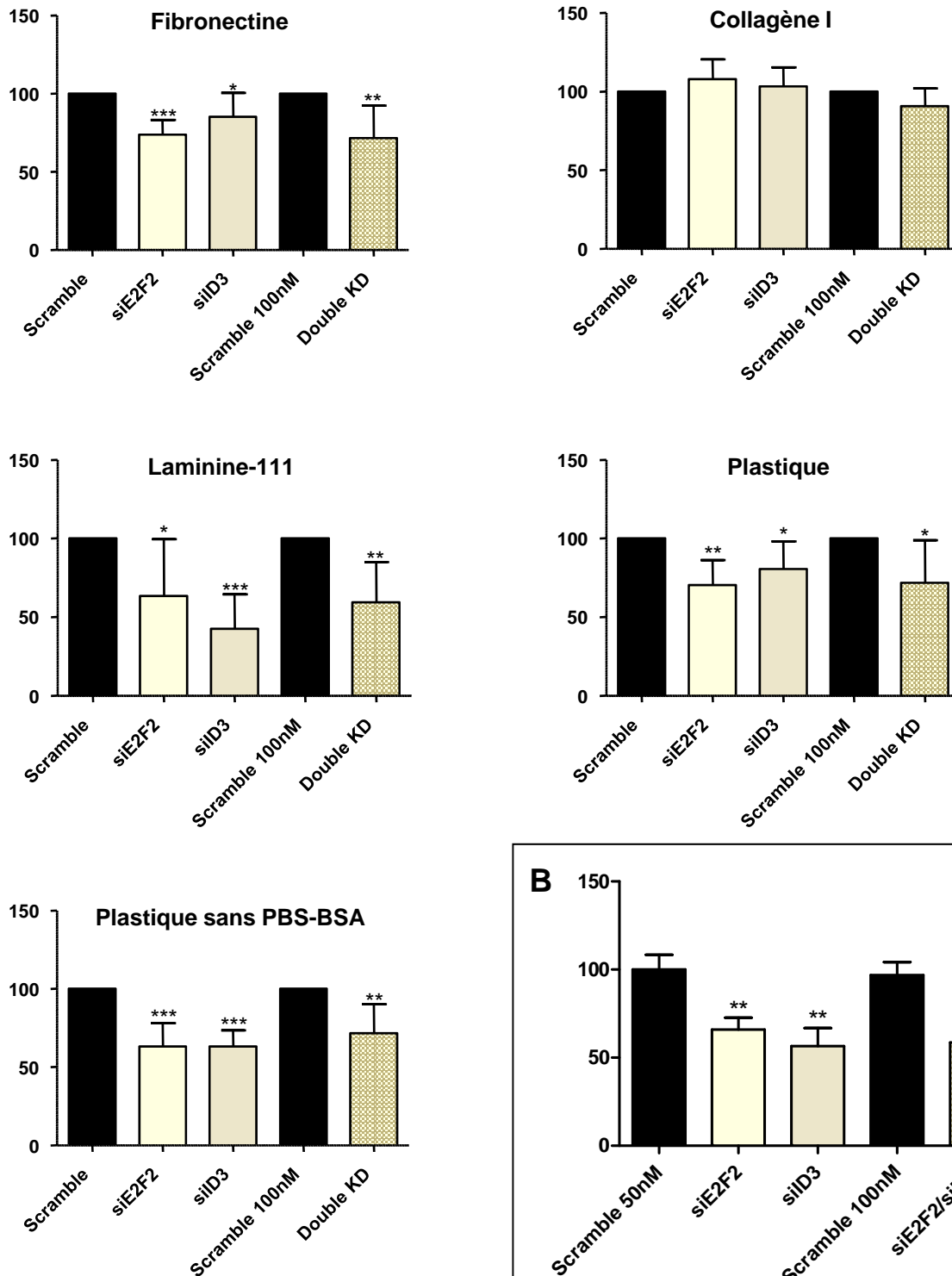


Figure 52: Efficacité de la double inhibition E2F2/ID3 sur l'adhérence et la migration. L'effet de la double inhibition E2F2/ID3 sur (A) l'adhérence sur différents supports et (B) la migration cellulaire. Les effets sont comparables à ceux obtenus avec la sous-expression de E2F2 ou de ID3. (n=6) ± SD. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

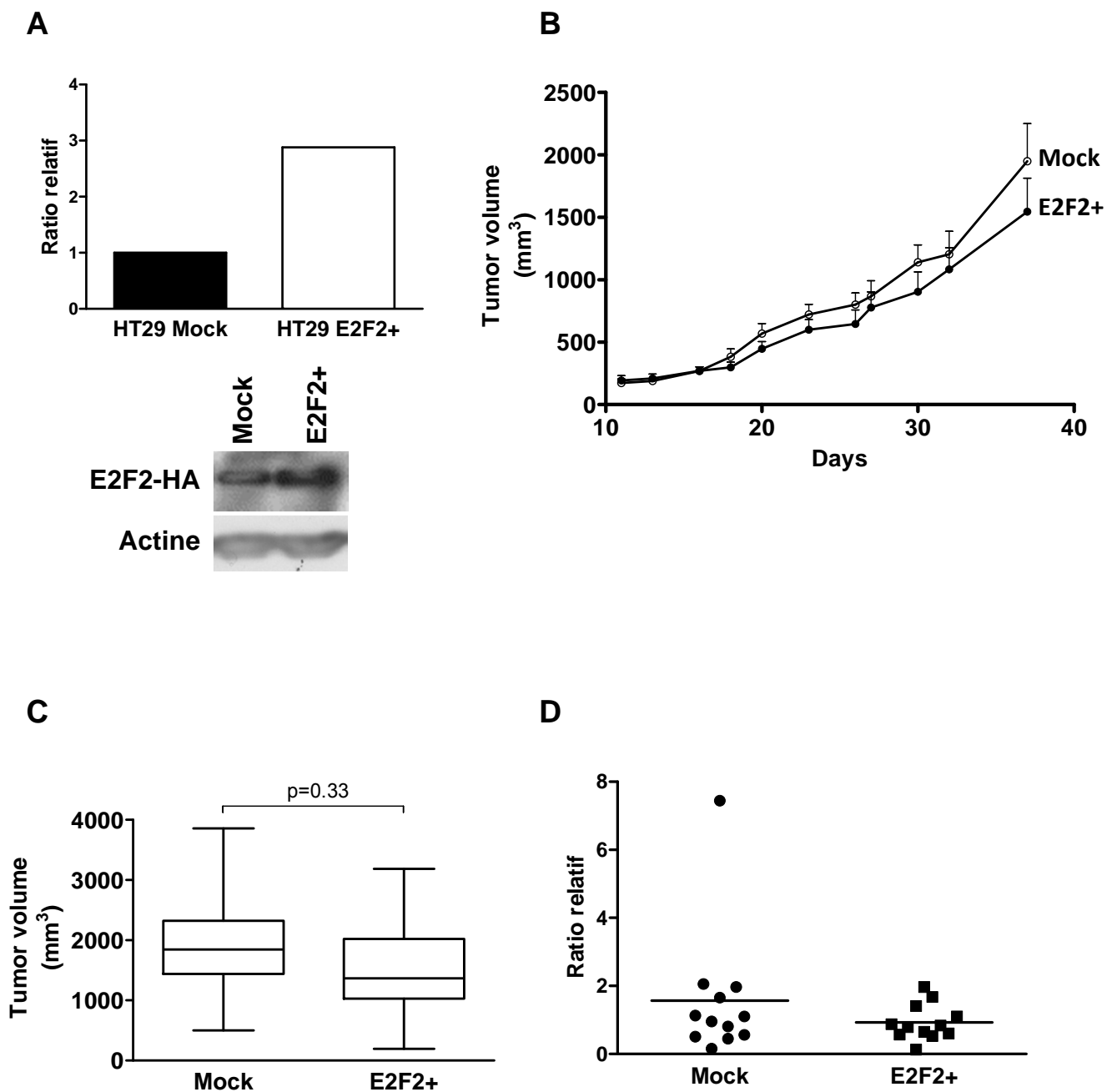


Figure 53: Efficacité de la sur-expression de E2F2 sur la croissance de tumeurs xéno-greffées en sous-cutané. Des cellules HT29 ont été infectées par un vecteur rétroviral contenant l'ADNc du gène E2F2 ou le vecteur viral vide (Mock) et sélectionnées grâce au gène de résistance à la néomycine. (A) L'expression de E2F2 analysée par RT-QPCR (histogramme) et western blot est 1.5 et 3 fois plus élevée dans les cellules HT29-E2F2+ par rapport aux cellules contrôle HT29-Mock. Les cellules stables ont été injectées en sous-cutané dans des souris nue. La croissance tumorale a été suivie pendant 37 jours (12 souris par groupe). La courbe de croissance (B) et le volume des tumeurs (C) le jour du sacrifice (Jour 37), ne sont pas différents pour les deux groupes ($p > 0.5$). (D) L'expression de E2F2 a été analysée à la fin de l'expérience, dans les tumeurs prélevées à J37. Dans ces tumeurs, il n'y a pas de sur-expression de E2F2.

III. Discussion

Analyse transcriptionnelle : plaque TEM

L'analyse des données de l'expression transcriptionnelle de la plaque « TEM » nécessite une validation par RT-qPCR pour chaque gène dont l'expression est dérégulée par la perte d'expression de E2F2 ou ID3. La perte de E2F2 conduit essentiellement à des sous-expressions tandis que la perte de ID3 conduit à des sous-expressions mais également des sur-expressions. Ces observations se justifient par la fonction d'activateur de E2F2 et pour ID3, de répresseur transcriptionnel.

Parmi les gènes ciblés par l'inhibition de E2F2 et ID3, ceux étant sous-exprimés régulent des fonctions associées au cancer et des modifications de leur niveau d'expression ont été décrites dans plusieurs types tumoraux dont le CC (**Tableau 1**). Parmi ces gènes, MSN, MMP9, FN1, GSC, CALD1, SPARC, MST1R, WNT11, IL1RN et VIM sont décrits pour être associés à la perte des caractéristiques mésenchymateuses (**Annexe 5**), au développement de métastases et à un faible pronostic de survie. Par conséquent, une inhibition de leur expression due à l'absence de E2F2 ou ID3, va empêcher le déclenchement de la TEM et donc de la migration et dissémination cellulaires. A l'opposé, l'inhibition de E2F2 et ID3 induit la sur-expression de TFPI2 qui est un régulateur négatif de la dégradation de la MEC dans la TEM.

Par contre, parmi les anomalies observées, certaines sont plus inattendues. Par exemple, l'inhibition de ID3 induit l'expression des gènes SNAI2 (Slug) et MMP3, connus pour favoriser la TEM. Cependant il semblerait que de tels effets dépendent du type cellulaire étudié. En effet, dans une lignée prostatique PC3, qui a un fort potentiel métastatique, l'inhibition de ID3 par des siRNA induit l'expression de Slug mais inhibe la prolifération cellulaire sans altérer l'expression de MMP9 alors que dans la lignée prostatique LNCaP, l'expression de MMP9 est inhibée par un siID3 (Asirvatham et al., 2007).

En conclusion, l'ensemble des altérations observées dans cette analyse appuie notre hypothèse dans le sens d'une régulation des propriétés invasives cellulaires par les gènes E2F2 et ID3

SYMBOLES	Types de protéines	Fonctions associées au cancer	Expression dans les cancers	Références
MSN	Protéine adaptatrice liant le cytosquelette et les récepteurs membranaires	Migration Invasion/Metastase	- Re-expression dans le CCR	Kim et al., 2012
MMP9*	Métalloprotéase matricielle	Dégradation de la matrice Invasion/Metastase	- Sur-exprimé dans le CC	Zucker et al., 2004 ; Liabakk et al., 1996
IL1RN	Cytokine anti-inflammatoire	Initiation tumorale Angiogenèse/Metastase	- Polymorphisme associé au risque de rechute des CC de stade II	Sehouli et al., 2002 ; Lurje et al., 2009
SPARC	Protéine de la MEC	Invasion/Metastase	- Sous-expression de mauvais pronostic (OS et PFS) - Sur-expression dans les cellules stromales inversement corrélée avec la différenciation tumorale et l'envahissement ganglionnaire	Yang et al., 2007 ; Liang et al., 2010
FN1	Protéine de la MEC	Migration Matrice/Adhésion cellulaire	- Fortement exprimé dans les CCR avec envahissement ganglionnaire (N>0) - Re-exprimé pendant la TEM	Meeh et al., 2009
GSC	Facteur de transcription	Differentiation/Development Invasion/Metastase	- Sur-exprimé dans le cancer du sein Initie la TEM et promeut le	Hartwell et al., 2006
MAP1B	Protéine liant les microtubules	Cytosquelette Migration	- Méthylé dans le CC et associé au phénotype CIMP	Ferracin et al., 2008
CAV2	protéine des cavéoles	Prolifération/Apoptose	- Sous-expression dans le cancer du sein - Sur-expression dans le cancer du poumon et de l'œsophage associée à un faible pronostic de survie	Sagara et al., 2004 ; Wikman et al., 2004 ; Ando et al., 2007
MST1R (ou RON)	Récepteur tyrosine kinase	Differentiation/Development Prolifération/Apoptose Migration	- Sur-expression dans le cancer du sein associée au développement des métastases osseuses	Xu et al., 2004 ; Welm et al., 2007
WNT11	Ligand de la voie Wnt non-canonique PCP	Différenciation/Polarité Migration Inflammation	- Sur-exprimé dans le CCR et associé à un faible pronostic	Nishioka et al., 2011
CALD1	Protéine liant l'actine et la calmoduline	Cytosquelette Migration (contraction)	- Exprimé dans les cellules tumorales et stromales des CCR	Kohler, 2011
VIM**	Filament intermédiaire de type III	Migration Adhésion	- Méthylé dans 50% des CCR - Forte expression dans le stroma tumoral associé à un mauvais pronostic de survie	Zhang et al., 2011 ; Ngan et al., 2007 ; Glaser-Gabay et al., 2011
SNAI2/SLUG**	Répresseur transcriptionnel	Differentiation/Development Morphogénèse Propriétés anti-apoptotiques	- Sur-expression dans le CCR - Rôle dans la survie des cellules cancéreuses qui ont subi une TEM et dans la résistance à la chimio- et radiothérapie	Larriba et al., 2009 ; Wang et al., 2010
MMP3**	Métalloprotéase matricielle	Dégradation de la matrice Invasion/Métastases	- Sur-exprimé dans les stades précoces des CC (modèle de rats traités à l'azoxyméthane)	Zucker et al., 2004 ; Bousserouel et al., 2010
TFPI2	Inhibiteur de serine protease	Régulation négative de la dégradation de la MEC	- Méthyké dans les CCR différenciés de stade avancé	Hibi et al., 2010 ; Zhang et al., 2011

Tableau 1 : bilan de l'analyse transcriptionnelle des gènes associés à la TEM dans les cellules Caco-2/TC7 sous-exprimant E2F2 et ID3. Les gènes sous-exprimés sont indiqués en vert et les gènes sur-exprimés en rouge. Leurs fonctions associées au cancer ainsi que leur expression dans le CC (ou dans un autre cancer le cas échéant) sont indiqués. * dérégulation spécifique à l'inhibition de E2F2. ** dérégulation spécifique à ID3.

Cavéoline-1 et progression tumorale

Dans les fibroblastes, l'expression de la cavéoline-1 est responsable de l'organisation tridimensionnelle de la MEC en activant la petite protéine Rho GTPase (Goetz et al., 2011). Dans le contexte tumoral, cette matrice 3D influence le comportement des cellules tumorales en

favorisant la migration, l'invasion et le développement de métastases *in vivo*. La cavéoline-1 est décrite comme une protéine adaptatrice capable de s'associer au cytosquelette d'actine et aux intégrines (Wary et al., 1998; Stahlhut and van Deurs, 2000). Elle active des signalisations de la voie des AFs en stimulant la kinase src et les protéines de la famille des Rho GTPases, favorisant ainsi la migration directionnelle et la polarisation de fibroblastes (Grande-García et al., 2007). Dans les cellules souches embryonnaires, la cavéoline-1 induit l'expression de l'intégrine $\beta 1$ par l'activation de la kinase FAK des AFs et par la voie des MAPK, stimulant la prolifération cellulaire (Lee et al., 2011). De plus, la cavéoline-1 est impliquée dans les mécanismes d'endocytose des protéines de jonctions serrées dont la claudine-1 (Nusrat et al., 2000; Hopkins et al., 2003) ainsi que le récepteur LRP5 activant la voie Wnt canonique (Yamamoto et al., 2006).

Dans nos conditions, la cavéoline-1 est sous-exprimée dans les cellules sous-exprimant E2F2 *in vitro*. Il est donc possible que la perte de la cavéoline-1 empêche l'activation de Rac et entraîne la désorganisation des jonctions serrées dans les cellules siE2F2, en empêchant l'internalisation des protéines associées à ces jonctions. Par conséquent, la cavéoline-1 entraînerait la perte du potentiel migratoire. De plus, comme la cavéoline-1 joue un rôle dans l'activation de la voie Wnt, sa sous-expression pourrait participer à la diminution de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. Enfin, la cavéoline-1 peut induire l'expression et la sécrétion de la FN1 (Lee et al., 2011). Or, les cellules siE2F2 adhèrent mal sur la FN1 dont l'expression transcriptionnelle est diminuée. Ces données suggèrent que la perte de la cavéoline-1 participe à la perte d'adhésion des cellules siE2F2.

On peut noter que dans l'analyse transcriptionnelle avec la plaque TEM, l'expression de la cavéoline-2 est également diminuée dans les cellules siE2F2 et siID3. Or les gènes codant les cavéoline-1 et -2 sont co-localisés au locus q31.1 du chromosome 7 et sont co-exprimés dans la plupart des types cellulaires, dont les cellules tumorales (Scherer et al., 1997).

Rôles de E2F2 et ID3 dans la délétion 1p36.11-12

La micro-délétion à ce locus cible plusieurs gènes, et pour certains d'entre eux il n'y a pas de fonction connue à ce jour. Parmi les gènes mieux étudiés, E2F2 et ID3 ont été retenus pour leur participation dans le processus cancéreux en ciblant des fonctions spécifiques à chacun des deux gènes. Pour l'ensemble des fonctions cellulaires analysées dans ce travail, on constate que la plupart des dérégulations sont similaires après l'inhibition de chacun des deux gènes, ce qui semble indiquer que ces gènes régulent des fonctions cellulaires et des gènes communs. Cependant, il est possible que d'autres fonctions, non étudiées ici, telles que la différenciation/polarité cellulaire, l'impact sur l'angiogenèse et l'immunité tumorale, puissent être affectées différemment ou individuellement par l'un ou l'autre gène. Aussi pour mieux comprendre la contribution de chacun sur la croissance tumorale et le développement de métastases, une lignée cellulaire sous-exprimant simultanément les deux gènes E2F2 et ID3 devrait être générée.

Des résultats préliminaires *in vitro* d'une double transfection transitoire avec les siRNA-E2F2 et siRNA-ID3 dans les cellules Caco-2/TC7, montrent une altération des capacités migratoires et adhésives sans potentialisation des effets. Cette observation va dans le sens de cibles communément affectées par l'inhibition de l'expression d'un seul gène. Cependant, le protocole idéal sera d'évaluer les effets sur des xénogreffes d'une double sous-expression stable *in vivo*, afin de déterminer le réel impact fonctionnel de la double délétion, telle qu'elle existe dans les tumeurs.

A ce jour, des pertes chromosomiques situées dans la région 1p36 ont été décrites dans plusieurs types de tumeurs. Toutefois, le(les) gène(s) potentiellement GST, et ciblé(s) par la délétion n'est(ne sont) pas encore connu(s). Parmi ces gènes (**Tableau 2**), peu ont été étudiés dans la littérature et sont aussi des cibles potentielles, dont la perte pourrait réguler la carcinogenèse colique.

D'autre part, il est prévu d'analyser les données de CGH dans le but de définir d'autres évènements génomiques associés à la délétion 1p36.12. En effet, il est évident que les tumeurs résultent de la combinaison de plusieurs altérations génétiques et épi-génétiques et non pas d'un seul type d'altération, et que par conséquent la recherche de signatures moléculaires permettrait de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la cancérogenèse colique.

Gènes	Description
HNRNPR	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
ZNF436	Zinc finger protein 436
TCEA3	Transcription elongation factor A (SII), 3
DDEFL1	Development and differentiation enhancing factor-like 1
E2F2	E2F transcription factor 2
ID3	Inhibitor of DNA-binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein
RPL11	Ribosomal protein L11
TCEB3	Transcription elongation factor B (SIII)
LYPLA2	Lisophospholipase II
GALE	UDP-galactosidase-4-epimerase
HMGCL	Hydroxymethyl-3-methylglutaryl-coenzymeA lyase
FUCA1	Fucosidase, alpha L-1
CNR2	Cannabinoid receptor 2
PNRC2	Proline-rich nuclear receptor coactivator 2
FUSIP1	FUS interacting protein 1

Tableau 2 : Gènes localisés dans la région de 0.7Mb délétée au locus 1p36.11-12 et leur fonction biologique principale.

CONCLUSION GENERALE ET PERPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La première partie de mon travail de thèse concernant une micro-délétion sur le bras court du chromosome 1 dans les cancers coliques humains a mis en évidence l'implication de facteurs de transcription tels que E2F2 et ID3, dans des processus cellulaires associés à la dissémination. Nos observations indiquent que *in vivo*, la perte d'E2F2 favorise la croissance tumorale et bloque le développement de métastases. Pour analyser les conséquences de la perte de E2F2 et ID3 à la fois sur la croissance tumorale et la dissémination métastatique dans les conditions les plus proches de tumeurs *in situ*, il serait intéressant de reproduire les expériences dans un modèle « orthotopique » qui consiste à injecter les cellules dans la paroi du caecum. Ce modèle fait intervenir le micro-environnement du côlon et est adapté pour observer la dissémination et l'implantation des cellules tumorales dans les organes cibles de métastases, que ce soit dans les ganglions ou dans le foie/poumons, par dissémination lymphatique et hématogène.

Enfin, pour valider le caractère de bon pronostic de la survie sans événement, il faudra étendre la recherche du statut du gène E2F2 (et/ou ID3) dans une nouvelle cohorte rétrospective pour laquelle les suivis cliniques des patients à 5 ans sont disponibles. A terme, une étude prospective chez les patients nouvellement diagnostiqués pour un cancer du côlon peut être envisagée.

La mise en évidence d'une telle délétion, si elle ne peut avoir de valeur clinique dans un avenir proche, peut toutefois permettre de progresser dans la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de l'évolution d'un adénome vers un carcinome mais aussi à l'origine de l'évolution péjorative de la maladie, puisque l'on sait que les patients meurent de leurs métastases.

CHAPITRE II

RESULTATS

CHAPITRE II : Intérêt du ciblage thérapeutique de CD13 par de nouveaux inhibiteurs chimiques dans le cancer du côlon

PUBLICATION 3

Résultats principaux

L'aminopeptidase N/CD13 est sur-exprimée dans plusieurs types de cancers, en particulier dans les néo-vaisseaux tumoraux et cette métalloprotéase est décrite comme une cible thérapeutique potentielle. Ce travail a évalué l'efficacité thérapeutique de nouveaux inhibiteurs pharmacologiques dérivés de la benzosubérone hautement sélectifs de CD13 et stables à pH physiologique. Dans ce travail, je montre que la morphogenèse et la migration de cellules endothéliale *in vitro* sont inhibées de manière dose-dépendante. De plus, les inhibiteurs sont capables d'inhiber la migration des cellules tumorales de manière dose-dépendante.

Le traitement par ces inhibiteurs de xénogreffes issues de différentes lignées cancéreuses, diminue la croissance tumorale et la vascularisation intra-tumorale. Enfin, la combinaison avec un inhibiteur de l'axe mTOR/HIF1 α (rapamycine) améliore l'effet de l'inhibiteur de CD13 sur la croissance tumorale.

Selective Aminopeptidase-N (CD13) - targeted inhibitors, relevance for cancer chemotherapy

Céline Schmitt^{1,#}, Manon Voegelin^{2,#}, Aurélie Marin¹, Dr Marjorie Schmitt¹, Fabienne Schegg¹, Dr Dominique Guenot^{2,*}, Prof Céline Tarnus¹

Authors affiliations :

¹ Université de Haute-Alsace, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse, Laboratoire de Chimie Organique et Bioorganique EA4566, 3 rue A. Werner, 68093 Mulhouse Cedex, France.

² EA 4438 Physiopathologie et Médecine Translationnelle, Université de Strasbourg, Inserm U682, Strasbourg Cedex, France

both authors equally contributed to the work

* Corresponding author : Dominique Guenot, EA 4438, 3 Avenue Molière, 67098 Strasbourg Cedex, France. Phone: 33-388-27-53-62; Fax: 33-388-26-35-38, dominique.guenot@inserm.fr.

Running title : Aminopeptidase N inhibitors and colon cancer

Key words: aminopeptidase N – xenograft – amino benzosuberone – carcinogenesis – rapamycin – Hif-1a

Abstract

Aminopeptidase N (APN/CD13) is highly expressed on the surface of numerous cancer cells as well as on endothelial cells of neoangiogenic vessels during tumorigenesis. This metallo-aminopeptidase is described as a potential target for cancer chemotherapies. In the present work, we have evaluated the efficacy of a novel series of benzosuberone analogues, previously described as highly potent and selective inhibitors APN, with K_i values varying from the micromolar to the sub-nanomolar range. We have shown that endothelial cell morphogenesis as well as cell motility are inhibited *in vitro*, in a dose dependant manner, at concentrations that correlated with the potency of the tested compounds. The toxicity of these new molecules has been extensively studied in order to perform pilot *in vivo* studies with mouse models. The treatment effect on the growth of a selected panel of tumors subcutaneously xenografted in Swiss nude mice is reported. The observed structure activity relationship indicated that APN can serve as a target to inhibit tumor growth with significant activities in mono therapies and a relevant effect in combined therapies.

Introduction

Aminopeptidase-N (APN/CD13; EC 3.4.11.2) is a high molecular weight ubiquitous ectopeptidase that belongs to the M1 family of zinc dependent enzymes [1]. It is known to remove preferentially the N-terminal neutral amino acid from unsubstituted oligopeptides with broad substrate specificity, although a significant preference for hydrophobic residues is observed [2]. APN/CD13 is expressed in several human organs, tissues and cell types [3] and this broad tissue distribution makes the identification of endogenous substrates highly complex, likewise the corresponding biological functions. One aspect that is more and more considered is the fact that APN is a multifunctional protein part of the moonlighting enzyme family, where the catalytic activity might be linked to more complex and systemic effects. The understanding of these mechanisms remains a challenge since many of the *in vivo* relevancies of these functions have not yet been determined. Nevertheless, interest in APN as a therapeutic target has been progressively increasing [4–6].

The expression of APN is clearly related to the regulation of signal peptides [3] and has been associated with various cell activation and migration processes. For example overexpression has been found to correlate with immunological abnormalities such as chronic inflammatory diseases [7,8] and autoimmune pathologies [9] suggesting a role in T cell function and activation. Several studies with small molecular weight inhibitors [10], active site directed anti-APN mAb [10,11], siRNA [10] and KO mice [11,12] indicate that APN is also an active player in angiogenesis, tumor progression and metastasis. Many of the functions attributed to APN has been associated with different aspects of normal (e.g. myeloid progenitor cells) and malignant development like tumor cell invasion, differentiation, proliferation and apoptosis, motility and angiogenesis [13–16]. With respect to angiogenesis, APN is found exclusively on the endothelial cells of angiogenic but not normal vasculature [5] and treatment of animals with APN inhibitors significantly impaired retinal neoangiogenesis and xenograft tumor growth. As these inhibitors impair the tube formation but not proliferation of vascular endothelial cells, it suggests that APN rather controls endothelial cell morphogenesis [3,5]. In tumorigenesis, a strong correlation between the expression and catalytic activity of APN, and the invasive capacity of numerous tumor cell types is observed and APN has been reported to be overexpressed or its enzymatic activity marked up, in numerous carcinomas [17,18]. More specifically, in human colon tumors, the APN expression is associated with tumor status and the overall survival rate for patients with positive APN expression tumors was significantly lower than that for patients with APN-negative tumors [19]. Similar concerns come from

breast cancer patients [20]. At last, APN was shown to be a functional marker that can be used to identify potentially dormant liver cancer stem cells resistant to treatment thus playing a role in relapse of liver cancer [4].

With the view of potential therapeutic relevance of some of the APN functions, the rational design of potent and selective APN inhibitors is of considerable interest. Over more than three decades, studies have evaluated numerous inhibitors of APN, including Bestatin [21] which is the best known for its application in the clinical treatment of adult acute non lymphocytic leukemia.

In recent years, several classes of APN inhibitors have been reported [22,23] including in particular hydroxamic, sulfonic and boronic acids peptide analogues. Recent reviews provide excellent compendium of the current available set of APN inhibitors [24]. While many of these compounds display high *in vitro* potency, their selectivity is regrettably, not always well documented and *in vivo* data remains very scarce. Accordingly we have recently reported the discovery of 7-amino-benzocucloheptan-6-one derivatives (scheme 1) as novel lead structures for selective APN inhibition [25,26]. These new chemotypes are considered as useful chemical biology tools to unravel new details about APN biological functions that imply the catalytic activity. We have evaluated these compounds in a panel of standard *in vitro* and *in vivo* assays, addressing the importance of APN in processes that promote cancer progression. To this respect, we have selected three derivatives with various K_i values on the target enzyme to ascertain a Structure Activity Relationship in the experiments performed and thus validate APN as the target. To further evaluate their *in vivo* activity, nude mouse xenografts were used and to this respect the K_i values, these compounds were evaluated on purified APN from human and mouse origin, since tumorigenesis processes such as angiogenesis require a functional interplay between malignant and non malignant cells within the micro-environment [12]. To explore the biological features where APN is described as an active player, in particular cell migration and organisation, a series of standard cell-based assays, i.e. *in vitro* endothelial capillary tube formation as well as endothelial and tumor cell migration assays were studied. Accordingly, pilot *in vivo* studies with the most promising inhibitors are reported on various tumor types expressing APN. Finally, we hypothesized that rapamycin, a well tolerated macrocyclic lactone and a potent mTOR inhibitor/immunosuppressive agent might cooperate in combination with an APN inhibitor. This bi-therapy was tested *in vitro* and *in vivo*.

Results and Discussion

1. *In vitro* affinity of inhibitors APN from human and mouse origin

Three compounds (I1, I2, I3) with diverse affinity constants (K_i values) were chosen in order to investigate the structure activity relationship and the dose dependent response in standard *in vitro* and *in vivo* models related to tumorigenesis. The synthesis of the inhibitors and their enzymatic activity on porcine kidney APN have already been published [25,26]. In the present work, the potency of our new scaffolds was checked on APN from human and mouse origin, before investigation in biological models. Indeed, the sequence homology of the three species of APN, members of the M1 family of peptidases, is high with 78% identity between the human and porcine sequences and 76% with the murine sequence (see <http://www.uniprot.org/>). The partial sequence alignments of the human (P15144), porcine (P15145) and mouse (P97449) APN are shown in **Figure 1**. For all species, the active site is highly conserved with a 98% homology. It refers to the consensus zinc binding motif “HEXXH-(X18)-E”, the exopeptidase motif “GXMEN” for binding the free primary amino group of the N-terminal residue of the peptidic substrate and the catalytic proton site. It explains the close K_i and Ligand Efficiency (LE) values determined with the purified enzymes (**Table 1**). We observed that I1 and I2 showed very similar activities on the enzyme from the three species with an identical SAR, although I3 remains the most potent compound with K_i values of 0.09nM and 1 nM on the human and mouse APN, respectively. It is interesting to notice that I2 and I3 are almost equipotent on the murine APN. The variation in the K_i values for I3 could result from subtle differences in the active site. However, to date, the APN three dimensional structures is not available. When evaluated *in vitro*, on the Human Umbilical Vein Endothelial cells (HUVECs) and two colon cell lines, Caco-2/TC7 and SW480, the K_i values were close to that with the purified human enzyme and the enzyme activity varied according to the cell type with HUVECs > Caco-2/TC7 > SW480. Interestingly, this activity could be related to the APN mRNA expression (**Figure 2A**). All these data established that the APN from different species and various cell types should be significantly inhibited in the *in vitro* and *in vivo* models studied hereafter.

2. *In vitro* cell-based assays

As several reports suggest that APNs are involved in both angiogenesis and tumor dissemination, capillary tube formation and cell motility were investigated.

2.1 Capillary tube formation

We used HUVECs to investigate whether the APN inhibitors could inhibit the ability of endothelial cells to spontaneously form three-dimensional capillary tubes. I1, I2 and I3 were found to inhibit the formation of capillary like structures and the few tubes that formed were particularly thin (**Figure 3**). As expected, the concentrations of I1 and I2 necessary to block this process correlated with their respective K_i value for APN, indicating that APN participates to the process of new blood vessels. Interestingly, I1 ($K_i=1\mu\text{M}$) was 70 times more active in this assay than bestatin, a non selective standard inhibitor with the same potency ($K_i=3.5\mu\text{M}$). In our experimental conditions, whereas a concentration of $300\mu\text{M}$ of bestatin was necessary to inhibit endothelial tubulogenesis, $10\mu\text{M}$ of I1, and $1\mu\text{M}$ of I2 and I3 were sufficient to produce a similar effect (60% inhibition of closed junctions). On the other hand, the APN inhibitors had no significant effect on cell proliferation and cellular toxicity was determined with CD_{50} values of 100, 20 and $10\mu\text{M}$ respectively for I1, I2 and I3 (data not shown). These data corroborate previous results [27] where APN antagonists, like bestatin or active site directed APN antibodies, interfere with tube formation but not proliferation of primary vascular endothelial cells, suggesting that during the vascular tube formation, APN contributes basically to the morphogenesis process.

2.2. Motility of HUVECs and human colon cells

Wound healing assay. To investigate whether APN inhibitors can affect the cell migration, they have been tested in the wound healing assay. At T16h, only I3 used at $0.01\mu\text{M}$ significantly inhibited HUVEC migration (**Figure 4A**). At higher concentrations of 0.1 and $1\mu\text{M}$, both I2 and I3 significantly inhibited the migration (**Figure 4A**). On Caco-2/TC7 cells, I2 had no significant effect whatever the concentration but cells treated with I3 at $0.1\mu\text{M}$ and $1\mu\text{M}$ migrated 30% and 40% slower than control cells respectively (**Figure 4B**). We concluded that I3, and I2 to a lesser extend, inhibited the cell migratory potential in a dose-dependent manner, although the inhibitors were more potent on endothelial cells than on colon tumor cells. Presently, the ability of the inhibitors to reduce the cell migration can also be related to the level of APN expression as HUVECs express much higher amount of the enzyme than the Caco/TC7 tumor cells (see **Figure 2**). It was already shown that APN favours the motility of several human carcinomas [13,28,29], and that a high expression is associated to highly invasive cells [29]. In addition, the potency of APN inhibitors like APN-targeting siRNA or highly specific chemical inhibitors, to reduce the cell migration was linked to the amount of APN [30]. Similarly, we have also observed that I2 and I3

significantly prevented HUVEC motility by 70% in the Boyden chamber migration assay, with VEGF used as a chemo-attractant (data not shown) at 0.1 and 1 μ M concentrations respectively.

3. Formulation and stability studies

A preclinical formulation, compatible with intraperitoneal administration (i.p), has been set up for I2 and I3. The chosen vehicle that allowed the solubilization of the compounds at a concentration of 5mg/ml, was DMSO in a 5% glucose solution at a ratio of 10/90 (v/v). Analysis by HPLC-MS of storage solutions at -20°C, 4°C and 20°C revealed that the compounds were chemically stable at least during 20 days (-20, +4 and +25°C). The chromatograms indicated the presence of a single peak for each substance, whatever the storage condition (data not shown). Nevertheless, slight precipitation of the compounds appeared with time (24 hours) probably due to the slow formation of a dimeric structure as already observed at high concentration [25]. Therefore, a fresh solution was prepared before each injection, from the solid.

4. Tolerance study in nude mouse

Toxicity of these new chemical entities has been carefully determined in nude mice. We evaluated the maximum tolerated dose (MTD) as well as the maximum total tolerated dose (MTTD).

MTD determination. Eighteen mice were randomized into 6 groups of 3 mice according to their individual body weight on D0 (21.2 \pm 1.4g). In the group treated with I2, one mouse displayed a slight and transient body weight loss between D0 and D2, while the two other mice gained weight. All mice gained weight after D2. The effect was more pronounced when a dose of 100mg/kg was injected, since all mice displayed this transient body weight loss during 2 days. At the dose of 150mg/kg, one mouse was found dead on D1, and two mice did not gain weight until day 5 but then did increase until day 11. Similar effects were observed with I3. In these conditions, the MTD was 100mg/kg.

MTTD determination. Randomization of 18 mice into 6 groups of 3 mice according to their individual body weight (21.2 \pm 0.7g) were treated on D0 with 40, 70 and 100mg/kg per injection (I2 or I3), every 3 days for a total of 8 injections (Q3D8) for the two first dosages and 4 injections for the highest dose. The treatment with I2 or I3 at a dose of

40mg/kg/injection was well tolerated and no macroscopic sign of toxicity was observed. After the second injection at a dose of 70mg/kg of I2, a transient catalepsy that persisted during two hours was observed. Nonetheless, all mice displayed increasing body weight up to the end of the treatment. At the highest treatment dose (100mg/kg/injection), convulsions were observed after the second injection, and mice were sacrificed after the third injection, on D10, for ethical reasons.

The most active APN inhibitor, I3, was less tolerated at 70mg/kg/injection since one mouse was found dead on day 3 and the two other mice displayed marked body weight loss during the course of the treatment (**Figure 5**). Thus, the MTTD was estimated at 40mg/kg for both APN inhibitors for one injection every three days.

5. Effects of APN inhibitors on the growth of xenografted tumors

APN is clearly dysregulated in human malignancy, conferring carcinogenesis properties. Therefore, development of novel anticancer drugs that would modulate APN expression, function or related signalling pathway(s) may lead to treatment improvement. APN is considered as a target for anti-angiogenic therapies [4] and although *in vitro* convincing data are available, *in vivo* data with specific inhibitors remained scarce [12,17]. Some of these aminopeptidase inhibitors with APN-inhibiting properties are currently evaluated in clinical trials in the cancer area [31,32].

As APN inhibitors are known to alter the angiogenesis process, we have compared I2 and I3 to Avastin, an anti-angiogenic compound [33] in xenografts models.

The anti-angiogenic anti-VEGF Avastin®, used as a standard control of tumor regression (5mg/kg twice a week for a total of 7 injections) and I2 and I3 (30 mg/kg and 40mg/kg, respectively) were evaluated for their potency to inhibit the growth of the A672 rhabdomyosarcoma cell line, which expresses APN, after implantation into the nude mouse (**Figure 6B**). The mice were treated one day after tumor cell injection and for further 26 days. At that time, the tumor size was reduced by 55% with Avastin®, 44% with I3 (30 mg/kg) whereas the tumors poorly responded to 40mg/kg of the I2 inhibitor (18% of growth inhibition). We have shown that the density of microvessels was closely related to the impact of each drug on the tumor growth: Avastin®, which exhibited the highest growth inhibitory effect, induced an important reduction in microvessel density, although the effect of I3 appeared very close on tumor growth as well as on vascularisation. I2 which barely reduced the vessel density was poorly efficient to reduce the tumor size (**Figure 6C**).

Besides acting at the level of cancer prevention, the urgent goal in cancer therapy is to treat established tumors and/or to avoid the metastasis spread. Therefore, the APN inhibitors were tested on already established xenografted tumors derived from the human MDA-MD231 breast cells. In these xenografts, the I2 and I3 compounds were unable to reduce the vessel density and the tumor growth.

6. APN inhibitors in drug combination

In order to identify a cell type that would respond to the APN inhibitors, human colon tumors were chosen because their growth relies on angiogenesis [34]. In these pilot experiments, the anti-tumor properties of I3 injected at 30mg/kg (Q3D8) was assessed in xenografts of human primary colon tumors and tumors derived from the human HT29 cell line. In addition, I3 has been tested in combination with rapamycin, a mTOR pathway inhibitor.

With the tumor derived from the HT29 cell line, no significant effect on the tumor growth was observed with I3 (15% TGI; **Figure 7A**). With the human primary colon tumors, we observed that the tumor 1 was less sensitive than tumor 2 to the APN inhibitor (TGI was 8% for the tumor 1 and 26% for the tumor 2; **Figure 7**). The effect was independent of the median tumor volume at the start of the treatment. Interestingly, the inhibitory impact of the APN inhibitor on the tumor growth can be related to the endogenous APN mRNA level of expression. Indeed, xenografts derived from HT29 cells and tumor 1 express low levels of human APN whereas the tumor 2 expresses a high level of human APN (70 times more than in tumor and 3.5 times more than in HT29 cells (**Figure 8**). On the other hand, xenografts are colonized by murine vasculature and APN expressed by the host endothelial cells could also be involved in the effect. However, the level of the murine APN mRNA did not differ between the three samples (**Figure 8**) probably because the level of vascularization is comparable in the three tumors.

Although these observations suggest that the efficacy of the inhibitor depends on the level of APN as already shown [30], the capacity of these molecules to inhibit the tumor growth is rather weak. Therefore, association of these inhibitors with other therapeutic drugs was considered to further improve the anti-tumor effect.

A major mechanism mediating adaptive responses to tumor hypoxia is the regulation of many genes that have key roles in cancer biology including angiogenesis [35] by the Hypoxia-Inducible Factor 1 [36] (HIF-1). Consequently, molecules that modulate the transcriptional activity or the quantity of HIF-1 have been shown to be effective in blocking the proliferation

and / or vascularization of tumors [37] As published data showed that mTOR inhibitors suppress steady-state levels of HIF-1a [38], thus preventing angiogenesis [39], we addressed whether rapamycin could potentiate the I3-induced tumor growth inhibition.

We observed that for tumor 2 only, which expresses a high level of APN, rapamycin significantly amplified the antitumor effect of the I3 inhibitor (TGI = 57% for tumor 1 vs 8% with I3 alone; 75% for tumor 2, vs 26% with I3 alone; **Figure 7**). Together, our study suggests that rapamycin is likely to increase the efficiency of I3 inhibitor. Therefore, we provide here a rationale for evaluating therapeutic combinations in order to simultaneously target multiple cellular pathways deregulated during the carcinogenesis process.

As it was shown that rapamycin inhibits the vascular tube morphogenesis [39], we observed that HUVECs treated with I3 (1 μ M) and rapamycin (20nM), did not develop capillary-like structures and this effect was cooperative between I3 and rapamycin (**Figure 9**).

7. APN inhibition on the HIF-1a expression: a putative mechanism of action for the APN inhibitor

So far, the substrates of APN in the context of carcinogenesis and angiogenesis are still unknown. On the other hand, it is known that inhibition of mTOR leads to the inactivation of HIF-1 mRNA translation and thus reduced HIF-1 protein expression. Subsequently, less HIF-1a transcriptional activity reduced the tumor vascularization, leading to growth arrest. In the present study, the I3-induced inhibition of Caco-2/TC7 cell migration indeed involves the HIF-1 protein as its expression decreased with increasing concentrations of I3. Interestingly, addition of rapamycin to the I3 inhibitor almost totally abolished HIF-1a expression (**Figures 10A-B**). Therefore, the present study shows that the I3 inhibitor targets HIF-1a and that addition of rapamycin greatly enhances the antitumor effect of the APN inhibitor in a human colon cell line.

So far, the mechanisms by which APN participates in tumor angiogenesis and cell invasion have been linked to its enzymatic activity and in the present study, we provide a putative mechanism by which APN would participate to cell invasion through involvement of the HIF-1 pathway, as already proposed in melanomas cells where HIF-1a and APN levels which were increased by hypoxia both at the transcriptomic and proteomic level [40].

Interestingly, inhibition of HIF-1a protein accumulation with I3 occurs through mTOR-independent mechanisms as the level of phosphorylated S6RP, a mTOR target, remained unchanged in cells treated with the APN inhibitor alone (data not shown). Modulation of the

mTOR pathway by aminopeptidases has already been described but could be related to the cell type; indeed, aminopeptidase inhibition by non specific inhibitor like CHR-2797, reduced mTOR substrate phosphorylation and rates of protein synthesis in HL-60 cells but not in HuT 78 cells, another haematopoietic cell line [22].

In contrast, the rapamycin-reduced HIF-1a expression required the mTOR pathway as the phosphorylated S6RP expression was reduced (data not shown). The ability of both the APN inhibitor and rapamycin to inhibit the HIF-1a protein by independent pathways may explain their synergistic effect and bring new opportunities to develop therapeutic strategies. Similar potentiation was shown in a previous data combining rapamycin and irinotecan [41].

Aminopeptidase inhibition also reduced phosphorylation of mTOR substrates and rates of protein synthesis, both indicative of amino acid depletion.

Conclusion

We have shown that aminobenzosuberone derivatives are potent nanomolar inhibitors of human and mouse APN and that they interfere *in vitro*, with cellular processes involved in cancer progression. The inhibition correlated with the K_i value of the tested compounds and dose dependent effects, have been demonstrated on standard *in vitro* cell migration assays. Pilot *in vivo* studies have been performed and toxicity determined. Inhibitors were well tolerated in mice after repeated i.p. injections and our best compound I3, impaired tumor growth to an extent very close to Avastin, and in close correlation with tumor vascularisation in a rhabdomyosarcoma xenograft model. In colon carcinoma, the effects on tumor growth can be correlated with APN expression and combined therapies with rapamycin are proven to bring additional benefit. Thus, we have shown that APN clearly participate to some extent to cancer progression, presumably through HIF-1a regulation and further investigation, on these promising results, warrant further pharmacological studies including dosing regimen and mode of administration to improve the overall treatment schedules and optimize the employment of aminobenzosuberone derivatives in cancer therapies.

Material and methods

1. Cell cultures

The *in vitro* tests were carried out with endothelial human cells (HUVECs) and human colon carcinoma cells (Caco-2/TC7; SW480; HT-29). Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Promocell, C-12200) were grown in endothelial cells growth medium (Promocell, C-22010) and Caco-2/TC7, HT29 and SW480 cells in DMEM (1g/l glucose) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 200U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen). All cell lines were incubated at 37°C, 5% CO₂. The cells were treated during exponential growth conditions, at a confluence of 30%.

2. Enzyme assays

Human and mouse recombinant APN (R&D Systems) and porcine kidney APN (Sigma Chemical Co) were used. The data were obtained with a HP/Agilent UV-Visible, diode array, spectrophotometer 8453 (HP chemstation software). The selected substrate for APN was L-leucine p-nitroanilide, ($K_m=0.2\text{mM}$). The tests were carried out on 1.8×10^5 HUVECs, 500.10^3 Caco-2/TC7 or SW480 cells grown in 96-well plates and tested at 30°C in 10mM Tris-HCl pH 7.5. The reaction was initiated upon the addition of 1mU of porcine APN, 1mU and 0.5mU of human APN, 1 mU of mouse APN. The release of p-nitroanilide ($\epsilon=10.8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) at 405nm was continuously measured every 10 minutes during 2 hours with a spectrometer (PerkinElmer), in order to get the initial velocities. K_i was obtained through Dixon plots [42].

3. Capillary tube formation assay

The capillary tube formation assay was assayed on 24-well plate was coated with Matrigel (BD Bioscience). In brief, 48-well cell culture plates were coated with 150 μL of Matrigel and allowed to solidification at 37 °C for 1 h. Then HUVECs (5×10^4) were seeded and growth in Endothelial Basal Medium supplemented with 0.1% of BSA, 1% FCS, 1% DMSO, Bestatin (300 μM) and I2 or I3 APN inhibitors at 10 and 0.2 μM respectively. After 24 h, tube formation was observed periodically under a phase contrast microscope (Leica, Germany).

4. *In vitro* migration assay

4.1. Boyden Chamber

HUVECs were cultured in Endothelial Basal Medium supplemented with 0.1% BSA and 1% FCS for 5 hours prior to use. 10^5 HUVECs were seeded in the upper part of BD Falcon™ Cell Culture Inserts filters of 3µm size (BD Biosciences, Mississauga, Canada) in medium supplemented with 0.1% BSA, 1% FCS. The lower part of the chamber was filled with the medium complemented with 100ng/ml VEGF. Inhibitors at various concentrations were added in both the upper and lower parts of the chamber. APN inhibitors at 0.1 and 0.01µM were added in the upper and lower parts of the chamber. After 22 hours of incubation at 37°C in 5% CO₂, the media were removed from the insert, which was then washed with PBS. Plates were then incubated with Calcein (4µg/ml) for one hour at 37°C, then for 30 minutes at the room temperature. The fluorescence was finally measured (495nm excitation, 515nm emission – PerkinElmer Victor).

4.2. Wound healing assay

Migration potential was assessed using Ibidi cell-culture inserts (Ibidi #81176) according to the manufacturer. Briefly, 28.10^3 Caco-2/TC7 cells and 10^5 HUVECs were seeded in two compartments separated by a 500µM thick wall. When confluence was reached 3 days later (T₀), the insert was removed and cells from each compartment were allowed to migrate in a directed-manner. Area between both cell patches was measured in 4 fields per dish at T₀, T_{16h} and T_{24h}. Treatments with APN inhibitors at 0.01, 0.1 and 1µM or vehicle (DMSO 0.25% final) were added at T₀ in DMEM 1g/l-BSA 1%. Migration was calculated as the surface colonised by cells from T₀ to T_{16h} or T_{24h} and results expressed as the percentage of migration compared to control cells.

5. *In vivo* toxicity tests

The toxicity of the APN inhibitors was evaluated through the determination of the maximum tolerated dose (MTD) and the maximum total tolerated dose (MTTD) on Swiss nude mice. For MTD, 6 groups of 3 mice were randomly constituted on day 0 and mice were injected with either I2, I3 at 50, 100 or 150mg/kg in a volume of 30ml/kg. For MTTD, the same groups as for the MTD study were formed. The mice received an i.p injection of either I2 or I3, every 3 days (for a total of 8 injections), at 40, 70 or 100mg/kg/inj in a volume of 30ml/kg. For both MTD and MTTD tests, behavior and clinical signs were monitored every day, and the mice were weighed twice a week.

Mice were sacrificed on day 11 for MTD tests, and day 29 (8 days after the last injection) for MTTD tests. The heart, lungs, spleen, liver, kidneys and gastro-intestinal tract were microscopically examined. The same examinations were also carried out on mice that died during the test.

6. *In vivo* tumor xenograft experiments

Female athymic nude mice (nu/nu), 6 to 8 weeks old, were purchased and maintained under pathogen-free conditions in facilities approved by the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators. Male athymic nude mice (nu/nu), 6–8 wks old (Charles River, L'Arbresle, France), were maintained under specific pathogen-free conditions. Human tumor tissue fragments were obtained after gaining informed consent from patients undergoing colectomy using protocols following the French Ethical Committee recommendations (CCPPRB d'Alsace). Two human colon tumors were minced on ice and injected subcutaneously into the right and left flanks of nude mice as previously described [43]. HT29 human tumor cells were injected sub-cutaneously into 2 points/flank (4 tumors/mouse). The treatment was initiated when the tumors reached a mean volume of 150–300 mm³. The mice were randomized into 4 groups (3 mice/group) and treated by i.p injections of 30mg/kg of I3 alone every 3 days, rapamycin alone every 5 days at 3.3mg/kg, or both drugs. The control group mice were treated with both vehicles. The individual relative tumor volumes (RTV) was defined as V_x/V_0 , where V_x is the volume in mm³ at a given time and V_0 is the volume at the start of treatment. Mean RTV and standard error of the mean (SEM) were calculated for each group. The tumor growth inhibition was also calculated according to $TGI = 100 - (RTV_{treated} / RTV_{control}) * 100$.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by The Ligue Nationale contre le cancer, the Université de Strasbourg, the Hôpitaux Universitaires (Strasbourg), the University of Haute-Alsace (Mulhouse). The authors wish to acknowledge Michèle Lavogez for the animal care, Elisabeth Martin, Christelle Lasthaus and Sophie Billiger for their excellent technical assistance.

REFERENCES

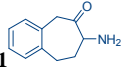
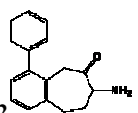
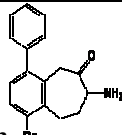
1. Barret AJ, Rawling ND, Woessner JF: In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd ed. Elsevier Academic Press:Oxford; 2004,2,233.
2. Drag M, Bogyo M, Ellman JA, Salvesen GS: Aminopeptidase fingerprints, an integrated approach for identification of good substrates and optimal inhibitors. *J Biol Chem* 2010 Jan 29;285:3310–3318.
3. Mina-Osorio P: The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med* 2008 Aug;14:361–371.
4. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Ohkuma M, Kim HM, et al.: CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest* 2010 Sep;120:3326–3339.
5. Wickström M, Larsson R, Nygren P, Gullbo J: Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci* 2011 Mar;102:501–508.
6. Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Röcken C: Ectopeptidases in tumour biology: a review. *Histol Histopathol* 2006 Dec;21:1339–1353.
7. Riemann D, Kehlen A, Langner J: CD13--not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today* 1999 Feb;20:83–88.
8. Reinhold D, Bank U, Träger M, Ansorge S, Wrenger S, Thielitz A, et al.: DP IV/CD26, APN/CD13 and related enzymes as regulators of T cell immunity: implications for experimental encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Front Biosci* 2008;13:2356–2363.
9. Reinhold D, Biton A, Pieper S, Lendeckel U, Faust J, Neubert K, et al.: Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) and aminopeptidase N (APN, CD13) as regulators of T cell function and targets of immunotherapy in CNS inflammation. *Int Immunopharmacol* 2006 Dec 20;6:1935–1942.
10. Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, et al.: Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 2000 Feb 1;60:722–727.
11. Yamashita M, Kajiyama H, Terauchi M, Shibata K, Ino K, Nawa A, et al.: Involvement of aminopeptidase N in enhanced chemosensitivity to paclitaxel in ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2007 May 15;120:2243–2250.
12. Rangel R, Sun Y, Guzman-Rojas L, Ozawa MG, Sun J, Giordano RJ, et al.: Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 Mar 13;104:4588–4593.
13. Hashida H, Takabayashi A, Kanai M, Adachi M, Kondo K, Kohno N, et al.: Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology* 2002 Feb;122:376–386.

14. Menrad A, Speicher D, Wacker J, Herlyn M: Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Res* 1993 Mar 15;53:1450–1455.
15. Mishima Y, Matsumoto-Mishima Y, Terui Y, Katsuyama M, Yamada M, Mori M, et al.: Leukemic cell-surface CD13/aminopeptidase N and resistance to apoptosis mediated by endothelial cells. *J Natl Cancer Inst* 2002 Jul 3;94:1020–1028.
16. Petrovic N, Schacke W, Gahagan JR, O’Conor CA, Winnicka B, Conway RE, et al.: CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodia formation. *Blood* 2007 Jul 1;110:142–150.
17. Fujii H, Nakajima M, Saiki I, Yoneda J, Azuma I, Tsuruo T: Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidase N/CD13. *Clin Exp Metastasis* 1995 Sep;13:337–344.
18. Kehlen A, Lendeckel U, Dralle H, Langner J, Hoang-Vu C: Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Res* 2003 Dec 1;63:8500–8506.
19. Bauvois B, Dauzonne D: Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev* 2006 Jan;26:88–130.
20. Ranogajec I, Jakić-Razumović J, Puzović V, Gabrilovac J: Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and aminopeptidase N/CD13 in breast cancer patients. *Med Oncol* 2012 Jun;29:561–569.
21. Harbut MB, Velmourougane G, Reiss G, Chandramohanadas R, Greenbaum DC: Development of bestatin-based activity-based probes for metallo-aminopeptidases. *Bioorg Med Chem Lett* 2008 Nov 15;18:5932–5936.
22. Krige D, Needham LA, Bawden LJ, Flores N, Farmer H, Miles LEC, et al.: CHR-2797: an antiproliferative aminopeptidase inhibitor that leads to amino acid deprivation in human leukemic cells. *Cancer Res* 2008 Aug 15;68:6669–6679.
23. Liu Y, Shang L, Fang H, Zhu H, Mu J, Wang Q, et al.: Design, synthesis, and preliminary studies of the activity of novel derivatives of N-cinnamoyl-L-aspartic acid as inhibitors of aminopeptidase N/CD13. *Bioorg Med Chem* 2009 Oct 15;17:7398–7404.
24. Mucha A, Drag M, Dalton JP, Kafarski P: Metallo-aminopeptidase inhibitors. *Biochimie* 2010 Nov;92:1509–1529.
25. Albrecht S, Al-Lakkis-Wehbe M, Orsini A, Defoin A, Pale P, Salomon E, et al.: Amino-benzosuberone: a novel warhead for selective inhibition of human aminopeptidase-N/CD13. *Bioorg Med Chem* 2011 Feb 15;19:1434–1449.
26. Maieranu C, Schmitt C, Schifano-Faux N, Le Nouën D, Defoin A, Tarnus C: A novel amino-benzosuberone derivative is a picomolar inhibitor of mammalian aminopeptidase N/CD13. *Bioorg Med Chem* 2011 Sep 15;19:5716–5733.
27. Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH: CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 2001 Feb 1;97:652–659.

28. Saitoh Y, Koizumi K, Minami T, Sekine K, Sakurai H, Saiki I: A derivative of aminopeptidase inhibitor (BE15) has a dual inhibitory effect of invasion and motility on tumor and endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 2006 Apr;29:709–712.
29. Chang Y-W, Chen S-C, Cheng E-C, Ko Y-P, Lin Y-C, Kao Y-R, et al.: CD13 (aminopeptidase N) can associate with tumor-associated antigen L6 and enhance the motility of human lung cancer cells. *Int J Cancer* 2005 Aug 20;116:243–252.
30. Lai A, Ghaffari A, Ghahary A: Inhibitory effect of anti-aminopeptidase N/CD13 antibodies on fibroblast migration. *Mol Cell Biochem* 2010 Oct;343:191–199.
31. Reid AHM, Protheroe A, Attard G, Hayward N, Vidal L, Spicer J, et al.: A first-in-man phase I and pharmacokinetic study on CHR-2797 (Tosedostat), an inhibitor of M1 aminopeptidases, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2009 Aug 1;15:4978–4985.
32. Cortes JE, Feldman EJ, Yee KE et al.: ASCO Meeting. Chicago. *J Clin Oncol* 2010 suppl; abstr TPS277.
33. Tonra JR, Hicklin DJ: Targeting the vascular endothelial growth factor pathway in the treatment of human malignancy. *Immunol Invest* 2007;36:3–23.
34. Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB: Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg* 1995 Dec;222:695–699.
35. Liao D, Johnson RS: Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007 Jun;26:281–290.
36. Semenza GL: Regulation of vascularization by hypoxia-inducible factor 1. *Ann N Y Acad Sci* 2009 Oct;1177:2–8.
37. Semenza GL: Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010 Feb 4;29:625–634.
38. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, et al.: Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 2002 Oct;22:7004–7014.
39. Huo Y, Iadevaia V, Proud CG: Differing effects of rapamycin and mTOR kinase inhibitors on protein synthesis. *Biochem Soc Trans* 2011 Apr;39:446–450.
40. Stockwin LH, Blonder J, Bumke MA, Lucas DA, Chan KC, Conrads TP, et al.: Proteomic analysis of plasma membrane from hypoxia-adapted malignant melanoma. *J Proteome Res* 2006 Nov;5:2996–3007.
41. Pencreach E, Guérin E, Nicolet C, Lelong-Rebel I, Voegeli A-C, Oudet P, et al.: Marked activity of irinotecan and rapamycin combination toward colon cancer cells in vivo and in vitro is mediated through cooperative modulation of the mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1 α axis. *Clin Cancer Res* 2009 Feb 15;15:1297–1307.

42. Segel IH: Enzyme Kinetics, John Wiley & Son: New-York, 1993.
43. Guenot D, Guérin E, Aguilon-Romain S, Pencreach E, Schneider A, Neuville A, et al.: Primary tumour genetic alterations and intra-tumoral heterogeneity are maintained in xenografts of human colon cancers showing chromosome instability. J Pathol 2006 Apr;208:643–652.
44. Weidner N: Chapter 14. Measuring intratumoral microvessel density. Meth Enzymol 2008;444:305–323.

Table 1. Ki values and Ligand Efficiency (LE) for selected benzo-suberone derivatives on human, porcine and murine APNs.

Inhibitor	Porcine APN	Human APN	Mouse APN
I₁ 	Ki= 1±0.5 μM* LE=0.63**	Ki= 2±0.71μM LE=0.61	Ki= 2±1.13μM LE=0.61
I₂ 	Ki= 7±1.5 nM LE=0.60	Ki= 11±2.4nM LE=0.58	Ki= 10±6.2nM LE=0.58
I₃ 	Ki= 0.06±0.02 nM LE=0.72	Ki= 0.35±0.24nM LE=0.66	Ki= 0.2±0.29nM LE=0.67

*Ki values (n=3). ** mean Ligand Efficiency (LE=ΔG/N, ΔG=-RTln Ki ou IC₅₀, Kcal/mol per non-hydrogen atom)

P15145 334-416	PKSDQIALPDFN GAMEN WGLVITYRENALLFDPSISSISNKERVVTVIA HEL AHQWFGNLVTLAWWNDLWLN EG FASSYVEYLG
P15144 339-421	PKSDQIGLPDFN GAMEN WGLVITYRENSLLFDPLSSSSSNKERVVTVIA HEL AHQWFGNLVTIEWWNDLWLN EG FASYVEYLG
P97449 338-420	PKSDQIALPDFN GAMEN WGLVITYRESSLVFDSQSSISNKERVVTVIA HEL AHQWFGNLVTVAWWNDLWLN EG FASYVEYLG

Figure 1. Partial sequence alignment for human, porcine and mouse APN active domains (P15145: Porcine ; P15144: Human; P97449: Mouse). The alignment was produced with the program Jalview: <http://www.jalview.org>.

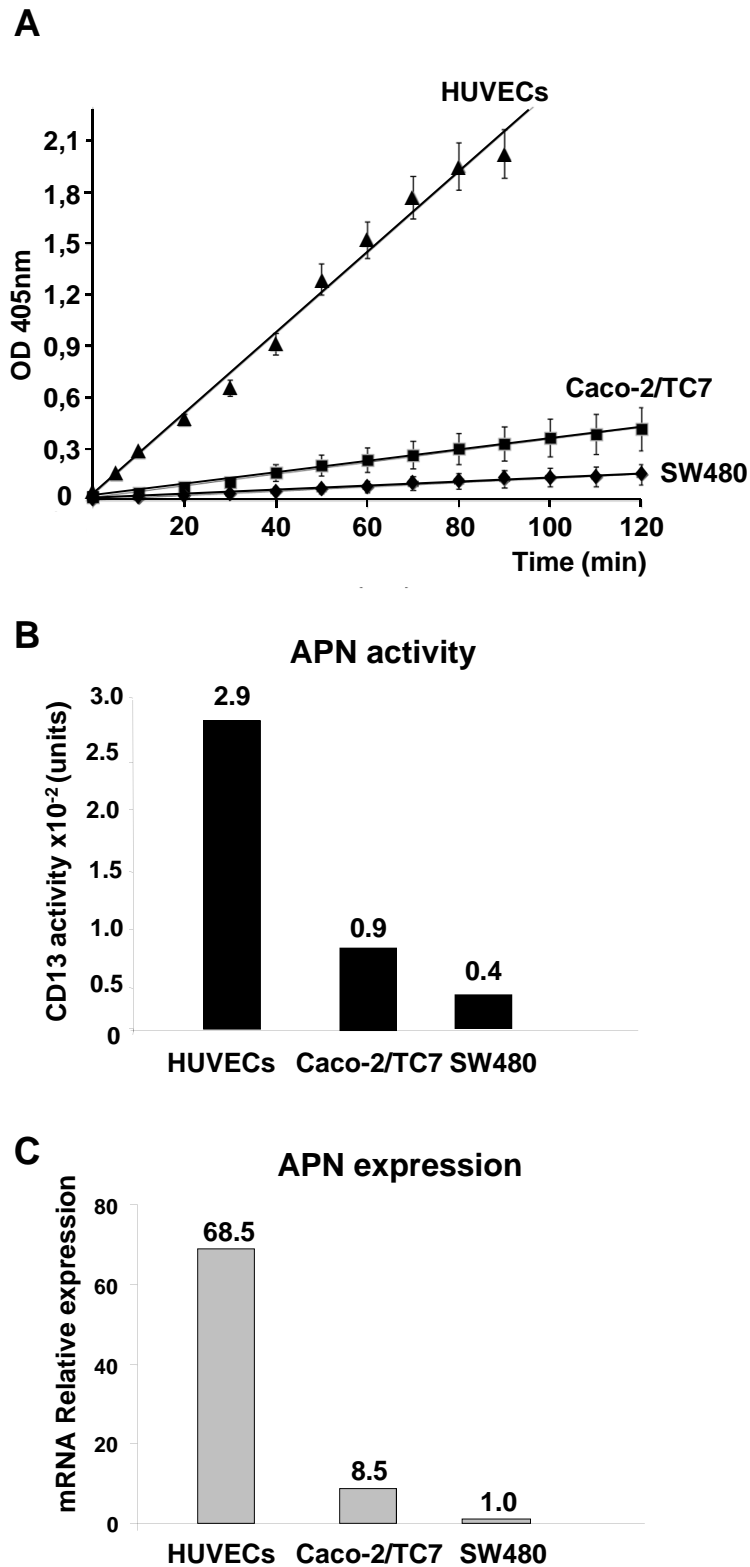


Figure 2. APN activity and expression. (A) Catalytic activity of APN in SW480, Caco-2/TC7 and HUVECs. APN catalytic activity is considered as the fraction of leucine-p-nitroanilide hydrolysis inhibited in presence of 1 μ M of the selective inhibitor I3. **(B)** Quantification of APN activity as enzymes units per 10⁶ cells. **(C)** APN mRNA expression in SW480 and Caco-2/TC7 cell lines.

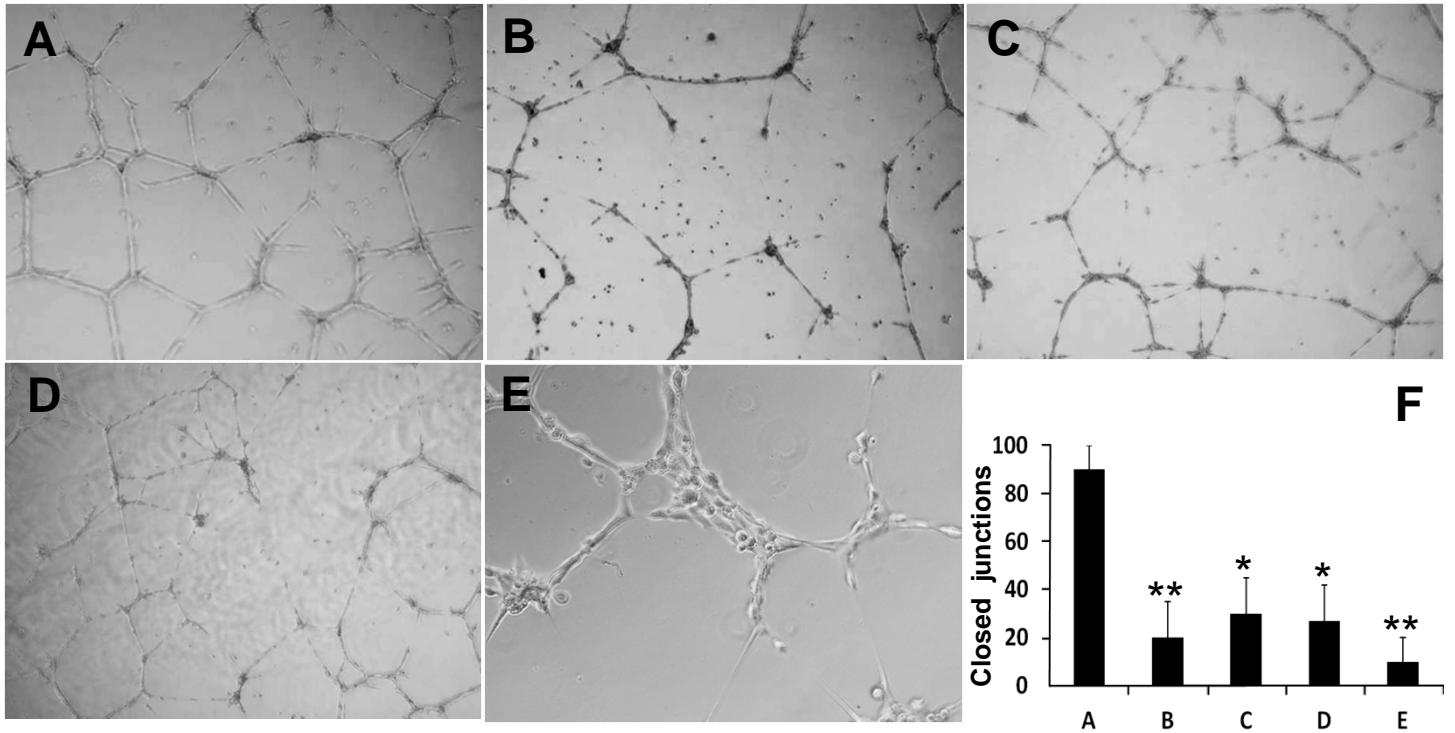


Figure 3. Capillary tube formation by HUVEC cells on Matrigel under normoxia conditions. (A) Control without inhibitor, (B) bestatin at a concentration of 300 μM ($K_i=3.5\mu\text{M}$), (C) I1 inhibitor at concentration of 10 μM ($K_i=6\mu\text{M}$), (D) I2 inhibitor at a concentration of 1 μM ($K_i=56\text{nM}$) and (E) I3 inhibitor at a concentration of 1 μM ($K_i=0.4\text{nM}$). (F) % of closed capillary junctions calculated from pictures A to E. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

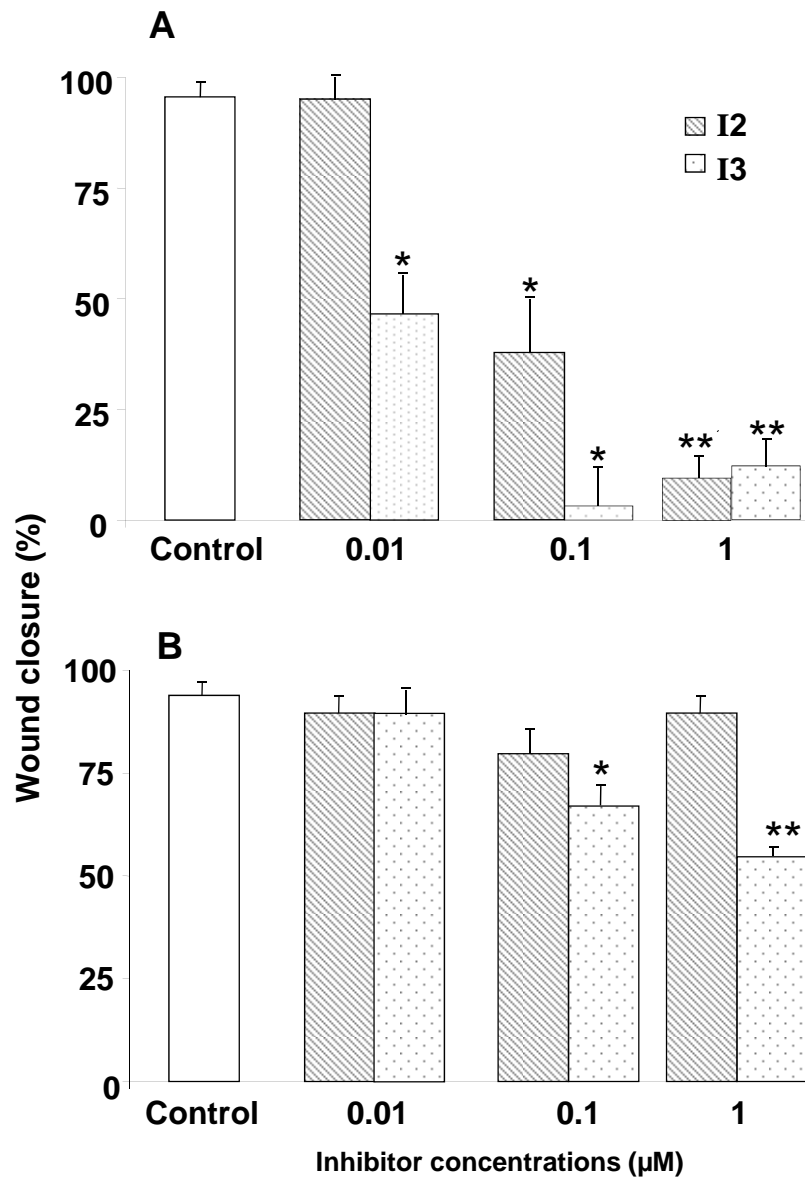


Figure 4. Wound healing closure assay. (A) HUVECs and **(B)** Caco-2/TC7 cells in presence of I2 and I3 inhibitors after 16h incubation. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

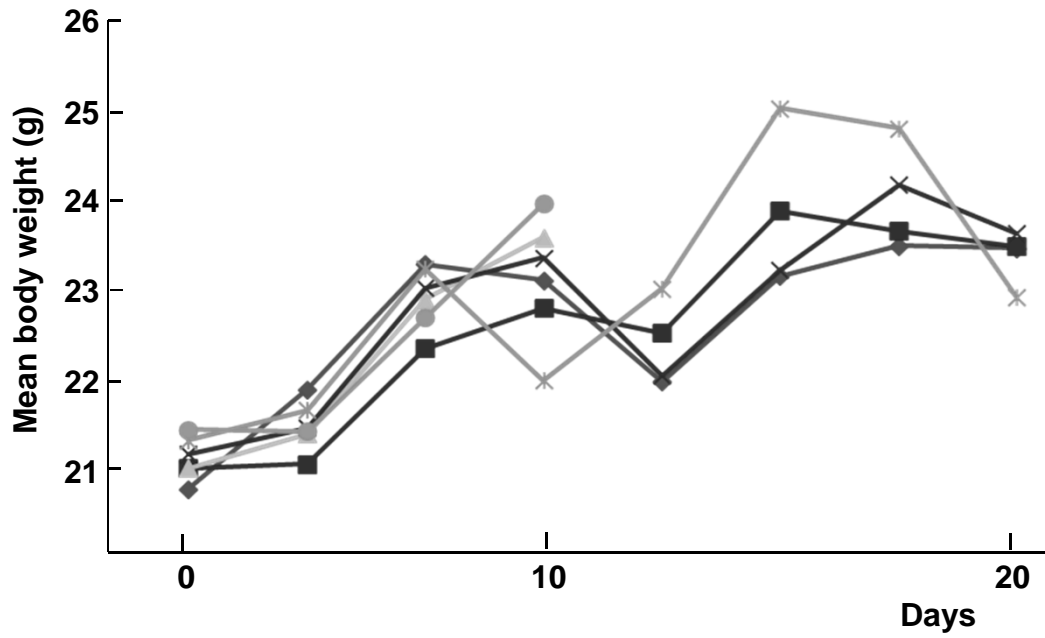


Figure 5. Mean values of body weight monitoring during MTTD determination.
 -◆- I2 40mg/Kg-Q3D8; -■- I2 70mg/Kg-Q3D8, -▲- I2 100mg/Kg-Q3D4.
 -x- I3 40mg/Kg-Q3D8; -* I3 70mg/Kg-Q3D8, -●- I3 100mg/Kg-Q3D4.

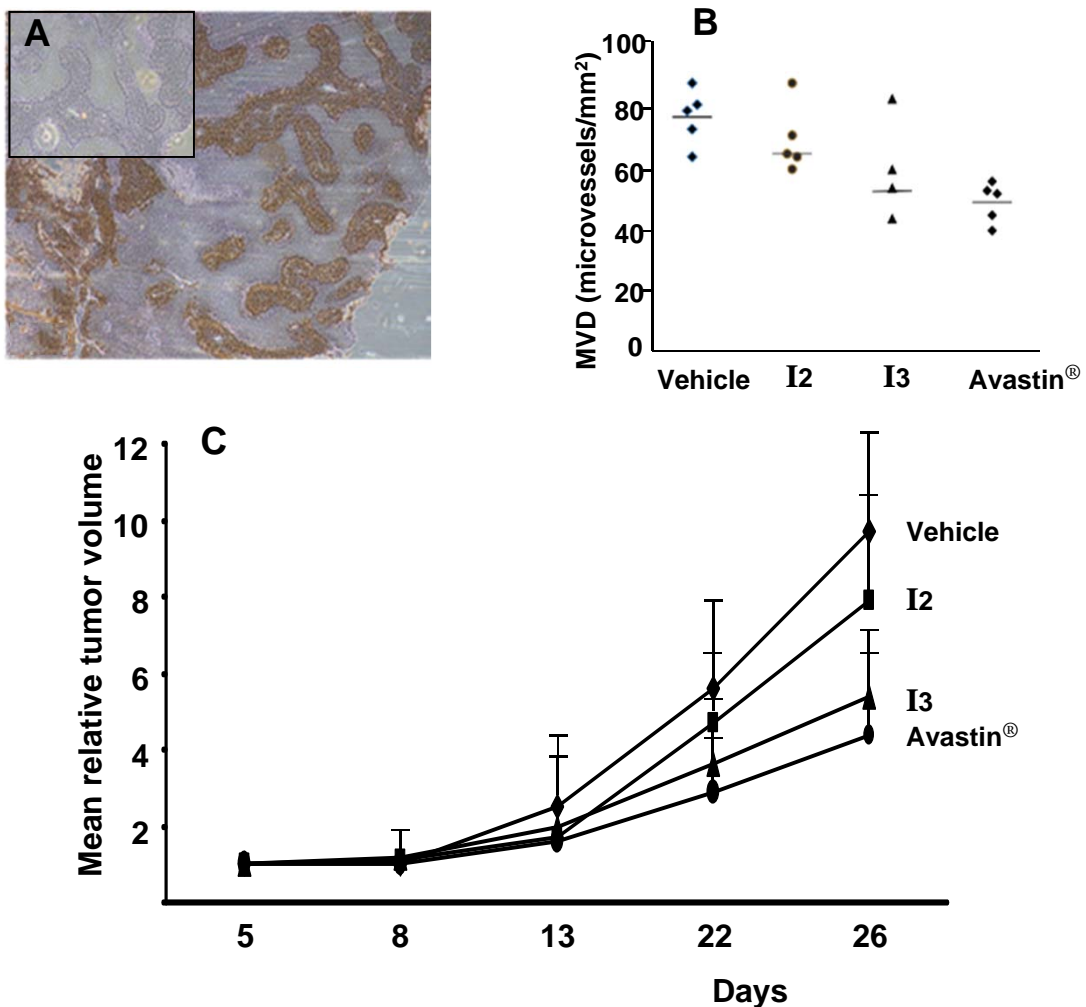


Figure 6. A-673 rhabdomyosarcoma cell line derived-xenografts. (A) Immunohistochemical expression of CD13 (insert: control without the primary anti-APN antibody). Magnification x400. (B) Vascularisation analysis of A-673 tumors at the end of treatment. The density of tumor microvessels was evaluated as already described [44]. The most vascularized areas (5 zones of 0.78 mm² per histological section) were selected and then studied at a x100 magnification (AxioVision software); the vessels counting was made by two different people, in order to get an average value. (C) Treatments effects on the growth of A-673 tumors subcutaneously xenografted in SWISS Nude mice (n=5). Mice were xenografted on D0 by a subcutaneous injection of 10⁷ A-673 tumor cells. On D1, mice received one IP injection of vehicle (◆), I2 at 40 mg/kg/injection (■) or I3 at 30 mg/kg/injection (▲) every three days for a total of 8 injections and one IP injection of Avastin® (●) at 5 mg/kg/injection twice a week for a total of 7 injections.

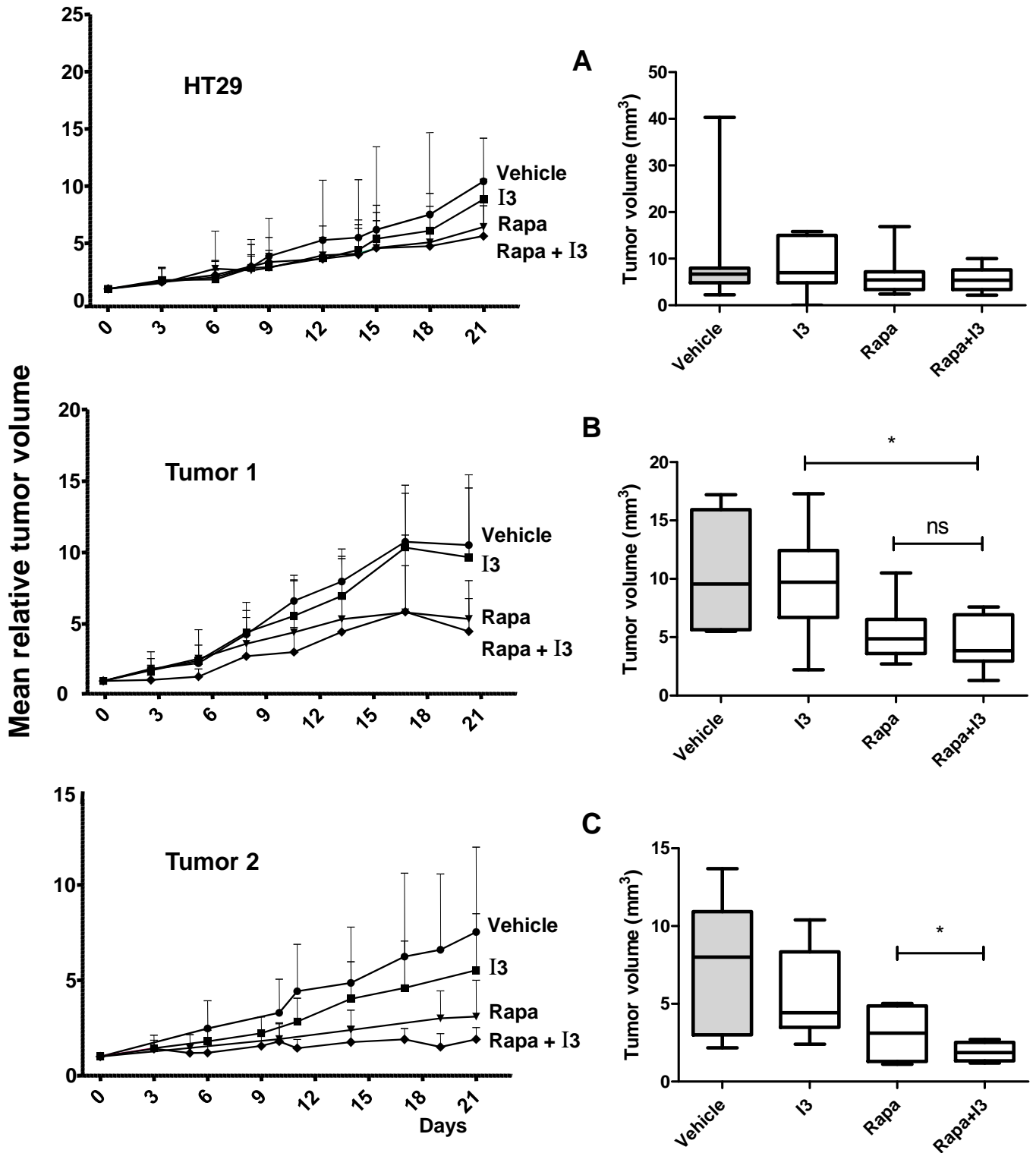


Figure 7. Impact of the I3 inhibitor *in vivo*. Effect of I3 inhibitor (30 mg/kg) with or w/o rapamycin (3.3 mg/kg) on the growth of HT29 cell line (A), colon tumor 1 (B) and 2 (C) xenografted in the nude mouse. * $p < 0.05$.

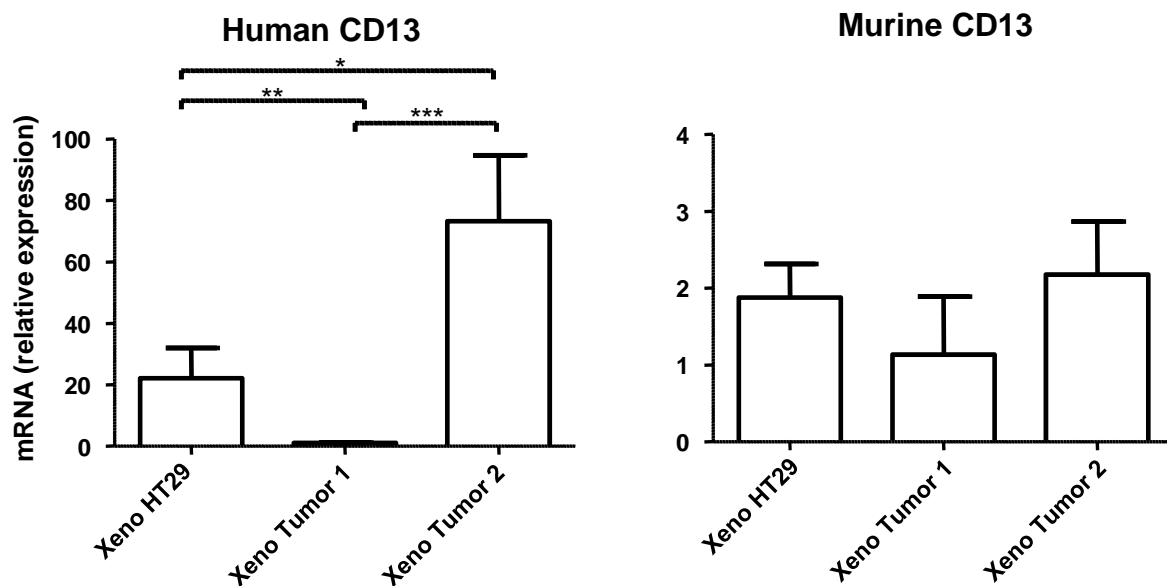


Figure 8. Relative mRNA expression of APN in human cells tumor and stromal murine cells in xenografts. mRNA was quantified with relative quantitative PCR using primers specific for human and murine APN mRNA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

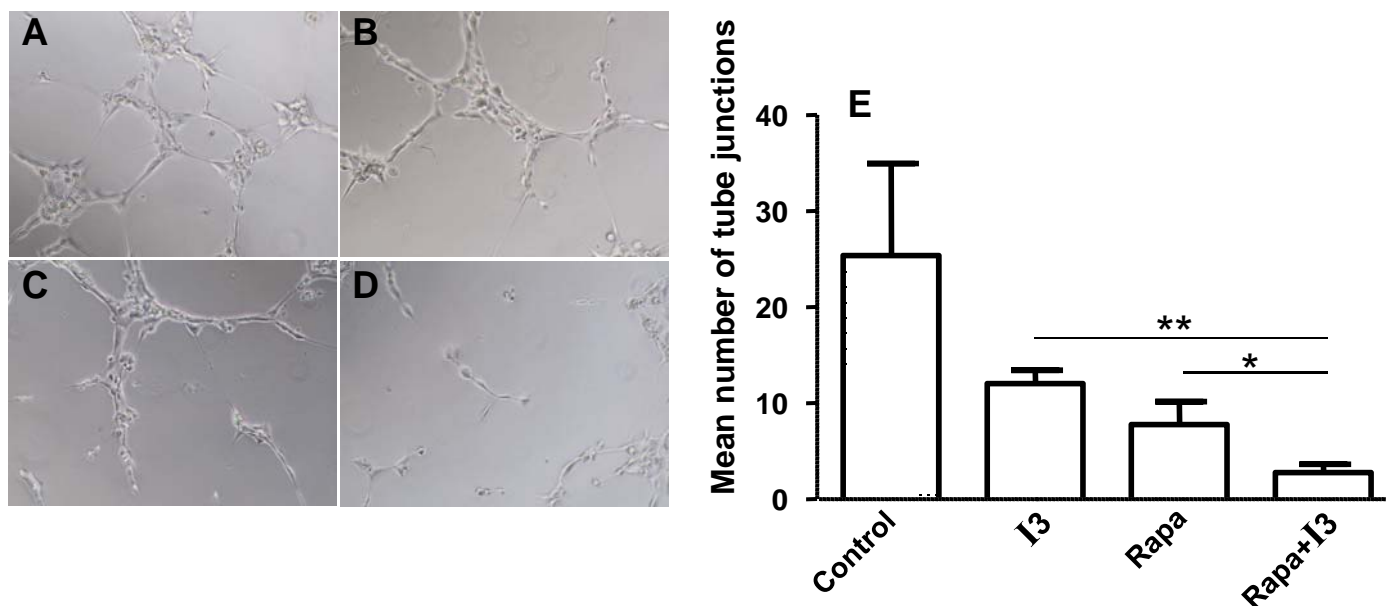


Figure 9. Effect of I3 inhibitor and rapamycin on HUVECs capillary tube formation. (A) Control without inhibitor. (B) I3 at a concentration of $1\mu\text{M}$. (C) Rapamycin at a concentration of 20 nM . (D) Rapamycin at a concentration of 20 nM and I3 at a concentration of $1\mu\text{M}$. (E) Quantification of the number of tube junctions according to the treatment. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

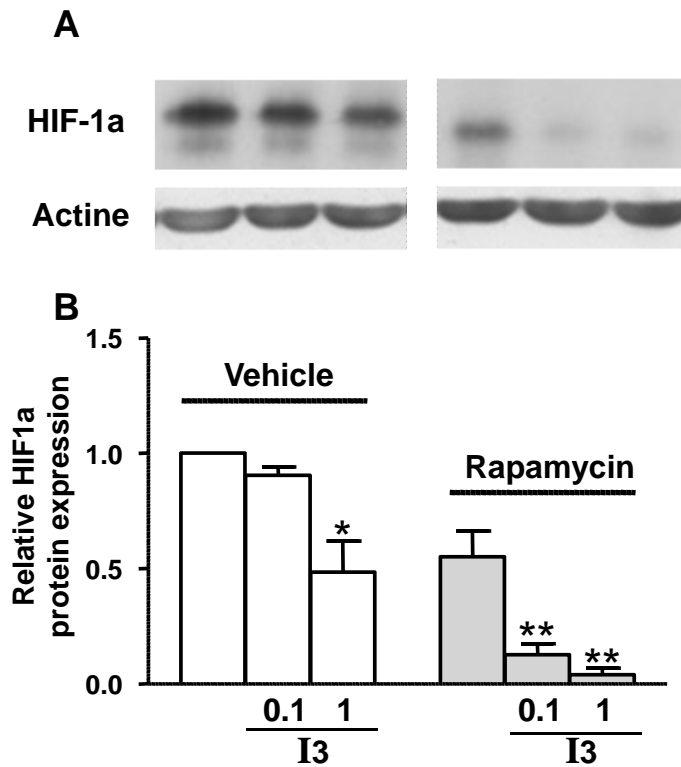


Figure 10. Effects of I3 inhibitor on HIF-1a protein expression in Caco-2/TC7 cells. (A) Western blots for HIF-1a expression. Actine served as a control. (B) Relative changes in the expression of HIF-1a after treatment with I3 inhibitor (0.1 and 1μM), rapamycin (20nM) or combination of I3 inhibitor (0.1 and 1μM) and rapamycin (20nM) for 48h, as compared to vehicle treated cells. * p<0.05; ** p<0.01

CONCLUSION GENERALE ET PERPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Historiquement, les thérapies anti-cancéreuses utilisent des molécules à activité cytotoxique puisque les cellules cancéreuses ont un index de prolifération beaucoup plus rapide que celui des cellules saines. Toutefois, l'activité cytotoxique de ces molécules affecte malgré tout certaines cellules ou tissus sains qui se renouvellent, comme l'épithélium digestif, la moelle osseuse, les kératinocytes ..., et créent des effets secondaires délétères pour la qualité de vie du patient. De plus, des cellules souches cancéreuses, présentes à l'état quiescent au sein de la tumeur, ne sont pas atteintes par ces drogues et sont en partie responsables des rechutes. D'autre part, il existe une importante hétérogénéité inter-tumorale pour un même type de cancer, qui contraint à développer des traitements de type « à la carte » pour chaque patient. De même, l'hétérogénéité intra-tumorale liée à la coexistence au sein d'une même tumeur, de sous-populations cellulaires ayant des altérations génétiques ou épigénétiques différentes ainsi que l'existence d'une résistance primaire, ou secondaire à un traitement, nécessite de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques combinant plusieurs molécules, chacune ayant des propriétés délétères pour une population cellulaire spécifique de par son origine ou son contexte génétique.

Par exemple, depuis plusieurs années, des molécules ciblant le stroma tumoral et notamment la vascularisation tumorale, dont les caractéristiques sont différentes de la vascularisation normale (Duda et al., 2007), ont été développées pour appauvrir la tumeur en nutriments et en oxygène. Dans ce contexte, CD13 est une cible particulièrement intéressante, puisque son expression est restreinte aux cellules endothéliales du réseau vasculaire tumoral néo-formé, et absente des cellules endothéliales normales. L'étude pilote présentée ici a démontré l'activité anti-tumorale de nouveaux inhibiteurs de CD13 sur différentes lignées cellulaires, associée à une diminution de la vascularisation. Par ailleurs, en associant plusieurs molécules qui activent des voies de signalisation convergentes, il sera possible d'élargir leur spectre d'activité et permettra de limiter les résistances primaires ou secondaires au traitement. L'activité de ces inhibiteurs peut également être augmentée en modifiant le mode de délivrance de la drogue à la cellule. En effet, des nouveaux inhibiteurs de CD13 couplés à l'arginine sont en cours de synthèse, pour générer des pro-drogues qui seront activées par la fonction enzymatique du CD13 au niveau des cellules présentes au sein de la tumeur exprimant spécifiquement l'enzyme.

A ce jour, les modèles d'études pré-cliniques développés pour évaluer l'efficacité de drogues sont des modèles de xénogreffes chez des souris immunodéficientes, qui occultent la composante immunitaire de l'hôte, alors que celle-ci représente une composante importante dans le développement et le pronostic des tumeurs (Mlecnik et al., 2011). En effet, dans le CCR en particulier, Galon et al. (2006) ont montré que la densité de cellules immunitaires dans la tumeur est un facteur pronostique de survie globale, et que ce paramètre a une valeur de fiabilité supérieure à celle donnée par les critères histologiques conventionnels pour estimer aussi bien la survie sans événement que la survie globale. Une approche alternative serait de réaliser des tests de drogues chez des animaux immunocompétents chez lesquels la carcinogenèse peut être induite chimiquement par l'*azoxyméthane* (AOM) ou le *Dextran Sodium Sulfate* (DSS) (Bousserouel et al, 2011).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam, R. (2003). Chemotherapy and surgery: new perspectives on the treatment of unresectable liver metastases. *Ann. Oncol.* 14 Suppl 2, ii13–16.
- Allegra, C.J., Yothers, G., O'Connell, M.J., Sharif, S., Petrelli, N.J., Colangelo, L.H., Atkins, J.N., Seay, T.E., Fehrenbacher, L., Goldberg, R.M., et al. (2011). Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J. Clin. Oncol.* 29, 11–16.
- Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D.J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., et al. (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 1626–1634.
- Ananthakrishnan, R., and Ehrlicher, A. (2007). The forces behind cell movement. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 303–317.
- Ando, T., Ishiguro, H., Kimura, M., Mitsui, A., Mori, Y., Sugito, N., Tomoda, K., Mori, R., Harada, K., Katada, T., et al. (2007). The overexpression of caveolin-1 and caveolin-2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 18, 601–609.
- André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., et al. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 2343–2351.
- Aozuka, Y., Koizumi, K., Saitoh, Y., Ueda, Y., Sakurai, H., and Saiki, I. (2004). Anti-tumor angiogenesis effect of aminopeptidase inhibitor bestatin against B16-BL6 melanoma cells orthotopically implanted into syngeneic mice. *Cancer Lett.* 216, 35–42.
- Arnold, J.M., Mok, S.C., Purdie, D., and Chenevix-Trench, G. (2001). Decreased expression of the Id3 gene at 1p36.1 in ovarian adenocarcinomas. *Br. J. Cancer* 84, 352–359.
- Arora, A., and Scholar, E.M. (2005). Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 971–979.
- Ashmun, R.A., Shapiro, L.H., and Look, A.T. (1992). Deletion of the zinc-binding motif of CD13/aminopeptidase N molecules results in loss of epitopes that mediate binding of inhibitory antibodies. *Blood* 79, 3344–3349.
- Asirvatham, A.J., Carey, J.P.W., and Chaudhary, J. (2007). ID1-, ID2-, and ID3-regulated gene expression in E2A positive or negative prostate cancer cells. *Prostate* 67, 1411–1420.
- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W.G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J.C.R., et al. (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* 24, 326–332.
- Bader, B.L., Rayburn, H., Crowley, D., and Hynes, R.O. (1998). Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* 95, 507–519.
- Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A., and Aaronson, S.A. (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* 3, 683–686.
- Bain, G., Cravatt, C.B., Loomans, C., Alberola-Ila, J., Hedrick, S.M., and Murre, C. (2001). Regulation of the helix-loop-helix proteins, E2A and Id3, by the Ras-ERK MAPK cascade. *Nat. Immunol.* 2, 165–171.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003–1007.
- Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M.A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151–3161.

- Baudino, T.A., Maclean, K.H., Brennan, J., Parganas, E., Yang, C., Aslanian, A., Lees, J.A., Sherr, C.J., Rousset, M.F., and Cleveland, J.L. (2003). Myc-mediated proliferation and lymphomagenesis, but not apoptosis, are compromised by E2f1 loss. *Mol. Cell* 11, 905–914.
- Bauvois, B., and Dauzonne, D. (2006). Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev* 26, 88–130.
- Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L., and Weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61, 49–59.
- Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8, 592–603.
- Bhagwat, S.V., Lahdenranta, J., Giordano, R., Arap, W., Pasqualini, R., and Shapiro, L.H. (2001). CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97, 652–659.
- Bhat-Nakshatri, P., Wang, G., Collins, N.R., Thomson, M.J., Geistlinger, T.R., Carroll, J.S., Brown, M., Hammond, S., Srour, E.F., Liu, Y., et al. (2009). Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 37, 4850–4861.
- Bièche, I., Khodja, A., and Lidereau, R. (1999). Deletion mapping of chromosomal region 1p32-pter in primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 24, 255–263.
- Bilchik, A.J., Hoon, D.S.B., Saha, S., Turner, R.R., Wiese, D., DiNome, M., Koyanagi, K., McCarter, M., Shen, P., Iddings, D., et al. (2007). Prognostic impact of micrometastases in colon cancer: interim results of a prospective multicenter trial. *Ann. Surg.* 246, 568–575; discussion 575–577.
- Birkenkamp-Demtroder, K., Christensen, L.L., Olesen, S.H., Frederiksen, C.M., Laiho, P., Aaltonen, L.A., Laurberg, S., Sørensen, F.B., Hagemann, R., and ØRntoft, T.F. (2002). Gene expression in colorectal cancer. *Cancer Res.* 62, 4352–4363.
- Biyashev, D., and Qin, G. (2011). E2F and microRNA regulation of angiogenesis. *Am J Cardiovasc Dis* 1, 110–118.
- De Bock, K., Cauwenberghs, S., and Carmeliet, P. (2011). Vessel abnormalization: another hallmark of cancer? Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 73–79.
- Boland, C.R., Thibodeau, S.N., Hamilton, S.R., Sidransky, D., Eshleman, J.R., Burt, R.W., Meltzer, S.J., Rodriguez-Bigas, M.A., Fodde, R., Ranzani, G.N., et al. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58, 5248–5257.
- Bousserouel, S., Gosse, F., Bouhadjar, M., Soler, L., Marescaux, J., and Raul, F. (2010). Long-term administration of aspirin inhibits tumour formation and triggers anti-neoplastic molecular changes in a pre-clinical model of colon carcinogenesis. *Oncol. Rep.* 23, 511–517.
- Bouvier, A.M. (13/01/2009). Épidémiologie descriptive du cancer colorectal en France. Numéro thématique - Dépistage organisé du cancer colorectal en France. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire [Bull Epidemiol Hebd]*, N°2-3
- Brabletz, T., Jung, A., Hermann, K., Günther, K., Hohenberger, W., and Kirchner, T. (1998). Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol. Res. Pract.* 194, 701–704.
- Bronner, C.E., Baker, S.M., Morrison, P.T., Warren, G., Smith, L.G., Lescoe, M.K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., and Lindblom, A. (1994). Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368, 258–261.
- Bufl, J.A. (1990). Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann. Intern. Med.* 113, 779–788.

- Burris, H., 3rd, and Rocha-Lima, C. (2008). New therapeutic directions for advanced pancreatic cancer: targeting the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor pathways. *Oncologist* 13, 289–298.
- Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G.J., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392, 300–303.
- Cao, Y., Tan, A., Gao, F., Liu, L., Liao, C., and Mo, Z. (2009). A meta-analysis of randomized controlled trials comparing chemotherapy plus bevacizumab with chemotherapy alone in metastatic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 24, 677–685.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.
- Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G., and Hanahan, D. (2005). Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8, 299–309.
- Chansel, D., Czekalski, S., Vandermeersch, S., Ruffet, E., Fournié-Zaluski, M.C., and Ardaillou, R. (1998). Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 275, F535–542.
- Chen, H.-Z., Tsai, S.-Y., and Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat. Rev. Cancer* 9, 785–797.
- Chittenden, T.W., Howe, E.A., Culhane, A.C., Sultana, R., Taylor, J.M., Holmes, C., and Quackenbush, J. (2008). Functional classification analysis of somatically mutated genes in human breast and colorectal cancers. *Genomics* 91, 508–511.
- Chong, J.-L., Tsai, S.-Y., Sharma, N., Opavsky, R., Price, R., Wu, L., Fernandez, S.A., and Leone, G. (2009). E2f3a and E2f3b contribute to the control of cell proliferation and mouse development. *Mol. Cell Biol.* 29, 414–424.
- Choti, M.A., Sitzmann, J.V., Tiburi, M.F., Sumetchotimetha, W., Rangsri, R., Schulick, R.D., Lillemoe, K.D., Yeo, C.J., and Cameron, J.L. (2002). Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann. Surg.* 235, 759–766.
- Christofori, G. (2006). New signals from the invasive front. *Nature* 441, 444–450.
- Claude, P. (1978). Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J. Membr. Biol.* 39, 219–232.
- Claude, P., and Goodenough, D.A. (1973). Fracture faces of zonulae occludentes from “tight” and “leaky” epithelia. *J. Cell Biol.* 58, 390–400.
- Cliffe, A., Hamada, F., and Bienz, M. (2003). A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Curr. Biol.* 13, 960–966.
- Cole, M.D., and Cowling, V.H. (2009). Specific regulation of mRNA cap methylation by the c-Myc and E2F1 transcription factors. *Oncogene* 28, 1169–1175.
- Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschuere, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., and van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell* 7, 1267–1278.
- Coppé, J.-P., Smith, A.P., and Desprez, P.-Y. (2003). Id proteins in epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 285, 131–145.
- Creemers, G.J., Lund, B., and Verweij, J. (1994). Topoisomerase I inhibitors: topotecan and irinotecan. *Cancer Treat. Rev.* 20, 73–96.
- Cress, R.D., Morris, C., Ellison, G.L., and Goodman, M.T. (2006). Secular changes in colorectal cancer incidence by subsite, stage at diagnosis, and race/ethnicity, 1992–2001. *Cancer* 107, 1142–1152.

- Cunningham, D., Pyrhönen, S., James, R.D., Punt, C.J., Hickish, T.F., Heikkila, R., Johannesen, T.B., Starkhammar, H., Topham, C.A., Awad, L., et al. (1998a). Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 352, 1413–1418.
- Cunningham, J.M., Christensen, E.R., Tester, D.J., Kim, C.Y., Roche, P.C., Burgart, L.J., and Thibodeau, S.N. (1998b). Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 58, 3455–3460.
- Curnis, F., Arrigoni, G., Sacchi, A., Fischetti, L., Arap, W., Pasqualini, R., and Corti, A. (2002). Differential Binding of Drugs Containing the NGR Motif to CD13 Isoforms in Tumor Vessels, Epithelia, and Myeloid Cells. *Cancer Research* 62, 867–874.
- Van Cutsem, E., Köhne, C.-H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C.-R., Makhson, A., D'Haens, G., Pintér, T., Lim, R., Bodoky, G., et al. (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 360, 1408–1417.
- Van Cutsem, E., and Oliveira, J. (2009). Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 20 Suppl 4, 61–63.
- Van Cutsem, E., Peeters, M., Siena, S., Humblet, Y., Hendlisz, A., Neyns, B., Canon, J.-L., Van Laethem, J.-L., Maurel, J., Richardson, G., et al. (2007). Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 25, 1658–1664.
- Danziger, R.S. (2008). Aminopeptidase N in arterial hypertension. *Heart Fail Rev* 13, 293–298.
- Deakin, N.O., and Turner, C.E. (2008). Paxillin comes of age. *J. Cell. Sci.* 121, 2435–2444.
- Deed, R.W., Hara, E., Atherton, G.T., Peters, G., and Norton, J.D. (1997). Regulation of Id3 cell cycle function by Cdk-2-dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6815–6821.
- DeGregori, J. (2002). The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim. Biophys. Acta* 1602, 131–150.
- DeGregori, J., and Johnson, D.G. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr. Mol. Med* 6, 739–748.
- Deleu, S., Savonet, V., Behrends, J., Dumont, J.E., and Maenhaut, C. (2002). Study of gene expression in thyrotropin-stimulated thyroid cells by cDNA expression array: ID3 transcription modulating factor as an early response protein and tumor marker in thyroid carcinomas. *Exp. Cell Res.* 279, 62–70.
- Deng, G., Bell, I., Crawley, S., Gum, J., Terdiman, J.P., Allen, B.A., Truta, B., Sleisenger, M.H., and Kim, Y.S. (2004). BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 191–195.
- Devault, A., Sales, V., Nault, C., Beaumont, A., Roques, B., Crine, P., and Boileau, G. (1988). Exploration of the catalytic site of endopeptidase 24.11 by site-directed mutagenesis. Histidine residues 583 and 587 are essential for catalysis. *FEBS Lett.* 231, 54–58.
- Dhawan, P., Singh, A.B., Deane, N.G., No, Y., Shiou, S.-R., Schmidt, C., Neff, J., Washington, M.K., and Beauchamp, R.D. (2005). Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 115, 1765–1776.
- Diamond, J.M. (1978). Channels in epithelial cell membranes and junctions. *Fed. Proc.* 37, 2639–2643.
- Diep, C.B., Kleivi, K., Ribeiro, F.R., Teixeira, M.R., Lindgjaerde, O.C., and Lothe, R.A. (2006). The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta-analysis of copy number changes. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 31–41.

- Dong, Q., Meng, P., Wang, T., Qin, W., Qin, W., Wang, F., Yuan, J., Chen, Z., Yang, A., and Wang, H. (2010). MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells in vitro and in vivo by targeting E2F2 and CCND2. *PLoS ONE* 5, e10147.
- Duda, D.G., Batchelor, T.T., Willett, C.G., and Jain, R.K. (2007). VEGF-targeted cancer therapy strategies: current progress, hurdles and future prospects. *Trends Mol Med* 13, 223–230.
- Duffaud, F., and Therasse, P. (2000). [New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors]. *Bull Cancer* 87, 881–886.
- Duguay, D., Foty, R.A., and Steinberg, M.S. (2003). Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Dev. Biol.* 253, 309–323.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12, 2245–2262.
- Ebos, J.M.L., and Kerbel, R.S. (2011). Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 210–221.
- Edwards, M.S., Chadda, S.D., Zhao, Z., Barber, B.L., and Sykes, D.P. (2012). A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer. *Colorectal Dis* 14, e31–47.
- Elliott, M.J., Dong, Y.B., Yang, H., and McMasters, K.M. (2001). E2F-1 up-regulates c-Myc and p14(ARF) and induces apoptosis in colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 7, 3590–3597.
- Ellis, L.M., and Hicklin, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat. Rev. Cancer* 8, 579–591.
- Emmrich, S., and Pützer, B.M. (2010). Checks and balances: E2F-microRNA crosstalk in cancer control. *Cell Cycle* 9, 2555–2567.
- Endo, Y., Wolf, V., Muraiso, K., Kamijo, K., Soon, L., Uren, A., Barshishat-Küpper, M., and Rubin, J.S. (2005). Wnt-3a-dependent cell motility involves RhoA activation and is specifically regulated by dishevelled-2. *J. Biol. Chem.* 280, 777–786.
- Endo-Munoz, L., Dahler, A., Teakle, N., Rickwood, D., Hazar-Rethinam, M., Abdul-Jabbar, I., Sommerville, S., Dickinson, I., Kaur, P., Paquet-Fifield, S., et al. (2009). E2F7 can regulate proliferation, differentiation, and apoptotic responses in human keratinocytes: implications for cutaneous squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res.* 69, 1800–1808.
- Faivre, J., Dancourt, V., Lejeune, C., Tazi, M.A., Lamour, J., Gerard, D., Dassonville, F., and Bonithon-Kopp, C. (2004). Reduction in colorectal cancer mortality by fecal occult blood screening in a French controlled study. *Gastroenterology* 126, 1674–1680.
- Faivre J. (13/01/2009). Le dépistage organisé du cancer colorectal en France et en Europe : historique et état des lieux. Numéro thématique. Dépistage organisé du cancer colorectal en France. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire [Bull Epidemiol Hebd]*, N°2-3
- Favaloro, E.J. (1991). CD-13 ('gp150'; aminopeptidase-N): co-expression on endothelial and haemopoietic cells with conservation of functional activity. *Immunol. Cell Biol.* 69 (Pt 4), 253–260.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.
- Ferracin, M., Gafà, R., Miotto, E., Veronese, A., Pultrone, C., Sabbioni, S., Lanza, G., and Negrini, M. (2008). The methylator phenotype in microsatellite stable colorectal cancers is characterized by a distinct gene expression profile. *J. Pathol.* 214, 594–602.
- Fischer, C., Mazzone, M., Jonckx, B., and Carmeliet, P. (2008). FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat. Rev. Cancer* 8, 942–956.
- Fischer von Weikersthal, L., Schalhorn, A., Stauch, M., Quietzsch, D., Maubach, P.A., Lambertz, H., Oruzio, D., Schlag, R., Weigang-Köhler, K., Vehling-Kaiser, U., et al. (2011). Phase III trial of irinotecan plus

infusional 5-fluorouracil/folinic acid versus irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment of advanced colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 47, 206–214.

Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M., and Kolodner, R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 1027–1038.

van der Flier, A., and Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305, 285–298.

van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260.

Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J.H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R.H., et al. (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat. Cell Biol.* 3, 433–438.

Folkman, J., and Hanahan, D. (1991). Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Int. Symp. Princess Takamatsu Cancer Res. Fund* 22, 339–347.

Folprecht, G., Grothey, A., Alberts, S., Raab, H.-R., and Köhne, C.-H. (2005). Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. *Ann. Oncol.* 16, 1311–1319.

Fong, Y., Cohen, A.M., Fortner, J.G., Enker, W.E., Turnbull, A.D., Coit, D.G., Marrero, A.M., Prasad, M., Blumgart, L.H., and Brennan, M.F. (1997). Liver resection for colorectal metastases. *J. Clin. Oncol.* 15, 938–946.

Fontijn, D., Duyndam, M.C.A., van Berkel, M.P.A., Yuana, Y., Shapiro, L.H., Pinedo, H.M., Broxterman, H.J., and Boven, E. (2006). CD13/Aminopeptidase N overexpression by basic fibroblast growth factor mediates enhanced invasiveness of 1F6 human melanoma cells. *Br. J. Cancer* 94, 1627–1636.

Forrest, S.T., Barringhaus, K.G., Perlegas, D., Hammarskjöld, M.-L., and McNamara, C.A. (2004). Intron retention generates a novel Id3 isoform that inhibits vascular lesion formation. *J. Biol. Chem.* 279, 32897–32903.

Fortin, J.-P., Gera, L., Bouthillier, J., Stewart, J.M., Adam, A., and Marceau, F. (2005). Endogenous aminopeptidase N decreases the potency of peptide agonists and antagonists of the kinin B1 receptors in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 1169–1176.

Frixen, U.H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Löchner, D., and Birchmeier, W. (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 113, 173–185.

Fuchs, E. (2009). The tortoise and the hair: slow-cycling cells in the stem cell race. *Cell* 137, 811–819.

Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H.E.M., Behrens, J., Sommer, T., and Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 222–231.

Furuse, M., and Tsukita, S. (2006). Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* 16, 181–188.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960–1964.

Gee, N.S., and Kenny, A.J. (1985). Proteins of the kidney microvillar membrane. The 130 kDa protein in pig kidney, recognized by monoclonal antibody GK5C1, is an ectoenzyme with aminopeptidase activity. *Biochem. J.* 230, 753–764.

- Gerbe, F., van Es, J.H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N.F., Bourgaux, J.-F., Pignodel, C., et al. (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* 192, 767–780.
- Gerdes, H., Chen, Q., Elahi, A.H., Sircar, A., Goldberg, E., Winawer, D., Urmacher, C., Winawer, S.J., and Jhanwar, S.C. (1995). Recurrent deletions involving chromosomes 1, 5, 17, and 18 in colorectal carcinoma: possible role in biological and clinical behavior of tumors. *Anticancer Res.* 15, 13–24.
- Giaccia, A.J., Simon, M.C., and Johnson, R. (2004). The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev.* 18, 2183–2194.
- Giantonio, B.J., Catalano, P.J., Meropol, N.J., O'Dwyer, P.J., Mitchell, E.P., Alberts, S.R., Schwartz, M.A., and Benson, A.B., 3rd (2007). Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J. Clin. Oncol.* 25, 1539–1544.
- Glaser-Gabay, L., Raiter, A., Battler, A., and Hardy, B. (2011). Endothelial cell surface vimentin binding peptide induces angiogenesis under hypoxic/ischemic conditions. *Microvasc. Res.* 82, 221–226.
- Goel, A., Arnold, C.N., Niedzwiecki, D., Carethers, J.M., Dowell, J.M., Wasserman, L., Compton, C., Mayer, R.J., Bertagnolli, M.M., and Boland, C.R. (2004). Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res.* 64, 3014–3021.
- Goetz, J.G., Minguet, S., Navarro-Lérida, I., Lazcano, J.J., Samaniego, R., Calvo, E., Tello, M., Osteso-Ibáñez, T., Pellinen, T., Echarri, A., et al. (2011). Biomechanical Remodeling of the Microenvironment by Stromal Caveolin-1 Favors Tumor Invasion and Metastasis. *Cell* 146, 148–163.
- Grady, W.M. (2004). Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 23, 11–27.
- Grady, W.M., Myeroff, L.L., Swinler, S.E., Rajput, A., Thiagalingam, S., Lutterbaugh, J.D., Neumann, A., Brattain, M.G., Chang, J., Kim, S.J., et al. (1999). Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* 59, 320–324.
- Grady, W.M., Rajput, A., Myeroff, L., Liu, D.F., Kwon, K., Willis, J., and Markowitz, S. (1998). Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res.* 58, 3101–3104.
- de Gramont, A., Bosset, J.F., Milan, C., Rougier, P., Bouché, O., Etienne, P.L., Morvan, F., Louvet, C., Guillot, T., François, E., et al. (1997a). Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J. Clin. Oncol.* 15, 808–815.
- de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., et al. (2000). Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 18, 2938–2947.
- de Gramont, A., Vignoud, J., Tournigand, C., Louvet, C., André, T., Varette, C., Raymond, E., Moreau, S., Le Bail, N., and Krulik, M. (1997b). Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hour continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 33, 214–219.
- Grande-García, A., Echarri, A., de Rooij, J., Alderson, N.B., Waterman-Storer, C.M., Valdivielso, J.M., and del Pozo, M.A. (2007). Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol* 177, 683–694.
- Grünert, S., Jechlinger, M., and Beug, H. (2003). Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 657–665.
- Gumbiner, B.M. (1993). Breaking through the tight junction barrier. *J. Cell Biol.* 123, 1631–1633.
- Half, E., Bercovich, D., and Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis* 4, 22.

- Hall, P.A., Coates, P.J., Ansari, B., and Hopwood, D. (1994). Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J. Cell. Sci.* *107* (Pt 12), 3569–3577.
- Haller, D.G., Tabernero, J., Maroun, J., de Braud, F., Price, T., Van Cutsem, E., Hill, M., Gilberg, F., Rittweger, K., and Schmoll, H.-J. (2011). Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J. Clin. Oncol.* *29*, 1465–1471.
- Haraguchi, N., Ishii, H., Mimori, K., Tanaka, F., Ohkuma, M., Kim, H.M., Akita, H., Takiuchi, D., Hatano, H., Nagano, H., et al. (2010). CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J. Clin. Invest.* *120*, 3326–3339.
- Hartwell, K.A., Muir, B., Reinhardt, F., Carpenter, A.E., Sgroi, D.C., and Weinberg, R.A. (2006). The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 18969–18974.
- Hendriks, Y.M.C., Wagner, A., Morreau, H., Menko, F., Stormorken, A., Quehenberger, F., Sandkuijl, L., Møller, P., Genuardi, M., Van Houwelingen, H., et al. (2004). Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance. *Gastroenterology* *127*, 17–25.
- Henley, S.A., and Dick, F.A. (2012). The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Div* *7*, 10.
- van Hensbergen, Y., Broxterman, H.J., Hanemaaijer, R., Jorna, A.S., van Lent, N.A., Verheul, H.M.W., Pinedo, H.M., and Hoekman, K. (2002). Soluble aminopeptidase N/CD13 in malignant and nonmalignant effusions and intratumoral fluid. *Clin. Cancer Res.* *8*, 3747–3754.
- Herbert, S.P., and Stainier, D.Y.R. (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 551–564.
- Hermesen, M., Postma, C., Baak, J., Weiss, M., Rapallo, A., Sciutto, A., Roemen, G., Arends, J.-W., Williams, R., Giaretti, W., et al. (2002). Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* *123*, 1109–1119.
- Hibi, K., Goto, T., Kitamura, Y.-H., Yokomizo, K., Sakuraba, K., Shirahata, A., Mizukami, H., Saito, M., Ishibashi, K., Kigawa, G., et al. (2010). Methylation of TFPI2 gene is frequently detected in advanced well-differentiated colorectal cancer. *Anticancer Res.* *30*, 1205–1207.
- Höglund, M., Gisselsson, D., Mandahl, N., Johansson, B., Mertens, F., Mitelman, F., and Säll, T. (2001). Multivariate analyses of genomic imbalances in solid tumors reveal distinct and converging pathways of karyotypic evolution. *Genes Chromosomes Cancer* *31*, 156–171.
- Hooper, N.M. (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* *354*, 1–6.
- Hopkins, A.M., Walsh, S.V., Verkade, P., Boquet, P., and Nusrat, A. (2003). Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *J. Cell. Sci.* *116*, 725–742.
- Huang, D., and Du, X. (2008). Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. *World J. Gastroenterol.* *14*, 1823–1827.
- Huang, J., Papadopoulos, N., McKinley, A.J., Farrington, S.M., Curtis, L.J., Wyllie, A.H., Zheng, S., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Morin, P., et al. (1996). APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 9049–9054.
- Hughes, K.S., Simon, R., Songhorabodi, S., Adson, M.A., Ilstrup, D.M., Fortner, J.G., Maclean, B.J., Foster, J.H., Daly, J.M., and Fitzherbert, D. (1986). Resection of the liver for colorectal carcinoma metastases: a multi-institutional study of patterns of recurrence. *Surgery* *100*, 278–284.
- Hurlstone, D.P., and Cross, S.S. (2005). Role of aberrant crypt foci detected using high-magnification-chromoscopic colonoscopy in human colorectal carcinogenesis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *20*, 173–181.

- Iacopetta, B. (2003). TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum. Mutat.* 21, 271–276.
- Iavarone, A., Garg, P., Lasorella, A., Hsu, J., and Israel, M.A. (1994). The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 8, 1270–1284.
- Imyanitov, E.N., Birrell, G.W., Filippovich, I., Sorokina, N., Arnold, J., Mould, M.A., Wright, K., Walsh, M., Mok, S.C., Lavin, M.F., et al. (1999). Frequent loss of heterozygosity at 1p36 in ovarian adenocarcinomas but the gene encoding p73 is unlikely to be the target. *Oncogene* 18, 4640–4642.
- Infante, A., Laresgoiti, U., Fernández-Rueda, J., Fullaondo, A., Galán, J., Díaz-Uriarte, R., Malumbres, M., Field, S.J., and Zubiaga, A.M. (2008). E2F2 represses cell cycle regulators to maintain quiescence. *Cell Cycle* 7, 3915–3927.
- Ivanov, A.I., Nusrat, A., and Parkos, C.A. (2004). Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol. Biol. Cell* 15, 176–188.
- Izumi, N., Mizuguchi, S., Inagaki, Y., Saika, S., Kawada, N., Nakajima, Y., Inoue, K., Suehiro, S., Friedman, S.L., and Ikeda, K. (2006). BMP-7 opposes TGF-beta1-mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through Id2. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 290, L120–126.
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., and Su, B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127, 125–137.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüegg, M.A., Hall, A., and Hall, M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6, 1122–1128.
- Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58–62.
- Jain, R.K., Duda, D.G., Clark, J.W., and Loeffler, J.S. (2006). Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 3, 24–40.
- Janoueix-Lerosey, I., Novikov, E., Monteiro, M., Gruel, N., Schleiermacher, G., Loriod, B., Nguyen, C., and Delattre, O. (2004). Gene expression profiling of 1p35-36 genes in neuroblastoma. *Oncogene* 23, 5912–5922.
- Jen, J., Powell, S.M., Papadopoulos, N., Smith, K.J., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1994). Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res.* 54, 5523–5526.
- Jen, Y., Manova, K., and Benezra, R. (1997). Each member of the Id gene family exhibits a unique expression pattern in mouse gastrulation and neurogenesis. *Dev. Dyn.* 208, 92–106.
- Jen, Y., Weintraub, H., and Benezra, R. (1992). Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with E2A proteins. *Genes Dev.* 6, 1466–1479.
- Jhawer, M., Goel, S., Wilson, A.J., Montagna, C., Ling, Y.-H., Byun, D.-S., Nasser, S., Arango, D., Shin, J., Klampfer, L., et al. (2008). PIK3CA Mutation/PTEN Expression Status Predicts Response of Colon Cancer Cells to the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Cetuximab. *Cancer Research* 68, 1953–1961.
- Jiang, B.-H., and Liu, L.-Z. (2009). PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* 102, 19–65.
- Jögi, A., Persson, P., Grynfeld, A., Pålman, S., and Axelson, H. (2002). Modulation of basic helix-loop-helix transcription complex formation by Id proteins during neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* 277, 9118–9126.
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 422–433.

- Kamalian, L., Gosney, J.R., Forootan, S.S., Foster, C.S., Bao, Z.Z., Beesley, C., and Ke, Y. (2008). Increased expression of Id family proteins in small cell lung cancer and its prognostic significance. *Clin. Cancer Res.* 14, 2318–2325.
- Kang, Y., and Massagué, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118, 277–279.
- Kawakatsu, T., Ogita, H., Fukuhara, T., Fukuyama, T., Minami, Y., Shimizu, K., and Takai, Y. (2005). Vav2 as a Rac-GDP/GTP exchange factor responsible for the nectin-induced, c-Src- and Cdc42-mediated activation of Rac. *J. Biol. Chem.* 280, 4940–4947.
- Kawamura, J., Shimada, Y., Kitaichi, H., Komoto, I., Hashimoto, Y., Kaganoi, J., Miyake, M., Yamasaki, S., Kondo, K., and Imamura, M. (2007). Clinicopathological significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 54, 36–40.
- Kehlen, A., Lendeckel, U., Dralle, H., Langner, J., and Hoang-Vu, C. (2003). Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 63, 8500–8506.
- Kehlen, A., Olsen, J., Langner, J., and Riemann, D. (2000). Increased lymphocytic aminopeptidase N/CD13 promoter activity after cell-cell contact. *J. Cell. Biochem.* 80, 115–123.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141, 52–67.
- Kim, C.Y., Jung, W.Y., Lee, H.J., Kim, H.K., Kim, A., and Shin, B.K. (2012). Proteomic analysis reveals overexpression of moesin and cytokeratin 17 proteins in colorectal carcinoma. *Oncol. Rep.* 27, 608–620.
- Kim, M.-Y., Yim, S.-H., Kwon, M.-S., Kim, T.-M., Shin, S.-H., Kang, H.-M., Lee, C., and Chung, Y.-J. (2006). Recurrent genomic alterations with impact on survival in colorectal cancer identified by genome-wide array comparative genomic hybridization. *Gastroenterology* 131, 1913–1924.
- Kimelman, D., and Xu, W. (2006). beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25, 7482–7491.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159–170.
- Knudson, A.G., Jr, Strong, L.C., and Anderson, D.E. (1973). Heredity and cancer in man. *Prog Med Genet* 9, 113–158.
- Köhler, C. (2011). Histochemical localization of caldesmon isoforms in colon adenocarcinoma and lymph node metastases. *Virchows Arch.* 459, 81–89.
- Köhne, C.-H., van Cutsem, E., Wils, J., Bokemeyer, C., El-Serafi, M., Lutz, M.P., Lorenz, M., Reichardt, P., Rückle-Lanz, H., Frickhofen, N., et al. (2005). Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986. *J. Clin. Oncol.* 23, 4856–4865.
- Kops, G.J.P.L., Weaver, B.A.A., and Cleveland, D.W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer* 5, 773–785.
- Koziczak, M., Krek, W., and Nagamine, Y. (2000). Pocket protein-independent repression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 gene expression by E2F1. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2014–2022.
- Kramer, W., Girbig, F., Corsiero, D., Pfenninger, A., Frick, W., Jähne, G., Rhein, M., Wendler, W., Lottspeich, F., Hochleitner, E.O., et al. (2005). Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J. Biol. Chem.* 280, 1306–1320.
- Kreider, B.L., Benezra, R., Rovera, G., and Kadesch, T. (1992). Inhibition of myeloid differentiation by the helix-loop-helix protein Id. *Science* 255, 1700–1702.

- Kuebler, J.P., Wieand, H.S., O'Connell, M.J., Smith, R.E., Colangelo, L.H., Yothers, G., Petrelli, N.J., Findlay, M.P., Seay, T.E., Atkins, J.N., et al. (2007). Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J. Clin. Oncol.* *25*, 2198–2204.
- Lallès, J.-P. (2010). Phosphatase alcaline intestinale : une vieille enzyme avec de nouvelles fonctions dans l'homéostasie intestinale et l'absorption des lipides. *Cahiers De Nutrition Et De Diététique* *45*, 293–300.
- Landis, S.H., Murray, T., Bolden, S., and Wingo, P.A. (1999). Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* *49*, 8–31, 1.
- Larriba, M.J., Martín-Villar, E., García, J.M., Pereira, F., Peña, C., de Herreros, A.G., Bonilla, F., and Muñoz, A. (2009). Snail2 cooperates with Snail1 in the repression of vitamin D receptor in colon cancer. *Carcinogenesis* *30*, 1459–1468.
- Lasorella, A., Iavarone, A., and Israel, M.A. (1996). Id2 specifically alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 2570–2578.
- Lasorella, A., Uo, T., and Iavarone, A. (2001). Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene* *20*, 8326–8333.
- Lee, M., Fridman, R., and Mobashery, S. (2004). Extracellular proteases as targets for treatment of cancer metastases. *Chem Soc Rev* *33*, 401–409.
- Lee, S.H., Lee, Y.J., Park, S.W., Kim, H.S., and Han, H.J. (2011). Caveolin-1 and integrin β 1 regulate embryonic stem cell proliferation via p38 MAPK and FAK in high glucose. *J. Cell. Physiol* *226*, 1850–1859.
- Lefebvre, O., Sorokin, L., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (1999). Developmental expression and cellular origin of the laminin alpha2, alpha4, and alpha5 chains in the intestine. *Dev. Biol.* *210*, 135–150.
- Leone, G., Nuckolls, F., Ishida, S., Adams, M., Sears, R., Jakoi, L., Miron, A., and Nevins, J.R. (2000). Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 3626–3632.
- Leone, G., Sears, R., Huang, E., Rempel, R., Nuckolls, F., Park, C.H., Giangrande, P., Wu, L., Saavedra, H.I., Field, S.J., et al. (2001). Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis. *Mol. Cell* *8*, 105–113.
- Lerche, C., Vogel, L.K., Shapiro, L.H., Norén, O., and Sjöström, H. (1996). Human aminopeptidase N is encoded by 20 exons. *Mamm. Genome* *7*, 712–713.
- Li, H., Dai, M., and Zhuang, Y. (2004). A T cell intrinsic role of Id3 in a mouse model for primary Sjogren's syndrome. *Immunity* *21*, 551–560.
- Li, J., Maruyama, T., Zhang, P., Konkell, J.E., Hoffman, V., Zamarron, B., and Chen, W. (2010). Mutation of inhibitory helix-loop-helix protein Id3 causes $\gamma\delta$ T-cell lymphoma in mice. *Blood* *116*, 5615–5621.
- Li, X.-J., Zhu, C.-D., Yu, W., Wang, P., Chen, F.-F., Xia, X.-Y., and Luo, B. (2012). Overexpression of Id3 induces apoptosis of A549 human lung adenocarcinoma cells. *Cell Prolif.* *45*, 1–8.
- Liabakk, N.B., Talbot, I., Smith, R.A., Wilkinson, K., and Balkwill, F. (1996). Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res.* *56*, 190–196.
- Liang, J., Wang, H., Xiao, H., Li, N., Cheng, C., Zhao, Y., Ma, Y., Gao, J., Bai, R., and Zheng, H. (2010). Relationship and prognostic significance of SPARC and VEGF protein expression in colon cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *29*, 71.
- Lipscomb, E.A., and Mercurio, A.M. (2005). Mobilization and activation of a signaling competent alpha6beta4 integrin underlies its contribution to carcinoma progression. *Cancer Metastasis Rev.* *24*, 413–423.

- Liu, B., Nicolaides, N.C., Markowitz, S., Willson, J.K., Parsons, R.E., Jen, J., Papadopolous, N., Peltomäki, P., de la Chapelle, A., and Hamilton, S.R. (1995). Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat. Genet.* 9, 48–55.
- Liu, Z.-P., Li, L.-M., Liu, X.-L., and Zhang, D.-X. (2012). Comparative analysis of tumor markers and evaluation of their predictive value in patients with colorectal cancer. *Onkologie* 35, 108–113.
- Look, A.T., Ashmun, R.A., Shapiro, L.H., and Peiper, S.C. (1989). Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J. Clin. Invest.* 83, 1299–1307.
- López-Otín, C., and Matrisian, L.M. (2007). Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 7, 800–808.
- Loukola, A., Eklin, K., Laiho, P., Salovaara, R., Kristo, P., Järvinen, H., Mecklin, J.P., Launonen, V., and Aaltonen, L.A. (2001). Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res.* 61, 4545–4549.
- Luo, W., Peterson, A., Garcia, B.A., Coombs, G., Kofahl, B., Heinrich, R., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Yost, H.J., and Virshup, D.M. (2007). Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex. *Embo J.* 26, 1511–1521.
- Lurje, G., Hendifar, A.E., Schultheis, A.M., Pohl, A., Husain, H., Yang, D., Manegold, P.C., Ning, Y., Zhang, W., and Lenz, H.-J. (2009). Polymorphisms in interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist associated with tumor recurrence in stage II colon cancer. *Pharmacogenet. Genomics* 19, 95–102.
- Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., et al. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.* 7, 1194–1201.
- Lyden, D., Young, A.Z., Zagzag, D., Yan, W., Gerald, W., O'Reilly, R., Bader, B.L., Hynes, R.O., Zhuang, Y., Manova, K., et al. (1999). Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 401, 670–677.
- MacIntyre, E.A., Roberts, P.J., Jones, M., Van der Schoot, C.E., Favalaro, E.J., Tidman, N., and Linch, D.C. (1989). Activation of human monocytes occurs on cross-linking monocytic antigens to an Fc receptor. *J. Immunol.* 142, 2377–2383.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261–1274.
- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., 3rd, Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., et al. (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell* 7, 801–809.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R.S., Zborowska, E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1995). Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268, 1336–1338.
- Martinez-Rico, C., Pincet, F., Perez, E., Thiery, J.P., Shimizu, K., Takai, Y., and Dufour, S. (2005). Separation force measurements reveal different types of modulation of E-cadherin-based adhesion by nectin-1 and -3. *J. Biol. Chem.* 280, 4753–4760.
- Matsas, R., Stephenson, S.L., Hryszko, J., Kenny, A.J., and Turner, A.J. (1985). The metabolism of neuropeptides. Phase separation of synaptic membrane preparations with Triton X-114 reveals the presence of aminopeptidase N. *Biochem. J.* 231, 445–449.
- Matsuoka, T., Mitomi, H., Fukui, N., Kanazawa, H., Saito, T., Hayashi, T., and Yao, T. (2011). Cluster analysis of claudin-1 and -4, E-cadherin, and β -catenin expression in colorectal cancers. *J. Surg. Oncol.* n/a–n/a.
- McLellan, E.A., and Bird, R.P. (1988). Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res.* 48, 6187–6192.

- Meeh, P.F., Farrell, C.L., Croshaw, R., Crimm, H., Miller, S.K., Oroian, D., Kowli, S., Zhu, J., Carver, W., Wu, W., et al. (2009). A gene expression classifier of node-positive colorectal cancer. *Neoplasia* 11, 1074–1083.
- Mendell, J.T. (2008). miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 133, 217–222.
- Menrad, A., Speicher, D., Wacker, J., and Herlyn, M. (1993). Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Res.* 53, 1450–1455.
- Mercurio, A.M., Rabinovitz, I., and Shaw, L.M. (2001). The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 541–545.
- Miller, H., Zhang, J., Kuolee, R., Patel, G.B., and Chen, W. (2007). Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World J. Gastroenterol.* 13, 1477–1486.
- Mina-Osorio, P. (2008). The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med* 14, 361–371.
- Mina-Osorio, P., and Ortega, E. (2004). Signal regulators in FcR-mediated activation of leukocytes? *Trends Immunol.* 25, 529–535.
- Mina-Osorio, P., Shapiro, L.H., and Ortega, E. (2006). CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *J. Leukoc. Biol.* 79, 719–730.
- Mina-Osorio, P., Soto-Cruz, I., and Ortega, E. (2007). A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 605–610.
- Mina-Osorio, P., Winnicka, B., O'Connor, C., Grant, C.L., Vogel, L.K., Rodriguez-Pinto, D., Holmes, K.V., Ortega, E., and Shapiro, L.H. (2008). CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.* 84, 448–459.
- Mirabelli-Primdahl, L., Gryfe, R., Kim, H., Millar, A., Luceri, C., Dale, D., Holowaty, E., Bapat, B., Gallinger, S., and Redston, M. (1999). Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res.* 59, 3346–3351.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 56–68.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K., and Yamada, K.M. (1995). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J. Cell Biol.* 131, 791–805.
- Mlecnik, B., Bindea, G., Pagès, F., and Galon, J. (2011). Tumor immunosurveillance in human cancers. *Cancer Metastasis Rev.* 30, 5–12.
- Moon, N.-S., and Dyson, N. (2008). E2F7 and E2F8 keep the E2F family in balance. *Dev. Cell* 14, 1–3.
- Morin, P.J. (2005). Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* 65, 9603–9606.
- Muleris, M., Delattre, O., Olschwang, S., Dutrillaux, A.M., Remvikos, Y., Salmon, R.J., Thomas, G., and Dutrillaux, B. (1990). Cytogenetic and molecular approaches of polyploidization in colorectal adenocarcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 44, 107–118.
- Murga, M., Fernández-Capetillo, O., Field, S.J., Moreno, B., Borlado, L.R., Fujiwara, Y., Balomenos, D., Vicario, A., Carrera, A.C., Orkin, S.H., et al. (2001). Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity* 15, 959–970.
- Nevins, J.R. (1998). Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ.* 9, 585–593.

- Ngan, C.Y., Yamamoto, H., Seshimo, I., Tsujino, T., Man-i, M., Ikeda, J.-I., Konishi, K., Takemasa, I., Ikeda, M., Sekimoto, M., et al. (2007). Quantitative evaluation of vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 96, 986–992.
- Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Wei, Y.F., Carter, K.C., Ruben, S.M., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Fleischmann, R.D., and Fraser, C.M. (1994). Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 371, 75–80.
- Niessen, C.M. (2007). Tight Junctions[so]Adherens Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 2525–2532.
- Niessen, C.M., and Gumbiner, B.M. (2002). Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *J. Cell Biol.* 156, 389–399.
- Nishioka, M., Ueno, K., Hazama, S., Okada, T., Sakai, K., Suehiro, Y., Okayama, N., Hirata, H., Oka, M., Imai, K., et al. (2011). Possible involvement of Wnt11 in colorectal cancer progression. *Molecular Carcinogenesis*.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62.
- Nomura, R., Kiyota, A., Suzaki, E., Kataoka, K., Ohe, Y., Miyamoto, K., Senda, T., and Fujimoto, T. (2004). Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J. Virol.* 78, 8701–8708.
- Nordlinger, B., Van Cutsem, E., Rougier, P., Köhne, C.-H., Ychou, M., Sobrero, A., Adam, R., Arvidsson, D., Carrato, A., Georgoulas, V., et al. (2007). Does chemotherapy prior to liver resection increase the potential for cure in patients with metastatic colorectal cancer? A report from the European Colorectal Metastases Treatment Group. *Eur. J. Cancer* 43, 2037–2045.
- Norén, K., Hansen, G.H., Clausen, H., Norén, O., Sjöström, H., and Vogel, L.K. (1997). Defectively N-glycosylated and non-O-glycosylated aminopeptidase N (CD13) is normally expressed at the cell surface and has full enzymatic activity. *Exp. Cell Res.* 231, 112–118.
- Nucci, M.R., Robinson, C.R., Longo, P., Campbell, P., and Hamilton, S.R. (1997). Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum. Pathol.* 28, 1396–1407.
- Nusrat, A., Parkos, C.A., Verkade, P., Foley, C.S., Liang, T.W., Innis-Whitehouse, W., Eastburn, K.K., and Madara, J.L. (2000). Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 10), 1771–1781.
- O’Connell, J.B., Maggard, M.A., and Ko, C.Y. (2004). Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1420–1425.
- O’Connell, M.J., Mailliard, J.A., Kahn, M.J., Macdonald, J.S., Haller, D.G., Mayer, R.J., and Wieand, H.S. (1997). Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J. Clin. Oncol.* 15, 246–250.
- O’Connell, P.J., Gerkis, V., and d’ Apice, A.J. (1991). Variable O-glycosylation of CD13 (aminopeptidase N). *J. Biol. Chem.* 266, 4593–4597.
- Ogino, S., Cantor, M., Kawasaki, T., Brahmandam, M., Kirkner, G.J., Weisenberger, D.J., Campan, M., Laird, P.W., Loda, M., and Fuchs, C.S. (2006). CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut* 55, 1000 – 1006.
- Ogunbiyi, O.A., Goodfellow, P.J., Gagliardi, G., Swanson, P.E., Birnbaum, E.H., Fleshman, J.W., Kodner, I.J., and Moley, J.F. (1997). Prognostic value of chromosome 1p allelic loss in colon cancer. *Gastroenterology* 113, 761–766.
- Okamoto, O.K., Oba-Shinjo, S.M., Lopes, L., and Nagahashi Marie, S.K. (2007). Expression of HOXC9 and E2F2 are up-regulated in CD133(+) cells isolated from human astrocytomas and associate with transformation of human astrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 437–442.

- Opavsky, R., Tsai, S.-Y., Guimond, M., Arora, A., Opavska, J., Becknell, B., Kaufmann, M., Walton, N.A., Stephens, J.A., Fernandez, S.A., et al. (2007). Specific tumor suppressor function for E2F2 in Myc-induced T cell lymphomagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 15400–15405.
- Pan, L., Sato, S., Frederick, J.P., Sun, X.H., and Zhuang, Y. (1999). Impaired immune responses and B-cell proliferation in mice lacking the Id3 gene. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 5969–5980.
- van der Pas, M.H., Meijer, S., Hoekstra, O.S., Riphagen, I.I., de Vet, H.C.W., Knol, D.L., van Grieken, N.C.T., and Meijerink, W.J.H.J. (2011). Sentinel-lymph-node procedure in colon and rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* *12*, 540–550.
- Pasqualini, R., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Sakamoto, M., Stryhn, A., Ashmun, R.A., Shapiro, L.H., Arap, W., and Ruoslahti, E. (2000). Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* *60*, 722–727.
- Patarroyo, M., Tryggvason, K., and Virtanen, I. (2002). Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* *12*, 197–207.
- Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* *7*, 415–428.
- Pencreach, E., Guérin, E., Nicolet, C., Lelong-Rebel, I., Voegeli, A.-C., Oudet, P., Larsen, A.K., Gaub, M.-P., and Guenot, D. (2009). Marked activity of irinotecan and rapamycin combination toward colon cancer cells in vivo and in vitro is mediated through cooperative modulation of the mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1alpha axis. *Clin. Cancer Res* *15*, 1297–1307.
- de Pereda, J.M., Ortega, E., Alonso-García, N., Gómez-Hernández, M., and Sonnenberg, A. (2009). Advances and perspectives of the architecture of hemidesmosomes: lessons from structural biology. *Cell Adh Migr* *3*, 361–364.
- Petrovic, N., Schacke, W., Gahagan, J.R., O’Conor, C.A., Winnicka, B., Conway, R.E., Mina-Osorio, P., and Shapiro, L.H. (2007). CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodia formation. *Blood* *110*, 142–150.
- Polager, S., and Ginsberg, D. (2008). E2F - at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol.* *18*, 528–535.
- Polakis, P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *17*, 45–51.
- Prasad, R., Gu, Y., Alder, H., Nakamura, T., Canaani, O., Saito, H., Huebner, K., Gale, R.P., Nowell, P.C., and Kuriyama, K. (1993). Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. *Cancer Res.* *53*, 5624–5628.
- Presta, L.G., Chen, H., O’Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M., and Ferrara, N. (1997). Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* *57*, 4593–4599.
- Price, L.S., Leng, J., Schwartz, M.A., and Bokoch, G.M. (1998). Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol. Biol. Cell* *9*, 1863–1871.
- Proost, P., Mortier, A., Loos, T., Vandercappellen, J., Gouwy, M., Ronsse, I., Schutyser, E., Put, W., Parmentier, M., Struyf, S., et al. (2007). Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. *Blood* *110*, 37–44.
- Qiao, H., Di Stefano, L., Tian, C., Li, Y.-Y., Yin, Y.-H., Qian, X.-P., Pang, X.-W., Li, Y., McNutt, M.A., Helin, K., et al. (2007). Human TFDP3, a novel DP protein, inhibits DNA binding and transactivation by E2F. *J. Biol. Chem.* *282*, 454–466.
- Radisky, D.C., Levy, D.D., Littlepage, L.E., Liu, H., Nelson, C.M., Fata, J.E., Leake, D., Godden, E.L., Albertson, D.G., Nieto, M.A., et al. (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* *436*, 123–127.

- Rafii, S., Avecilla, S., Shmelkov, S., Shido, K., Tejada, R., Moore, M.A.S., Heissig, B., and Hattori, K. (2003). Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 996, 49–60.
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Velculescu, V.E. (2002). Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418, 934.
- Rako, I., Jakic-Razumovic, J., Katalinic, D., Sertic, J., and Plestina, S. (2012). Mutation pattern of KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer patients. *Neoplasma*.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C., and Perucho, M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275, 967–969.
- Rangel, R., Sun, Y., Guzman-Rojas, L., Ozawa, M.G., Sun, J., Giordano, R.J., Van Pelt, C.S., Tinkey, P.T., Behringer, R.R., Sidman, R.L., et al. (2007). Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 4588–4593.
- Raoul, J.-L., Van Laethem, J.-L., Peeters, M., Brezault, C., Hussein, F., Cals, L., Nippgen, J., Loos, A.-H., and Rougier, P. (2009). Cetuximab in combination with irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid (FOLFIRI) in the initial treatment of metastatic colorectal cancer: a multicentre two-part phase I/II study. *BMC Cancer* 9, 112.
- Ravitz, M.J., and Wenner, C.E. (1997). Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Adv. Cancer Res.* 71, 165–207.
- Reimer, D., Sadr, S., Wiedemair, A., Goebel, G., Concin, N., Hofstetter, G., Marth, C., and Zeimet, A.G. (2006). Expression of the E2F family of transcription factors and its clinical relevance in ovarian cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1091, 270–281.
- Reimer, D., Sadr, S., Wiedemair, A., Stadlmann, S., Concin, N., Hofstetter, G., Müller-Holzner, E., Marth, C., and Zeimet, A.G. (2007). Clinical relevance of E2F family members in ovarian cancer--an evaluation in a training set of 77 patients. *Clin. Cancer Res.* 13, 144–151.
- Resnick, M.B., Konkin, T., Routhier, J., Sabo, E., and Pricolo, V.E. (2004). Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol* 18, 511–518.
- Reynaud-Deonauth, S., Zhang, H., Afouda, A., Taillefert, S., Beatus, P., Kloc, M., Etkin, L.D., Fischer-Lougheed, J., and Spohr, G. (2002). Notch signaling is involved in the regulation of Id3 gene transcription during *Xenopus* embryogenesis. *Differentiation* 69, 198–208.
- Reynolds, A.B., and Rocznik-Ferguson, A. (2004). Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene* 23, 7947–7956.
- Riechmann, V., van Crüchten, I., and Sablitzky, F. (1994). The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. *Nucleic Acids Res.* 22, 749–755.
- Ried, T., Knutzen, R., Steinbeck, R., Blegen, H., Schröck, E., Heselmeyer, K., du Manoir, S., and Auer, G. (1996). Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 15, 234–245.
- Riemann, D., Kehlen, A., and Langner, J. (1999). CD13--not just a marker in leukemia typing. *Immunol. Today* 20, 83–88.
- Riemann, D., Kehlen, A., Thiele, K., Löhn, M., and Langner, J. (1997). Induction of aminopeptidase N/CD13 on human lymphocytes after adhesion to fibroblast-like synoviocytes, endothelial cells, epithelial cells, and monocytes/macrophages. *J. Immunol.* 158, 3425–3432.
- van Rijnsoever, M., Grieu, F., Elsaleh, H., Joseph, D., and Iacopetta, B. (2002). Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut* 51, 797–802.
- Roberts, B.J., Pashaj, A., Johnson, K.R., and Wahl, J.K., 3rd (2011). Desmosome dynamics in migrating epithelial cells requires the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 317, 2814–2822.

- Rougier, P., Van Cutsem, E., Bajetta, E., Niederle, N., Possinger, K., Labianca, R., Navarro, M., Morant, R., Bleiberg, H., Wils, J., et al. (1998). Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 352, 1407–1412.
- Rounbehler, R.J., Rogers, P.M., Conti, C.J., and Johnson, D.G. (2002). Inactivation of E2f1 enhances tumorigenesis in a Myc transgenic model. *Cancer Res.* 62, 3276–3281.
- Rubinfeld, B., Tice, D.A., and Polakis, P. (2001). Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase 1epsilon. *J. Biol. Chem.* 276, 39037–39045.
- Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 697–715.
- Sagara, Y., Mimori, K., Yoshinaga, K., Tanaka, F., Nishida, K., Ohno, S., Inoue, H., and Mori, M. (2004). Clinical significance of Caveolin-1, Caveolin-2 and HER2/neu mRNA expression in human breast cancer. *Br. J. Cancer* 91, 959–965.
- Saiki, I., Fujii, H., Yoneda, J., Abe, F., Nakajima, M., Tsuruo, T., and Azuma, I. (1993). Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int. J. Cancer* 54, 137–143.
- Saitoh, Y., Koizumi, K., Minami, T., Sekine, K., Sakurai, H., and Saiki, I. (2006). A derivative of aminopeptidase inhibitor (BE15) has a dual inhibitory effect of invasion and motility on tumor and endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 709–712.
- Saltz, L.B., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., Koski, S., Lichinitser, M., Yang, T.-S., Rivera, F., et al. (2008). Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J. Clin. Oncol.* 26, 2013–2019.
- Saltz, L.B., Cox, J.V., Blanke, C., Rosen, L.S., Fehrenbacher, L., Moore, M.J., Maroun, J.A., Ackland, S.P., Locker, P.K., Pirog, N., et al. (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N. Engl. J. Med.* 343, 905–914.
- Samowitz, W.S., Curtin, K., Ma, K.N., Schaffer, D., Coleman, L.W., Leppert, M., and Slattery, M.L. (2001a). Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10, 917–923.
- Samowitz, W.S., Holden, J.A., Curtin, K., Edwards, S.L., Walker, A.R., Lin, H.A., Robertson, M.A., Nichols, M.F., Gruenthal, K.M., Lynch, B.J., et al. (2001b). Inverse relationship between microsatellite instability and K-ras and p53 gene alterations in colon cancer. *Am. J. Pathol.* 158, 1517–1524.
- Sampson, J.R., Dolwani, S., Jones, S., Eccles, D., Ellis, A., Evans, D.G., Frayling, I., Jordan, S., Maher, E.R., Mak, T., et al. (2003). Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 362, 39–41.
- Samuels, Y., and Velculescu, V.E. (2004). Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle* 3, 1221–1224.
- Sangiorgi, E., and Capecchi, M.R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat. Genet.* 40, 915–920.
- Sant, M., Aareleid, T., Berrino, F., Bielska Lasota, M., Carli, P.M., Faivre, J., Grosclaude, P., Hédelin, G., Matsuda, T., Møller, H., et al. (2003). EUROCORE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary. *Ann. Oncol.* 14 Suppl 5, v61–118.
- Sarachana, T., Zhou, R., Chen, G., Manji, H.K., and Hu, V.W. (2010). Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. *Genome Med* 2, 23.
- Sato, T., Fujita, N., Yamada, A., Ooshio, T., Okamoto, R., Irie, K., and Takai, Y. (2006). Regulation of the assembly and adhesion activity of E-cadherin by nectin and afadin for the formation of adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 281, 5288–5299.

- Savagner, P., Yamada, K.M., and Thiery, J.P. (1997). The Zinc-Finger Protein Slug Causes Desmosome Dissociation, an Initial and Necessary Step for Growth Factor–induced Epithelial–Mesenchymal Transition. *The Journal of Cell Biology* 137, 1403–1419.
- Scheijen, B., Bronk, M., van der Meer, T., De Jong, D., and Bernards, R. (2004). High incidence of thymic epithelial tumors in E2F2 transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 279, 10476–10483.
- Scherer, P.E., Lewis, R.Y., Volonte, D., Engelman, J.A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D.S., van Donselaar, E., Peters, P., and Lisanti, M.P. (1997). Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 29337–29346.
- Schlessinger, K., McManus, E.J., and Hall, A. (2007). Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity. *J. Cell Biol.* 178, 355–361.
- Sears, R., Ohtani, K., and Nevins, J.R. (1997). Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the E2F2 gene in response to cell growth signals. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5227–5235.
- Sehouli, J., Mustea, A., Könsgen, D., Katsares, I., and Lichtenegger, W. (2002). Polymorphism of IL-1 receptor antagonist gene: role in cancer. *Anticancer Res.* 22, 3421–3424.
- Semenza, G. (1986). Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocytes and renal tubuli. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2, 255–313.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 721–732.
- Shapiro, L.H., Ashmun, R.A., Roberts, W.M., and Look, A.T. (1991). Separate promoters control transcription of the human aminopeptidase N gene in myeloid and intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 266, 11999–12007.
- Shattil, S.J., Kim, C., and Ginsberg, M.H. (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 288–300.
- Shekarabi, M., Moore, S.W., Tritsch, N.X., Morris, S.J., Bouchard, J.-F., and Kennedy, T.E. (2005). Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J. Neurosci.* 25, 3132–3141.
- Shen, L., and Turner, J.R. (2005). Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 16, 3919–3936.
- Shepherd, T.G., Thériault, B.L., and Nachtigal, M.W. (2008). Autocrine BMP4 signalling regulates ID3 proto-oncogene expression in human ovarian cancer cells. *Gene* 414, 95–105.
- Shi, T., Mazumdar, T., Devecchio, J., Duan, Z.-H., Agyeman, A., Aziz, M., and Houghton, J.A. (2010). cDNA microarray gene expression profiling of hedgehog signaling pathway inhibition in human colon cancer cells. *PLoS ONE* 5, .
- Simbulan-Rosenthal, C.M., Daher, A., Trabosh, V., Chen, W.-C., Gerstel, D., Soeda, E., and Rosenthal, D.S. (2006). Id3 induces a caspase-3- and -9-dependent apoptosis and mediates UVB sensitization of HPV16 E6/7 immortalized human keratinocytes. *Oncogene* 25, 3649–3660.
- Sounni, N.E., Paye, A., Host, L., and Noël, A. (2011). MT-MMPS as Regulators of Vessel Stability Associated with Angiogenesis. *Front Pharmacol* 2, 111.
- Souza, R.F., Appel, R., Yin, J., Wang, S., Smolinski, K.N., Abraham, J.M., Zou, T.T., Shi, Y.Q., Lei, J., Cottrell, J., et al. (1996). Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat. Genet.* 14, 255–257.
- Stahlhut, M., and van Deurs, B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* 11, 325–337.

- Stang, A., Stabenow, R., Stegmaier, C., Eisinger, B., Bischof-Hammes, E., and Jöckel, K.-H. (2007). Unexplained inversion of the incidence ratio of colon and rectal cancer among men in East Germany. A time trend analysis including 147,790 cases. *Eur. J. Epidemiol.* 22, 245–255.
- Di Stefano, L., Jensen, M.R., and Helin, K. (2003). E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *Embo J.* 22, 6289–6298.
- Su, Y., Fu, C., Ishikawa, S., Stella, A., Kojima, M., Shitoh, K., Schreiber, E.M., Day, B.W., and Liu, B. (2008). APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Mol. Cell* 32, 652–661.
- Swiss, V.A., and Casaccia, P. (2010). Cell-context specific role of the E2F/Rb pathway in development and disease. *Glia* 58, 377–390.
- Sylvestre, Y., De Guire, V., Querido, E., Mukhopadhyay, U.K., Bourdeau, V., Major, F., Ferbeyre, G., and Chartrand, P. (2007). An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J. Biol. Chem.* 282, 2135–2143.
- Taïeb, J., Artru, P., Paye, F., Louvet, C., Perez, N., André, T., Gayet, B., Hebbar, M., Goebel, F.M., Tournigand, C., et al. (2005). Intensive systemic chemotherapy combined with surgery for metastatic colorectal cancer: results of a phase II study. *J. Clin. Oncol.* 23, 502–509.
- Takacs, C.M., Baird, J.R., Hughes, E.G., Kent, S.S., Benchabane, H., Paik, R., and Ahmed, Y. (2008). Dual positive and negative regulation of wingless signaling by adenomatous polyposis coli. *Science* 319, 333–336.
- Takai, Y., and Nakanishi, H. (2003). Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J. Cell. Sci.* 116, 17–27.
- Takata, M., Yao, T., Nishiyama, K.-I., Nawata, H., and Tsuneyoshi, M. (2003). Phenotypic alteration in malignant transformation of colonic villous tumours: with special reference to a comparison with tubular tumours. *Histopathology* 43, 332–339.
- Takayama, T., Ohi, M., Hayashi, T., Miyanishi, K., Nobuoka, A., Nakajima, T., Satoh, T., Takimoto, R., Kato, J., Sakamaki, S., et al. (2001). Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 121, 599–611.
- Tao, Y., Kassatly, R.F., Cress, W.D., and Horowitz, J.M. (1997). Subunit composition determines E2F DNA-binding site specificity. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6994–7007.
- Taussig, D.C., Pearce, D.J., Simpson, C., Rohatiner, A.Z., Lister, T.A., Kelly, G., Luongo, J.L., Danet-Desnoyers, G.H., and Bonnet, D. (2005). Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* 106, 4086–4092.
- Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., and Nakagama, H. (2007). Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15472–15477.
- Tesser-Gamba, F., Petrilli, A.S., de Seixas Alves, M.T., Filho, R.J.G., Juliano, Y., and Toledo, S.R.C. (2011). MAPK7 and MAP2K4 as prognostic markers in osteosarcoma. *Human Pathology*.
- Thibodeau, S.N., Bren, G., and Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260, 816–819.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454.
- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131–142.
- Thorstensen, L., Qvist, H., Heim, S., Liefers, G.J., Nesland, J.M., Giercksky, K.E., and Lothe, R.A. (2000). Evaluation of 1p losses in primary carcinomas, local recurrences and peripheral metastases from colorectal cancer patients. *Neoplasia* 2, 514–522.

- Tokuhara, T., Hattori, N., Ishida, H., Hirai, T., Higashiyama, M., Kodama, K., and Miyake, M. (2006). Clinical significance of aminopeptidase N in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 3971–3978.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., and Issa, J.P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 8681–8686.
- Trimarchi, J.M., and Lees, J.A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 11–20.
- Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 285–293.
- Turner, A.J. (1986). Processing and metabolism of neuropeptides. *Essays Biochem.* 22, 69–119.
- Vandeputte, D.A.A., Troost, D., Leenstra, S., Ijlst-Keizers, H., Ramkema, M., Bosch, D.A., Baas, F., Das, N.K., and Aronica, E. (2002). Expression and distribution of id helix-loop-helix proteins in human astrocytic tumors. *Glia* 38, 329–338.
- Vasen, H.F., Watson, P., Mecklin, J.P., and Lynch, H.T. (1999). New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116, 1453–1456.
- Veilleux, A., Houde, V.P., Bellmann, K., and Marette, A. (2010). Chronic Inhibition of the mTORC1/S6K1 Pathway Increases Insulin-Induced PI3K Activity but Inhibits Akt2 and Glucose Transport Stimulation in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecular Endocrinology* 24, 766–778.
- Viguier J. (13/01/2009). L'organisation du dépistage du cancer colorectal en France. Numéro thématique - Dépistage organisé du cancer colorectal en France. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire [Bull Epidemiol Hebd]*, N°2-3
- Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* 2, 594–604.
- Wallingford, J.B., and Habas, R. (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 132, 4421–4436.
- Wallingford, J.B., Rowning, B.A., Vogeli, K.M., Rothbacher, U., Fraser, S.E., and Harland, R.M. (2000). Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* 405, 81–85.
- Wang, X., Bhattacharyya, D., Dennewitz, M.B., Kalinichenko, V.V., Zhou, Y., Lepe, R., and Costa, R.H. (2003). Rapid hepatocyte nuclear translocation of the Forkhead Box M1B (FoxM1B) transcription factor caused a transient increase in size of regenerating transgenic hepatocytes. *Gene Expr.* 11, 149–162.
- Wang, Y., Ngo, V.N., Marani, M., Yang, Y., Wright, G., Staudt, L.M., and Downward, J. (2010). Critical role for transcriptional repressor Snail2 in transformation by oncogenic RAS in colorectal carcinoma cells. *Oncogene* 29, 4658–4670.
- Wary, K.K., Mariotti, A., Zurzolo, C., and Giancotti, F.G. (1998). A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94, 625–634.
- Watanabe, Y., Ito, K., Iwaki-Egawa, S., Yamaguchi, R., and Fujimoto, Y. (1998). Aminopeptidase N in sera of healthy subjects is a different N-terminal processed derivative from the one obtained from maternal serum. *Mol. Genet. Metab.* 63, 289–294.
- Weber, J.-C., Meyer, N., Pencreach, E., Schneider, A., Guérin, E., Neuville, A., Stemmer, C., Brigand, C., Bachellier, P., Rohr, S., et al. (2007). Allelotyping analyses of synchronous primary and metastasis CIN colon cancers identified different subtypes. *Int. J. Cancer* 120, 524–532.
- Weis, S.M., and Cheresh, D.A. (2005). Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 437, 497–504.
- Welm, A.L., Sneddon, J.B., Taylor, C., Nuyten, D.S.A., van de Vijver, M.J., Hasegawa, B.H., and Bishop, J.M. (2007). The macrophage-stimulating protein pathway promotes metastasis in a mouse model for breast cancer and predicts poor prognosis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 7570–7575.

- White, P.S., Thompson, P.M., Gotoh, T., Okawa, E.R., Igarashi, J., Kok, M., Winter, C., Gregory, S.G., Hogarty, M.D., Maris, J.M., et al. (2005). Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene* 24, 2684–2694.
- Wickström, M., Larsson, R., Nygren, P., and Gullbo, J. (2011). Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci* 102, 501–508.
- Wiggan, O., and Hamel, P.A. (2002). Pax3 regulates morphogenetic cell behavior in vitro coincident with activation of a PCP/non-canonical Wnt-signaling cascade. *J. Cell. Sci.* 115, 531–541.
- Wikman, H., Seppänen, J.K., Sarhadi, V.K., Kettunen, E., Salmenkivi, K., Kuosma, E., Vainio-Siukola, K., Nagy, B., Karjalainen, A., Sioris, T., et al. (2004). Caveolins as tumour markers in lung cancer detected by combined use of cDNA and tissue microarrays. *J. Pathol.* 203, 584–593.
- Wilson, J.W., Deed, R.W., Inoue, T., Balzi, M., Becciolini, A., Faraoni, P., Potten, C.S., and Norton, J.D. (2001). Expression of Id helix-loop-helix proteins in colorectal adenocarcinoma correlates with p53 expression and mitotic index. *Cancer Res* 61, 8803–8810.
- Wilson, R.B., Kiledjian, M., Shen, C.P., Benezra, R., Zwollo, P., Dymecki, S.M., Desiderio, S.V., and Kadesch, T. (1991). Repression of immunoglobulin enhancers by the helix-loop-helix protein Id: implications for B-lymphoid-cell development. *Mol. Cell. Biol.* 11, 6185–6191.
- Xu, X.-M., Wang, D., Shen, Q., Chen, Y.-Q., and Wang, M.-H. (2004). RNA-mediated gene silencing of the RON receptor tyrosine kinase alters oncogenic phenotypes of human colorectal carcinoma cells. *Oncogene* 23, 8464–8474.
- Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Ikeda, S., Takada, S., and Kikuchi, A. (1999). Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability. *J. Biol. Chem.* 274, 10681–10684.
- Yamamoto, H., Komekado, H., and Kikuchi, A. (2006). Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin. *Dev. Cell* 11, 213–223.
- Yang, E., Kang, H.J., Koh, K.H., Rhee, H., Kim, N.K., and Kim, H. (2007). Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers. *Int. J. Cancer* 121, 567–575.
- Yang, H.-Y., Liu, H.-L., Liu, G.-Y., Zhu, H., Meng, Q.-W., Qu, L.-D., Liu, L.-X., and Jiang, H.-C. (2011). Expression and prognostic values of Id-1 and Id-3 in gastric adenocarcinoma. *J. Surg. Res.* 167, 258–266.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927–939.
- Yeung, T.M., Chia, L.A., Kosinski, C.M., and Kuo, C.J. (2011). Regulation of self-renewal and differentiation by the intestinal stem cell niche. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2513–2523.
- Yothers, G., O'Connell, M.J., Allegra, C.J., Kuebler, J.P., Colangelo, L.H., Petrelli, N.J., and Wolmark, N. (2011). Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J. Clin. Oncol.* 29, 3768–3774.
- Zavadil, J., and Böttinger, E.P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24, 5764–5774.
- Zebedee, Z., and Hara, E. (2001). Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene* 20, 8317–8325.
- Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., and He, X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873–877.
- Zhang, J.-P., Wang, J., Gui, Y.-L., Zhu, Q.-Q., Xu, Z.-W., and Li, J.-S. (2011). [Human stool vimentin, oncostatin M receptor and tissue factor pathway inhibitor 2 gene methylation analysis for the detection of colorectal neoplasms]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 91, 2482–2484.

Zhang, S., Zhang, D., and Sun, B. (2007). Vasculogenic mimicry: current status and future prospects. *Cancer Lett.* 254, 157–164.

Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., and Hung, M.-C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 6, 931–940.

Zhu, J.W., Field, S.J., Gore, L., Thompson, M., Yang, H., Fujiwara, Y., Cardiff, R.D., Greenberg, M., Orkin, S.H., and DeGregori, J. (2001). E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8547–8564.

Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., and Mo, Y.-Y. (2008). MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res.* 18, 350–359.

Zucker, S., and Vacirca, J. (2004). Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 23, 101–117.

Zwijsen, A., Verschueren, K., and Huylebroeck, D. (2003). New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. *FEBS Lett.* 546, 133–139.

CITATIONS

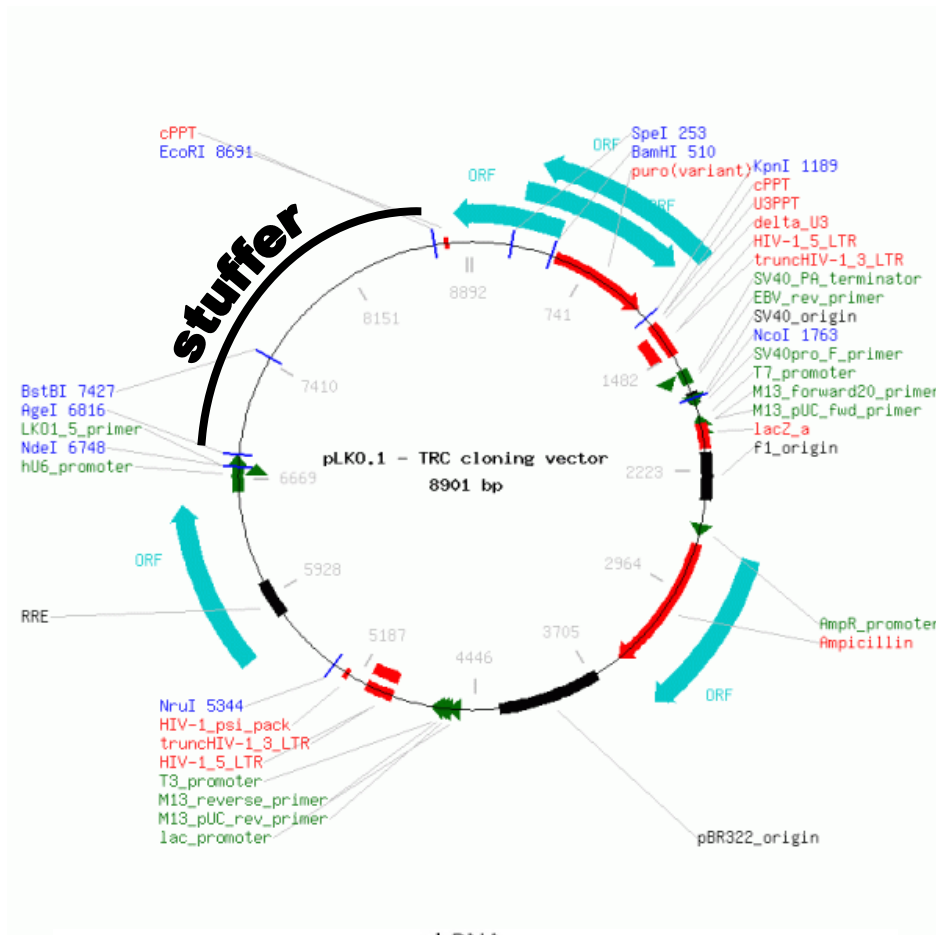
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM071590.pdf>

European Commission, European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening. 2009.

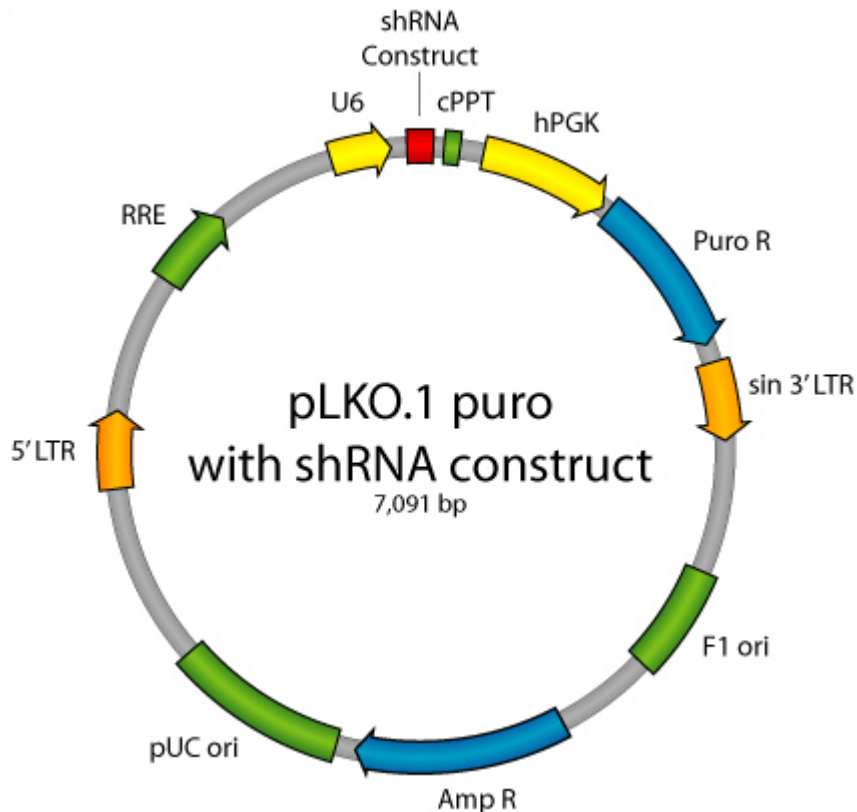
Programme national de dépistage organisé du cancer colorectal - Synthèse relative aux modalités de migration vers l'utilisation des tests immunologiques de dépistage, INCa, Boulogne-Billancourt, novembre 2011)

ANNEXES

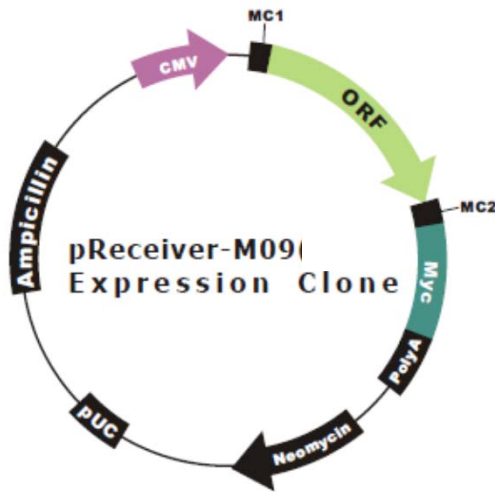
A



B



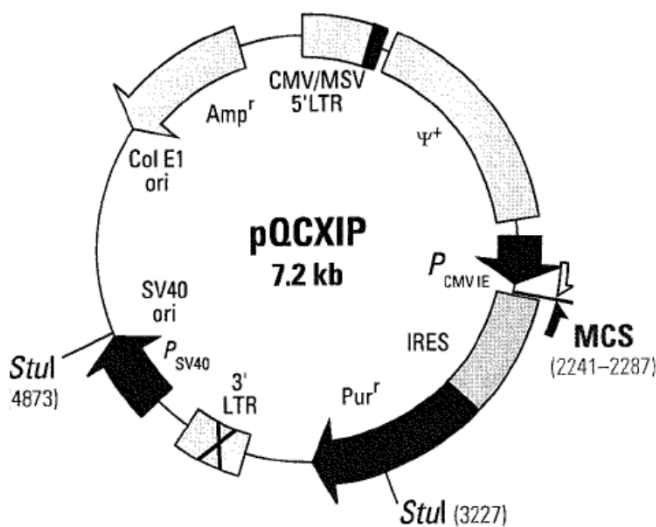
Annexe 1 : Carte du vecteur lentiviral pLKO.1-TRC (*The RNAi Consortium*). (A) Le plasmide pLKO.1-TRC de 8.9kb contient un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection bactérienne, à la puromycine pour la sélection des cellules de mammifères, et un « *stuffer* » de 1.9kb. (B) Le « *stuffer* » est enlevé et remplacé par la séquence codant le shRNA formant un vecteur de 7.1kb. Le shRNA est sous le contrôle du promoteur U6



Vector Features

Promoter	CMV
Host Cell	Mammalian
Bacterial selection antibiotic	Ampicillin
Mammalian selection marker	Yes
Tag	C-myc

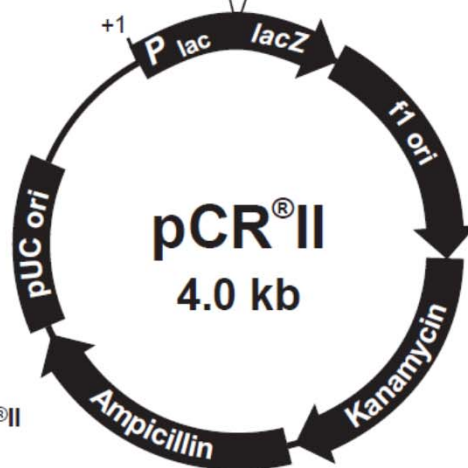
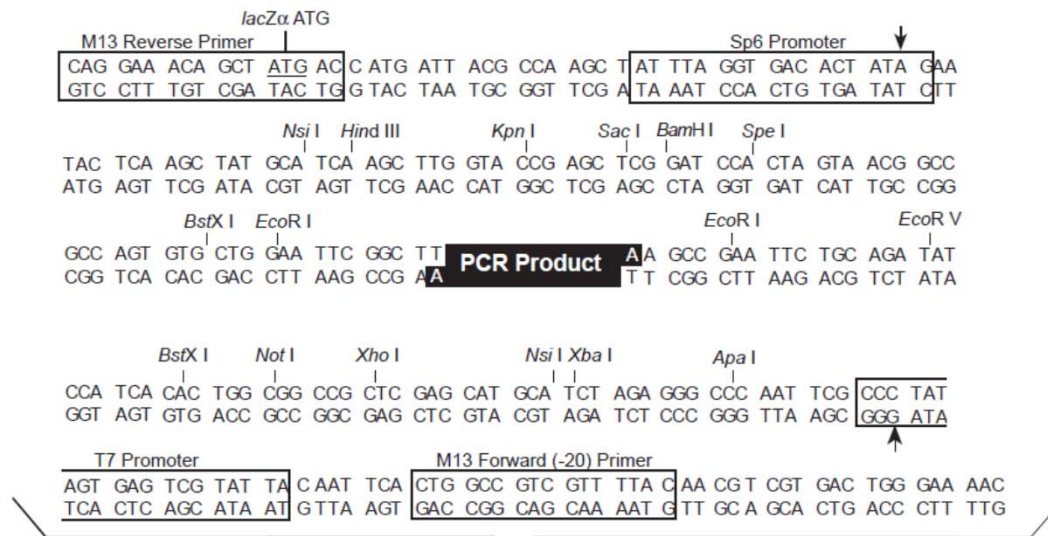
Annexe 2 : Carte du vecteur plasmidique pReceiver-M09 (Genecopoeia). Le plasmide pReceiver contient l'ADNc de E2F2 (ORF) suivi de l'étiquette c-myc et d'une queue polyA sous le contrôle du promoteur CMV.



Annexe 3 : Carte du vecteur d'expression rétroviral pQCXIP.

Le plasmide pQCXIP de 7.2 kb contient les séquences pour le signal d'encapsidation (ψ^+) sous le contrôle du promoteur CMV/MSV. Il contient aussi une cassette de clonage MCS (*Multiple Cloning Sites*) avec, entre autres, les sites de restriction BamH1 et EcoR1 pour insérer le gène cible (E2F2), la séquence IRES et le gène de résistance à la puromycine générant un messager bicistronique sous le contrôle du promoteur PCMV IE. Il contient aussi un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection dans les bactéries.

- 5' LTR (CMV/MSV): 1–728
Cytomegalovirus (CMV)/ mouse sarcoma virus (MSV) hybrid promoter: 1–511
R region: 584–654
U5 region: 655–728
- Ψ^+ (extended packaging signal): 758–1567
- Immediate early CMV promoter (P_{CMVIE}): 1601–2132
- Multiple Cloning Site (MCS): 2239–2287
- Internal ribosome entry site (IRES): 2289–2862
- Puromycin resistance gene (Pur^r): 2898–3494
Start codon (ATG): 2895–2897; stop codon (TGA): 3492–3494
- 3' MoMuLV LTR (deletion in U3): 3868–4293
Poly A region: 4195–4216
- SV40 promoter: 4573–4840
- SV40 ori: 4794–4859
- Col E1 ori (Site of replication initiation): 5180
- Ampicillin resistance gene (β -lactamase): 6800–5940
Start codon (ATG): 6800–6798 stop codon (TAA): 5940–5942



Comments for pCR®II
3971 nucleotides

- LacZα gene: bases 1-587
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- Sp6 promoter: bases 239-256
- T7 promoter: bases 404-423
- M13 (-20) Forward priming site: bases 431-446
- f1 origin: bases 588-1025
- Kanamycin resistance ORF: bases 1359-2153
- Ampicillin resistance ORF: bases 2171-3031
- pUC origin: bases 3176-3849

Annexe 4 : Carte du vecteur plasmidique pCRII. Deux sites de restriction EcoR1 encadre le site d'insertion du produit de PCR.

<p>Gènes sur-exprimés</p> <p>AHNAK, BMP1, CALD1, CAMK2N1, CDH2, COL1A2, COL3A1, COL5A2, FN1, FOXC2, GNG11, GSC, IGFBP4, ITGA5, ITGAV, MMP2, MMP3, MMP9, MSN, SERPINE1, SNAI1, SNAI2, SNAI3, SOX10, SPARC, STEAP1, TCF4, TIMP1, TMEFF1, TMEM132A, TWIST1, VCAN, VIM, VPS13A, WNT5A, WNT5B.</p>
<p>Gènes sous-exprimés</p> <p>CAV2, CDH1, DSP, FGFBP1, IL1RN, KRT19, MITF, MST1R, NUDT13, OCLN, PPPDE2, RGS2, SPP1, TFPI2, TSPAN13.</p>
<p>Différenciation</p> <p>AKT1, BMP1, BMP7, COL3A1, COL5A2, CTNNB1, DSP, ERBB3, F11R, FOXC2, FZD7, GSC, JAG1, KRT14, MITF, MST1R, NODAL, NOTCH1, PTP4A1, SMAD2, SNAI1, SNAI2, SOX10, TGFB2, TGFB3, TMEFF1, TWIST1, VCAN, WNT11, WNT5A, WNT5B.</p>
<p>Morphogenèse</p> <p>CTNNB1, FOXC2, JAG1, RAC1, SMAD2, SNAI1, SOX10, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TWIST1, WNT11, WNT5A</p>
<p>Prolifération</p> <p>AKT1, BMP1, BMP7, CAV2, CTNNB1, EGFR, ERBB3, FGFBP1, FOXC2, IGFBP4, ILK, JAG1, MST1R, NODAL, PDGFRB, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TIMP1, VCAN, ZEB1.</p>
<p>Migration</p> <p>CALD1, CAV2, EGFR, FN1, ITGB1, JAG1, MSN, MST1R, NODAL, PDGFRB, RAC1, STAT3, TGFB1, VIM</p>
<p>Cytosquelette</p> <p>CAV2, KRT7, MAP1B, PLEK2, RAC1, VIM.</p>
<p>Adhésion</p> <p>BMP1, BMP7, CDH1, CDH2, COL1A2, COL3A1, COL5A2, CTNNB1, DSC2, EGFR, ERBB3, F11R, FN1, FOXC2, ILK, ITGA5, ITGAV, ITGB1, MMP2, MMP3, MMP9, PTK2, RAC1, SERPINE1, SPP1, TGFB1, TGFB2, TIMP1, VCAN.</p>
<p>Voies de signalisation</p> <p><u>Estrogen Receptor</u>: CAV2, ESR1, KRT19, TGFB3. <u>G-Protein Coupled Receptor</u>: AKT1, FZD7, GNG11, RAC1, RGS2. <u>Integrin-Mediated</u>: COL3A1, ILK, ITGA5, ITGAV, ITGB1, PTK2. <u>Notch</u>: FOXC2, JAG1, NOTCH1. <u>Receptor Tyrosine Kinase</u>: EGFR, ERBB3, PDGFRB, RGS2, SPARC. <u>TGFβ / BMP</u>: BMP1, BMP7, COL3A1, SMAD2, TGFB1, TGFB2, TGFB3. <u>WNT</u>: CTNNB1, FZD7, GSK3B, WNT11, WNT5A, WNT5B.</p>
<p>Facteurs de transcription</p> <p>CTNNB1, ESR1, FOXC2, GSC, MITF, NOTCH1, SIP1, SMAD2, SNAI2, SNAI3, SOX10, STAT3, TCF3, TCF4, TWIST1, ZEB1, ZEB2.</p>
<p>Gènes de références</p> <p>B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH, ACTB</p>

Annexe 5 : Liste des gènes de la plaque PCR « Transition Epithélio-Mésenchymateuse » (TEM). La plaque TEM comprend des gènes connus pour être sur- et sous-exprimés durant la TEM, ainsi que dans les processus cellulaires associés. Cinq gènes de références sont analysés dans cette étude.

Manon VOEGELIN

Rôle des facteurs de transcription E2F2 et ID3 dans la progression tumorale et intérêt du ciblage de l'aminopeptidase N/CD13 dans le traitement du cancer colique humain

Résumé

Une analyse génomique (Comparative Genomic Hybridization) a été réalisée sur une cohorte d'adénomes et de tumeurs coliques et a mis en évidence, parmi d'autres altérations, la délétion de la région 1p36.12 dans 23% des adénomes et 47% des carcinomes. Parmi les 15 gènes ayant une fonction connue retrouvés dans cette zone, le gène codant pour le facteur de transcription E2F2 a été retenu en raison de son implication dans des processus cellulaires clés. Une analyse de Kaplan-Meier a montré que la délétion de E2F2 est un facteur de bon pronostic de survie sans progression. Afin de mieux cerner l'implication des gènes ciblés par la micro-délétion en 1p36.12, une étude fonctionnelle in vitro et in vivo de la perte de fonction de E2F2 a été réalisée, et étendue à celle de ID3 dont le gène est le voisin direct de E2F2. Nos observations indiquent qu'in vivo, la perte d'E2F2 favorise la croissance tumorale et bloque le développement de métastases.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de biochimiste du Pr Céline TARNUS (U.H.A.), une étude pilote a été réalisée pour prouver l'efficacité anti-tumorale de nouveaux inhibiteurs hautement sélectifs pour l'aminopeptidase N.

Summary

A genomic analysis (Comparative Genomic Hybridization) evidenced, among other chromosomal alterations, a microdeletion at 1p36.12 locus in 23% and 47% of colon adenomas and carcinomas, respectively. Among the 15 genes located in the deleted region, we focused on E2F2 gene involved in various cellular processes. The Kaplan-Meier curve analysis showed that E2F2 deletion is associated with a better progression-free survival. To better understand the involvement of genes targeted by the microdeletion in colon tumors, we assessed the functional impact of the underexpression of E2F2 and of its direct neighbor gene ID3, coding for a dominant-negative repressor involved in cell differentiation. Our results indicated that E2F2 loss favors tumor growth and prevent metastatic spread.

In collaboration with the biochemical team directed by the Pr Céline TARNUS, we started a pilot study to prove the anti-tumor potential of new chemical inhibitors highly selective of the aminopeptidase N.