Université de Sherbrooke

L'implication de la protéase à cystéine cathepsine B dans la tumorigénèse colorectale

par Benjamin Bian Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire

Thèse présentée à la faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Biologie Cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada Décembre 2013

Membres du jury d'évaluation :

Pre Nathalie RIVARD, département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire Pre Caroline SAUCIER, département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire Pr Jean-Bernard DENAULT, département de Pharmacologie Pre Audrey CLAING, département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal

© Benjamin Bian, 2013

Les tumeurs sont caractérisées par une croissance exacerbée ainsi qu'une capacité à pouvoir se disséminer dans l'organisme. Ces deux aspects sont assurés en partie par une expression et une sécrétion soutenues de protéases. Plus particulièrement, une expression importante et une délocalisation de la protéase à cystéine cathepsine B corrèle avec les pouvoirs métastatiques de plusieurs types de tumeurs. La cathepsine B est une protéase lysosomale dont le rôle majeur est de dégrader les protéines en fin de vie. Dans les cancers colorectaux, l'épithélium colique possède une importante activité cathepsine B dès l'apparition d'adénomes précoces, mais aussi dans des tumeurs avancées et métastatiques. Par ailleurs, une expression et une activité importante de cette enzyme sont des indices de mauvais pronostics de survie chez les patients atteints de cancers colorectaux.

Le but de ce travail a été d'évaluer l'importance de la cathepsine B dans les processus tumorigéniques de lignées cancéreuses colorectales. Pour cela, nous avons analysé les statuts d'expression, de sécrétion et d'activité de la cathepsine B dans les cellules normales HIEC comparativement à sept lignées cancéreuses colorectales humaines. La cathepsine B est sécrétée par les lignées cancéreuses et par les cellules HIEC qui expriment néanmoins de hauts niveaux de cathepsine B intracellulaire et sécrètent la forme non-active de la cathepsine B. Par ailleurs, nous avons employé la technique d'interférence à ARN ciblant spécifiquement les transcrits de la cathepsine B dans deux lignées cancéreuses colorectales afin d'en évaluer l'impact sur leurs capacités de croissance et d'invasion. Le ciblage de la cathepsine B réduit de manière modeste la croissance sur plastique de ces deux lignées cancéreuses ; cependant, leur potentiel à former des colonies en indépendance d'ancrage ainsi que leur capacité à migrer et envahir la matrice extracellulaire sont drastiquement affectés par la baisse de cathepsine B. En parallèle, le ciblage pharmacologique des formes actives et sécrétées de la cathepsine B réduit les pouvoirs d'invasion des cellules cancéreuses sans interférer avec leur capacité à former des colonies en indépendance d'ancrage. De plus, nous avons pu montrer que le ciblage moléculaire de la cathepsine B dans les deux lignées cancéreuses réduit de manière importante leurs capacités tumorigéniques chez la souris. L'analyse biochimique des tumeurs sous-exprimant la cathepsine B révèle des niveaux plus importants de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27Kip1 ainsi qu'une réduction de la cycline B. Enfin, nous avons montré que la cathepsine B a la capacité de cliver directement l'inhibiteur p27Kip1, contribuant ainsi à sa dérégulation dans le cancer colorectal. De plus, la génération d'un mutant de p27^{kip1} non clivable par cette enzyme permet d'augmenter de manière significative la stabilité de l'inhibiteur. En résumé, l'ensemble de ces travaux montre que la cathepsine B est un acteur important dans les caractères tumoraux des cellules cancéreuses colorectales et que son ciblage moléculaire et/ou pharmacologique pourrait être une approche valide pour réduire l'expansion de ces tumeurs chez l'humain. Mots clés : cancer colorectal, protéases, cathepsine B, croissance tumorale, invasion, métastases, épithélium intestinal.

À mes filles, Morgane et Emma...

RÉSUMÉII			
LISTE [DES FIGURESIX		
LISTE DES TABLEAUXX			
LISTE DES ABRÉVIATIONSXI			
1	INTRODUCTION1		
1.1	L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL1		
1.1.1	Le tube digestif1		
1.1.2	Structures de l'épithélium intestinal et colique2		
1.1.3	Les quatre types cellulaires majoritairement rencontrés dans l'épithélium intestinal3		
1.1.4	L'axe crypte-villosité et le renouvellement de l'épithélium intestinal5		
1.2	LE CANCER		
1.2.1	Généralités		
1.2.2	Les caractéristiques d'une cellule tumorale8		
1.2.3	Les étapes de la carcinogenèse11		
1.3	LE CANCER COLORECTAL15		
1.3.1	Généralités15		
1.3.2	Les origines génétiques du cancer colorectal15		
1.3.2.	1 Le modèle génétique de Fearon et Vogelstein 16		
1.3.2.2	2 Caractéristiques moléculaires CIN 17		
1.3.2.3	3 Caractéristiques moléculaires MSI		
1.3.2.4	4 Caractéristiques moléculaires CIMP 18		
1.3.3	Les principales voies de signalisation et leurs altérations dans les cancers		
colo	prectaux		
1.3.3.	1 La voie canonique Wnt/β-caténine		
1.3.3.2	2 La voie du TGFβ		
1.3.3.3	3 La voie TP53		

1.3.3.4	4 La voie Ras/Raf/MAPK	21
1.3.3.	5 La voie PI3K/AKT	22
1.3.4	L'inhibiteur de complexes CDK/Cyclines : p27 ^{Kip1} et sa dérégulation dans les c	ancers
colo	prectaux	24
1.4	CYCLE CELLULAIRE ET PROTÉOLYSE	25
1.5	L'IMPLICATION DE LA CATHEPSINE B DANS LA PROGRESSION DES CANCERS	26
1.5.1	Généralités sur les protéases	26
1.5.2	Les protéases à cystéine	29
1.5.3	La famille des cathepsines à cystéine (clan CA, famille C1a)	29
1.5.4	La cathepsine B (E.C. 3.4.22.1)	31
1.5.4.1	1 Structure, routage et localisation de la cathepsine B	31
1.5.4.2	2 Dérégulations de l'expression de la cathepsine B dans les cancers	33
1.5.4.3	3 Délocalisation de la cathepsine B dans les cancers	35
1.5.4.4	Rôles dans le remaniement de la matrice extracellulaire	36
1.5.4.	5 La place de la cathepsine B dans les cascades protéolytiques tumorales	38
1.5.4.6	6 Données concernant la cathepsine B dans les néoplasies et cancers colorectaux	40
1.5.5	Objectifs de recherche	41
2	MATÉRIEL ET MÉTHODES	43
2.1	MATÉRIELS	43
2.2	CULTURE CELLULAIRE	43
2.2.1	Les cellules HIEC	43
2.2.2	Les cellules Caco-2/15	44
2.2.3	Autres cellules cancéreuses colorectales	44
2.2.4	Les cellules 293T	45
2.3	TRANSFECTIONS TRANSITOIRES-MÉTHODE DU PHOSPHATE DE CALCIUM	45
2.4	LYSE CELLULAIRE ET IMMUNOBUVARDAGES	46
2.5	RT-PCR QUANTITATIVE	46
2.6	ÉCHANTILLONS DE TUMEURS COLORECTALES HUMAINES	47

2.7	IMMUNOFLUORESCENCES47	
2.8	ENRICHISSEMENTS DES FRACTIONS PROTÉIQUES CYTOPLASMIQUES ET NUCLÉAIRES48	
2.9	ESSAIS DE CLIVAGE PAR LA CATHEPSINE B48	
2.10	DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ CATHEPSINE B À L'AIDE D'UN SUBSTRAT FLUOROGÉNIQUE49	
2.11	CONCENTRATION DES MILIEUX CONDITIONNÉS DES DIFFÉRENTES LIGNÉES	
INTESTIN	IALES	
2.12	CLONAGE DE P27 ^{KIP1} , CTSB-FL ET CTSB Δ 52 EN VECTEUR DE TYPE PCDNA 3.150	
2.13	MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE ET CONSTRUCTION DU DOUBLE MUTANT P27KIP1△96-	
100/R1	52A51	
2.14	GÉNÉRATION D'UN SHARN DIRIGÉ CONTRE L'EXPRESSION DE CATHEPSINE B53	
2.14.1	Construction du plasmide pLentiV6-U6/sh-Cathepsine B et de la séquence contrôle	
aléa	atoire	
2.14.2	Production du lentivirus54	
2.14.3	Infection des cellules avec le virus54	
2.15	EXPÉRIENCES DE CROISSANCE CELLULAIRE PAR COMPTAGES DE CELLULES	
2.16	CROISSANCE DE COLONIES CELLULAIRES EN MILIEU SEMI-SOLIDE D'AGAROSE MOU 56	
2.17	EXPÉRIENCES D'INVASION CELLULAIRE EN CHAMBRES DE BOYDEN	
2.18	INJECTION SOUS-CUTANÉE CHEZ LA SOURIS CD1 NU/NU IMMUNODÉFICIENTE	
2.19	INJECTION DANS LA VEINE DE LA QUEUE CHEZ LA SOURIS FOX CHASE SCID BEIGE.58	
2.20	TRAITEMENT AOM-DSS SUR LES SOURIS CATHEPSINE B -/	
2.21	ANALYSES STATISTIQUES	
3	RÉSULTATS60	
3.1	CARACTÉRISATION DU STATUT D'EXPRESSION DE LA CATHEPSINE B DANS LES	
LIGNÉES DE CELLULES CANCÉREUSES COLORECTALES60		
3.1.1	L'expression de la cathepsine B est hétérogène dans les lignées cancéreuses60	
3.1.2	Localisation de l'activité cathepsine B dans les lignées cancéreuses colorectales63	

3.1.3	État de la sécrétion de la cathepsine B par les lignées intestinales normales et	
cancér	euses	
3.1.4	L'expression de la cathepsine B est augmentée dans des échantillons de tumeurs	
colored	tales71	
3.1.5	Expression du variant d'épissage CB (-2;-3) dans les cellules cancéreuses	
colored	stales	
3.2 L/	A CATHEPSINE B EST UN ACTEUR IMPORTANT DE LA TUMORIGÉNÈSE DES CELLULES	
CANCÉREU	SES COLORECTALES: APPROCHE PAR ARN INTERFÉRENCE STABLE	
3.2.1	La croissance sur pétri des cellules cancéreuses colorectales HT-29 et DLD-1 est	
ralentie	e suite à la baisse d'expression de la cathepsine B83	
3.2.2	L'inhibition de l'expression de la cathepsine B diminue la formation de colonies en	
indépe	ndance d'ancrage des cellules cancéreuses colorectales HT-29 et DLD-1	
3.2.3	L'inhibition de l'expression et de l'activité extracellulaire de la cathepsine B réduit les	
capaci	tés invasives des cellules HT-29 et DLD-1 in vitro	
3.2.4	L'inhibition de l'expression de la cathepsine B réduit les capacités tumorigéniques des	
cellules	s HT-29 après injection chez la souris immunodéficiente92	
3.3 É ⁻	IUDE DE LA CARCINOGÉNÈSE COLORECTALE ASSOCIÉE À UNE COLITE CHEZ LE	
MODÈLE MU	JRIN D'INVALIDATION GÉNIQUE TOTALE DE LA CATHEPSINE B : LA SOURIS	
C57BL6/C	rs <i>B^{-/-}</i> 99	
3.4 R	ÉGULATION POST-TRADUCTIONNELLE DE L'INHIBITEUR DU CYCLE CELLULAIRE	
P27 ^{Kip1} PAR LA CATHEPSINE B DANS LES CELLULES CANCÉREUSES COLORECTALES103		
3.4.1	La protéase cathepsine B clive l'inhibiteur p27 ^{Kip1} in vitro et in cellulo	
3.4.2	Distribution subcellulaire des protéines p27 ^{Kip1} et cathepsine B dans les cellules	
normales HIEC et cancéreuses Caco-2/15106		
3.4.3	La génération d'une forme de p27 ^{Kip1} mutante non clivable par la cathepsine B	
augme	nte sa stabilité110	
4 D	ISCUSSION115	

4.1	HÉTÉROGÉNÉITÉ D'EXPRESSION DE LA CATHEPSINE B DANS LES CELLULES		
CANCÉR	EUSES COLORECTALES ET AUGMENTATION DANS LES TUMEURS		
4.2	LA SÉCRÉTION DE LA CATHEPSINE B DANS LES LIGNÉES COLORECTALES NORMALES		
ET CANCÉREUSES120			
4.3	CARACTÉRISATION D'UN VARIANT D'ÉPISSAGE DE LA CATHEPSINE B DANS LES		
CELLUL	ES CANCÉREUSES COLORECTALES122		
4.4	LES SOURIS INVALIDÉES POUR LE GÈNE DE LA CATHEPSINE B NE SONT PAS PLUS OU		
MOINS S	ENSIBLES AU TRAITEMENT COMBINÉ AZOXYMÉTHANE-DSS124		
4.5	CATHEPSINE B ET DÉVELOPPEMENT TUMORAL : APPROCHE ARN INTERFÉRENCE		
STABLE	126		
4.5.1	Mise au point du shARN dirigé contre la cathepsine B		
4.5.2	La cathepsine B intracellulaire favorise la croissance de colonies cellulaires en		
ind	épendance d'ancrage127		
4.5.3	La cathepsine B promeut l'invasion des cellules cancéreuses colorectales		
4.5.4	La cathepsine B promeut le potentiel tumoral des cellules cancéreuses colorectales		
che	z la souris		
4.5.5	La cathepsine B promeut le développement de métastases pulmonaires d'origine		
cole	prectale		
4.5.6	Régulation de l'inhibiteur p27 ^{Kip1} par la cathepsine B dans les cellules cancéreuses		
cole	prectales		
5	CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES137		
5.1	CONCLUSIONS		
5.2	PERSPECTIVES		
6	ANNEXES141		
7	REMERCIEMENTS144		
8	REFERENCES		

Liste des figures

Figure 1.1.3 : Structure de l'axe crypte-villosité intestinal chez les mammifères

Figure 1.1.4: Les rôles de p21^{Cip1} et de p27^{Kip1} dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales.

Figure 1.2.2 : Les caractéristiques propres aux cellules tumorales

Figure 1.2.3 : Les modèles de progression tumorale

Figure 1.3.2.1 : Le «Vogelgramme», un modèle de progression tumorale colorectale linéaire selon Fearon et Vogelstein.

Figure 1.5.1 : Les 5 classes de protéases du dégradome humain et la régulation de leur activation.

Figure 1.5.4.1 : Routage et maturation de la cathepsine B

Figure 1.5.4.5: Les différents types de protéases impliqués dans la dégradation de la MEC.

Figure 2.14 : Carte des différents vecteurs utilisés pour le clonage du shARN dirigé contre la cathepsine B.

Figure 3.1.1 : Statut d'expression de la cathepsine B dans les lignées intestinales en culture.

Figure 3.1.2 : Localisation de l'activité intracellulaire de la cathepsine B.

Figure 3.1.3 : La sécrétion des formes actives et l'activité extracellulaire de la cathepsine B sont augmentées dans les lignées cancéreuses colorectales.

Figure 3.1.5 : Caractérisation de l'expression et de l'activité enzymatique du variant d'épissage ctsb (-2,-3).

Figure 3.2 : Inhibition de l'expression de la cathepsine B dans les lignées colorectales HT-29 et DLD1 par l'utilisation d'un shARN.

Figure 3.2.1 : La croissance sur pétri des cellules cancéreuses HT-29 et DLD1 est ralentie suite à la baisse d'expression de la cathepsine B.

Figure 3.2.2 : L'inhibition de l'expression et de l'Activité cathepsine B inhibe la formation de colonies en indépendance d'ancrage des cellules cancéreuses colorectales HT-29 et DLD1.

Figure 3.2.3 : L'inhibition de l'expression.et de l'activité cathepsine B réduit les capacités invasives des cellules HT-29 et DLD1 *in vitro*.

Figure 3.2.4 : L'inhibition de l'expression de la cathepsine B réduit les capacités tumorigéniques des cellules HT-29 après injection chez la souris immunodéficiente.

Figure 3.2.5 : L'inhibition de l'expression de la cathepsine B réduit les capacités métastatiques des cellules HT-29 après injection chez la souris immunodéficiente.

Figure 3.3 : Non-incidence de la perte du gène codant la cathepsine B sur la charge tumorale induite par un traitement à long terme à l'AOM-DSS.

Figure 3.4.1 : La protéase cathepsine B clive l'inhibiteur p27^{Kip1} in vitro

Figure 3.4.2 : La protéine p27^{Kip1} et la cathepsine B colocalisent dans les cellules Caco2/15.

Figure 3.4.3 : La génération d'une forme de p27^{Kip1} mutant non clivable par la cathepsine B augmente sa stabilité.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales caractéristiques des lignées épithéliales au cours de ces travaux.

 Tableau 2 : Programme PCR utilisés pour les mutagénèses par extensions d'amorces.

Tableaux annexes : Liste des anticorps utilisés ee immunobuvardages et enimmunofluorescence et listes des amorces utilisées pour les PCR quantitatives.

Liste des abréviations

AFC Amino-4-tri-Fluoromethyl Coumarine AOM AzOxyMéthane APC Adenomatous Polyposis Coli BCA **Bicinchoninic Acid** BSA **Bovine Serum Albumine** CDK Cyclin-Dependent Kinase CHX Cycloheximide CIMP CpG Island Methylator Phenotype CIN Chromosomal INstability CIP Cdk-Inhibitory Protein CKI Cyclin-dependant Kinase Inhibitor CMV Cyto-Mégalo Virus ctsB Cathepsine B ctsB-FL Cathepsin B Full Length DAPI 4', 6'-DiAmidino-2-PhénylIndole DCC **Deleted in Colorectal Cancer** DHFR DiHydroFolate Reductase DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium DMSO Dimethylsulfoxyde DSS Dextran Sodium Sulfate DTT Dithiothréitol

- EBS Ets-Binding Sequence
- **EGF** Epidermal Growth Factor
- ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- **ERK** Extracellular signal-Regulated Kinase
- **ETS** E-twenty-six Transcription Factor
- **FAP** Familial Adenomatous Polyposis
- SVF Sérum de veau foetal
- FITC Fluorescéine IsoThioCyanate
- **GSK3** Glycogen Synthase Kinase-3
- **GST** Glutathion-S-Transferase
- H&E Hématoxyline & Éosine
- HA HémAglutinine
- **HEK** Human Embryonic Kidney
- **HIEC** Human Intestinal Epithelial Cells
- HNPCC Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
- HRP HorseRadish Peroxydase
- Ig ImmunoGlobuline
- INK4 INhibitor of CDK4
- IP ImmunoPrécipitation
- **IPTG** IsoPropyl-1-Thio-β-D-Galactopyranoside
- **KIP** Kinase Inhibitory Proteins
- **KPC** Kip1 ubiquitinylation-Promoting Complex
- **KRAS** Kirsten RAt Sarcoma viral oncogene homolog

LB	Luria-Berthani
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MIN	Multiple Intestinal Neoplasia
MMP	Matrix Metalloproteinase
ΜΜΤν	Mouse Mammary Tumor Virus
MSI	MicroSatellite Instability
МТТ	bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localization Signal
ΡΑ	Phosphatase Alcaline
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCDE	Primary Culture of Differentiated Enterocytes
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PFA	ParaFormAldéhyde
PI3K	PhosphatidyIInositide 3-Kinase
PMSF	PhenylMethylSulfonyle Fluoride
PTEN	Phosphatase et TENsin homolog
PVDF	PolyVinyliDene Fluoride
РуМТ	Polyoma-virus Middle T antigen
RE	Réticulum Endoplasmique
RIPA	RadioImmunoPrecipitation Assay

- **RTPCR** Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
- SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
- shRNA Small Hairpin Ribonucleic Acid
- SKP-2 S-phase Kinase-associated Protein-2
- **SMAD** Sma/Mothers Against Decapentaplegic
- TCF T-Cell transcription Factor
- **TEM** Transition Épithelio-Mésenchymateuse
- **TGF** Transforming Growth Factor
- **TGF** β Transforming Growth Factor β
- TIMP Tissue Inhibitor of MetalloProteinase
- tPA Tissue Plasminogen Activator
- ts-FHI Temperature-sensitive Fetal Human Intestinal cell
- **uPAR** Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor
- **VEGF** Vascular Endothelial Growth Factor
- VSVG Vesicular Stomatitis Virus G

1 INTRODUCTION

1.1 L'épithélium intestinal

1.1.1 Le tube digestif

La principale fonction de l'intestin est d'assimiler et d'absorber les nutriments provenant de la prise alimentaire afin de les faire passer dans la circulation sanguine et lymphatique. Le tube digestif s'assure, par ailleurs, d'éliminer les aliments non assimilables. Cependant, en plus de sa fonction d'absorption, l'intestin participe aussi aux défenses immunitaires de l'organisme ainsi qu'à l'homéostasie endocrinienne. Le tube digestif humain adulte mesure environ 7,5 m et il est composé de quatre enveloppes (ou tuniques) : la muqueuse, la sousmuqueuse, la musculeuse ainsi que la séreuse (à l'extérieur). La muqueuse intestinale est composée d'un épithélium de revêtement simple et cylindrique qui repose sur du tissu conjonctif nommé la sous-muqueuse ou encore le chorion. Ce tissu conjonctif est très riche en vaisseaux sanguins ainsi qu'en vaisseaux lymphatiques. En plus de ces deux composantes, il contient les plexus nerveux de Meissner (ou plexus sous-mugueux) qui sont un vaste réseau nerveux, important pour les fonctions sensitives, motrices et sécrétoires du tube digestif. La couche musculeuse est composée de deux feuillets de cellules musculaires lisses : l'un est circulaire et l'autre est longitudinal et interviennent tous les deux dans le péristaltisme intestinal afin d'expulser les selles. Enfin, la tunique externe du tube digestif est composée d'un type de tissu conjonctif lâche aux extrémités du tractus digestif ce qui rend la tunique solidaire des autres organes (l'adventice). En revanche, entre ces deux extrémités, ce tissu conjonctif est tapissé sur son versant externe par un épithélium simple (le mésothélium) qui constitue le feuillet viscéral de la séreuse péritonéale (Young et al., 2000). Selon l'axe craniocaudal, le tractus digestif se divise en trois parties majeures : les éléments de la cavité buccale (dents, langue, glandes salivaires), l'œsophage, l'estomac, les éléments du petit et du gros intestin et, enfin, les glandes annexes (foie, pancréas, vésicule biliaire, etc.). La composante intestinale du tube digestif s'étend de la sortie de l'estomac jusqu'au rectum et se divise en deux parties : l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et le côlon qui comprend le cæcum ou appendice, le côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde et enfin, le rectum. Leur fonction principale est d'assimiler l'eau et les nutriments alimentaires en les faisant passer dans le sang. Par ailleurs, l'intestin abrite des centaines de milliers de micro-organismes, pour la plupart, d'origine bactérienne, qui constituent le microbiote intestinal qui est nécessaire à la digestion de substances indigestes pour l'humain comme la cellulose, d'origine végétale, ou encore les tissus cartilagineux. Une autre fonction importante de la flore intestinale est la synthèse de vitamine K (Resta, 2009) que le corps humain ne peut produire seul. L'intestin grêle poursuit la digestion des aliments initiée par l'estomac. Son rôle est de dégrader les macromolécules (protéines, glucides et lipides) en molécules plus petites et capables de diffuser ou encore d'être transportées au travers de l'épithélium intestinal. Il est à noter que pour réaliser ces processus, l'intestin grêle a besoin d'une large zone d'échange avec le sang qui est permise grâce à la multitude de plis (les valvules conniventes) et de villosités qui permettent d'augmenter d'un facteur 600 la surface de contact et d'échange avec la circulation systémique. La fonction principale du côlon, quant à elle, est la récupération d'eau et de sels minéraux à partir des résidus de l'intestin grêle ainsi qu'à l'évacuation des matières fécales par les mouvements péristaltiques (Carey, 1977).

1.1.2 Structures de l'épithélium intestinal et colique

L'épithélium intestinal est formé d'une simple couche de cellules recouvrant la face externe de la muqueuse de l'intestin ; ce feuillet cellulaire est une structure à renouvellement rapide (3 à 5 jours). Outre son rôle important d'absorption des nutriments, l'épithélium de l'intestin constitue, comme tous les types de muqueuses, l'unique barrière protégeant l'organisme de l'environnement extérieur. Dans le cas de l'intestin grêle, son épithélium recouvre une multitude de protubérances digitiformes projetées vers la lumière et correspondant aux villosités intestinales. On peut observer, entre ces villosités, des invaginations en structures tubulaires : les cryptes glandulaires de Lieberkühn. En revanche, au niveau du côlon, l'épithélium recouvre des structures glandulaires invaginées et

tubuleuses d'apparence cryptale dont les bases reposent sur la musculeuse. Ces glandes sont espacées par du chorion recouvert d'un épithélium plat et de surface (Humphries and Wright, 2008).

1.1.3 Les quatre types cellulaires majoritairement rencontrés dans l'épithélium intestinal

L'intestin grêle et le côlon sont deux éléments distincts du tube digestif qui possèdent des caractéristiques structurelles adaptées à leurs fonctions propres notamment du point de vue de l'absorption et de la digestion. La majeure partie de l'assimilation des nutriments se déroule dans l'iléon au niveau des villosités intestinales. Celles-ci représentent le compartiment différencié de l'épithélium. Elles sont essentiellement composées de cellules post-mitotiques et spécialisées que l'on peut regrouper en 4 types distincts (schéma 1). Les entérocytes représentent la grande majorité (95 %) des cellules épithéliales intestinales. Ces cellules sont les cellules absorbantes de la villosité. Les cellules caliciformes ou cellules à mucus sont, comme leur nom l'indique, des productrices de mucus nécessaire à la protection de la mugueuse ainsi qu'à sa lubrification. Les cellules entéroendocrines sont quant à elles responsables de la sécrétion d'hormones digestives vers la circulation sanguine chorionique. Enfin, les cellules de Paneth sont les seules cellules différenciées du compartiment cryptal. Elles servent à protéger l'épithélium par la sécrétion de facteurs antibactériens comme le lysozyme. Dans le cas du côlon, ses fonctions majeures sont d'achever la digestion du chyme alimentaire non digéré par l'intestin grêle, mais aussi de réabsorber l'eau contenue dans les fèces ainsi qu'à leur évacuation contrôlée. La muqueuse colique est composée d'un épithélium de revêtement, plat en surface et qui s'invagine dans les glandes de Lieberkühn. Ces glandes sont très riches en cellules à mucus dont la densité augmente vers la portion distale du côlon. En effet, les selles étant de plus en plus déshydratées, il y a nécessité d'une plus grande quantité de mucus afin de protéger la muqueuse. Les entérocytes ou colonocytes se font de moins en moins nombreux en portion distale du côlon. Enfin, le chorion sous-muqueux est très riche en tissus lymphoïdes (lymphocytes et follicules lymphoïdes) (Crosnier et al., 2006).



Figure 1.1.3.: Structure de l'axe crypte-villosité intestinal chez les mammifères

L'unité fonctionnelle de l'épithélium intestinal est composée de la crypte de Lieberkühn (compartiment de prolifération) au sein de laquelle les cellules souches et les précurseurs prolifératifs, en voie de différenciation, vont alimenter la villosité (compartiment fonctionnel) en cellules pleinement différenciées qui sont en majorité des entérocytes (cellules absorbantes) et en cellules sécrétrices de types mucineux (cellules à goblet), cellules entéroendocrines et cellules de Paneth. Il est à noter que ces dernières sont les seules cellules différenciées du compartiment cryptal suite à leur migration rétrograde. Par ailleurs, elles sont totalement absentes dans le côlon (Young et al., 2000).

1.1.4 L'axe crypte-villosité et le renouvellement de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal, tout comme l'épiderme ou encore le système hématopoïétique, est un tissu dynamique en constant renouvellement. L'axe crypte-villosité constitue son unité fonctionnelle et permet d'y définir un compartiment de prolifération : la crypte, où les cellules souches y donnent naissance à des précurseurs prolifératifs. Ces cellules progénitrices s'engagent alors dans une des quatre voies de différenciation décrites précédemment (Peifer, 2002; Pinto et al., 2003). La villosité, quant à elle, constitue le compartiment différencié au sein duquel, les cellules épithéliales sont pleinement fonctionnelles et sorties de leur cycle cellulaire. Les processus de transit cellulaire entre la crypte et la villosité impliquent donc des régulations fines des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, plusieurs études ont pu démontrer que la dérégulation de la prolifération de cellules cryptales peut être néfaste et figure notamment à l'origine du cancer.

Le cycle cellulaire des cellules de mammifères est une succession de quatre phases (G1, S, G2 et M). Chacune de ces phases ne peut débuter avant que la précédente ne soit achevée et leur succession est régie par l'activité de kinases dépendantes des cyclines : les CDK. L'activation des CDK est dépendante de certaines modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations mais principalement par leur association avec les cyclines qui sont considérées comme les sous-unités régulatrices de ces complexes CDK/Cyclines (Obaya and Sedivy, 2002). Il existe notamment les cyclines de la phase G1 et de la transition G1/S (par exemple cyclines C, D1-3, E) ainsi que les cyclines mitotiques (par exemple cyclines A et B) qui interviennent dans la transition G2/M et pendant la mitose. Les complexes CDK/cyclines responsables du passage à la phase de synthèse de l'ADN peuvent être réprimés par une famille d'inhibiteurs et parmi eux, les inhibiteurs p21^{Cip1} et p27^{Kip1} (Besson et al., 2008). Ces protéines ont été rapportées comme étant des facteurs clés dans les mécanismes de sortie du cycle cellulaire et d'entrée en différenciation des cellules épithéliales intestinales lors de la migration des cellules depuis les cryptes vers les villosités (Tian and Quaroni, 1999). Selon les travaux des Drs Tian et Quaroni, lors de la différenciation de la lignée immortalisée de cellules épithéliales intestinales tsFHI, les inhibiteurs p21^{Cip1} et p27^{Kip1} sont fortement induits et stabilisés (Tian and Quaroni, 1999).

Dans cette étude, les niveaux de p21^{Cip1} augmentent rapidement, mais de manière transitoire tandis que ceux de p27^{Kip1} augmentent plus lentement, mais de manière soutenue. D'après ces données, les auteurs suggèrent que p21^{Cip1} serait l'inhibiteur responsable de l'arrêt irréversible du cycle cellulaire tandis que p27^{Kip1} serait impliqué dans le maintien de certaines fonctions de différenciation, et ce, indépendamment de son statut d'inhibiteur de complexes CDK/cyclines.

Par ailleurs, les travaux de l'équipe de la Pre Rivard ont permis de démontrer un rôle important de p27Kip1 dans la différenciation de cellules épithéliales intestinales. En effet, l'équipe a observé que l'expression de p27Kip1 augmentait fortement lors de la différenciation des cellules de l'épithélium intestinal, au contraire de l'expression des deux autres inhibiteurs p21^{Cip1} et p57^{Kip2} qui reste stable (Deschenes et al., 2001). Des analyses de co-immunopréciptations ont confirmé que p27Kip1 était le principal inhibiteur lié à la kinase CDK2 durant la différenciation. De plus, l'équipe a montré que son expression était requise non seulement pour l'arrêt du cycle cellulaire nécessaire à la différenciation mais également pour l'expression de marqueurs de différenciation tels que la sucraseisomaltase. En effet, la même équipe a montré que p27Kip1 inhibait la phosphorylation de CDX2 par CDK2 dans les cellules intestinales qui se différencient, empêchant ainsi sa dégradation dans le protéasome. La protéine CDX2 est un facteur impliqué dans la transcription de gènes spécifiques de la différenciation entérocytaire (Boulanger et al., 2005). Toutes ces données obtenues suggèrent que p21^{Cip1} et p27^{Kip1} sont des éléments centraux dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales lors de leur transit crypto-villositaire. Les deux protéines semblent mener conjointement à l'arrêt irréversible du cycle cellulaire tandis que p27^{Kip1}, en stabilisant indirectement CDX2, participerait au maintien de l'état différencié des entérocytes.



Figure 1.1.4 : Les rôles de p21^{Cip1} et p27^{Kip1} dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales

Les cellules progénitrices, situées au tiers supérieur de la crypte ont la capacité d'exprimer l'inhibiteur p21^{Cip1}. L'expression de p21^{Cip1} aurait pour conséquence de limiter le nombre de divisions cellulaires et serait aussi responsable de l'arrêt définitif de la prolifération de ces cellules à la base de la villosité. Dès leur entrée dans le compartiment villositaire, les cellules expriment de hauts niveaux de p27^{Kip1} qui joueraient un rôle important dans le maintien de l'état non prolifératif initié par p21^{Cip1} et dans le maintien des processus de différenciation par stabilisation du facteur de transcription CDX2 (*Boulanger et al. JBC 2005*) (Tiré et adapté de *Tian et Quaroni, Am J Physiol Cell Physiol 2000*).

1.2 Le cancer

1.2.1 Généralités

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), les cancers sont une des causes majeures de décès dans le monde. Ces maladies sont à l'origine de 7,6

millions de décès en 2008, soit 13 % de la mortalité mondiale (Ferlay et al., 2010). D'après les estimations, la mortalité due aux cancers va continuer à augmenter pour dépasser 13,1 millions de décès en 2030. Le cancer est une maladie complexe qui peut atteindre tous les types de tissus du corps humain. Il est d'abord caractérisé par une prolifération importante et incontrôlée des cellules au sein d'un tissu normal ce qui est nocif pour son homéostasie et sa survie. Ces pathologies se développent à partir d'accumulations d'altérations de l'ADN qui sont engendrées par certains facteurs (génétiques, héréditaires et/ou environnementaux) qui vont finir par induire la transformation de la cellule touchée (tumorigénèse ou initiation tumorale) et sa progression vers un cancer avancé (Bishop, 1991). On compte à l'heure actuelle environ 350 gènes répertoriés l'initiation à comme participant à et la progression tumorale (http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/). Il est connu qu'en plus des altérations génétiques rencontrées au niveau de ces gènes (mutations, délétions, translocations), peuvent s'ajouter, dans le contexte de transformation tumorale, des variations d'ordre épigénétiques comme des méthylations de l'ADN et des acétylations d'histones (Yoo and Jones, 2006). Il semblerait, par ailleurs, qu'il existe au sein d'une tumeur, certaines cellules cancéreuses possédant des caractéristiques de cellules souches en termes de renouvellement et de différenciation. En 2007, une étude de Kelly et collaborateurs a proposé l'hypothèse selon laquelle ces cellules ont la capacité d'initier une tumeur maligne. Elles participeraient à la croissance de la tumeur en lui fournissant constamment de nouvelles cellules cancéreuses matures et différenciées (Kelly et al., 2007). En 2012, trois études viennent confirmer cette hypothèse dans les modèles murins de cancers colorectaux, de glioblastomes et de cancers de la peau (Chen et al., 2012; Driessens et al., 2012; Schepers et al., 2012).

1.2.2 Les caractéristiques d'une cellule tumorale

Lors de la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse, certains changements d'ordre génétique vont mener à l'acquisition d'un caractère « *malin* » pouvant ou non apporter un avantage sélectif et prolifératif. En 2000, Hanahan et Weinberg ont proposé six caractéristiques « darwinistes », propres aux cellules

tumorales illustrées dans la figure 1.2.2 : 1. La cellule cancéreuse n'est plus dépendante des signaux extérieurs pro-prolifératifs. Elle sécrète des facteurs autocrines et paracrines et expriment leurs récepteurs adaptés (exemples du PDGF et du TGF β) afin de proliférer constamment. Par ailleurs, les cellules tumorales peuvent activer constitutivement certaines voies mitogéniques par autoactivation de récepteurs en amont qui sont indépendants de leurs propres ligands (exemple de l'amplification du récepteur à l'EGF dans les cancers colorectaux). 2. La cellule cancéreuse ne répond plus aux signaux antiprolifératifs. Par exemple, la perte de fonction des « pocket proteins » de type Rb, souvent due à des mutations, mène à un relargage massif et incontrôlé des facteurs de transcription E2F, des inducteurs de plusieurs gènes contrôlant la synthèse de l'ADN (Poznic, 2009). Par ailleurs, la perte de fonction du gène APC dans les cancers colorectaux induit le relargage d'une forme active et stabilisée de la β-caténine qui transloque dans le noyau menant à des programmes transcriptionnels pro-prolifératifs (Morin et al., 1997). Enfin, la perte d'expression par mutation, méthylation ou dégradation d'inhibiteurs du cycle cellulaire comme p15^{INK4B} et p27^{Kip1} promeut là aussi une augmentation de la croissance des cellules tumorales (Yew, 2001). 3. La cellule tumorale a la capacité d'échapper aux processus de mort cellulaire programmée (apoptose) en exacerbant ses de survie et en inactivant les senseurs et effecteurs signaux proapoptotiques (Harris, 1996). Par exemple, l'effecteur pro-apoptotique Bax est retrouvé muté dans certains cancers colorectaux avec instabilité aux microsatellites ce qui a pour effet de rendre les cellules en partie résistantes aux processus apoptotiques (Miquel et al., 2005) 4. La cellule tumorale a un potentiel réplicatif illimité. En effet, les cellules tumorales sont la plupart du temps immortalisées suite à l'activation de la télomérase qui maintient la taille des



В.



Figure 1.2.2 : Les caractéristiques d'une cellule tumorale selon Hanahan et Weinberg

A : En 2000, six capacités distinctives des cellules tumorales ont été décrites par Hanahan et Weinberg. B : En 2011, les auteurs ont mis à jour ces caractéristiques par l'addition de deux facteurs émergents que sont les **dérégulations métaboliques** ainsi que l'**immunoévasion**. Par ailleurs, les **instabilités génomiques** et **l'inflammation** sont deux caractéristiques acquises précocement dans la tumorigénèse et seraient sans soute les causes de l'émergence des autres caractéristiques citées précédemment. télomères à chaque division (Blackburn, 2011; Hayflick, 1997). **5. La cellule tumorale soutient la néoangiogénèse par sécrétion soutenue de facteurs proangiogéniques comme le VEGF (Rapisarda and Melillo, 2012). 6. La cellule tumorale a la capacité d'envahir et de métastaser.** Les cellules tumorales ont la capacité de survivre même sans ancrage à la matrice et de remodeler leur propre matrice extracellulaire par protéolyse pour s'échapper et coloniser un tissu cible (Gupta and Massague, 2006).

En 2011, Hanahan et Weinberg ont mis à jour la liste des capacités distinctives des cancers. Ils y ont additionné deux nouvelles caractéristiques des cancers que sont, d'une part, la **dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire** accompagnant une croissance cellulaire prolongée et une prolifération exacerbée. D'autre part, une caractéristique nouvelle des cellules cancéreuses est **l'échappement aux programmes de surveillance par le système immunitaire** qui va permettre aux tumeurs de se développer sans être éliminées par le système d'immunosurveillance. Enfin, ces auteurs spécifient deux caractéristiques supplémentaires favorisant les cancers mais qui ne sont pas considérées comme étant des capacités distinctives. Il s'agit de **l'inflammation** favorisant la croissance tumorale ainsi que **l'instabilité génomique** qui serait la cause de l'acquisition de certaines caractéristiques tumorales énoncées précédemment, comme par exemple les potentiels réplicatifs illimités.

1.2.3 Les étapes de la carcinogenèse

La carcinogenèse est un processus caractérisé par trois étapes majeures. Lors de l'initiation tumorale, certaines cellules sont exposées à des carcinogènes (le plus souvent d'origine chimique ou pathogène) à une dose suffisante pour initier leur caractère hyper prolifératif. Ensuite, l'étape de promotion tumorale survient quand l'exposition à ces carcinogènes devient soutenue et dépasse un seuil critique. Il y a alors une sélection clonale des cellules déjà initiées. Enfin l'étape de transformation maligne et de progression vers un phénotype plus agressif au cours de laquelle les cellules subissent des désordres génétiques et épigénétiques. Ces altérations conduisent dans la majorité des cas à un avantage

sélectif de ces clones cellulaires qui ont la capacité de former une tumeur avancée et métastatique.

À ce jour, il existe deux modèles connus d'interprétation de la progression tumorale vers l'émergence de métastases. Le modèle de progression tumorale linéaire et le modèle de progression tumorale parallèle.

Le modèle de progression linéaire : Ce modèle a été proposé à l'origine par Leslie Foulds et collaborateurs en 1958. Selon Foulds, les cellules tumorales accumulent une série d'altérations génétiques jusqu'à l'acquisition d'un caractère propre à former un cancer complètement malin. L'émergence de métastases serait un processus tardif où certaines cellules auraient la capacité de se détacher de leur lame basale et de s'échapper dans la circulation sanguine (Klein, 2008). Selon Weinberg et collaborateurs, les cellules métastatiques pourraient disséminer dans la circulation sanguine et lymphatique jusqu'à l'atteinte d'une masse limite et létale de la tumeur primaire d'environ 1 kg (soit 10¹² à 10¹³ cellules). Dès lors de la colonisation des tissus cibles, ces métastases primaires peuvent à leur tour générer des métastases secondaires, beaucoup plus agressives (Weinberg, 2008) et ainsi de suite.

Le modèle de progression parallèle : Dans ce modèle, il est proposé que l'initiation des métastases survient très précocement et bien avant que la tumeur primaire ait fini son programme de transformation. Cette progression métastatique se déroulerait en parallèle de la progression de la tumeur primaire et serait déjà initiée avant l'apparition des premiers signes de manifestation du cancer (Friberg and Mattson, 1997).

En 2002, une étude épidémiologique réalisée sur un groupe de 12 000 patientes atteintes de cancers mammaires stipule que les métastases seraient initiées cinq à sept ans avant l'apparition de la tumeur primaire (Engel et al., 2003). Parallèlement à la progression de la tumeur primaire, les métastases pourraient entrer en dormance pendant de longues années avant leur apparition clinique (Aguirre-Ghiso, 2007). De plus, une étude de Podsypanina et collaborateurs parue dans la revue Science, a rapporté que des cellules épithéliales mammaires

A



В



Figure 1.2.3 : Les modèles de progression tumorale linéaire et parallèle

A) Dans le modèle de propagation linéaire des cellules tumorales, au stade du diagnostic de la tumeur primaire, certaines cellules métastatiques pourraient être sélectionnées et disséminer pour former des métastases primaires puis secondaires. Lors de la progression de la tumeur primaire, celle-ci continuerait à générer des cellules métastatiques jusqu'au décès du patient. **B)** D'après ce modèle de progression parallèle, la tumeur primaire pourrait générer des cellules métastatiques de manière très précoce (d'une taille approximative de 1 à 4 mm). Ces métastases pourraient croître dans différents tissus cibles en parallèle à la tumeur primaire (Tiré de *Klein, Nat Rev Cancer 2009, autorisation no : 3347171198056*).

non transformées et injectées dans la veine de la queue de souris peuvent établir résidence dans les poumons. Suite à l'activation d'oncogènes tels que c-myc ou KRAS dans ces cellules par l'ajout de doxycycline dans la diète, ces cellules développent rapidement des lésions métastatiques pulmonaires sans avoir formé au préalable de tumeur primaire. Cette étude suggèrent donc que la dissémination métastatique peut précéder la tumorigénèse à un site primaire (Podsypanina et al., 2008). Dans le cas des cancers d'origine épithéliale, on a longtemps pensé que la dissémination de cellules métastatiques était un processus final succédant au programme d'altérations génétiques. Les travaux d'A. Weinberg, l'un des pionniers dans la compréhension des mécanismes de carcinogénèse, proposent que des anomalies génétiques supplémentaires touchent certaines cellules tumorales primaires en leur conférant la capacité à s'échapper et à métastaser (Weinberg, 2008). En effet, un programme complexe connu sous le nom de transition épithélio-mesenchymateuse (TEM) permettrait l'activation de certains facteurs de transcription agissant sur l'acquisition des caractères invasifs et métastatiques chez les cellules tumorales encore bénignes. La T.E.M. a initialement été caractérisée comme étant importante lors de processus développementaux de gastrulation chez les métazoaires (Stern, 1992), mais encore dans les programmes de réparation des blessures épithéliales (e.g. cicatrisation). L'invasion des cellules cancéreuses en phase de T.E.M. se traduit par la surexpression et la sécrétion de certaines familles de protéases qui vont leur permettre de réorganiser leur matrice extracellulaire. Par ailleurs, ces cellules perdent l'expression de leurs protéines de jonctions cellulaires et de cohésion de leur cytosquelette comme la E-cadhérine ou la cytokératine (Thiery, 2002). Tous ces phénomènes font passer la cellule cancéreuse d'un état sédentaire à un état mobile et invasif traduisant son agressivité. Il a été montré que certains récepteurs d'autoguidage ou de « homing » spécifiques à certains organes sont exprimés par les cellules métastatiques ce qui leur permet d'atteindre et d'envahir ces tissus cibles spécifiques (Fidler, 2003).

1.3 Le cancer colorectal

1.3.1 Généralités

Selon la société canadienne du cancer, le cancer colorectal est classé au troisième rang, en matière d'incidence, des cancers dans le monde. En 2012, on estime que 23 300 Canadiens ont reçu un diagnostic de cancer colorectal et que 9 200 personnes en sont décédées (statistiques canadiennes sur le cancer 2012, http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/canadian-cancer-

statistics-publication). Ce type de cancer touche dans 60 % des cas le côlon et dans 40 % des cas le rectum. Il est généralement initié depuis des polypes adénomateux dans la muqueuse colorectale. Beaucoup d'études ont pu montrer que ce type de cancer est souvent associé à des facteurs de risques comme l'âge, l'hérédité, les habitudes alimentaires et la présence conjointe de maladies d'origine inflammatoire. Parmi les symptômes causés par la maladie, on note la présence de douleurs abdominales associées à des saignements de la muqueuse colorectale. Ces phénomènes sont accompagnés d'anémie générale et peuvent conduire à des perforations de la muqueuse (Tsai et al., 2007).

1.3.2 Les origines génétiques du cancer colorectal

D'un point de vue morphologique, les tumeurs colorectales sont assez homogènes puisqu'environ 85% des cancers colorectaux sont des adénocarcinomes (Laurent-Puig et al., 2010). Malgré cela, l'essor des techniques de biologie moléculaire a permis de mieux comprendre l'origine génétique de ces cancers. De manière générale, on peut les classer selon deux grandes familles :

- <u>Les cancers colorectaux héréditaires</u> (d'origine familiale) qui sont la conséquence de mutations germinales à forte pénétrance. Ce type de cancer est assez rare et représente environ 5 % des cancers colorectaux avec d'une part la polypose adénomateuse familiale (FAP) dans 0,1 % des cas et d'autre part, les cancers colorectaux héréditaires sans polypose (HNPCC) dans 3 à 4 % des cas (Kinzler and Vogelstein, 1996).

- <u>Les cancers colorectaux sporadiques</u>, c'est-à-dire issus de mutations somatiques spontanées, sont les formes les plus répandues de cancers

colorectaux et représentent plus de 95% des cas.

1.3.2.1 Le modèle génétique de Fearon et Vogelstein

Au début des années 1990, un premier modèle génétique de carcinogénèse colorectale est proposé (Fearon and Vogelstein, 1990). Ce modèle suggère que le passage d'un épithélium intestinal normal vers un épithélium cancéreux impliquerait l'activation de certains oncogènes et en parallèle, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur selon une séquence précise certains (figure1.3.2.1). L'accumulation séquentielle de ces altérations génétiques permettrait aux cellules tumorales d'acquérir un potentiel métastatique. Ce modèle génétique a été proposé suite à l'étude moléculaire comparative des statuts génétiques d'épithéliums intestinaux adénomateux normaux, et adénocarcinomateux.



Figure 1.3.2.1 : Le « vogelgramme », un modèle de progression tumorale colorectale linéaire, selon Fearon et Vogelstein

La tumorigénèse colorectale implique une série d'altérations génétiques touchant l'oncogène KRAS et aussi certains suppresseurs de tumeur comme APC, DCC et p53. Ces altérations vont induire la sélection clonale de cellules hyper-prolifératives et la formation d'adénomes et d'adénocarcinomes. L'ordre d'apparition de ces altérations génétiques n'est pas immuable et il semblerait que leur accumulation soit plus importante que leur succession dans la genèse des cancers colorectaux (Adapté de *Fearon et Vogelstein, Cell 1990*)

Depuis peu, la caractérisation des deux grandes voies de carcinogénèse colorectale correspondant aux instabilités chromosomiques d'une part (CIN) et aux instabilités aux microsatellites (MSI) d'autre part, a permis de réviser la séquence d'apparition des différentes mutations tout en reconnaissant l'importance de leur accumulation séquentielle. Il existe trois types d'altérations génétiques colorectales se traduisant sur le plan phénotypique tumoral par l'existence d'instabilité chromosomique (phénotype CIN), une instabilité aux microsatellites (phénotype MSI) et enfin une hyperméthylation des ilots CpG dans certains gènes de réparation de l'ADN (phénotype CIMP) (Worthley and Leggett, 2010).

1.3.2.2 Caractéristiques moléculaires CIN

L'instabilité chromosomique est le phénotype tumoral le plus fréquemment rencontré dans les cancers colorectaux (environ 80 % des cancers sporadiques). Il est caractérisé par l'émergence de pertes alléliques importantes situées majoritairement sur les bras courts des chromosomes 8 et 17 ainsi que sur les bras longs des chromosomes 5, 18 et 22. Ces altérations génétiques sont fréquemment associées à des mutations « perte de fonctions » retrouvées sur les gènes codant pour des suppresseurs de tumeur comme APC (adenomatous polyposis coli) ou encore TP53 qui participent à leur perte bi allélique (Grady, 2004). Par ailleurs, il a été montré que dans les types de tumeurs colorectales CIN, il est fréquent d'observer certaines anomalies de ségrégation chromosomique conduisant à l'aneuploïdie (contenu anormal en ADN) (Fodde et al., 2001b). Bien que ces mécanismes soient encore largement incompris, la perte d'apc pourrait en expliquer la cause. En effet, en plus de son rôle antiprolifératif, la protéine APC a été montrée comme jouant un rôle dans la ségrégation chromosomique en participant au maintien de la polymérisation des microtubules. Par ailleurs, APC peut se lier à la protéine BUB1 (budding uninhibited by benzimidazoles 1) qui, elle-même, est associées aux kinétochores des chromosomes (Fodde et al., 2001a).

1.3.2.3 Caractéristiques moléculaires MSI

Un autre groupe de cancers colorectaux est caractérisé par la présence d'instabilités des locus microsatellites liées à des défauts de réparation des mésappariements de l'ADN. Dans les cas de cancers sporadiques, ces défauts de réparations sont liés à l'hyperméthylation du promoteur du gène hMLH1 (Herman et al., 1998). En revanche, dans le cas des syndromes de Lynch, la défaillance du système de réparation de l'ADN fait intervenir des mutations sur les gènes hMSH2, hMLH1, hMSH6 et PMS2 et sont rencontrées dans environ 15% des cancers colorectaux non sporadiques et l'inactivation d'apc et de tp53 y est moins fréquente que dans les tumeurs à phénotype CIN (Olschwang et al., 1997). Les défaillances des systèmes de réparation de l'ADN sont à l'origine de l'accumulation de mutations secondaires au niveau des séguences microsatellites qui peuvent être délétères si ces dernières se situent sur des séquences codantes de l'ADN. Certains gènes importants intervenant dans le contrôle de la prolifération, de l'apoptose ainsi que dans la réparation de l'ADN peuvent être inactivés par la survenue de mutations dans ces séquences codantes répétées que sont les microsatellites. À titre d'exemples, les mutations du récepteur de type II du TGF (transforming growth factor), des facteurs de transcription TCF-4 (Transcription Factor 4) et E2F4 ainsi que le gène pro-apoptotique Bax sont associées aux cancers de type MSI (Duval and Hamelin, 2002).

1.3.2.4 Caractéristiques moléculaires CIMP

Certaines anomalies de la méthylation de l'ADN sont caractéristiques de certains cancers colorectaux. Ces anomalies épigénétiques touchent essentiellement les cytosines des ilots CpG de certains gènes importants dans le contrôle de la prolifération comme l'inhibiteur de complexes Cycline D-CDK4/6, la protéine p16^{INK4A} (Issa, 2004; Kondo and Issa, 2004). En effet, l'hyperméthylation du gène *CDKN2A* est retrouvée dans 26% des cancers colorectaux (Barault et al., 2008a). Par ailleurs, la caractéristique CIMP n'est pas complètement indépendante des caractéristiques CIN et MSI. En effet, le promoteur du gène *hMLH1* est fréquemment hyperméthylé lorsque les tumeurs ont un phénotype

MSI+. Ce double phénotype MSI+ ; CIMP+ est d'ailleurs une caractéristique rare de certains cancers sporadiques.

Finalement, il est important de mentionner que bien que ces trois mécanismes d'altérations génétiques précédemment décrits soient différents, les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la transformation des cellules épithéliales coliques sont généralement similaires.

1.3.3 Les principales voies de signalisation et leurs altérations dans les cancers colorectaux.

1.3.3.1 La voie canonique Wnt/β-caténine

La protéine APC est un régulateur négatif important de la signalisation Wnt/βcaténine. L'altération de son gène est responsable des polyposes adénomateuses familiales (PAF) et il est muté dans 60 à 80% des cancers colorectaux de phénotype CIN (Powell et al., 1992). Le premier évènement de mutation inactive un des deux allèles d'APC par délétion ou insertion de guelgues bases dans le gène ce qui donne naissance à une protéine tronquée (Laurent-Puig et al., 1998). Le second évènement de mutation est soit la perte de l'autre bras court du chromosome 5 contenant l'autre allèle d'APC ou encore la présence d'une autre mutation sur ce même allèle. Il a été démontré qu'APC est un régulateur négatif de la signalisation Wnt/ β -caténine par son interaction directe avec la β -caténine. Après une stimulation de cette voie par les facteurs Wnt qui sont principalement d'origine mésenchymateuse, le β-caténine s'accumule dans le cytoplasme puis dans le noyau où elle peut se complexer avec le facteur de transcription TCF-4 (Goss and Groden, 2000). Les complexes β-caténine/TCF4 ont la capacité d'augmenter la transcription de gènes importants pour la prolifération tels que la cycline D1 et l'oncogène c-MYC. Notons que ces deux gènes sont très fréquemment surexprimés dans les cancers colorectaux (Leach et al., 1993) (He et al., 1998). Il a été démontré que dans des cellules exprimant une forme mutée d'APC, les complexes β-caténine/TCF4 sont stables et activés de manière constitutive. Il faut mentionner que la régulation négative de l'activité de la βcaténine par APC implique aussi d'autres protéines partenaires comme l'axine et la GSK3- β qui participent à la formation d'un complexe séquestrant la β -caténine dans le cytoplasme. La GSK3- β est une kinase qui a la capacité de phosphoryler la β -caténine sur des résidus sérine/thréonine, ce qui induit sa dégradation par le protéasome (Goss and Groden, 2000). Lorsque le gène *APC* n'est pas muté, c'est souvent le gène codant pour la β -caténine qui l'est ou le gène codant pour l'axine 2. Les mutations de la β -caténine sont d'ailleurs observées dans plus de 50% des cancers ne possédant pas d'altérations de la protéine APC (Sparks et al., 1998).

La voie des Wnt/ β -caténine est non seulement impliquée dans la transformation cellulaire par exacerbation de la prolifération, mais elle participe aussi à la T.E.M. dans les cellules épithéliales intestinales. En effet, la β -caténine, lorsqu'elle est associée à la face cytosolique des membranes plasmiques, interagit avec une glycoprotéine importante dans l'adhésion cellulaire : la E-cadhérine. Il a été suggéré qu'APC, en se liant à la β -caténine, déplace celle-ci de son interaction avec la E-cadhérine ce qui a pour conséquence la perte d'adhérence des jonctions intercellulaires et de plus, favorise la migration des cellules (Goss and Groden, 2000). Mentionnons aussi que la voie Wnt/ β -caténine, est activée dans les cancers colorectaux de type CIN+ et MSI+ (Fukushima et al., 2001). Dans les cas de cancers CIN+, c'est le gène *APC* qui est altéré de manière bi-allélique tandis que dans les cancers de type MSI+, c'est la β -caténine elle-même qui est mutée. La fréquence d'activation de cette voie est d'environ 80% dans les deux types de cancers précédemment décrits (Morin et al., 1997).

1.3.3.2 La voie du TGFβ

Les protéines de la famille du TGF β sont des facteurs de croissance impliqués dans l'arrêt de prolifération ainsi que dans la différenciation, dans la synthèse de matrice extracellulaire et dans les processus angiogéniques (Massague and Chen, 2000). Après activation du TGF β (par clivage protéolytique) et liaison à son récepteur le TGF β R de type II, ce dernier forme un hétérotétramère avec le TGF β R de type I. Ces complexes actifs ont la capacité de transduire le signal par activation des protéines SMAD2 et SMAD4 (S. Mother Against Decapentaplegic).

Après leur complexation, les SMAD2 et 4 ont la capacité de transloquer au noyau pour aller y activer la transcription de leurs gènes cibles comme par exemple le gène encodant pour l'inhibiteur du cycle cellulaire p15^{INK4B} (Heldin et al., 1997). L'activation de la voie TGF β est associée à une inhibition de l'activité des complexes CDK2/Cycline A, E qui sont importants dans le franchissement de la transition G1-S et dans la progression de la phase S du cycle cellulaire. Dans les cancers de type CIN, la voie du TGF β est inactivée dans environ 20 à 30% des cas par des mutations dans les gènes SMAD2 et SMAD4. Dans les cancers de type MSI+, c'est le gène codant pour le récepteur type II du TGF β qui est inactivé de manière bi-allélique dans 60 à 80% des cas (Parsons et al., 1995).

1.3.3.3 La voie TP53

Le gène *TP53* codant pour la protéine p53 est un gène suppresseur de tumeur situé sur le bras court du chromosome 17. Il a été démontré que non seulement ce gène pouvait subir des pertes alléliques mais encore des mutations ponctuelles dans 60 à 80% des cas de cancers colorectaux de type CIN (Grady, 2004). Ces mutations sont moins fréquentes dans les cancers de type MSI. La protéine p53 est surnommée « gardien du génome » principalement parce que suite aux dommages à l'ADN, elle est responsable de l'induction de l'inhibiteur p21^{Cip1} qui va causer un blocage du cycle cellulaire en phase G1 (Itahana et al., 2001). Par ailleurs, la protéine p53 promeut l'apoptose des cellules lorsque les dommages à l'ADN de celles-ci sont trop importants pour être réparés. Dans ces cas, p53 entraine l'augmentation de l'expression de BAX, un effecteur pro-apoptotique (Chipuk et al., 2004). Les altérations de p53 émergent généralement tardivement lors de la progression adénome-carcinome et seraient nécessaires à la transformation maligne des cellules en induisant de nouvelles altérations génétiques participant au phénotype CIN.

1.3.3.4 La voie Ras/Raf/MAPK

La voie de signalisation Ras/Raf/MAPK est impliquée dans la transduction de signaux extracellulaires par le biais de molécules réceptrices membranaires comme le récepteur à l'EGF qui possède une activité tyrosine kinase et qui est
amplifié dans 30 à 85 % des cancers colorectaux (Krasinskas, 2011). Ces signaux sont impliqués dans des processus comme la prolifération, la différenciation, les réponses aux stress cellulaires, la migration et l'angiogenèse. Les protéines Ras sont des proto-oncogènes, activateurs en amont de la voie des MAPK. Ils jouent le rôle d'interrupteurs moléculaires et vont induire l'activation des kinases RAF qui vont phosphoryler les kinases MEK1 et MEK2, lesquelles vont phosphoryler et activer les isoformes ERK1 et ERK2, via MEK1 et MEK2. Une fois activées, les kinases ERK1 et ERK2 ont la capacité de transloquer au noyau pour aller y phosphoryler des facteurs de transcription régulant ainsi la transcription de gènes cibles comme ceux de c-myc, de c-fos, de la cycline D1 ou encore de cdk6 qui sont essentiels pour entrer en phase de prolifération (Lavoie et al., 1996a; Lavoie et al., 1996b) (Fang and Richardson, 2005). Dans les cancers colorectaux, l'isoforme KRAS est retrouvée constitutivement sous sa forme active, liée au GTP, dans plus de 40% des cancers non héréditaires et cette activité constitutive est la conséquence de mutations faux sens qui lui confèrent un pouvoir oncogénique (Lievre et al., 2006). Plus récemment, des mutations de type aussi gain-defonction ont été trouvées chez l'isoforme BRAF, située directement en aval de KRAS, et ce, dans environ 10 à 15% des cancers colorectaux (Ogino et al., 2006; Weisenberger et al., 2006). Ces mutations de BRAF sont plus fréquentes dans les cas de cancers MSI+ que dans les cas de cancers CIN. Pour conclure, mentionnons que les mutations de KRAS et de BRAF sont retrouvées de manière mutuellement exclusive dans les cancers colorectaux (Richman et al., 2009); en effet, aucune étude à l'heure actuelle n'a pu observer la présence de ces deux mutations chez un même patient atteint de cancer colorectal.

1.3.3.5 La voie PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT joue un rôle important dans certaines fonctions cellulaires comme la croissance cellulaire, la prolifération, la glycogénèse, la survie et la migration (Brazil and Hemmings, 2001). Tout comme la voie des MAP kinases ERK1/2, la voie PI3K/AKT est activée par des récepteurs à activité tyrosine kinase comme le récepteur à l'EGF. Suivant l'activation du récepteur, celui-ci recrute la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K, constitutivement liée à la sous-unité p110.

Suite à ce recrutement qui rapproche la PI3K de la membrane, la sous-unité p110 phosphoryle le PI(4,5)P2 en position 3, produisant du PI(3,4,5)P3. Le PI(3,4,5)P3, qui est un messager secondaire, recrute à son tour deux kinases PDK1 et PDK2 qui sont importantes dans la transduction du signal via la kinase AKT. La protéine AKT est un proto-oncogène, qui a de nombreuses cibles en aval dont mTOR. mTOR est également régulé par l'état nutritionnel de la cellule, c'est-à-dire par le taux en acides aminés ou en nutriments cytoplasmiques, et par l'hypoxie. L'activation de mTOR est cruciale pour la synthèse des protéines. Il a été montré que suite à l'activation de la kinase AKT, celle-ci entraine la transcription de gènes nécessaires à la phase G1 du cycle cellulaire comme le gène CCND1codant pour la cycline D1 (Gera et al., 2004). AKT joue également un rôle majeur dans l'inhibition de l'apoptose en réponse aux facteurs de croissance. Beaucoup d'études ont pu montrer des relations étroites entre la voie des MAP kinases ERK1/2 et la voie PI3K/AKT (Aksamitiene et al., 2012). En effet, Grb2 est une protéine adaptatrice qui a été rapportée comme pouvant recruter RAS qui, à son tour peut activer p110 et ce, indépendamment de p85 (Aksamitiene et al., 2012). Des mutations du gène codant pour la sous-unité catalytique de la PI3K qui entrainent son activation constitutive sont observées dans 12 à 15% des cancers colorectaux et elles sont observées de manière identique dans les cancers de type CIN et MSI+. Certaines données suggèrent que les mutations activatrices de la PI3K sont fréquemment associées aux mutations activatrices du gène RAS et sont un indice de mauvais pronostique de survie des patients atteints de cancers colorectaux (Barault et al., 2008b). Le principal régulateur négatif de l'activation de la voie PI3K est la phosphatase PTEN (phosphatase with tensin homology) qui a pour rôle de transformer le PIP3 en PIP2 par opposition de la fonction de la PI3K. Le gène codant pour PTEN est un suppresseur de tumeur qui est retrouvé altéré dans le cas de mutation, de perte allélique et d'hyperméthylation de son promoteur. La perte d'expression de PTEN est observée dans 15 à 30% des cancers colorectaux et la prévalence des mutations de PTEN est d'environ 18% dans le cas des cancers MSI et d'environ 2% dans les cas de cancers MSS (Guanti et al., 2000).

1.3.4 L'inhibiteur de complexes CDK/Cyclines : p27^{Kip1} et sa dérégulation dans les cancers colorectau*x*

La progression du cycle cellulaire implique toujours l'activation et l'inactivation de kinases dépendantes de cyclines, les CDK. Ces kinases sont activées par leur association avec les cyclines qui jouent le rôle de sous-unité régulatrice des complexes CDK/Cycline et, au contraire, sont inactivées sous l'influence d'inhibiteur de ces complexes. La protéine p27^{Kip1} (aussi connue sous le nom de CDKN1B ou KIP1) appartient à la famille des CIP/KIP (*cycline/kinase inhibitory proteins*) (Besson et al., 2008). Cette protéine a la capacité d'inhiber tous les complexes CDK/cyclines et sa dégradation joue un rôle clé dans le franchissement de la transition G1/S du cycle cellulaire en permettant la pleine activation des complexes cycline A/CDK2 et cycline E/CDK2 (Sherr and Roberts, 1999). Ces derniers sont responsables de la phosphorylation de pRb et du relargage des facteurs de transcription E2F qui induisent transcription de gènes nécessaires à la synthèse d'ADN comme par exemple, la dihydrofolate réductase ou encore la thymidine kinase (Lam and La Thangue, 1994).

L'inhibiteur p27^{Kip1} a fait l'objet de nombreuses études concernant sa régulation au cours du cycle cellulaire normal et cancéreux (Bloom and Pagano, 2003; Hara et al., 2001; Lavoie et al., 1996b; Rivard et al., 1999; Takuwa and Takuwa, 1997; Thomas et al., 1998). Dans un contexte normal, les niveaux protéiques de p27^{Kip1} oscillent pendant le cycle cellulaire pour atteindre un niveau maximum en phase G0/G1 et un niveau le plus faible en phase de synthèse de l'ADN. Sa fonction d'inhibiteur de la prolifération en fait une cible privilégiée dans plusieurs types de cancers comme le cancer du poumon, de la prostate, du sein, de l'estomac et dans les cancers colorectaux. En effet, il a été rapporté que la faible expression de p27^{Kip1} dans ces cancers en fait un indice de mauvais pronostic de survie et aussi un indice de l'agressivité des tumeurs (Palmqvist et al., 1999). Dans la majorité des cas, la régulation des niveaux de p27^{Kip1} est surtout post-traductionnelle et il a été rapporté que son gène est très rarement supprimé ou inactivé dans les pathologies cancéreuses (Hengst and Reed, 1996). Dans les cancers colorectaux, les faibles niveaux protéiques de p27^{Kip1} sont en partie régis

par le système ubiquitine-protéasome et Skp-2 (Hershko et al., 2001). La phosphorylation de p27^{Kip1} sur sa thréonine 187 est un signal de dégradation reconnu par l'ubiquitine ligase Skp-2. Suite à son ubiquitination par Skp-2, p27^{Kip1} est reconnue par le protéasome puis clivé (Hara et al., 2001). Dans les cancers colorectaux, il a été montré une relation inverse entre les niveaux de p27^{Kip1} et de ceux de Skp-2 dans 85 % des tumeurs analysées (Hershko et al., 2001). Selon Nalepa et Wade, le système ubiquitine-protéasome serait une cible de choix pour une approche thérapeutique anticancéreuse afin de restaurer les niveaux de p27^{Kip1} (Nalepa and Wade Harper, 2003). Bien que le gène *CDKN1B* (codant pour p27^{Kip1}) soit rarement inactivé dans les cancers, l'utilisation de modèles murins d'invalidation génique de p27^{Kip1} a permis d'améliorer la compréhension des rôles de cet inhibiteur dans la tumorigenèse colorectale. Les souris invalidées pour p27Kip1 ont été rapportées comme étant plus grosses que leurs congénères sauvages. En effet, il a été observé certaines organomégalies notamment au niveau du thymus (Fero et al., 1996). Par ailleurs, il a été démontré que les individus doublement invalidés pour p27^{Kip1} développent de manière spontanée des tumeurs duodénales. Et plus particulièrement, l'apport d'une diète de type occidentale c'est-à-dire riche en gras et en sodium et faible en calcium et vitamine D favorise l'induction d'adénomes intestinaux (Yang et al., 2005). Enfin, la descendance issue du croisement des souris invalidées pour p27Kip1 avec la lignée murine APC^{Min/+} aura une augmentation de leur charge adénomateuse intestinale. Toutes ces observations caractérisent l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1} comme un régulateur négatif de la tumorigénèse intestinale.

1.4 Cycle cellulaire et protéolyse

Comme il a été mentionné précédemment, plusieurs acteurs clés du cycle cellulaire font l'objet de dégradation cyclique dans la succession des différentes phases du cycle cellulaire. On peut ainsi considérer le cycle cellulaire comme un cycle coordonné de synthèse protéique, d'activation transitoire et de processus de dégradation protéique (Hara et al., 2001). Nous avons mentionné le rôle important du système ubiquitine protéasome dans la dégradation de protéines impliquées dans le déroulement du cycle cellulaire. Plusieurs complexes d'ubiquitine ligase

sont impliqués dans l'envoi au protéasome de certaines cibles dont l'activation transitoire nécessite un contrôle fin dans l'espace et dans le temps. En plus du complexe SCF/Skp-2 qui est actif du milieu de la phase G1 jusqu'à l'entrée en phase G2, le complexe APC/cyclosome est lui, responsable de la dégradation de certains facteurs (p. ex., cycline B) depuis l'entrée en phase G2 jusqu'au milieu de la phase G1 (Peters, 2006). Les sous-unités protéasomales font partie des complexes de dégradation finale des protéines et elles appartiennent majoritairement à la famille des thréonines protéases. Les protéases sont une large famille regroupant plus de 500 individus chez les mammifères. Non seulement les thréonines protéases sont impliquées dans la tumorigénèse, notamment dans la dégradation protéasomale des protéines du cycle, mais aussi d'autres types protéasiques y jouent un rôle important. Les protéases feront l'objet d'une description détaillée de leurs rôles dans le cancer dans la prochaine section.

1.5 L'implication de la cathepsine B dans la progression des cancers

1.5.1 Généralités sur les protéases

Les protéases régulent une grande variété de processus biologiques nécessaires à la vie tels que le cycle cellulaire, la mort cellulaire, la réponse immunitaire, la digestion des aliments et le recyclage protéique. Au cours des dernières décennies, l'amélioration constante des techniques de génomique et de protéomique a permis l'identification d'un très grand nombre de protéases ainsi que leurs substrats et leurs inhibiteurs dans les différents modèles animaux les plus communément utilisés. Ce répertoire enzymatique a été qualifié de « dégradome » du monde animal (Lopez-Otin and Overall, 2002). Le dégradome humain comprend au moins 569 protéases qui sont regroupées en cinq classes selon leur type de site catalytique. Il compte 194 métalloprotéases, 176 protéases à sérine, 150 protéases à cystéine, 28 protéases à thréonine et 21 protéases à aspartate (Puente et al., 2003; Quesada et al., 2009). D'un point de vue évolutif, ces classes enzymatiques montrent une grande plasticité structurelle et -



Figure 1.5.1.: Les cinq classes de protéases du «dégradome» humain et la régulation de leur activation

A) Les cinq familles protéasiques sont classifiées selon la nature de leur site catalytique. Il peut être un acide aminé dans le cas des protéases à cystéine, sérine, thréonine et aspartate ou un ion métallique dans le cas des métalloprotéases. Pour chaque classe, les panneaux de gauche représentent le nombre d'individus intracellulaires et les panneaux de droite représentent les individus sécrétés ou associés aux faces externes des membranes plasmiques. (Tiré et modifié de Carlos López-Otín & Lynn M. Matrisian, Nature Reviews Cancer 2007). B) Les mécanismes de régulation de l'activation des protéases sont communs dans la majorité des cas. Les précurseurs zymogéniques inactifs sont activés soit par des facteurs allostériques soit par auto-activation directe. Une fois l'enzyme active, ces substrats et ces inhibiteurs entrent en compétition pour leur liaison (Tiré et modifié de Turk, Nature Reviews Drug Discovery 2006, autorisation no : 3347181379475)

-fonctionnelle. Dans les cas les plus simples, les protéases sont de petites protéines qui sont constituées en majeure partie d'un site catalytique. Dans d'autres cas, certaines espèces protéasiques peuvent atteindre de hauts poids moléculaires et même s'associer en macrocomplexes comme il a été mentionné pour le protéasome (Turk et al., 2012). Il en va de même pour leur spécificité, certaines protéases sont hautement sélectives comme dans le cas des caspases qui ne clivent qu'après un aspartate. D'autres protéases qui sont majoritairement représentées ne montrent que peu de spécificité vis-à-vis de leurs substrats comme dans le cas des protéases lysosomales qui doivent recycler un grand nombre de polypeptides (Turk et al., 2012). Au contraire des kinases qui vont apporter, lors de leurs phosphorylations, des modifications post-traductionnelles transitoires, les protéases ne modifient leurs substrats que de manière irréversible. Leur régulation fine tant transcriptionnelle que post-transcriptionnelle est donc requise. L'expression d'inhibiteurs naturels, l'expression sous forme zymogènique des protéases, le pH, sont tous des facteurs de régulation nécessaires à l'équilibre protéolytique d'un mécanisme donné. Tout débalancement dans ces régulations va engendrer, dans la majorité des cas, des situations physiopathologiques notamment dans les cas de pathologies neurodégénératives, mais encore dans les dégénérescences articulaires de types ostéo-arthrites et dans les cancers (DeClerck et al., 2004; Troeberg and Nagase, 2012; Turk et al., 2000). De nombreuses études ont démontré que les protéases sont des acteurs importants dans la progression et la croissance tumorale tant au niveau de la tumeur primaire que dans les sites métastatiques (DeClerck et al., 2004; Herszenyi et al., 2000). Par ailleurs, certaines données de la littérature corrèlent de manière claire l'agressivité de la tumeur avec l'expression et la sécrétion de certaines protéases (Koblinski et al., 2000). Au sein d'une tumeur, l'expression de protéases n'est pas issue que des cellules tumorales transformées, mais provient aussi des cellules associées à la tumeur. En effet des fibroblastes du stroma tumoral, les cellules immunitaires infiltrantes (macrophages, lymphocytes, neutrophiles, etc.) ainsi que les cellules endothéliales qui vont nourrir la tumeur de vaisseaux sanguins sont tous des types cellulaires qui vont exprimer une activité protéolytique protumorale. Toutes ces composantes cellulaires font partie intégrante de ce l'on qualifie de microenvironnement ou écosystème tumoral (Hendrix et al., 2011). Pendant la tumorigénèse, depuis l'acquisition du phénotype mésenchymateux des cellules épithéliales jusqu'à l'implantation de bourgeons métastatiques à distance, ces étapes font appel à l'action de types protéasiques spécifiques, qui font partie des cinq classes précédemment citées (Kim et al., 1998; Radisky and Radisky, 2010).

1.5.2 Les protéases à cystéine

Les protéases à cystéine sont généralement de petites protéines qui comportent majoritairement un seul site catalytique. Elles comprennent plusieurs sous-groupes, dont les caspases, les calpaines et les cathepsines, etc. Ces deux dernières appartiennent, selon la nomenclature enzymologique, aux familles C1 et C2 du même clan CA (Chapman et al., 1997). Bien que leurs séquences soient éloignées, elles sont dérivées d'un gène ancestral commun qui est l'homologue du gène codant pour la papaïne, découverte dans le fruit du papayer (Carica papaya). Ces enzymes partagent toutes un même mécanisme protéolytique mettant en jeu leur cystéine catalytique. Cette réaction enzymatique se déroule en trois étapes. Dans un premier temps, le groupement thiol porté par la cystéine subit une déprotonation par un acide aminé latéral basique de l'enzyme, généralement une histidine faisant partie de la triade catalytique (Mort and Buttle, 1997; Turk et al., 2000). La deuxième étape consiste en une attaque nucléophile sur un des carbones du substrat, libérant ainsi un premier fragment tandis que l'autre fragment de digestion reste lié à l'enzyme par la liaison thioester formée lors de l'attaque nucléophile. Enfin lors de la dernière étape, l'hydrolyse de cette liaison permet de libérer le deuxième fragment et de restaurer ainsi la conformation originale du site catalytique.

1.5.3 La famille des cathepsines à cystéine (clan CA, famille C1a)

C'est en analysant un bol alimentaire gastrique animal, pendant les années 1920, qu'un groupe allemand a observé une activité protéolytique inconnue que les auteurs avaient qualifiée de « catheptique » (Willstätter R, 1929).

Cet adjectif avait été emprunté au grec ancien, kathépsein, qui veut littéralement dire : « digérer ». Il existe 11 cathepsines à cystéine chez les mammifères (cathepsine B, C, F, H, K, L, O, S, W, V et Z/X). Ces enzymes stables à pH acide sont exprimées de manière ubiquitaire et sont principalement lysosomales et/ou endosomales. Depuis de nombreuses années, beaucoup de données ont permis de caractériser les rôles précis de ces enzymes. Elles participent, de manière générale, au recyclage des protéines en fin de vie au sein des lysosomes et ont longtemps été perçues comme des éboueurs protéiques ou « scavengers ». Cependant, on sait maintenant qu'elles participent aussi à des mécanismes homéostatiques spécifiques comme la réponse immunitaire, le renouvellement osseux et cartilagineux ou la maturation des neuropeptides et des hormones (Turk et al., 2000). Suite à ces découvertes, il a été possible d'observer d'autres compartiments d'expression de ces enzymes par exemple le cytosol, le noyau, les mitochondries ou encore le milieu extracellulaire (Reiser et al., 2010). Comme il a été mentionné précédemment, ces enzymes sont généralement petites, mise à part la cathepsine C qui est une protéine oligomérique aux alentours des 200 kDa. Leur structure se simplifie à deux domaines majeurs enveloppant le site catalytique et décrivant une forme en « V ou de livre ouvert ». Le domaine gauche ou L-Domain, comprend une large chaine en hélice α d'une trentaine d'acides aminés tandis que le domaine droit ou R-Domain est majoritairement conformé en feuillets β. Les cathepsines sont de puissants destructeurs protéigues, leur activité est donc régulée à plusieurs niveaux. Il a été démontré que d'infimes débalancements de la régulation de leur activité participent souvent à des situations pathologiques telles que rencontrées dans les cancers (Turk, 2006). Dans d'autres cas rares, c'est la défaillance même d'une de ces protéases qui est la cause de la pathologie comme dans le cas de l'inactivation du gène de la cathepsine K dans les maladies osseuses de type pycnodysostoses (Gelb et al., 1996). De nombreuses études ont montré une corrélation positive entre l'expression et/ou l'activité de certaines cathepsines à cystéines et la progression tumorale (Bengsch et al., 2013; Reinheckel et al., 2012). Bien que les familles des métalloprotéases et des sérines protéases soient elles aussi impliquées fortement dans la progression tumorale, la famille des cathepsines et surtout la cathepsine B a fait l'objet d'études poussées en cancérologie. Par le fait même que ces protéases peuvent être observées à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule et qu'elles puissent remodeler la matrice extracellulaire dans ces deux compartiments, elles suscitent donc une attention particulière de la plupart des études dans le domaine de la protéolyse associée aux cancers.

1.5.4 La cathepsine B (E.C. 3.4.22.1)

1.5.4.1 Structure, routage et localisation de la cathepsine B

La cathepsine B est, avec la cathepsine L, la cathepsine la plus exprimée chez les mammifères (Reinheckel et al., 2001) avec une concentration lysosomale dépassant les 1 mM. Cette enzyme est bilobée et a une taille de 30 kDa sous sa forme active. La cathepsine B possède une particularité unique parmi les protéases à cystéine puisqu'elle a une double activité majoritairement endopeptidasique, mais aussi exodipeptidasique compte tenu du pH environnant (Mort and Buttle, 1997). En effet, cette protéase est la seule à posséder une structure appelée « boucle occlusive » qui obstrue de manière partielle le site catalytique à pH neutre. Si cette boucle est en conformation « fermée », la charge positive de l'histidine 111 de la cathepsine B est attirée par les charges négatives des extrémités carboxy-terminales de substrats potentiels. Cette protéase est codée par un gène unique situé sur le locus 22 du bras court du chromosome 8. Ce gène comporte 12 exons et s'étend sur environ 27 kilobases. Il a été démontré la présence d'exons supplémentaires (2a et 2b) situés entre les exons 2 et 3 dans certains tissus cancéreux comme dans des tumeurs gastriques (Berquin et al., 1995). Par ailleurs, il a été rapporté la présence de multiples variants d'ARN messagers chez l'humain et la souris qui se différencient pour la plupart par leurs séquences régulatrices non traduites 5' et 3'(Cao et al., 1994; Zwicky et al., 2003). Ces ARN messagers sont traduits dès leur ciblage au réticulum endoplasmique granuleux et leur peptide signal est clivé pendant la traduction. L'enzyme est alors traduite sous forme zymogène inactive et monochaine d'une taille de 45 kDa qui



possède un propeptide en N-terminal. La protéine passe du réticulum au

Figure 1.5.4.1 : Routage et maturation de la cathepsine B

La préprocathepsine B est synthétisée dans le réticulum endoplasmique granuleux où le peptide signal est clivé co-traductionnellement. Dès son arrivée dans l'appareil de Golgi, la proenzyme subit des glycosylations et le signal mannose-6-phosphate est assemblé permettant sa reconnaissance par son récepteur localisé dans le réseau trans-golgien. La pro-cathepsine B est alors dirigée vers les compartiments endolysosomaux où le propeptide y est clivé pour permettre la pleine activité de l'enzyme. De manière concomitante, la cathepsine B peut être sécrétée sous sa forme proenzyme et activée à distance dans le milieu extracellulaire (Tiré et adapté de *Reinheckel et al. 2012, autorisation no : 3347191295785*).

compartiment golgien et subit alors plusieurs additions de sucres de type mannose par N-glycosylation. La greffe de groupements mannoses est un signal d'adressage de l'enzyme vers les compartiments endo-lysosomaux et empruntera la voie d'adressage du mannose -6-phosphate (m6p) (Mort and Buttle, 1997). À

l'approche des lysosomes et suite à l'acidification progressive du milieu, la procathepsine B subit plusieurs clivages par l'intermédiaire de la protéase à aspartate cathepsine D (van der Stappen et al., 1996), mais encore la cathepsine G, tPA, uPA ou l'élastase (Dalet-Fumeron et al., 1996; Dalet-Fumeron et al., 1993) qui ont pour rôle d'ôter le propeptide. Suite à ces modifications, l'enzyme est alors clivée en deux chaines distinctes de 5 kDa et de 25 kDa. Bien que ces deux chaines soient clivées tardivement, elles sont néanmoins associées précocement par des ponts disulfures au sein du réticulum endoplasmique (Mort and Buttle, 1997).

1.5.4.2 Dérégulations de l'expression de la cathepsine B dans les cancers

L'isolation d'une séquence promotrice de 2,2 kilobases située directement en amont de l'exon 1 du gène CTSB a été réalisée à l'origine par l'équipe de la D^{re} Bonnie Sloane. Cette séquence a permis de caractériser, en partie, le promoteur du gène CTSB et sa régulation dans les cancers, notamment dans les gliomes (Frosch et al., 1999; Yan and Sloane, 2003). Cette région promotrice est très riche en éléments GC (80 %), mais ne possède aucune séquence de type TATA ni de type CAAT directement en amont du site initiateur de la transcription. Ces observations tendent à suggérer que le gène encodant la cathepsine B est un gène « de ménage ». En revanche, la séquence promotrice minimale du gène CTSB d'environ 228 paires de bases qui contient l'activité basale du promoteur, possède six sites de liaison aux facteurs de transcription Sp1 et Sp3, quatre sites de liaison aux facteurs Ets (EBS) et une séquence de liaison aux facteurs USF (Yan et al., 2003; Yan and Sloane, 2003). Ces données suggèrent que le gène CtB peut aussi être régulé dans certaines conditions. Par ailleurs dans les gliomes, certains transcrits CTSB ont été identifiés comme débutant par l'exon 3 et l'exon 4 respectivement, ce qui suggère la présence d'autres séquences promotrices alternatives de la transcription dans ces situations pathologiques (Yan and Sloane, 2003). Il a été mentionné précédemment que le gène CTSB est porté sur le locus 8p22, un locus fréquemment altéré dans les cancers, et subit des délétions dans les carcinomes du sein (Hirano et al., 2001), les carcinomes hépatocellulaires (Pineau et al., 1999), les adénocarcinomes colorectaux (Yaremko et al., 1994) et dans les carcinomes prostatiques (Bova et al., 1993).

Mais de manière intéressante, il a été montré que le gène CTSB n'est que peu touché dans les délétions de ce locus, ce qui suggère son utilité dans ces pathologies. Dans les carcinomes œsophagiens, le locus 8p22 est souvent amplifié et un nouvel amplicon contenant le gène CTSB y a été découvert dans des extraits de tumeurs œsophagiennes humaines (Hughes et al., 1998). Cette étude démontre que dans les tumeurs possédant l'amplification du gène CTSB, les niveaux d'ARNm sont augmentés dans 100% des cas ; cependant, dans les tumeurs œsophagiennes ne possédant pas l'amplification, l'augmentation des niveaux des ARN messagers CTSB est observée dans 33% des cas, ce qui suggère une régulation transcriptionnelle de la cathepsine B dans ces tumeurs. L'élévation du niveau des transcrits CTSB est observée dans beaucoup de cancers et s'accompagne toujours d'une augmentation des niveaux protéiques de l'enzyme et surtout de son activité, lesquelles corrèlent souvent avec l'invasion des cancers précédemment cités. La transactivation du promoteur de la cathepsine B joue un rôle important dans ces mécanismes de surexpression. Mentionnons que les facteurs de transcription Sp1, Sp3 et Ets-1 sont des transactivateurs importants du gène codant la cathepsine B dans les glioblastomes (Yan et al., 2000). Dans ces tumeurs d'origine cérébrale, l'augmentation de l'expression des ARNm corrèle avec leur stade de progression. Ce phénomène est observable dans beaucoup d'autres types de cancers. Par ailleurs, certains cas de variation d'épissage des ARNm ctsb sont aisément observables dans les tissus tumoraux en comparaison aux tissus normaux. En effet, plusieurs études ont fait référence à de nombreux variants d'épissage qui diffèrent dans leur majorité par leurs extrémités 5' et 3' non traduites. Dans la plupart des cas, ces ARN codent pour la même préproenzyme que l'ARN pleine longueur sauvage, cependant leur stabilité et la vitesse de leur traduction sont souvent modulées (Baici et al., 2006; Zwicky et al., 2003). Dans certains cas plus rares, la variation d'épissage s'opère dans la séquence codante et il en résulte parfois une enzyme fonctionnelle, mais plus courte. Par exemple, il a été observé dans des tumeurs d'origine cérébrale et gastrique, la présence de variants d'épissage ne possédant plus les exons 2 et/ou 3. Le variant ne possédant plus les deux exons est traduit plus rapidement que sa forme sauvage et l'enzyme traduite est dépourvue des 17 premiers acides aminés du peptide signal ce qui ne lui permet pas d'être acheminé dans son compartiment de prédilection (Muntener et al., 2003). Il en résulte sa délocalisation et son association aux faces cytosoliques de certaines organelles comme les noyaux et les mitochondries. Cependant, à l'heure actuelle, il reste difficile de corréler l'expression de ce variant d'épissage de la cathepsine B avec la progression tumorale.

1.5.4.3 Délocalisation de la cathepsine B dans les cancers

Bien que la majorité de l'expression de la cathepsine B ainsi que son activité soient essentiellement observées dans les compartiments lysosomaux d'une cellule normale, beaucoup d'évidences montrent des délocalisations importantes de la protéine lors de néoplasies. En prenant l'exemple du colonocyte normal polarisé, l'expression et l'activité de la protéase ont été essentiellement observées au sein des compartiments trans-golgiens et endolysosomaux dans la partie apicale de la cellule. De plus, une étude de Hazen et collaborateurs montre que selon l'axe glande-épithélium de surface, la protéase est modérément exprimée et son activité est observée surtout dans les colonocytes matures de surface. Le fond des cryptes coliques semble cependant dépourvu d'activité cathepsine B. Cependant dans un adénome colique tubulaire, une augmentation de l'expression et de l'activité de la protéase sont clairement observables dans la totalité de l'épithélium colique (Hazen et al., 2000). De manière intéressante, l'activité de la cathepsine B est toujours restreinte dans des compartiments vésiculaires, situés non pas aux pôles apicaux mais bien baso-lateraux des colonocytes. Ces observations suggerent que lors de l'apparition des phénotypes néoplasiques, il y a migration progressive des lysosomes vers les pôles baso-latéraux, très proches de la lame basale sous-jacente (Hazen et al., 2000). Les travaux de l'équipe de B. Sloane ont permis de confirmer ces observations et ont apporté certaines données sur le déroutage de la cathepsine B dans des lignées cellulaires épithéliales transformées ou non (Cavallo-Medved et al., 2003; Sloane et al., 1994). Tout d'abord les auteurs ont constaté que dans la lignée épithéliale mammaire MCF10A, une lignée peu agressive et invasive, la majorité des vésicules positives pour l'expression de cathepsine B est localisée au pourtour des noyaux de ces cellules. Suite à la surexpression d'une forme oncogénique de la protéine H-RAS, il s'en suit une délocalisation de ces vésicules vers la périphérie cellulaire qui corrèle avec le degré de transformation et l'augmentation de l'index d'invasion de ces cellules (Sloane et al., 1994). Ces phénomènes de délocalisation de la cathepsine B en fonction du degré de transformation cellulaire ont aussi été observés dans la lignée épithéliale colique HCT116. Ces cellules, issues d'un adénocarcinome colorectal, possèdent un allèle de K-Ras muté et ont la capacité de sécréter de la cathepsine B active dans leur milieu extracellulaire. Le relargage massif de l'enzyme dans le milieu serait dû à la fusion des lysosomes avec les structures membranaires cavéolaires de ces cellules (Cavallo-Medved et al., 2003). Des expériences de colocalisations et de coimmunoprécipitations avaient, auparavant, montré que des formes immatures pro-cathepsine B étaient associées aux membranes plasmiques par l'intermédiaire des petites chaines p11 appartenant aux tétramères d'annexine II des domaines cavéolaires (Mai et al., 2000). Ces tétramères sont composés de deux petites chaines p11 qui interviennent dans l'association de l'annexine II avec la membrane plasmigue et de deux grandes chaines p36 qui sont utilisées en tant que récepteurs pour certains ligands (Luo and Hajjar, 2013). Par ailleurs, la lignée cellulaire HKh-2 qui est une lignée issue de la lignée parentale HCT116 dans laquelle l'allèle K-Ras muté a été restauré par sa forme sauvage, sécrète des niveaux de cathepsine B bien inférieurs à ceux des HCT116. De plus, les niveaux d'association de la procathepsine B avec la sous-unité p11 sont grandement diminués par la baisse d'expression de p11 elle-même dans ces cellules. Dans l'ensemble, toutes ces observations tendant à suggérer que le déroutage de la cathepsine B est un phénomène précoce dans l'évolution de la maladie et que la sécrétion sous sa pro-forme est la conséquence d'une fusion vésiculaire entre les lysosomes et les cavéoles au niveau des membranes plasmiques. Cette fusion étant orchestrée par la transformation cellulaire dont K-Ras constitutif actif peut être l'un des initiateurs.

1.5.4.4 Rôles dans le remaniement de la matrice extracellulaire.

Lors de la progression d'une tumeur épithéliale in situ vers une tumeur invasive,

celle-ci met en place un programme protéolytique complexe lui permettant de dégrader sa membrane basale qui la sépare du tissu conjonctif sous-jacent. Beaucoup d'études ont démontré que les cathepsines à cystéine lysosomales et plus précisément la cathepsine B, sont impliquées dans le remodelage de certains éléments composant la matrice extracellulaire (MEC) (Cavallo-Medved et al., 2009; Tu et al., 2008; Victor et al., 2011). La cathepsine B possède une particularité parmi toutes les protéases : elle est l'unique enzyme chez l'humain et la souris à pouvoir dégrader la MEC autant dans le milieu extracellulaire qu'intracellulaire. En effet, sa sécrétion et son activation à distance depuis la cellule tumorale ou encore les formes associées aux cavéoles lui permettent de dégrader la MEC hors de la cellule. En parallèle, la cathepsine B endolysosomale peut dégrader la MEC après phagocytose de celle-ci (Premzl et al., 2006; Premzl et al., 2003). Comme le démontre l'étude de Hazen et collaborateurs, dans des adénocarcinomes colorectaux déjà invasifs, l'épithélium perd peu à peu l'expression et l'activité de la cathepsine B au détriment du stroma entourant la tumeur, comparativement à un adénome. Cependant, seuls les bourgeons invasifs de l'épithélium tumoral conservent une forte expression et activité de la cathepsine B ce qui suggère un rôle protéolytique important dans ces zones invasives (Hazen et al., 2000). Parmi les substrats connus de la cathepsine B appartenant à la MEC, on compte : certains collagènes, la fibronectine, certaines laminines, l'ostéocalcine, l'aggrecan et l'ostéonectine (Baumgrass et al., 1997; Buck et al., 1992; Maciewicz et al., 1990; Mort et al., 1998; Page et al., 1993). Ces éléments représentent une grande majorité des protéines de la matrice extracellulaire, ce qui rend compte du rôle potentiellement destructeur de la cathepsine B active vis-à-vis de la MEC. Lors de la croissance d'une tumeur, l'épithélium n'est pas le seul tissu à exprimer des facteurs protéolytiques comme la cathepsine B. De manière générale, tous les types cellulaires annexes du microenvironnement tumoral sont d'importants sécréteurs de protéases comme les fibroblastes du stroma qui participent aussi au remodelage de la matrice extracellulaire (Yin et al., 2012). Il a été montré un dialogue précis entre certaines cellules du microenvironnement, la MEC et l'épithélium lui-même dans l'établissement de programmes protéolytiques précis.

Par exemple, le dépôt de cellules carcinomateuses prostatiques DU-145 sur une monocouche de collagène-1 est un signal suffisant pour induire l'expression de la cathepsine B ainsi que sa sécrétion (Podgorski et al., 2005). Par ailleurs, la co-culture en sphéroïdes de cellules adénocarcinomateuses colorectales HT-29 avec des cellules monocytaires ou des fibroblastes humains augmente là aussi l'expression de la cathepsine B dans les trois types cellulaires. Cette augmentation corrèle avec le degré d'invasion de ces cellules (Krueger et al., 2005).

1.5.4.5 La place de la cathepsine B dans les cascades protéolytiques tumorales

Bien que les cathepsines à cystéine jouent des rôles dans la protéolyse tumorale, elles ne sont pas les seules à participer à ces processus. De nombreuses études rapportent aussi l'implication conséquente de certaines métalloprotéases et protéases à sérine dans la progression tumorale (Rao, 2003). Les métalloprotéases sont regroupées dans une famille d'enzymes sécrétées qui possède une activité hydrolytique contre la majorité des composants de la MEC. Parmi les plus connues, trois sont des collagénases (MMP1, MMP8 et MMP13), cinq appartiennent à la classe des stromélysines (MMP3, MMP7, MMP10, MMP11 et MMP26), deux sont des gélatinases (MMP2 et MMP9) et six sont des MMP de type membranaire comme les MT1-MMP et MT6-MMP. Des corrélations directes ont été montrées entre l'augmentation de l'expression des MMP et les capacités invasives d'une tumeur, l'angiogenèse, l'établissement de métastases et la réduction de la probabilité de survie du patient (Rundhaug, 2003). Conjointement à l'action des métalloprotéases et des cathepsines à cystéine, certaines autres protéases à sérine sont aussi impliquées dans la progression tumorale. Parmi elles, l'activateur du plasminogène de type-urokinase (uPA) et sa forme transmembranaire (tPA) ont été montrés comme favorisant le remodelage tissulaire, la migration cellulaire et l'invasion tumorale (Chandrasekar et al., 2003). Ces enzymes ont en effet la capacité d'activer, par maturation du zymogène, une autre protéase à sérine, la plasmine, qui peut dégrader certains éléments de la matrice comme la fibronectine et la laminine (Sordat and Tran-Thang, 1994).



Figure 1.5.4.5 : Les différents types de protéases impliqués dans la dégradation de la MEC

L'activation de la pro-cathepsine B par la **cathepsine D** et l'activateur du plasminogène **(tPA)** initie une cascade protéolytique amenant à l'activation de l'activateur du plasminogène de type urokinase **(uPA)**, des metalloprotéases matricielles **(MMP)** et de la **plasmine**. Les domaines cavéolaires sont des zones de co-localisation importante de ces différents types protéasiques. Ceci facilite l'émergence de cascades protéolytique, sélectives, ciblant la MEC (Tiré et modifié de *J.Rao et al. Nat Rev 2003, autorisation no : 3347200395996*).

Ces trois systèmes protéolytiques ne sont pas indépendants et illustrent la complexité des cascades protéolytiques engendrées par une cellule tumorale. Toutes ces enzymes sont exprimées sous formes inactives et leur interactivation constitue un dialogue moléculaire qui permet d'amplifier la réponse protéolytique. Plusieurs études suggèrent un rôle important de la cathepsine B et du système plasminogène/plasmine dans le déclenchement de ces processus protéolytiques. La forme membranaire tPA colocalise avec la pro-cathepsine B dans les domaines cavéolaires et participerait au clivage du pro-peptide inhibiteur de la cathepsine B.

En effet tPA peut se lier, tout comme la procathepsine B sur la sous-unité p11 des tétramères d'annexine II (Mai et al., 2000). La cathepsine B active extracellulaire a aussi été montrée comme agissant sur l'initiation de la cascade impliquant l'uPA, le plasminogène et la plasmine par activation de l'uPA. L'activation des métalloprotéases découle en partie de l'activation de la plasmine, mais il a été démontré que la cathepsine B peut directement cliver et activer certaines MMP, comme la collagénase-1 et la stromélysine-1 (Eeckhout and Vaes, 1977). De plus, il a été rapporté que l'augmentation de l'activité de la cathepsine B corrèle avec l'augmentation de l'activation de la MMP2 dans les bourgeons invasifs d'adénocarcinomes colorectaux ce qui suggère, là encore, une place centrale de la cathepsine B dans les cascades protéolytiques tumorales (Emmert-Buck et al., 1994). Par ailleurs, dans les chondrocytes articulaires qui ont des capacités invasives, la cathepsine B participe à la suractivation des MMP en dégradant leurs inhibiteurs naturels, les TIMP1 et TIMP2 (Kostoulas et al., 1999). Toutes ces observations nous amènent à considérer l'importance du ciblage thérapeutique de l'activité de la cathepsine B dans les traitements chimio-thérapeutiques et antiprotéolytiques.

1.5.4.6 Données concernant la cathepsine B dans les néoplasies et cancers colorectaux

À l'heure actuelle, la cathepsine B a fait l'objet de plusieurs études suggérant une implication potentielle dans la carcinogenèse colorectale. Cependant, la majorité des études s'est concentrée sur l'analyse de son expression, de sa localisation et de son activité dans des tumeurs colorectales humaines et murines comparativement aux portions saines des tissus lésés (Campo et al., 1994; Cavallo-Medved et al., 2003; Chan et al., 2010; Emmert-Buck et al., 1994; Gounaris et al., 2008; Guzinska-Ustymowicz, 2006; Hazen et al., 2000; Krueger et al., 2005). Il a été montré qu'une augmentation de l'expression de la cathepsine B corrèle avec le degré de sévérité de la maladie, si bien qu'une forte expression et activité de la protéine est un facteur de mauvais pronostic de survie des patients souffrant de cancers colorectaux (Campo et al., 1994). Il a aussi été démontré que la cathepsine D, qui est le principal activateur de la cathepsine B, est aussi

fortement exprimée dans les tumeurs colorectales (Kirana et al., 2012). L'utilisation des modèles murins a permis d'en comprendre davantage sur l'implication de la cathepsine B dans divers types de tumorigénèse. Il a été montré par une approche transcriptomique et protéomique chez la lignée murine APC^{Min}, que la cathepsine B est un margueur important des lésions polypeuses, ce qui suggère que la cathepsine B pourrait avoir un rôle à jouer dans l'initiation tumorale intestinale. Par ailleurs, l'invalidation du gène ctsb chez les souris APC^{Min} réduit non seulement leur charge tumorale, mais diminue aussi le niveau d'inflammation dans les polypes (Gounaris et al., 2008). Les souris invalidées pour le gène de la cathepsine B représentent donc un outil prometteur pour une étude plus détaillée des rôles de cette protéase dans la tumorigénèse intestinale. Cette lignée murine de fond génétique C57Bl6 est parfaitement viable et fertile et ne possède pas de phénotypes apparents (Reinheckel et al., 2001). Cependant, le croisement de ces souris avec des modèles murins de tumorigénèse du sein et pancréatique a permis de révéler la contribution importante de la cathepsine B dans la progression tumorale et métastatique (Gopinathan et al., 2012; Vasiljeva et al., 2008).

1.5.5 Objectifs de recherche

Les protéases sont des acteurs moléculaires importants de la tumorigénèse en permettant notamment aux cellules tumorales de proliférer plus rapidement, mais encore en facilitant leur invasion locale et leur dissémination métastatique. Pour sa part, la cathepsine B a été, de nombreuses fois, démontrée comme étant impliquée dans la progression de différents types de tumeurs.

À ce jour, la majorité des études sur la cathepsine B dans les cancers colorectaux se restreint à des mesures de son expression, de son activité ou de sa sécrétion dans des tissus tumoraux issus de patients traités chirurgicalement. Il est largement accepté que son expression augmentée est un indice de mauvais pronostic de survie pour ces patients. Par ailleurs l'augmentation de son activité dans les lésions intestinales précancéreuses de type adénomes en fait une cible intéressante dans le diagnostic précoce des cancers colorectaux chez l'humain.

Malheureusement, très peu d'études se sont intéressées aux fonctions et rôles de cette protéase à l'échelle cellulaire, notamment dans des lignées intestinales normales et cancéreuses. L'hypothèse principale de ces travaux est d'évaluer si la cathepsine B possède des fonctions pro-tumorales dans les lignées cancéreuses colorectales et en conséquence, d'évaluer les effets de la réduction de son expression et/ou de son activité sur les capacités tumorigéniques de ces cellules, *in vitro* et en xénogreffes. C'est dans cette optique que s'est inscrit mon projet de doctorat qui comportait trois objectifs :

1- Analyser les statuts d'expression, de sécrétion et d'activité enzymatique de la cathepsine B dans des lignées cancéreuses colorectales comparativement aux cellules épithéliales intestinales normales.

2- Cibler de manière spécifique l'expression de la cathepsine B dans deux lignées cancéreuses colorectales et en évaluer l'impact sur leurs caractères tumorigéniques *in vitro* et *in vivo* chez la souris.

3- Identifier les cibles potentielles de cette protéase dans les cellules tumorales colorectales.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériels

La cathepsine B issue de foies humains a été purifiée par chromatographie d'affinité par la compagnie Calbiochem (Mississauga, ON, Canada). Le substrat colorimétrique I z-RR-pNA séléctif de la cathepsine B ainsi que le kit de détection de l'activité cathepsine B ont été aussi obtenus de la compagnie Calbiochem. Le kit de quantification de l'activité cathepsine B utilisant le substrat fluorogénique z-RR-AFC a été obtenu de la compagnie BioVision (Burlington, ON, Canada). L'inhibiteur spécifique de l'activité cathepsine B, Ca074 ainsi que son homologue perméant Ca074-Me (Méthyl Ester) ont été obtenus de la compagnie Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Les anticorps polyclonaux de chèvre et dirigés contre les formes murines et humaines de la cathepsine B ont été obtenus de la compagnie R&D Systems (Burlington, ON, Canada). Les anticorps polyclonaux dirigés contre p27^{Kip1} humain et murin (C-19, N-20 et M197), p21^{Cip1} (N20), p57^{kip2} (C20), Lamine B (M20), Calpaïne 2 (H240) et ERK2 total (C-14) ont été obtenus de la compagnie Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Les anticorps monoclonaux dirigés contre pAKT (# 9271), pERK1/2 (#9101) ont été obtenus de la compagnie Cell Signaling Technology (Whitby, ON, Canada). L'anticorps polyclonal dirigé contre la protéine PCNA (Ab-18197) a été obtenu de la compagnie Abcam (Toronto, ON, Canada). L'anticorps monoclonal dirigé contre l'actine (clone C4 – Mab 1501R) a été obtenu de la compagnie Millipore (Gibston, NJ, USA). La liste des anticorps utilisés ainsi que leur conditions d'utilisation sont listés dans la section annexes.

2.2 Culture cellulaire

2.2.1 Les cellules HIEC

Les cellules non immortalisées HIEC, initialement connues sous le nom de HIEC-6 «Human Intestinal Epithelial Cell clone 6», sont issues de l'épithélium cryptal d'iléon humain fœtal (17 semaines). Cette population a été initialement caractérisée par le groupe du Pr Jean-François Beaulieu de l'Université de Sherbrooke (Perreault and Beaulieu, 1996). Ces cellules sont maintenues dans un

milieu de culture de type Opti-MEM (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplémenté de 5 % en sérum bovin fœtal (Wisent, St Bruno, QC, Canada), 4 mM glutamine, pénicilline 50 U/ml, streptomycine 50 µg/ml (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 20 mM HEPES et insuline 0,2 U/ml (Connaught Novo Laboratories, Willowdale, Canada). Lors de leur synchronisation en phase G0/G1, ces cellules sont maintenues en milieu de type DMEM 0% SVF pendant 36 h.

2.2.2 Les cellules Caco-2/15

La lignée de cellules cancéreuses colorectales Caco-2/15 a été obtenue grâce au Dr A. Quaroni (Université Cornell, NY, USA). Le clone 15, issu de la lignée parentale adénocarcinomateuse colique Caco-2, a initialement été caractérisé par Jean-François Beaulieu et collaborateurs (Beaulieu and Quaroni, 1991). Ces cellules Caco-2/15 ont la particularité d'entamer un programme de différenciation de type « entérocytaire » dès l'atteinte de la confluence (Deschenes et al., 2001). Elles sont maintenues dans un milieu de type DMEM supplémenté de 10% SVF, 4 mM glutamine, pénicilline 50 U/ml, streptomycine 50 µg/ml, 20 mM HEPES.

2.2.3 Autres cellules cancéreuses colorectales

Toutes les lignées cancéreuses colorectales humaines utilisées proviennent d'adénocarcinomes adultes et ont été achetées d'ATCC (Manassas, VA, USA). Les lignées cancéreuses HT-29 et HCT116 sont cultivées en milieu de type McCoy 5A supplémenté en 10% SVF. Les cellules DLD-1 et Colo205 sont cultivées en milieu de type RPMI supplémenté de 10% SVF. Les cellules Lovo et SW480 sont cultivées dans des milieux de type Ham's F12 et Leibovitz L15 respectivement et supplémentés de 10% SVF. Tous les milieux utilisés sont de la compagnie Gibco. Les caractéristiques génétiques et les potentiels invasifs de ces lignées cancéreuses sont énumérés dans le **Tableau 1**. Tous les milieux contiennent 4 mM glutamine, pénicilline 50 U/ml, streptomycine 50 µg/ml, 20 mM HEPES.

	lignées	origine	statuts			potentiel invasifs	
			kRAS	bRAF	p53	APC	
normale	HIEC	epithélium cryptal - iléon foetal humain	sauvage	sauvage	sauvage	sauvage	-
adenocarcinomes	Caco 2/15	tumeur colonique	sauvage	sauvage	muté	muté	+
	HCT116	tumeur colonique	muté	sauvage	sauvage	sauvage	+++
	DLD-1	tumeur colonique-stade de Duke type C-grade IV	muté	sauvage	muté	muté	+++
	HT-29	tumeur colonique	sauvage	muté	sauvage	muté	++
	Lovo	tumeur colonique-grade IV	muté	sauvage	sauvage	muté	++
	SW480	tumeur colonique-stade de Duke type B	mute	sauvage	sauvage	muté	-
	Colo205	ascites métastatique mésentériques-stade de Duke type D	sauvage	muté	sauvage	muté	-
	T84	métastase pulmonaire d'origine colonique	muté	sauvage	sauvage	muté	+



Les cellules HEK293 proviennent d'un épithélium de rein fœtal humain, mais de manière curieuse, ces cellules expriment fortement certains marqueurs neuronaux comme les neurofilaments (Shaw et al., 2002). Ces cellules parentales HEK293 ont été initialement transformées à l'aide d'un adénovirus. Le sous-clone 293T exprime l'antigène T du Virus SV40 permettant la réplication soutenue de plasmides transfectés portant une origine de réplication de type SV40. Ces cellules sont utilisées pour la surexpression ectopique de protéines d'intérêt ainsi que pour la production de particules lentivirales. Elles sont cultivées en milieu de type DMEM supplémenté de 10% SVF.

2.3 Transfections transitoires-méthode du phosphate de calcium

Les cellules 293T sont transfectées par la technique de transfection au phosphate de calcium selon la méthode décrite par Lefloch et collaborateurs (Lefloch et al., 2008). Les cellules sont ensemencées dans des pétris de 100 mm de diamètre $(2,2 \times 10^6 \text{ par pétri})$. Le lendemain, le milieu de transfection est préparé en mélangeant dans un volume final de 1 ml, 20 µg maximum d'ADN plasmidique, à la solution de CaCl₂ d'une concentration finale de 125 mM dans une solution d'HBSP (Glucose 6 mM, Hepes 25 mM, NaCl 140 mM, Na2HPO4 750 µM, KCl 5 mM, pH 7,06). Après 1 min à T° ambiante, le précipité est ajouté goutte à goutte et de manière homogène sur la surface de la boite de culture. Les cellules sont ensuite lysées 24 à 48 h après la transfection.

2.4 Lyse cellulaire et immunobuvardages

Les cellules sont lavées dans du PBS (NaCl 140mM, KCl 2.5mM, NaHPO4 10mM, KH2PO4 2mM, pH 7.4) puis lysées à température ambiante avec du tampon de dénaturation de Laemmli (Tris-HCl 63 mM, SDS 2%, glycérol 10%, 2-Mercaptoéthanol 0.1%, bleu de bromophénol 0.001%, pH 6.8) (Wagner and Laemmli, 1976). Après sonication des échantillons pendant 5 min, la concentration en protéines est déterminée par la méthode du BCA (Sigma-Aldrich). Les échantillons (entre 15 et 50 µg de protéines) sont dénaturés pendant 5 min à 95°C en présence de bleu de bromophénol et de 5% β-mercaptoethanol. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de 7,5%, 10% ou 12,5% en présence de SDS (SDS-PAGE) (voltage = 150 V, ampérage = 40 mA/gel) et transférées sur une membrane de PVDF (Ampérage = 110mA limitant pendant 16 h). La membrane est ensuite saturée pendant 1 h à température ambiante dans un tampon de saturation (lait 5% dans du PBS-T 0,1% v/v Tween 20) puis est incubée pendant 1 h dans ce même tampon avec les différents anticorps d'intérêts. La membrane est lavée trois fois pendant 10 min dans de l'eau, puis incubée à température ambiante pendant 1 h avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase dans du tampon de saturation. La membrane est à nouveau lavée trois fois pendant 5 min puis les protéines sont révélées en utilisant les systèmes de chimiluminescence (ECL) (Millipore).

2.5 **RT-PCR** quantitative

Les ARN totaux ont été extraits des cellules et purifiés selon les recommandations du kit RNAeasy mini kit de la compagnie Qiagen (Toronto, Canada). Les traces résiduelles d'ADN cellulaire sont éliminées par digestion par la DNAse I (Qiagen). Un µg d'ARNm est rétrotranscrit par l'enzyme reverse-transcriptase AMV de la compagnie Roche à 37°C pendant une heure. La PCR quantitative est réalisée sur un cycleur de type LightCycler® Carousel-Based System de la compagnie Roche, avec le mélange de polymérase + SYBRgreen de Qiagen, suivant les recommandations des fabricants (hybridation à 60°C). La normalisation des échantillons est réalisée par un couple d'oligonucléotides qui amplifie

spécifiquement l'ARNm de la protéine humaine RPLPO (aussi nommé *ARBP* chez la souris, ou *36B4*).

2.6 Échantillons de tumeurs colorectales humaines

Les échantillons d'adénomes et d'adénocarcinomes colorectaux ainsi que leur marge de résections normale et appariée (éloignés d'au moins 10 cm de la tumeur) ont été obtenus de patients opérés chirurgicalement. Les tissus ont été obtenus après consentement des patients en accord avec le protocole d'éthique de la commission institutionnelle d'études des sujets humains du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Tous les tissus ont été extraits depuis les inclusions de tissus en paraffine préalablement fixés à la formaline suivant le kit d'extraction FFPE DNA Isolation Kit for Cells and Tissues (Qiagen). APC (exon 15) et KRAS (exons 1 et 2) ont été amplifiés par PCR et la présence des mutations a été détectée par séquençage direct (Plateforme de Séquençage et de Génotypage des Génomes du CRCHUL, QC, Canada) Les tissus pairés ont été lysés dans un tampon Triton et les immunobuvardages ont été réalisés comme décrits précédemment.

2.7 Immunofluorescences

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles en verre dans des plaques de culture de 6 puits (10⁵ cellules par puits). Après 24 à 48h, elles sont fixées par ajout dans les puits de culture de paraformaldéhyde (PFA) à 3,7% final et à 37°C pendant 15 min. Après 3 lavages avec du PBS/2% BSA, utilisée ici comme agent mouillant, les cellules sont perméabilisées avec du Triton X-100 0,1% pendant 15 min. Pour les expériences de colocalisation p27^{Kip1}/cathepsine B, les lamelles sont incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires (voir tableau annexe) dans un tampon PBS/2% BSA (anti-p27^{Kip1} C-19 1/100^e et anti-cathepsine B R&D ; 1/50^e). Les lamelles sont rincées trois fois dans du PBS puis incubées pendant 45 min, à température ambiante, dans le tampon PBS/2% BSA en présence d'un anticorps secondaire fluorescent (anti-lapin Alexa Fluor 488 pour p27^{Kip1} et anti-chèvre Alexa Fluor 594 pour la cathepsine B, voir tableau annexe). Les lamelles

sont rincées 3 fois dans du PBS et incubées en présence du réactif de DAPI pour colorer les noyaux. Elles sont rincées à l'eau bidistillée pendant 1 min puis montées sur lames en utilisant du milieu de montage Gel Mount (Biomeda, Foster City, USA). Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal de type Zeiss Axio Observer muni d'un objectif de 63X/1.4 et de 100X/1.46 à immersion dans l'huile (Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada). Les contrôles négatifs incluant les anticorps secondaires seuls ont été réalisé au même temps d'exposition (photos non montrées). L'acquisition des images s'est faite en mode séquentiel afin d'éviter toute interférence due au chevauchement des signaux de fluorescence. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel Zen Black Edition (Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada).

2.8 Enrichissements des fractions protéiques cytoplasmiques et nucléaires

Les cellules sont lavées dans du PBS, récoltées par grattage puis centrifugées 5 min à 1200 r.p.m à 4°C. Le culot est ensuite resuspendu dans 100µl de tampon de lyse (10 mM HEPES pH 7.9, 1 mM EDTA, 60 mM KCL, 5% NP-40, 0.25 mM PMSF et 1 mM DTT) suivi d'une incubation sur glace pendant 5 min. Les débris cellulaires sont culottés 10 min à 13000 r.p.m à 4°C et le surnageant transféré dans un tube eppendorf constitue la portion cytoplasmique de l'extrait. Au culot, 100µl d'un tampon de resuspension nucléaire (0.25M Tris pH 7.8, 75 mM KCL, 0.25mM PMSF et 1mM DTT) sont ajoutés avant de procéder à 3 cycle de gel/dégel 2 min dans un bain d'azote liquide et une plaque chauffante à 37°C. Les tubes sont centrifugés 10 min à 13000 r.p.m. à 4°C. Le surnageant constitue la portion protéique nucléaire de l'extrait cellulaire. Les échantillons sont finalement dosés puis analysés par immunobuvardage. La calpaine est utilisée comme contrôle d'enrichissement de la fraction protéique et la lamine B en contrôle d'enrichissement nucléaire. Protocole adapté de Boudreau et collaborateurs, (Boudreau et al., 2007)

2.9 Essais de clivage par la cathepsine B

La protéine humaine recombinante cathepsine B a été fournie par la compagnie Calbiochem (Burlington, ON, Canada). 50 ng de cathepsine B ont

d'abord été incubés 5 min à 30°C dans un tampon de réaction (50 mM Tris pH 6.5, 5 mM DTT). 50µg de lysat cellulaire surexprimant les constructions HA-p27^{kip1} ont alors été rajoutés puis la réaction a été incubée pendant 30 min à 30°C. La réaction a été stoppée par l'ajout d'un même volume de tampon de type Laemmli 2X et les échantillons ont été analysés par immunobuvardage.

2.10 Détection de l'activité cathepsine B à l'aide d'un substrat fluorogénique

L'activité protéolytique de la cathepsine B a été détectée sur des cellules en culture à l'aide d'un substrat fluorogénique formé d'un doublet d'arginines lié au fluorophore de type crésyl violet émettant un signal lumineux entre 550 et 590 nm, comme indiqué par le fabricant. Pour ce faire, les cellules ont été ensemencées sur lamelle dans des pétris de 35 mm. Le lendemain, le substrat est ajouté au milieu de culture pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont lavées au PBS puis fixées dans une solution de PFA 3,7% pendant 10 min. Elles sont ensuite traitées 10 min dans une solution de Hoeschst 33342 à 1 µg/ml afin de colorer les noyaux. Les cellules sont ensuite lavées à l'eau bidistillée puis les lames sont montées sur lamelles. Les observations ainsi que les photographies sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal de type Zeiss Axio Observer muni d'un objectif de 100X/1.46 à immersion (Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada). Les images ont été analysées à l'aide du logiciel Zen Black edition (Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada).

2.11 Concentration des milieux conditionnés des différentes lignées intestinales

Brièvement, les cellules ont été comptées au compteur Invitrogen Cell Counter puis ensemencées à une même densité de 7x10⁶ cellules par pétris de 100 mm, pour les différents types cellulaires étudiés, dans leurs milieux respectifs (10% SVF, 2mM hydroxyurée). L'hydroxyurée est utilisée ici pour empêcher les cellules de proliférer pendant le conditionnement des milieux. Le lendemain, les milieux de culture ont été changés par 5 ml de milieu frais (0% SVF, 2mM hydroxyurée) afin de permettre leur concentration. Après 48 h de conditionnement, les milieux

ont été prélevés puis centrifuger 5 min à 1500 r.p.m afin d'enlever les débris cellulaires puis stocker stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Pour l'immunobuvardage, les milieux de culture conditionnés ont été décongelés puis 4 ml ont été placés sur des colonnes Amicon Ultra 10 kDa (Millipore) afin de les concentrer par ultracentrifugation (4000g, 60min). Environ 50µl ont été récoltés pour chaque concentrats de milieux conditionnés.

2.12 Clonage de p27^{Kip1}, ctsB-FL et ctsB∆52 en vecteur de type PCDNA 3.1 L'ADN complémentaire codant pour la forme humaine de p27^{Kip1} a été amplifié par PCR à partir de la rétrotranscription d'ARN totaux issus des cellules humaines HIEC. L'amplification a été effectuée en utilisant l'oligonucléotide sens 5'- TCA CTA GGA TCC ACC ATG TCA AAC GTG CGA G -3' portant le site de restriction BamHI suivi du codon initiateur de la traduction et l'oligonucléotide antisens 5'-AGT GAT CTC GAG TTA CGG GAG GCT AGC ATA ATC AGG AAC ATC ATA CGT TTG ACG TCT TCT GAG GCC AGG CTT -3' portant la séquence codant pour une étiquette HA (YDVPDYASLP) en amont du site de restriction Xhol. Après séquençage de l'amplicon, celui-ci a été inséré par ligation dans un vecteur de type PCDNA 3.1 après ouverture de ce dernier par digestion enzymatique BamHI-Xhol.

Dans le cas de la cathepsine B pleine longueur (ctsB-FL) et de sa forme épissée ctsB Δ 52, leurs ADN complémentaires ont été amplifiés en utilisant les oligonucléotides sens 5'- **TCA CTA GGA TCC ACC ATG TGG CAG CTC TGG GCC** -3' et 5'- **TCA CTA GGA TCC ACC ATG AGC TAC TTG AAG AGG**- 3' respectivement. Comme dans le cas de p27^{Kip1}, ces oligonucléotides contiennent chacun un site de restriction BamH1 suivi du codon initiateur de la traduction correspondant à la méthionine 1 pour ctsB-FL et à la méthionine 52 pour ctsB Δ 52. Pour ces deux formes qui partagent une extrémité C-terminale commune, l'oligonucléotide antisens 5'- **GTC GGT TGC AGG TCG CGC TAT TCC TGC GCA TTG-** 3' est commun pour les deux formes.

2.13 Mutagénèse dirigée et construction du double mutant p27Kip1∆96-100/R152A

La construction codant pour le double mutant p27Kip1-A96-100/R152A a été réalisée par la méthode de mutagénèse dirigée « Overlap Extension » avec la technique de PCR (polymerase chain reaction) par remplacement de la portion entre les sites de restriction Bamh1 et Xho1 du vecteur d'expression pCDNA3.1. Toutes les amorces ont été synthétisées chez Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON, Canada), les amorces externes étant respectivement en 5' hp27-BamH1-S - 5' TCA CTA GGA TCC ACC ATG TCA AAC GTC 3' - et en position 3' hp27-Xho1-AS - 5' AGT GAT CTC GAG TTA CGT TTG ACG TCT TCT GAG 3' où les bases en caractère gras représentent les sites de restriction ajoutés. Les amorces internes pour les différentes mutations sont les suivantes ; Deletion 96-100, hp27-∆96-100-sens – 5' CCC CCG CGG CCC CCC GTC CCG GCG 3' et hp27-A96-100-antisens 5' CTC CTG CGC CGG CAC GGG GGG CCG. Pour la mutation ponctuelle R152A; hp27R152A-sens - 5' TGC GCA GGA ATA CCA AAG CGA CCT GCA ACC 3' – et hp27R152A-antisens - 5' GCT TGC AGG TCG CTT TGC TAT TCC TGC 3'. La réaction de PCR a été effectuée dans les conditions suivantes : 100 ng vecteur de départ (pCDNA3.1), 25 mM dNTP, 200 nM de chaque oligonucléotide, 5 µl de tampon 10X pour l'ADN polymérase Pful et 2 unités de l'ADN polymérase *Pful* (Stratagene, La Jolla, CA, USA). La solution a été complétée à 50 µl avec de l'eau stérile. L'appareil PCR utilisé est un Personal ThermoCycler (Biometra, Montréal Biotech, Montréal, QC, Canada) en utilisant le programme Overlap Extention qui comprend les conditions suivantes :

Nombre	Dénaturation	Hybridation	Polymérisation
Premier cycle	2 min 94°c	-	-
20 cycles	1 min 94°c	1 min 50°c	1 min 72°c
Dernier cycle	1 min 94°c	-	10 min 72°c

Tableau 2 : Programme PCR « overlap extension »

Après la réaction de PCR, les fragments ont été séparés sur un gel d'agarose 1% (Sigma-Aldrich). Les bandes correspondantes aux amplicons attendus ont été coupées et placées dans un tube Eppendorf stérile contenant environ 1 cm de laine de verre compactée dans lequel deux trous ont été perforés. Ce tube a été placé sur un autre tube Eppendorf et centrifugé cinq min à 13000 r.p.m. Les fragments récupérés ont été purifiés par une extraction au phénol-chloroformealcool isoamyl (25 : 24 : 1) dans un ratio de 1/1, après centrifugation à 13000 r.p.m. propre. L'ADN a été précipité par l'ajout d'acétate de sodium 3M 1 :10 et d'éthanol 100% glacial, et centrifugé pendant 30 min à 13000 r.p.m. Le culot a été ensuite resuspendu dans un volume de 30 µl et utilisé pour la seconde réaction PCR.

La seconde réaction PCR a été réalisée en utilisant 50 ng de chacun des fragments obtenus lors de la première réaction et en utilisant les amorces externes hp27-BamH1-S et hp27-Xho1-AS. Les fragments obtenus ont été digérés par les enzymes BamH1 et Xho1. Les réactions PCR ont été purifiées sur colonne Microcon-PCR (Millipore, Bedford, MA, USA) pour éliminer les contaminants (amorces et enzymes de restriction). Les fragments obtenus ont été ligués dans le vecteur pCDNA3.1 préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction, à l'aide du Rapid DNA Ligation Kit (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) pendant 20 min à température de la pièce. Les produits ont été transformés dans

les bactéries compétentes Dh5 α *Escherichia coli* (Clontech, Mississauga, ON, Canada). La présence des mutations a été vérifiée par digestion à l'aide d'enzymes de restriction adéquates et par séquençage (University Core DNA & Protein Services, University of Calgary, Calgary, AB, Canada).

2.14 Génération d'un shARN dirigé contre l'expression de cathepsine B

La construction du vecteur d'expression lentiviral ainsi que la production de lentivirus ont été réalisées suivant les instructions d'Invitrogen.

2.14.1 Construction du plasmide pLentiV6-U6/sh-Cathepsine B et de la séquence contrôle aléatoire

La caractérisation de la séquence du shARN a été réalisée par analyse de la séquence nucléotidique de l'ARNm de la cathepsine B humaine par le logiciel web BLOCK-iT[™] RNAi Designer du site d'Invitrogen. La séquence donnant la meilleure chance de réussite (**5'-GGATCACTGTGGAATGGAATC-3'** située dans l'exon 12 de l'ARNm) a été utilisée pour la construction des oligonucléotides. La séquence entière du shARN contient plusieurs domaines importants : les séquences sens et antisens ciblées par le shARN, les sites de clonages Bam H1 et Xho1 nécessaires à l'insertion du shARN dans le pLenti V6-U6, une séquence de terminaison pour l'ARN polymérase III ainsi qu'une séquence riche en AU permettant la formation d'une petite boucle (small hairpin).

La séquence aléatoire du shARN dite «scramble» est utilisée en contrôle et contient la même quantité de nucléotides ACTG que la séquence du shARN mais dans ordre différent (5'-GAGCCATTAGGACGGTTAGAT-3'). un Les oligonucléotides ont été resuspendus à une concentration de 10µM dans de l'eau nanopure. Leur hybridation a été effectuée en ajoutant 2 pmoles de chacun des oligonucléotides dans un tampon d'hybridation (1 M Tris - HCL pH 7.5, 5M NaCl, 0,5M EDTA) chauffé à 65°C pendant 10 min. Les tubes ont alors été sortis du bloc chauffant et laissés tempérés jusqu'à l'atteinte de la température de la pièce. Le vecteur pLenti V6-U6 est une construction réalisée par le Dr Dominique Jean (Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Université de Sherbrooke) dans laquelle la séquence du promoteur du gène de l'ARNsn U6 provenant du plasmide

pSilencer 2.0-U6 a été insérée dans le vecteur d'origine pLentiV6/V5-D-TOPO. Brièvement, le promoteur U6 a été amplifié par PCR à partir du pSilencer 2.0-U6 en utilisant l'oligonucléotide sens 5'- CCATCGATCATGATTACGAATTGCAACG-3' site restriction Cla1) (insertion du de et l'oligonucléotide 5'-GGCCAGTGCCAAGCTTG-3'. Le produit de la PCR a été digéré par BamH1 et Cla1 et a été cloné dans le pLentiV6/V5-D-TOPO, linéarisé par une digestion BamH1 et Cla1, en remplacement du promoteur CMV. Le vecteur a été amplifié puis digéré par les enzymes de restriction BamH1 et Xho1, purifié et dosé par les techniques usuelles de biologie moléculaire. Une portion des oligonucléotides du shARN double brin a été liguée dans le vecteur pLentiU6 linéarisé puis la construction a servi à la transformation de bactéries compétentes E. coli stabl3. L'ADN des clones bactériens ayant poussé a été amplifié puis isolé. Après séquençage des clones (Génome Québec, Université Laval, QC), ceux ayant incorporé le shARN ont été utilisés pour la fabrication du lentivirus.

2.14.2 Production du lentivirus

Une journée avant la transfection des cellules 293T, ces dernières ont été ensemencées à une densité de 5x10⁶ cellules/pétri de 100 mm. Le lendemain les cellules ont été transfectées par la méthode phosphate de calcium (voir section transfections) avec un mélange d'ADN comprenant 7 µg du vecteur plp1, 7 µg du vecteur plp2, 7 µg du vecteur VSVG et 7 µg du vecteur pLentiV6/U6-shCathepsine B ou pLentiV6/U6-scramble. Quarante-huit heures après la transfection, le milieu de culture des cellules 293T a été récolté puis filtré à 0.45 µm, aliquoté puis stocké à -80°C.

2.14.3 Infection des cellules avec le virus

Les cellules d'intérêt ont été cultivées en pétris de 100 mm jusqu'à l'obtention d'une confluence d'environ 40 à 60%. Le virus a alors été décongelé rapidement dans un bain à 37°C et 1 μ l de polybrène frais (4 μ g/ μ l) a été ajouté. Le milieu de culture des cellules a été remplacé par 1 ml de solution virale pendant 1 h à 37°C puis 5 ml de DMEM frais a été ajouté. Après 2 jours de culture, le milieu a été remplacé par un milieu contenant de la blasticidine (10 μ g/ml) qui est l'antibiotique

nécessaire à la sélection des cellules infectées. La sélection a été maintenue pour une période minimum de 14 jours. Les cellules ont par la suite été analysées quant à l'expression de la cathepsine B.



Figure 2.14: Cartes des différents vecteurs utilisés pour le clonage du lentivirus portant la séquence de shARN dirigée contre la cathepsine B humaine

a) Le plasmide **pLenti V6-U6** a été utilisé pour l'insertion du shARN double brins entre les sites de restriction BamH1 et Xho1. b) Les trois plasmides **pLP1**, **pLP2 et pLP/VSVG** ont été utilisés pour la production du lentivirus dans les cellules 293T. pLP1 code pour le gène viral *gag* : nécessaire à la structure du lentivirus et pour le gène *pol* : nécessaire à sa réplication. pLP2 code pour le gène *Rev* qui est requis pour l'expression des gènes *gag* et *pol* ainsi que pour l'exportation nucléaire des ARN viraux dans les virions néosynthétisés. Enfin, pLP/VSVG code pour une glycoprotéine G de l'enveloppe virale.

2.15 Expériences de croissance cellulaire par comptages de cellules.

Toutes les expériences de croissance cellulaire ont été réalisées au moins 14 jours après la sélection stable des cellules. Les cellules ont été ensemencées dans des pétris de 35 mm en plaque de 6 puits à une concentration de 120 000 cellules/puits pour les DLD-1, 200 000 cellule par puits pour les HT-29 et les HIEC. La croissance cellulaire a été mesurée pendant 7 à 8 jours en utilisant un compteur à cellules (Cell Particle Counter, Invitrogen).

2.16 Croissance de colonies cellulaires en milieu semi-solide d'agarose mou

Les milieux de culture 2X McCoy 5A (HT-29) et RPMI (DLD-1) ont été préparés en ajoutant 20% SVF, 8 mM glutamine, pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 mg/ml (Invitrogen), 40 mM HEPES (Wisent). Ces milieux 2X ont été mélangés 1:1 avec de l'agarose type VII 1,4%, stérilisé et maintenu à 42°C. Les puits de 35 mm ont été recouverts de 1 ml/puits du mélange milieu/agarose puis laissés à température pièce pendant 1 h pour laisser figer la première couche. Les cellules ont alors été ensemencées dans ce même mélange milieu/agarose à 50 000 cellules/ml (HT-29) et 30 000 cellules/ml (DLD-1) à raison de 1,5 ml/puits. Les puits sont laissés à température pièce sous la hotte jusqu'à solidification de la couche contenant les cellules puis sont placés à 37°C, 5% CO₂. Les milieux 1X (McCoy 5A et RPMI) frais et supplémentés de 10% SVF sont ajoutés au 2-3 jours à la surface des couches d'agarose. Dans le cas de traitements avec des inhibiteurs pharmacologiques, les milieux ont été changés quotidiennement. Après environ 18 à 21 jours, les colonies formées ont été colorées par addition de 1 ml d'une solution de MTT à 0,5 mg/ml dans du PBS sur la surface de l'agarose pendant 2 h à 37°C, 5%. Le MTT est un colorant qui s'accumule dans les cellules vivantes. Les images ont été acquises avec une caméra Alphalmager (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA) et les colonies ont été comptées en utilisant le logiciel informatique ImageJ. Protocole adapté de Diaz et collaborateurs, (Diaz et al., 2002).

2.17 Expériences d'invasion cellulaire en chambres de Boyden

Les expériences d'invasion cellulaire ont été réalisées en utilisant les chambres d'invasion BD Matrigel[™] Invasion Chamber 24-well plate 8.0 µM et en suivant les instructions du fabricant. Brièvement, les plaques sont réchauffées à température pièce pendant 30 min afin d'éviter la condensation d'eau sur les membranes. Ensuite le Matrigel[™] a été humidifié avec du milieu McCoy 5A (HT-29) ou du RPMI (DLD-1) pendant au moins 1 h à 37°C, 5% CO₂. Les cellules ont alors été ensemencées à 30 000 cellules (HT29) ou 10 000 cellules (DLD-1) dans 200 µl de leur milieu respectif ne contenant pas de sérum. Du milieu de culture contenant 20% sérum a été ajouté dans les compartiments inférieurs. Les plagues sont alors placées à 37°C, 5% CO₂ pendant 48 à 72 h afin de permettre aux cellules d'envahir la membrane de Matrigel™. Les cellules n'ayant pas traversé la membrane ont été enlevées en utilisant 2 cotons tiges, tandis que les cellules avant traversé la membrane ont été fixées dans une solution de PBS/PFA 4% pendant 10 min. Après rinçages, les cellules ont été perméabilisées dans une solution de Triton 0,1% pendant 10 min avant d'être colorées au réactif de DAPI pendant 5 min. Le comptage manuel des noyaux a été réalisé sous le microscope.

2.18 Injection sous-cutanée chez la souris CD1 nu/nu immunodéficiente

Les souris femelles CD1 nu/nu ont été obtenues par la compagnie Charles River (Wilmington, MA, USA). Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique sur l'expérimentation animale de l'Université de Sherbrooke. Brièvement, toutes les cellules exprimant le shARN dirigé contre la cathepsine B ainsi que leurs contrôles (scramble) ont subi un minimum de 14 jours de sélection à la blasticidine (5 µg/ml) Des suspensions de 1x10⁶ de cellules HT-29 contrôles ou sous-exprimant la cathepsine B dans 100 µl de milieu McCoy 5A supplémenté de 10% SVF ont été injectées dans les tissus sous-cutanés dorsaux de souris âgées de 6 semaines. Le suivi de la croissance des tumeurs s'est fait par mesure directe journalière à l'aide d'un étrier. Les souris nu/nu ont été sacrifiées 23 jours post-injection. Les tumeurs sous-cutanées ont été prélevées, mesurées puis lysées dans un tampon de type RIPA (50mM Tris, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Na déoxycholate, 1mM PMSF) contenant des inhibiteurs de protéases afin d'éviter
la dégradation protéique de ces extraits tumoraux, une tablette complète d'un cocktail d'inhibiteurs (Roche) a été ajoutée pour 10 ml de tampon.

2.19 Injection dans la veine de la queue chez la souris Fox Chase SCID Beige

Les souris femelles Fox Chase SCID Beige ont été obtenues par la compagnie Charles River. Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique sur l'expérimentation animale de l'Université de Sherbrooke. Brièvement, la veine de la queue a été injectée avec une suspension de 1x10⁶ cellules HT-29 dans un volume de 100 µl de milieu McCoy 5A supplémenté de 10% SVF. Les animaux ont été sacrifiés aux premiers signes de détresse respiratoire ou de perte de poids apparent à environ 30 jours post-injection. Les poumons des souris injectées ont été prélevés puis incubés dans le tampon fixateur de type Bouin pour une période de 24 h. Les lobes pulmonaires ont été séparés puis le nombre total de métastases sur la surface visible des lobes pulmonaire a été déterminé.

2.20 Traitement AOM-DSS sur les souris cathepsine B -/-

Le traitement à l'AOM (azoxyméthane) et au DSS (Dextan Sosuim Sulfate) induit chez la souris des lésions cancéreuses colorectales associées à une colite (Meunier et al., 2010). Les souris C57Bl/6j invalidées pour l'expression de la cathepsine B ont été gracieusement données par le Dr Thomas Reinheckel de l'Université de Freiburg en Allemagne. Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique sur l'expérimentation animale de l'Université de Sherbrooke. Brièvement, les souris âgées de 8 semaines ont reçu une simple dose d'AOM à 10 mg/kg par injection intra-péritonéale au jour zéro de l'expérience. Cette injection a été suivie de trois cycles de 4 jours de traitement au DSS 1,5% dans l'eau de boisson. La solution de DSS 1,5% est préparée en diluant le DSS dans de l'eau du robinet filtrée et stérile et en utilisant un filtre de 0,22 µm. Le premier cycle du traitement au DSS s'est réalisé 7 jours après l'administration de l'AOM. Chaque cycle de traitement au DSS est espacé d'une période de récupération de 15 jours afin de permettre la restitution de l'épithélium colique. À la suite du dernier traitement au DSS, les souris ont reçu de l'eau

normale jusqu'à leur sacrifice. Les souris sont alors âgées de 18 semaines. À la fin de l'expérience, les souris sont sacrifiées, le colon est prélevé et les tumeurs sont comptées. La charge tumorale a été déterminée en calculant la somme des aires des tumeurs formées (Aire _{ellipse} = petit diamètre x grand diamètre x π).

2.21 Analyses statistiques

Toutes les expériences montrées sont représentatives d'un minimum de trois à quatre essais. La quantification des signaux obtenus par immunobuvardage a été réalisée à l'aide du logiciel libre ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Dans les expériences d'analyses biochimiques des tumeurs sous-cutanées, les analyses statistiques ont été faites à l'aide du test-t de Wilcoxon et sont considérées statistiquement valides à p<0.05. Dans les expériences d'ancrage ainsi que les expériences d'invasion, les analyses statistiques ont été faites à l'aide d'un test-t de Student.

3 RÉSULTATS

3.1 Caractérisation du statut d'expression de la cathepsine B dans les lignées de cellules cancéreuses colorectales.

3.1.1 L'expression de la cathepsine B est hétérogène dans les lignées cancéreuses.

Dans le but de pouvoir comparer et mieux caractériser le statut de la protéase à cystéine cathepsine B à l'échelle cellulaire, nous avons utilisé différents modèles de cellules normales et cancéreuses. Les différentes caractéristiques des lignées étudiées sont listées dans le tableau 1 (section Matériel et méthodes). Dans un premier temps, les différents types cellulaires ont été cultivés dans des conditions normales de culture jusqu'à l'atteinte de la confluence désirée (50 à 75%) nécessaire pour l'extraction des protéines et des ARN totaux. L'expression des ARN messagers codants pour la cathepsine B semble être relativement hétérogène dans les différentes lignées cancéreuses comparées. Cependant, les cellules HIEC qui sont des cellules normales épithéliales mais d'origine iléale, expriment des niveaux d'ARNm codant pour la cathepsine B entre 6X supérieurs à ceux observés dans la lignées cancéreuses colorectales Caco 2/15 (****, p<0,0001) et 1,4X supérieur à ceux observés pour la lignée Colo205(**, p<0,01) (figure 3.3.1A). De manière intéressante, les ratios d'expression en ARNm observés sont similaires aux niveaux protéiques observés par immunobuvardage (figure 3.3.1.B). Néanmoins, on dénote, là aussi, une hétérogénéité d'expression entre les différents types cellulaires étudiés, les HIEC étant les cellules possédant un plus haut niveau protéique de cathepsine B. On constate aussi, au sein des lignées cancéreuses, des niveaux variables de cathepsine B tant en ce qui concerne l'expression du zymogène pro-cathepsine B que l'expression des formes dites actives de la protéase soit la forme monochaîne de 30 kDa ainsi que la forme de 25 kDa correspondant à la chaîne lourde de la protéine. On constate que les Caco-2/15 possèdent de hauts niveaux du zymogène non actif pro-cathepsine B comparativement aux autres types cellulaires. Par ailleurs, la forme active -

Figure 3.1.1 : Statut d'expression de la cathepsine B dans les lignées intestinales en culture. A : Les cellules normales iléales HIEC et les lignées cancéreuses colorectales (Caco2/15, HCT116, DLD-1, HT-29, Lovo, SW480 et Colo205) ont été cultivées jusqu'à la confluence désirée (de 50 à 75 %) puis lysées. Les ARN totaux ont été isolés puis purifiés suivant les recommandations du fabricant. La PCR quantitative a été effectuée suivant la méthode décrite dans la section Matériel et méthodes. Les niveaux relatifs en ARN messagers codant pour la cathepsine B ont été quantifiés par la méthode de la courbe standard puis normalisés sur l'expression du gène de ménage huPBGD. Le graphique représente les moyennes +/- écarts types de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicats pour chaque lignée. **** : moyennes significativement différentes du contrôle HIEC (p<0.0001), ** : moyennes significativement différentes du contrôle HIEC (p<0. 01) (test-t de Student) B : Les mêmes lignées cellulaires ont été cultivées dans les mêmes conditions puis lysées afin de récolter les lysats protéiques. L'expression de la cathepsine B a été évaluée par buvardage de type Western. L'actine et ERK2 total sont utilisés comme contrôles de charge. En haut, les cellules ont été cultivées en milieu contenant 10 % SVF (5 % pour les HIEC). En bas, les cellules ont été déprivées en sérum pendant 48 h.



В.



Figure 3-1-1

А.

-de 25 kDa semble être beaucoup moins exprimée que la forme de 30 kDa ce qui suggère que la maturation de cette protéase n'est pas totale dans ce type cellulaire, à l'état prolifératif. En vue des expériences ultérieures, nous avons également vérifié si l'expression protéique de la cathepsine B était modifiée lorsque les cellules cancéreuses étaient cultivées en absence de sérum. Nous n'avons pas pu constater de modulation relative importante de l'expression de la cathepsine B entre les différentes lignées à l'exception peut-être de la lignée Lovo qui semble en exprimer plus lorsque privée en sérum (figure 3.3.1B).

3.1.2 Localisation de l'activité cathepsine B dans les lignées cancéreuses colorectales

La révélation de l'activité protéolytique intracellulaire de la cathepsine B a été permise par l'utilisation du substrat fluorogénique z-RR-crésyl violet (voir Matériel et méthodes) qui émet de la fluorescence lorsque celui-ci est clivé et dégradé par la cathepsine B. Nous pouvons constater une localisation majoritairement vésiculaire dont la densité est plus élevée au pourtour des noyaux ce qui suggère une localisation golgienne (figure 3.1.2A). De plus, nous observons l'activité protéasique de la cathepsine B dans des compartiments de types vésiculaires lysosomaux et endolysosomaux qui sont les principaux compartiments de stockage de la cathepsine B. Les marquages d'activité restent, là aussi, hétérogènes notamment en ce qui concerne la densité des vésicules intracellulaires possédant une activité cathepsine B. Par ailleurs, la présence de cathepsine B intralysosomale a été confirmée par immunofluorescence dans les cellules Caco-2/15 après leur traitement au LysoTracker® (figure 3.1.2B). La forte expression intracellulaire de la cathepsine B dans les cellules HIEC nous est confirmée par les marquages d'activité qui révèlent une densité lysosomale plus importante dans ces cellules que dans les cellules Caco 2-15 ou HT-29 (figure 3.1.2A). Enfin, il nous a été possible de déceler la présence de cathepsine B dans le noyau des cellules cancéreuses Caco-2/15 comme le montre la colocalisation

Figure 3.1.2 : Localisation de l'activité intracellulaire de la cathepsine B

A: Les cellules HIEC, Caco-2/15, HT-29 puis DLD-1 ont été cultivées sur lamelles de verre dans des puits de 35 mm. Le substrat fluorescent, reconstitué à 26X dans du PBS, a été ajouté dans le milieu de culture de 30 à 60 min dans une atmosphère à 37°C, 5% CO₂. Les cellules ont alors été lavées puis fixées au paraformaldéhyde 3,7% pendant 10 min. Les lamelles ont été posées sur lames puis la fluorescence engendrée par l'activité de la cathepsine B a été observée par microscopie à épifluorescence inversée (Zeiss, Axiovert) à une longueur d'onde de 550 nm et à un grossissement de 40X. Les noyaux ont été margués au DAPI. **B**: Au préalable de leur fixation, les cellules Caco 2-15 ont été traitées avec le colorant acidophile LysoTracker® Red-DND99 75 nM dans du DMEM pendant 1 h. Suite à la fixation, l'immunofluorescence contre la cathepsine B a été réalisée et l'acquisition des signaux émis par la cathepsine B (en vert) et par les lysosomes (en rouge) a été réalisée par microscopie à épifluorescence. C et D: L'expression (en C) et l'activité nucléaire de la cathepsine B (en D) ont été observées dans la lignée cancéreuse Caco-2/15 à l'aide d'un microscope confocal (Olympus FV -1000, Centre de Recherche clinique Etienne-LeBel du CHUS).

А.





Caco 2/15



Figure 3-1-2



D.

C.



DAPI/FITC. Ceci suggère qu'une petite partie de l'expression de la protéase est probablement déroutée vers les noyaux dans cette lignée cancéreuse colorectale (figure 3.1.2C). De plus, il semblerait que la cathepsine B observée dans le noyau soit active puisque les marquages d'activités cathepsine B révèlent, eux aussi, des zones de marquage nucléaire (figure 3.1.2D).

3.1.3 État de la sécrétion de la cathepsine B par les lignées intestinales normales et cancéreuses.

Il a beaucoup été documenté que la cathepsine B puisse subir un déroutage et ainsi être sécrétée dans certains cas physiologiques spécifiques ainsi que dans plusieurs pathologies telle que le cancer (Koblinski et al., 2002; Yan and Sloane, 2003). Nous avons donc, dans cette optique, tenté de caractériser le niveau de sécrétion de cette protéase par les différentes lignées cellulaires étudiées précédemment. Pour cela, les milieux de culture de chacun des types cellulaires ont été concentrés sur des colonnes Amicon ultra 10kDa nous permettant de filtrer les protéines d'un poids inférieur à 10 kDa et par le fait même, de concentrer les protéines d'un poids moléculaire supérieur à 10 kDa dans un volume final de 50 µl. Afin d'amener un niveau de normalisation adéquat pour comparer la sécrétion de cathepsine B par les cellules normales et cancéreuses, nous avons ensemencé un nombre équivalent de cellules pour chaque lignées. Pendant le conditionnement des différents milieux de culture (sans sérum), nous avons ajouté aux milieux, une dose de 2mM finale d'hydroxyurée afin d'empêcher les cellules de se diviser et ainsi d'abroger le différentiel de prolifération entre les cellules normales et cancéreuses qui devient relativement important en 48 heures. Dans cette expérience les cellules normales HIEC ont été remplacées par la lignée CRL-1831 qui est une lignée colique normale fœtale humaine.Les échantillons ont été analysés par immunobuvardage contre la cathepsine B. Nous constatons d'après la figure 3.1.3 que les niveaux des sécrétats cathepsine B sont là aussi hétérogènes dans les différentes lignées testées. Nous décelons aussi un niveau de sécrétion de la forme zymogène inactive de la protéase dans les cellules normales CRL-1831. Au sein des lignées cancéreuses, la sécrétion de la forme zymogène est observée en plus grande quantité dans certaines lignées comme les Caco-2/15, SW480 et SW620. De plus les formes actives de la protéase de 30 et 25 kDa sont plus facilement observables dans les lignées cancéreuses telles que les Caco-2/15 et SW480 comparativement aux cellules normales CRL-1831. Notons que la maturation extracellulaire de la cathepsine B étant un processus complexe faisant intervenir le pH environnant ainsi que d'autres protéases (Mach et al., 1994; Reiser et al., 2010), il reste difficile par immunobuvardage, de bien caractériser l'état de l'activité protéolytique intracellulaire et extracellulaire de l'enzyme dans les différentes lignées intestinales. Nous ne pouvons évaluer que de manière qualitative la quantité globale d'enzyme sécrétée pour chaque lignée.

Figure 3.1.3 : État de la sécrétion de la cathepsine B par les lignées intestinales normales et cancéreuses.

Pour chaque lignée, 7 millions de cellules ont été ensemencées dans leurs milieux respectifs (10% SVF, 2mM hydroxyurée). Le lendemain, les cellules ont été déprivées en sérum. Pour chaque type cellulaire, 5 ml de leurs milieux respectifs (0% SVF, 2 mM hydroxyurée) ont été ajoutés pour un conditionnement de 48h. Ensuite les milieux ont été récoltés puis centrifuger (1500 r.p.m, 5 min) afin d'ôter les débris cellulaires. Pour chaque milieux de conditionnement, 4 ml ont été concentrés sur des concentrateurs de type AMICON ultra 10kDa par ultra centrifugation (4000g, 60 min). Pendant la concentration des milieux, les cellules ont été lavées trois fois au PBS puis lysées dans du tampon de Laëmmli 1,5X. Les protéines totales des lysats cellulaires ont été dosées par la méthode BCA. En parallèle, suite à la concentration des milieux des différents types cellulaires, environ 50 µl de concentrats ont été récoltés et 10 µl de chaque concentrat ont été déposés sur gel de SDS-PAGE 12,5% tandis que 30 µg de chaque lysat ont été déposés sur un deuxième gel du même type. Un immunobuvardage dirigé contre la cathepsine B humaine a été réalisé afin d'évaluer l'expression des différentes formes de cathepsine B (intracellulaire et sécrétées) dans les lignées intestinales étudiées.



Figure 3-1-3

3.1.4 L'expression de la cathepsine B est augmentée dans des échantillons de tumeurs colorectales.

L'expression de la forme non épissée et pleine longueur de l'ARN messager codant pour la cathepsine B a été évaluée par PCR quantitative dans des échantillons de tumeurs colorectales humaines à différents stades de progression provenant de résections chirurgicales. Une portion normale de tissu a aussi été prélevée dans un endroit non lésé de la muqueuse colonique et proche de la tumeur, servant de contrôle normal et pairable pour chaque patient testé. La figure 3.1.4A montre que tant pour les adénomes coloniques que pour les adénocarcinomes des différents stades de progression, il y a une augmentation significative de l'expression de la cathepsine B dans les tissus lésés comparativement aux marges de résection. La banque de tumeurs utilisée ici a été bien documentée (Bergeron et al., 2010; Langlois et al., 2010) notamment en ce qui concerne les mutations des principaux oncogènes et suppresseurs de tumeurs fréquemment rencontrés lors de la carcinogénèse colorectale.

Figure 3.1.4 : L'expression de la cathepsine B est augmentée dans des échantillons de tumeurs colorectales humaines. A : Les ARNm totaux, isolés depuis un panel de tumeurs colorectales humaines ainsi que de leur marge de résection respective, ont été rétro-transcrits en ADN complémentaires en utilisant la rétro transcriptase AMV-RT. Les ADNc totaux ont été dilués dans de l'eau contenant de la RNAse et dépourvue de DNAse. Lors de la réaction de PCR quantitative, 1 ng d'ADNc traité est amplifié. L'expression relative des ADNc codant pour la forme pleine longueur de la cathepsine B a été calculée en utilisant le logiciel gBASE Framework et en utilisant les trois gènes de référence MRLP19 (mitochondrial ribosomal protein L19), PUM1 (pumilio homologue 1) et RPL13A (Ribosomal protein L13A). Dans toutes les réactions de PCR, un contrôle sans ADNc et un contrôle sans reverse transcription ont été réalisés pour chaque paire d'oligonucléotides utilisée. La significativité des données a été évaluée par la méthode du test-t apparié de Student (adénomes : p=0,038 (*) ; stade 1 : p=0,042 (*); stade 2: p=0,025 (*); stade 3: p=0,015 (*); stade 4: p=0,0047 (**). B: Corrélation des niveaux d'induction des transcrits de la cathepsine B en fonction des statuts de mutation des gènes KRAS et APC. Dans chacune de ces expériences, les échantillons ont été testés en triplicats.







Figure 3-1-4

Il nous a donc été possible de corréler l'induction de l'expression des ARNm codant pour la cathepsine B avec certaines mutations typiques des cancers colorectaux telles que les mutations de l'oncogène KRAS (environ 40% des cancers colorectaux, (Laurent-Puig et al., 2010) ainsi que les mutations du suppresseur de tumeur APC (60 à 80% des cancers colorectaux, (Laurent-Puig et al., 2010)). Nous n'avons pas constaté de différence significative dans les niveaux d'induction du gène *ctsb* au sein des patients portant les mutations du gène *KRAS* (G12V et G13D) comparativement aux patients de génotypes sauvages. Cependant, il a été possible de montrer que les tumeurs portant la mutation inactivatrice du gène *APC* ont des niveaux 2,5X plus élevés de transcrits de la cathepsine B que les tumeurs qui expriment une forme sauvage d'APC (figure 3.1.4B).

3.1.5 Expression du variant d'épissage CB (-2;-3) dans les cellules cancéreuses colorectales

L'ARN messager de la cathepsine B comporte 12 exons. Il est soumis à de nombreux événements possibles d'épissage (Yan and Sloane, 2003). La littérature rapporte l'existence d'un variant d'épissage observé à l'origine dans des tissus tumoraux hépatiques et colorectaux ainsi que dans certains tissus en dégénération dans des pathologies de type ostéoarthrite (Gong et al., 1993; Olivotto et al., 2007; Zwicky et al., 2002). L'ARN messager formé par ce phénomène d'épissage, ne possède plus les exons 2 et 3. L'exon 2 code pour une partie de la séquence 5' UTR de l'ARNm mais l'exon 3 génère le début de sa séquence codante notamment la séquence du peptide signal à partir de son ATG ainsi que les 44 premiers acides aminés du pro-peptide. L'enzyme générée par ce variant d'épissage est traduite plus rapidement que la forme sauvage (Gong et al., 1993). De plus, par le fait même de sa troncation, ce variant enzymatique se trouve dérouté dans les mitochondries et le compartiment nucléaire (Baici et al., 2006). Dans le but de caractériser l'expression de ce variant dans les lignées cancéreuses colorectales, nous avons mesuré les niveaux d'expression de la forme sauvage et du variant (-2 ;-3) par PCR quantitative.

Figure 3.1.5 : <u>Caractérisation de l'expression et de l'activité enzymatique du</u> variant d'épissage ctsb (-2 ;-3).

A: Les différentes lignées ont été cultivées dans leurs milieux respectifs contenant du SVF Les ARN totaux des différentes lignées ont été purifiés et 1 µg d'ARN total a été rétro-transcrit en ADNc pendant 1 h à 37 °C avec l'aide de la reverse transcriptase AMV-RTase. L'amplification des ADNc codant pour la forme ctsb (-2;-3) s'est faite en utilisant l'amorce sens spécifique de la jonction des exons 1 et 4 de l'ARNm de la cathepsine B tandis que l'amorce anti-sens est située dans l'exon 5. Dans le cas de la forme pleine longueur de l'ARNm de la cathepsine B, l'amplification s'est faite avec l'aide de l'amorce sens situé dans l'exon 2 et de l'amorce anti-sens située dans l'exon 3. La stratégie d'amplification des deux formes alternatives est décrite en annexe 1. L'histogramme représente l'expression relative de la forme pleine longueur de l'ARNm cathepsine B (en noir) et de la forme épissée (en gris) par rapport à l'expression du gène de ménage huPBGD, en triplicats pour trois populations indépendantes de chaque lignée. B : L'histogramme représente les ratios d'expression de la forme épissée ctsb (-2 ;-3) sur la forme pleine longueur (FL) normalisée à 1 pour la lignée normale HIEC. Expérience représentative de trois tests indépendants. C: L'expression de la forme épissée ctsb (-2 ;-3) a été évaluée par RT-PCR semi-quantitative dans un échantillon d'adénocarcinome colorectal humain de grade IV ainsi que dans sa marge de résection en tant que contrôle. D : Les séquences codantes de la forme pleine longueur ainsi que de son variant ctsb (-2;-3) ont été insérées dans des vecteurs d'expression de type PCDNA3.1 et transfectées par la méthode du phosphate de calcium dans la lignée 293T. Dans les cas de co-transfections, le vecteur d'expression du shARN a été additionné. Les quantités d'ADN transféctés ont été normalisées pour chaque condition. Quarante-huit heures après la transfection en milieux contenants 10% SVF, les cellules ont été lysées dans le tampon de lyse livré avec le kit de mesure d'activité cathepsine B de la compagnie BioVision. Après dosage protéique, 30 µg de lysats protéiques ont été chargés sur gel de polyacrylamide 12,5% puis l'expression des deux formes de l'enzyme a été confirmée par immunobuvardage à l'aide de l'anticorps de chèvre anti-cathepsine

B humaine. E: Après surexpression du variant ctsb (-2;-3) dans la lignée 293T, les cellules ont subi une lyse par fractionnement de leurs contenus nucléaires et cytoplasmiques. Ces extraits ont été déposés sur gel et l'expression du variant a été testée par immunobuvardage. Les niveaux de charge en lamine B et en calpaïne rendent compte des niveaux d'enrichissement des différentes fractions protéigues. F: L'activité protéolytique des deux formes de cathepsine B a été mesurée par fluorimétrie à l'aide du substrat séléctif Z-Arg-Arg-AMC. Les données sont normalisées sur la quantité totale en protéines. (blanc) : Substrat seul sans extraits cellulaires. (n.t.) : extraits de cellules 293T non transfectées, prétraitées ou non avec l'inhibiteur perméant Ca074-Me (10 µM, 1 h). (ctsB-FL): Cellules surexprimant la forme pleine longueur de la cathepsine B et traitées ou non avec l'inhibiteur Ca074-Me. (ctsB -2;-3): Cellules surexprimant le variant d'épissage ctsb (-2;-3) traitées ou non avec l'inhibiteur Ca074-Me. Dans les deux dernières colonnes, ce variant d'épissage a été co-exprimé avec un shARN dirigé contre la cathepsine B. Les données sont obtenues suivant la lecture en triplicats de la fluorescence émise dans trois expériences de transfections indépendantes. Les données représentent les moyennes obtenues +/- écarts types.



Figure 3-1-5

77





F.

E.



Figure 3-1-5

L'oligonucléotide «sens» liant la jonction des exons 1 et 4 de l'ARNm de la cathepsine B a été utilisé pour détecter l'expression du variant (-2 ;-3). La figure 3.1.5A montre que les cellules normales HIEC expriment de hauts niveaux des deux formes d'ARNm. Par contre, il semble que les lignées cancéreuses colorectales ont une tendance à exprimer de plus hauts niveaux du variant (-2 ;-3) par rapport à la forme sauvage de l'ARNm. Cette tendance est plus prononcée dans les deux lignées cancéreuses SW480 et Colo205 qui sont issues de cancers colorectaux avancés et métastatiques. De manière générale, la comparaison des ratios d'expression de la forme épissée de l'ARNm sur la forme sauvage montre une augmentation allant d'un facteur 0,5X pour les Caco-2/15 à 4X pour les Colo205 (figure 3.1.5B). Par ailleurs, nous avons évalué, de manière préliminaire, l'expression du variant d'épissage (-2;-3) dans un échantillon de tumeur colorectale de stade avancé en comparaison avec sa propre marge de résection et nous pouvons constater par PCR semi- quantitative que les niveaux d'ARNm sont augmentés dans la tumeur (figure 3.1.5C). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent une meilleure aptitude des cellules cancéreuses colorectales à exprimer une forme épissée de l'ARNm de la cathepsine B codant pour une forme tronquée de l'enzyme par rapport à la forme sauvage de cet ARNm.

Dans l'optique de comprendre les possibles rôles de la forme tronquée de la cathepsine B (ctsB Δ 52) et ne possédant pas les outils de détection nécessaires pour la forme endogène de ce variant, nous avons cloné son ADN complémentaire dans un vecteur d'expression de type PCDNA3.1 et l'avons surexprimé dans les cellules 293T afin de mieux le caractériser. La figure 3-1.5D nous montre les niveaux d'expression dans les cellules 293T de la forme pleine longueur de la cathepsine B (ctsB(FL)) ainsi que la forme tronquée (ctsB Δ 52). La forme pleine longueur subit une maturation typique générant les formes dites actives de 30 kDa (monochaîne) et 25 kDa (chaîne lourde du dimère) en accord avec la littérature. Nous constatons que la forme ctsB Δ 52 reste sous forme monochaîne de 38 kDa suggérant que sa maturation ne se fait pas selon les mêmes mécanismes que la forme pleine longueur. De plus, dans les deux cas, la co-transfection avec un shARN spécifique de la cathepsine B nous montre une

perte quasi-totale de l'expression des deux formes de cathepsine B. Dans le but de comparer les potentiels enzymatiques de ces deux formes, nous avons testé leur activité dans les lysats de cellules 293T à l'aide d'un substrat spécifique de la cathepsine B. Nous constatons d'après la figure 3.1.5F que les niveaux d'activité en condition non transfectée sont négligeables suggérant des niveaux faibles d'expression endogène de la cathepsine B dans ces cellules. De plus, nous constatons que l'activité protéolytique de la forme pleine longueur est de 3 à 4 fois supérieure à l'activité de la forme tronquée (colonnes 4 et 6). Ces niveaux d'activités sont ramenés à un niveau basal pour les deux formes dans les conditions d'inhibition pharmacologique de la cathepsine B ainsi qu'en co-transfection avec un shARN spécifique de ces formes de cathepsine B. La perte du peptide signal d'entrée au réticulum endoplasmique et la perte des 44 premiers acides aminés du pro-peptide suggèrent une voie alternative d'adressage de la protéine. Les fractionnements cyto/noyaux suggèrent d'ailleurs une présence majoritairement nucléaire de ce variant enzymatique.

3.2 La cathepsine B est un acteur important de la tumorigénèse des cellules cancéreuses colorectales: approche par ARN interférence stable.

Afin de pouvoir évaluer dans nos modèles cellulaires la contribution globale de la protéase à cystéine cathepsine B dans des processus tumorigéniques et invasifs, nous avons entrepris une approche par interférence à ARN stable dans deux lignées cancéreuses colorectales HT-29 et DLD-1. Ces deux lignées ont déjà été documentées comme ayant des pouvoirs tumorigéniques *in vitro* ainsi que dans les modèles animaux (Cespedes et al., 2007; Sun et al., 2012). La séquence du shARN a été générée pour cibler une portion non épissée de l'ARN messager de la cathepsine B afin de réduire l'expression de toutes les formes d'ARNm variantes et pleine longueur.

Figure 3.2 : Efficacité d'inhibition de l'expression de la cathepsine B dans les cellules cancéreuses colorectales HT-29 et DLD-1 par l'utilisation d'un shARN. Les cellules cancéreuses HT-29 et DLD-1 ont été infectées avec un lentivirus contenant un shARN dirigé contre une séquence non épissée de l'ARNm de la cathepsine B. A : Les niveaux d'ARNm codant pour la cathepsine B pleine longueur ont été évalués par PCR quantitative dans les lignées exprimant le shARN ainsi que son contrôle « scramble » relativement à l'expression du gène de ménage huPBGD. Ces expériences ont été réalisées sur trois clones indépendants provenant d'une même infection B : La baisse des niveaux protéiques a été évaluée par immunobuvardage sur gel de polyacrylamide 12,5 % et à l'aide de l'anticorps anti-cathepsine B humaine.



Figure 3-2

A.

Après infection lentivirale stable des deux lignées cancéreuses HT-29 et DLD-1 puis une période de sélection des cellules, l'analyse de l'expression de la cathepsine B a été évaluée aux niveaux transcriptionnel et protéique. L'efficacité du shARN est observable par PCR quantitative et montre une capacité à réduire d'environ 70 à 75% les niveaux des ARNm des différentes formes dans les deux lignées testées (figure 3.2A). De plus, l'analyse par immunobuvardage de l'expression de l'enzyme montre là aussi une réduction importante des niveaux de cathepsine B dans ces deux lignées cancéreuses (figure 3.2B).

3.2.1 La croissance sur pétri des cellules cancéreuses colorectales HT-29 et DLD-1 est ralentie suite à la baisse d'expression de la cathepsine B.

Afin d'évaluer les capacités tumorigéniques des cellules sous-exprimant la cathepsine B, nous avons, dans un premier temps, analysé les capacités de croissance de ces cellules. La cathepsine B est une protéase sécrétée dans les cancers et son implication dans la dégradation de la MEC joue un rôle majeur sur les processus de migration et d'invasion des cellules cancéreuses. Néanmoins, un rôle sur la croissance cellulaire n'est pas à exclure Des expériences de croissance cellulaire en monocouche sur plastique ont été réalisées pour les HT-29 et les DLD-1. Les courbes de croissance ont été effectuées dans des doses relativement faibles en sérum bovin fœtal soit 2% dans les différents milieux de cultures. La figure 3.2.1A montre qu'après une période de 8 jours, la densité cellulaire est réduite d'environ 25 à 30% pour les cellules HT-29 sous-exprimant la cathepsine B par rapport à leurs cellules contrôles infectées avec le shARN aléatoire (p<0,0001). De manière similaire, la réduction de prolifération observée pour les DLD-1 shctsB est d'environ 20% par rapport aux cellules contrôles (figure 3.2.1B).

Figure 3.2.1 : La croissance sur pétri des cellules cancéreuses colorectales HT-29 et DLD-1 est ralentie suite à la baisse d'expression de la cathepsine B. Dans ces expériences, 200 000 cellules HT-29 shctsB et shSCR (A) ainsi que 120 000 cellules DLD-1 shctsB et shSCR (B) ont été ensemencées en triplicata dans des puits de 35 mm dans leur milieu respectif contenant 2% sérum bovin fœtal. La croissance de ces populations a été évaluée par décompte cellulaire aux deux à trois jours à l'aide d'un compteur de cellules. Ces expériences sont représentatives d'un total de trois essais pour chacune des lignées cellulaires. Les données représente les moyenne +/- écarts types du nombre de cellules comptées par puit. La significativité des résultats a été confirmée par un test-t multiple de Student.





В.





Figure 3-2-1

3.2.2 L'inhibition de l'expression de la cathepsine B diminue la formation de colonies en indépendance d'ancrage des cellules cancéreuses colorectales HT-29 et DLD-1.

Dans un souci de mieux mimer les conditions de croissance d'une colonie tumorale en indépendance d'ancrage, nous avons utilisé l'approche de formation de colonies cellulaires en milieu semi solide d'agarose 0.7%. Dans un premier temps, nous avons testé la capacité des cellules cancéreuses sous-exprimant la cathepsine B à croître en indépendance d'ancrage. Après une période d'expansion d'environ 3 semaines, les colonies cellulaires analysées montrent une réduction importante de leur nombre tant en ce qui concerne les HT-29 que les DLD-1 sous-exprimant la cathepsine B (figure 3.2.2A). Le niveau de réduction approche les 70% pour les HT-29 (p<0,0001). Ces résultats montrent une implication importante de la cathepsine B dans l'établissement de colonies cancéreuses colorectales en indépendance d'ancrage. Dans un second temps, nous avons utilisé la même approche mais cette fois-ci sur des cellules cancéreuses HT-29 et DLD-1 non infectées et traitées de manière régulière avec un inhibiteur spécifique de la cathepsine B, le Ca074 ou (L-3-trans-(Propylcarbamyl) oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline, à une concentration finale de 10 µM (figure 3.2.2B). Sous cette forme, cet inhibiteur n'a pas la capacité de franchir les membranes plasmiques, ce qui le rend capable d'inhiber uniquement les formes sécrétées de cathepsine B (Yamamoto et al., 1997). De manière intéressante, l'inhibition de la portion sécrétée de la cathepsine B n'influence pas la croissance des colonies HT-29 et DLD-1. Ces résultats suggèrent un rôle conséquent de la cathepsine B intracellulaire dans ce modèle de croissance cellulaire *in vitro*.

Figure 3.2.2 : L'inhibition de l'expression de la cathepsine B inhibe la formation de colonies en indépendance d'ancrage des cellules cancéreuses colorectales HT-29 et DLD-1. A : dans ces expériences 50 000 cellules HT-29 sous-exprimant ou non la cathepsine B ainsi que 30 000 cellules DLD-1 ont été ensemencées dans des puits de 35 mm dans un mélange 1 : 1 de milieux 2X et d'agarose type VII 1,4 %. Après que cette couche semi-solide eut figé, 1,5 ml de milieu 1X sont ajoutés tous les deux jours. Dès l'apparition de colonies visibles à l'œil nu, celles-ci ont été marquées au MTT pendant 1 h à 37°C puis elles ont été comptées par l'utilisation du logiciel ImageJ. Les histogrammes montrent le nombre de colonies comptées par puits, pour les différentes lignées cellulaires Dans ces expériences, trois populations indépendantes de chaque lignée ont été testées en triplicats **B**: Dans ces expériences, les lignées HT-29 et DLD-1 non infectées avec le shARN ont été ensemencées dans les mêmes conditions qu'en A. L'inhibiteur non perméant Ca074 spécifique de la cathepsine B a été ajouté à une concentration finale de 10 µM dans les différents milieux de culture et a été renouvelé tous les jours pendant 21 jours. Les données représentent les moyennes et les écarts types du nombre de colonies formées par puit dans guatre expériences indépendantes réalisées hexaplicats. en * : Movennes significativement différentes p≤0,05 (test de Student); ***: p≤0,001 (test de Student)







A.

250

200

150

HT-29 non infectées ns







3.2.3 L'inhibition de l'expression et de l'activité extracellulaire de la cathepsine B réduit les capacités invasives des cellules HT-29 et DLD-1 in vitro.

La progression d'une tumeur colorectale implique souvent le relargage massif d'enzymes protéolytiques destinées à remodeler la matrice extracellulaire environnante (Duffy, 1996). Il a d'ailleurs été montré que suite à un processus de transformation cellulaire, une cellule épithéliale avait la capacité de dégrader certaines matrices de culture de type collagénique par relâche de ses contenus vésiculaires endolysosomaux après fusion avec la membrane plasmique (Cavallo-Medved et al., 2003). Afin de caractériser le rôle de la protéase à cystéine cathepsine B dans ces processus de dégradation et d'invasion tumorale colorectale, nous avons évalué les capacités invasives des cellules HT-29 et DLD-1 sous-exprimant la cathepsine B dans un modèle d'invasion in vitro de chambre de Boyden. Brièvement, la membrane semi poreuse, percée de pores de 8 µm de diamètre, est recouverte d'une fine couche de MatriGel[™], un analogue de matrice extracellulaire couramment employé en biologie cellulaire. Ceci oblige les cellules à digérer cette membrane, avant de pouvoir traverser les pores, la conduisant vers son gradient de chemoattraction dans le compartiment inférieur de la chambre. Lors de l'expérience, un même nombre de cellules contrôles et de cellules sousexprimant la cathepsine B a été déposé dans le compartiment supérieur de la chambre de Boyden. Après 48 à 72h de transmigration, la capacité de ces cellules à passer la membrane a été évaluée. La figure 3.2.3A montre que dans les deux types cellulaires HT-29 et DLD-1, les populations sous-exprimant la cathepsine B ont un index d'invasion diminué d'un facteur 2X à 2,5X. Ces résultats montrent une part conséquente de l'activité protéolytique cathepsine B dans ces processus d'invasion *in vitro*. Par ailleurs, dans le but de comprendre quel type de formes, sécrétées ou non, pourrait intervenir dans ces processus, les mêmes expériences ont été réalisées sur les mêmes lignées non infectées et traitées avec l'inhibiteur extracellulaire de la cathepsine B.

Figure 3.2.3 : L'inhibition de l'expression et de l'activité de la cathepsine B réduit les capacités invasives des cellules HT-29 et DLD-1 in vitro. A : Des suspensions cellulaires de 3 000 DLD-1 et 10 000 HT-29 dans 200 µl de leurs milieux respectifs ne contenant pas de sérum ont été placées dans les compartiments supérieurs de chambres d'invasion de la compagnie BD Biosciences munies d'une membrane semi-poreuse et recouverte de Matrigel®. Après 48 h de transmigration, les cellules n'ayant pas traversé la membrane ont été soigneusement grattées à l'aide d'un coton-tige imbibé de PBS. Les cellules ayant envahi le Matrigel®, et traversé la membrane semi-poreuse ont été marquées au DAPI puis les membranes ont été découpées au scalpel et montées entre lame et lamelle. La totalité des noyaux a été comptée manuellement à l'aide d'un microscope à fluorescence pour chaque insert. Les graphiques représentent la moyenne du nombre de noyaux comptés dans chaque condition. Cet index d'invasion a été normalisé à 1 dans le cas des populations contrôles infectées avec le sh scramble. Dans ces expériences, trois clones indépendants pour chaque lignée ont été testés B: L'index d'invasion des lignées HT-29 et DLD-1 non infectées et traitées avec l'inhibiteur non perméant Ca074 10 µM durant la période de transmigration a été évalué par la même méthode qu'en A. Les données en A. et B. représentes les moyennes et les déviations standard des index d'invasion (nombre de cellules invasives/nombre total de cellules encemencées) évaluer dans quatre expériences indépendantes réalisées en triplicats.* : Moyennes significativement différentes p≤0,05 (test de Student) ; ** : p≤0,005 (test de Student)



Figure 3.2.3

La figure 3.2.3B montre que les cellules traitées au Ca074 à la concentration finale de 10 µM durant toute la durée de l'expérience ont, là aussi, une capacité diminuée à envahir le compartiment inférieur des chambre de Boyden. Nous pouvons constater que les facteurs de diminution de l'invasion observés ici sont similaires à ceux observés lors de l'inhibition de l'expression totale de cathepsine B. Ces résultats montrent que les formes sécrétées de cathepsine B par les cellules tumorales colorectales jouent un rôle important dans les processus de réorganisation de la matrice extracellulaire.

3.2.4 L'inhibition de l'expression de la cathepsine B réduit les capacités tumorigéniques des cellules HT-29 après injection chez la souris immunodéficiente.

Après avoir caractérisé l'implication de la cathepsine B dans les processus tumoraux colorectaux dans un contexte *in vitro*, nous avons ensuite tenté de définir les rôles de cette enzyme dans l'établissement de tumeurs et de métastases ectopiques d'origine colorectale chez la souris immunoincompétente.

A-<u>Croissance tumorale sous-cutanée des cellules HT-29 sous-exprimant la cathepsine B</u>

Dans ces expériences, les cellules cancéreuses colorectales humaines HT-29 sous-exprimant la cathepsine B ainsi que leur contrôles ont été injectées sous la peau des flancs antérieurs et postérieurs de souris balb/c-*nude*. Chaque population cellulaire a été injectée en suspension de 1 x 10⁶ cellules dans un volume de 100 µl de milieu McCoy 10% SVF. Les cellules contrôles ont été injectées dans les flancs gauches des souris et les cellules sh-ctsB dans les flancs droits de manière à pairer la croissance de ces tumeurs. Les diamètres des tumeurs en formation ont été mesurés tous les trois à quatre jours jusqu'au sacrifice des souris. Ces tumeurs ont alors été mesurées plus finement (sans les tissus cutanés sus-jacents) puis pesées. D'après la courbe de croissance tumorale (figure 3.2.4A), on constate que les tumeurs formées par les cellules HT-29 sous-exprimant toutes les formes de cathepsine B subissent une réduction de croissance significative durant toute la durée de l'expérience.

Figure 3.2.4 : L'inhibition de l'expression de la cathepsine B réduit les capacités tumorigéniques des cellules HT-29 après injection chez la souris immunodéficiente. A : Les courbes de croissance tumorales (en mm³) ont été réalisées après injection sous-cutanée de 1x10⁶ cellules HT-29 shSCR (flancs gauches) et HT-29 shctsB (flancs droits). Les données obtenues ici représentent les moyennes des volumes tumoraux issues d'une expérience représentative de trois expériences indépendantes, chacune réalisée sur au moins cinq souris. Les volumes des tumeurs ont été déterminés par mesure externe aux 3 à 4 jours (V= $(d^{2}xD)/2$; D = grand diamètre de la tumeur, d = petit diamètre de la tumeur. La significativité des données a été testée par un test t multiple de Student, (* p< 0,05). B: Le jour du sacrifice, les tumeurs prélevées ont été pesées ex vivo. Les données représentent la moyenne des poids en mg des tumeurs prélevées chez cinq individus. La significativité des données est apportée par un test t de Wilcoxon pour échantillons appariés et non paramétriques, * p<0,05. **C** : Les tumeurs contrôles et sous-exprimant la cathepsine B ont été broyées puis lysées dans un tampon RIPA. Après dosage des protéines totales, 35 µg d'extraits protéigues issus de tumeurs des flancs postérieurs de sept souris injectées ont été déposés sur gel de polyacrylamide. Les niveaux d'expression de cathepsine B, p27^{Kip1}, p21^{cip1}, p57^{kip2}, phosphoERK1/2, ERK2 total, phosphoAKT et de l'actine ont été réalisés par immunobuvardage. La densitométrie des signaux a été réalisée à l'aide du logiciel imageJ. Les données représentent les moyennes +/écarts types des ratios d'expression des protéines d'intérêt sur les niveaux d'actine.* : $p \le 0.05$ (test de Wilcoxon). **D** : Dans ces expériences, 10⁶ cellules HT-29 shSCR ou shctsB ont été injectées dans les veines caudales d'un groupe de dix souris (5 shSCR et 5 shctsB). Dès l'apparition des premiers signes de détresse respiratoire, les animaux ont été sacrifiés puis la charge métastatique pulmonaire a été observée à l'œil nu. Les guatre premières souris ont été sacrifiées 31 jours après l'injection dans la queue tandis que les autres souris ont été sacrifiées 28 jours après. La quantification de l'aire de recouvrement des poumons par les métastases s'est faite à l'aide du logiciel ImageJ. Les graphiques représentes les
moyennes +/- écarts types pour chaque injection (n=2 et n=3 respectivement). Moyenne significativement différentes à p≤0.05, test de Mann-Whitney.



B.





96



La réduction des volumes tumoraux atteint environ 70% (p<0,0001 au jour 20) en ce qui concerne les flancs antérieurs. Par ailleurs, la figure 3.2.4B nous permet de constater que les volumes tumoraux induits sur les flancs antérieurs sont plus importants que ceux induits sur les flancs postérieurs et la différence en volume des tumeurs shctsB et de leurs contrôles montre une meilleure amplitude.

Dans un second temps, les tumeurs prélevées ont été broyées à froid dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier puis lysées dans un tampon de lyse de type RIPA. Afin de pouvoir mieux caractériser les phénotypes observés pour les tumeurs sous-exprimant la cathepsine B, les extraits tumoraux des flancs antérieurs ont été testés biochimiquement pour l'expression de certains facteurs importants contrôlant la transition des phases G1/S du cycle cellulaire. Comme le montre la figure 3.2.4C, le statut d'activation de certaines voies mitogéniques fréquemment altérées dans les cancers colorectaux, comme la voie des MAP kinases ERK1/2 et la voie PI3K/AKT, a été évalué. Les statuts d'activation des isoformes ERK1/ERK2 ne montrent pas de variations notables sous l'influence de la baisse d'expression de la cathepsine B. Les mêmes observations sont faites pour le statut d'activation de la kinase AKT. Par ailleurs, les statuts de certains inhibiteurs du cycle cellulaire réputés pour être altérés, eux aussi, dans les cancers colorectaux, ont été évalués. Nous pouvons constater qu'au sein de la famille des inhibiteurs du cycle cellulaire CIP/KIP (p27^{Kip1}, p57^{kip2}, p21^{cip1}), seuls les niveaux de l'inhibiteur p27^{Kip1} sont significativement augmentés d'un facteur 1,5 environ (p=0.029) dans les tumeurs sous-exprimant la cathepsine B par rapport à leurs contrôles respectifs. Cette observation suggère une influence directe ou non de la protéase à cystéine cathepsine B sur les niveaux de cet inhibiteur dans le contexte de croissance tumorale colorectale in vivo. De plus les niveaux d'expression de la cycline B ont tendance à augmenter dans les tumeurs shCtsB dans la majorité des souris étudiées, par rapport aux tumeurs contrôles.





Figure 3.2.4

B- <u>Potentiel métastatique des cellules HT-29 sous-exprimant la cathepsine B suite</u> à l'injection dans la veine de la queue

Les cellules cancéreuses métastatiques ont toutes la capacité d'envahir leurs tissus cibles par dégradation de leurs matrices extracellulaires après libération d'enzymes protéolytiques. La cathepsine B a, pour sa part, été documentée comme favorisant l'implantation de métastases d'origine mammaire ou encore gliales (Matarrese et al., 2010; Vasiljeva et al., 2008). Afin de caractériser l'implication de la protéase cathepsine B dans l'établissement de métastases d'origine colorectale dans les poumons de souris Fox-Chase SCID® Beige, nous avons injecté les cellules HT-29 sous-exprimant la cathepsine B ainsi que leurs contrôles dans les veines des queues de 10 souris. Des suspensions de 1 x 10⁶ cellules ont été injectées dans des volumes de 100 µl de milieu McCoy 5A 10% SVF. Après une période d'incubation d'environ 28 jours, les souris ont été sacrifiées puis les charges métastatiques sur la surface des lobes pulmonaires ont été évaluées de manière qualitative. La figure 3.2.4D nous permet de constater une baisse de la charge métastatique chez les souris injectées avec les cellules sous-exprimant la cathepsine B. Ces résultats suggèrent donc un rôle prométastatique de la cathepsine B dans ce modèle in vivo.

3.3 Étude de la carcinogénèse colorectale associée à une colite chez le modèle murin d'invalidation génique totale de la cathepsine B : la souris *C57BI6/ctsb^{-/-}*.

Les souris de fond génétique *C57Bl6* invalidées de manière totale pour le gène codant la cathepsine B ont été générées par le groupe de C. Peters à l'Université de Freibourg (Deussing et al., 1998) et caractérisées sur leurs capacités à augmenter le potentiel tumoral et invasif de certains types de tumeurs lorsque croisées avec d'autres modèles murins (Gopinathan et al., 2012; Reinheckel et al., 2012; Sevenich et al., 2011). Nous disposons, au laboratoire, d'une technique d'induction des processus de tumorigenèse colorectale chez les rongeurs. Cette technique consiste à traiter l'animal avec un agent carcinogénique puissant, l'azoxyméthane. Ce composé liquide et incolore, est, après injection péritonéale, métabolisé par le foie et les reins de l'animal injecté. Le métabolite issu de cette

100

transformation, le méthylazoxyméthanol, est hautement carcinogénique pour les cellules souche colorectales (Tanaka et al., 2003). Dans le cadre de mes recherches, nous avons utilisé le modèle murin d'invalidation du gène codant pour la cathepsine B afin d'évaluer la susceptibilité de cette lignée vis-à-vis d'un traitement à long terme à l'azoxyméthane. Mentionnons cependant, que la lignée murine de fond génétique C57BI/6 est reconnue comme particulièrement résistante aux stress carcinogéniques dûs à l'azoxyméthane (Meunier et al., 2010). Nous avons donc dû additionner au traitement à l'AOM un traitement répété induisant une inflammation soutenue de la muqueuse colonique, à l'aide d'un sel de Dextran (DSS) afin d'induire chez ces souris un cancer colorectal associé à une colite inflammatoire. (Tanaka et al., 2003) Dans cette expérience, nous avons traité un panel de 15 souris contrôles dites «sauvages» exprimant les deux allèles du gène ctsb, 22 souris hétérozygotes pour le gène et 21 souris invalidées dites «KO» pour le gène ctsb. Suite aux sacrifices des souris à la 17ième semaine post-natale, nous avons évalué la charge tumorale des différents groupes de génotypes. De plus, une évaluation histologique fine a été réalisée sur des échantillons de muqueuse normale et dysplasique issue de la jonction rectoanale des souris traitées. Comme le montre la figure 3.3.1, l'analyse détaillée de la charge tumorale des souris invalidées pour le gène ctsb n'a pas révélé de différences significatives entre les trois groupes de génotypes testés, tant pour le nombre d'adénomes formés que pour la superficie de la mugueuse que ceux-ci occupent. Par ailleurs l'analyse histochimique par marguage au BrDU ne montre aucune différence notable dans les capacités prolifératives des lésions dysplasiques formées (non montré). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'invalidation génique totale de la protéase à cystéine cathepsine B n'a pas d'incidences observables sur les charges tumorales colorectales induites par les traitements à l'AOM-DSS chez la souris C57/BI6-J.

Figure 3.3.1 : <u>Non-incidence de la perte du gène codant la cathepsine B sur</u> <u>la charge tumorale induite par un traitement à long terme à l'AOM/DSS</u> Dans ces expériences, un groupe de 64 souris C57BL6 (15 *ctsb -/-*, 22 *ctsb +/-*, 21 *ctsb -/-*) a reçu un traitement à l'azoxyméthane (injection i.p. 10 mg/kg) suivi de deux périodes de traitement au DSS 1,5 % dilué dans l'eau de boisson. La chronologie du protocole expérimental est détaillée dans la figure 3.3.1. À la fin de l'expérience, la charge tumorale de chaque souris a été déterminée en calculant la somme des aires des tumeurs coloniques formées. (Aire = petit diamètre x grand diamètre x π). Les données représentent les médianes (barres rouges) des différentes charges tumorales (points, carrés et triangles noirs) pour chaque génotype *ctsb*. C57BL6 ctsb -/-





Figure 3-3-1

3.4 Régulation post-traductionnelle de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1} par la cathepsine B dans les cellules cancéreuses colorectales.

La cathepsine B est une endopeptidase agissant principalement dans les compartiments lysosomaux. Cependant, son déroutage rencontré dans les cancers peut l'amener à rencontrer de nouvelles cibles non-lysosomales (par exemple la dégradation extracellulaire de composantes matricielles en périphérie de la cellule). De manière intrigante, des expériences de double hybride réalisées chez la levure avec comme appât p27^{Kip1} et une librairie d'ADN complémentaires issue de cellules Caco-2/15 prolifératives avaient déjà suggéré que la cathepsine B pouvait lier p27^{Kip1} dans les cellules cancéreuses colorectales, Ces expériences ont été réalisées il y a déjà quelques années dans notre laboratoire (Dr Jim Boulanger, résultats décrits dans la thèse). Par ailleurs, il m'a été possible d'observer une certaine activité cathepsine B directement dans les noyaux des cellules cancéreuses Caco-2/15 prolifératives (figure 3.1.2B). De plus, dans un contexte de croissance tumorale colorectale ectopique, nous avons pu observer une modulation des niveaux protéigues de p27^{Kip1} dans les tumeurs formées par les cellules HT-29 sous-exprimant la cathepsine B à l'aide d'un shARN (figure 3.2.4C). Ces différentes observations suggèrent donc la possible régulation de cet inhibiteur du cycle cellulaire par la cathepsine B dans le contexte tumoral colorectal, ce qui pourrait mettre en lumière un nouveau mode de contrôle de l'expression de p27^{Kip1}.

3.4.1 La protéase cathepsine B clive l'inhibiteur p27^{Kip1} in vitro et in cellulo.

En accord avec les précédentes observations, nous avons, dans un premier temps, surexprimé la protéine p27^{Kip1} humaine dans la lignée 293T. La réaction enzymatique a été réalisée par l'ajout de 50ng de cathepsine humaine purifiée dans un tampon acide Na-Acétate (pH 6.5) facilitant l'activation de l'enzyme. La figure 3.4.1A permet de constater que la protéine p27^{Kip1} est clivée par la cathepsine B en générant deux fragments majoritaires d'environ 20kDa et 10kDa révélés par l'anticorps dirigé contre l'étiquette HA en N-terminal de p27^{Kip1}.

A : L'ADNc codant la protéine p27^{kip1} humaine pour étiquetée HA en N-terminal a été transfecté de manière transitoire dans la lignée 293T.Un total de 50µg de lysat a été mis en présence de cathepsine B humaine purifiée (50ng) pendant 30 minutes à 30°C dans le tampon de réaction à pH6,5. Les protéines ont été solubilisées dans un tampon Laemmli, séparées sur un gel de SDS-PAGE et analysées par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps spécifique de la partie C-terminale de p27^{Kip1} (C-19). A droite, la séquence péptidique de la protéine p27kip1 spécifiant les sites putatifs de clivage par la cathepsine B (en rouge). **B**: La protéine p27^{Kip1} recombinante humaine a été produite par les cellules 293T après transfection au phosphate de calcium. 50 µg d'extrait protéique ont été incubés avec 50 ng de cathepsine B humaine purifiée dans les mêmes conditions qu'en A. La réaction enzymatique a été stoppée à différents temps par l'ajout de Laemmli puis les différents échantillons ont été déposés sur gel pour évaluer les niveaux de p27^{Kip1} par immunobuvardage.

Β.



séquence péptidique de p27^{Kip1} humain

1-MSNVRVSNGSPSLERMDARQAEHPKPSACRNLFGPVDHEE 41-LTRDLEKHCRDMEEASQ**RK**WNFDFQNHKPLEGKYEWQEVE 81-KGSLPEFYYRPPRPP**KGACK**VPAQESQDVSGSRPAAPLIG 121-APANSEDTHLVDPKTDPSDSQTGLAEQCAGI**R**KRPATDDS 161-STQNKRANRTEENVSDGSPNAGSVEQTPKKPGL**R**RQT-198



Figure 3-4-1

Par ailleurs, afin d'avoir une idée plus précise sur le nombre de fragments formés ainsi que sur leurs tailles approximatives, nous avons surexprimé la forme humaine de p27^{Kip1} étiquetée HA dans les cellules 293T puis nous avons incubé, dans une cinétique allant jusqu'à 30 min, 50 µg d'extraits cellulaires avec de la cathepsine B humaine purifiée (50 ng). Les immunobuvardages contre p27Kip1 représenté dans la figure 3.4.1B, nous permettent de constater qu'en condition contrôle sans enzyme, la protéine p27^{Kip1} montre deux bandes de dégradation «basales» d'environ 21 et 15 kDa révélées par l'anticorps dirigé contre l'étiquette HA. En decà de 1 min suite à l'ajout de l'enzyme, deux fragments d'environ 20 et 10-12 kDa sont générés simultanément suggérant leur spécificité. Il est important de noter qu'en condition contrôle (sans enzyme), certaines bandes de dégradation de p27^{kip1} sont déjà observables, ce qui suggère qu'il y a certains mécanismes de clivage de p27^{kip1} qui ne sont pas dépendants de l'ajout de cathepsine B dans ces expériences. Les niveaux de production de ces deux fragments restent forts jusqu'à environ 20 min tandis que la forme pleine longueur de p27^{Kip1} diminue graduellement. Cette observation suggère que la dégradation des fragments formés par la cathepsine B est équilibrée par leur propre production depuis la forme pleine longueur. Après 30 min d'incubation avec l'enzyme, nous constatons que les niveaux des fragments baissent à leur tour confirmant leur dégradation par l'enzyme. Enfin, nous pouvons noter que l'utilisation de l'anticorps polyclonal dirigé contre p27^{Kip1} (C-19) révèle la présence d'un fragment d'environ 15-17kDa et qui n'est pas révélé par l'anticorps anti-HA. Ces résultats montrent que la cathepsine B engendre, de manière rapide et spécifique, plusieurs fragments majoritaires issus de la protéine p27^{Kip1} pleine longueur, ces fragments étant à leurs tours dégradés par la suite.

3.4.2 Distribution subcellulaire des protéines p27^{Kip1} et cathepsine B dans les cellules normales HIEC et cancéreuses Caco-2/15

Afin de confirmer la possible interaction subcellulaire des protéines p27^{Kip1} et cathepsine B, nous avons observé leur localisation respective dans les cellules HIEC et Caco-2/15 par des expériences de double immunofluorescence en

microscopie confocale. Ces expériences ont été réalisées en utilisant l'anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé contre p27^{Kip1} humain (C -19) et l'anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre la cathepsine B (AF -953). L'analyse des images nous montre une distribution de la protéine p27^{Kip1} essentiellement nucléaire et de manière uniforme dans les deux types cellulaires. Cependant, il nous est possible d'observer un marquage de cet inhibiteur de type ponctué dans les compartiments cytoplasmiques des deux types cellulaires. De la même manière, les marquages de la cathepsine B nous montrent des zones de concentration de la protéase essentiellement dans des vésicules cytoplasmigues. Dans ces expériences, un minimum de 10 cellules ont été analysées sur des champs différents et les photos sont représentatives de l'ensemble. La superposition des deux types de signaux montre une colocalisation de ces deux protéines dans la lignée cancéreuse Caco-2/15 et non dans les HIEC. Les profils de fluorescence des deux protéines ont été quantifiés à l'aide du logiciel de traitement des images ZEN (Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada). Les graphiques de la figure 3.4.2 représentent les intensités de fluorescence engendrées par le signal de type Alexa-488 dans le cas de p27^{Kip1} et de type Alexa-594 dans le cas de la cathepsine B en fonction de la distance en microns parcourue par la ligne droite en rouge (voir zones encadrées).

Figure 3.4.2 : La protéine p27^{Kip1} et la cathepsine B colocalisent dans les cellules Caco-2/15. Ces images représentatives et acquises en microscopie confocale (63X) montrent les distributions subcellulaires des protéines p27^{kip1} (en vert) et cathepsine B (en rouge) (voir dilutions anticorps annexe 6.2) dans des expériences de double immunofluorescence réalisées dans les cellules HIEC (A) et Caco 2/15 (B), l'anticorps secondaire de poulet anti-lapin Alexa-Fluor 488 a été utilisé pour p27^{kip1} au 1/400^e et l'anticorps d'âne anti-chèvre Alexa-Fluor 594 a été utilisé pour la cathepsine B au 1/400e. Les contrôles négatifs incluant les anticorps secondaires seuls ont été réalisés (photos non montrées). Les régions encadrées à faible grossissement sont agrandies à droite et les graphiques représentent les profils de fluorescence engendrés par les différents signaux le long de la ligne rouge et montrent la présence de zones de colocalisation dans les cellules Caco-2/15. Les (*) indiquent la présence de vésicules positives pour la cathepsine B.



Figure 3.2.4

110

Nous pouvons constater dans le cas des cellules Caco-2/15 que les vésicules positives pour la cathepsine B contiennent aussi des niveaux modérés de p27^{Kip1}, ce qui suggère la présence de p27^{Kip1} dans les lysosomes des Caco-2/15.

3.4.3 La génération d'une forme de p27^{Kip1} mutante non clivable par la cathepsine B augmente sa stabilité.

La régulation des niveaux de l'inhibiteur de complexes Cdk-cyclines p27^{Kip1} notamment par sa dégradation dans le protéasome est un processus clés dans le contrôle du passage de la transition G1/S du cycle cellulaire (Malek et al., 2001). La littérature rapporte aussi une forte dégradation de p27^{Kip1} dans les cancers colorectaux, ce qui en fait d'ailleurs un facteur de mauvais pronostique de survie chez les patients atteints de ce type de cancer (Loda et al., 1997; Thomas et al., 1998). De plus, il a été montré que les niveaux transcriptionnels de p27^{Kip1} ne varient généralement pas dépendamment des phases du cycle cellulaire ou de l'état prolifératif. Les principaux modes de contrôle des niveaux d'expression de la protéine s'effectuent majoritairement à un niveau traductionnel et posttraductionnel, par sa stabilisation ou par sa dégradation majoritairement dépendante du protéasome (Hengst et al., 1994). Dans le but d'évaluer la stabilité d'une forme de p27^{Kip1} qui ne serait plus clivable par la cathepsine B, nous avons identifié plusieurs sites de clivages putatifs par l'enzyme sur la séguence peptidique de p27^{Kip1}. Il a été décrit que les enzymes «papaïne-like» de type cathepsine B possèdent toutes un acide aminé basique dans leur sous-site catalytique en position S2 les rendant capables de cliver préférentiellement leurs substrats après des séquences -Arg-Arg- ou encore -Lys-Arg- (Chapman et al., 1997). Depuis, d'autres types de séquences cibles ont été découvertes mettant en jeu une glycine en position P3' du substrat (Biniossek et al., 2011). Nous avons cloné différents mutants de délétion ou de substitution de la protéine p27^{Kip1} afin de tester leur susceptibilité à être clivés par de la cathepsine B humaine purifiée (résultats non publiés de S. Mongrain, professionnel de recherche). Dans ces tests de digestion enzymatiques, deux formes mutantes de p27Kip1 ont attiré notre attention.

Figure 3.4.3 : La génération d'une forme de p27^{Kip1} mutante non clivable par la cathepsine B augmente sa stabilité. A : Dans ces expériences de clivages enzymatiques, les séquences codantes de la forme sauvage de la protéine p27^{Kip1} humaine ainsi que de ses deux mutants p27Kip1A96-100 et p27Kip1R152A ont été surexprimées dans la lignée 293T par transfection transitoire (3µg d'ADN/60mm). 50 µg d'extraits cellulaires des différentes conditions ont été mis en présence de 50 ng de cathepsine B humaine purifiée pendant 30 min à 30°C. Les réactions ont été stoppées par l'ajout de Laemmli 4X puis les échantillons ont été analysés par immunobuvardage contre l'étiquette HA portée par les constructions p27^{Kip1}. Dans le cas du double mutant de p27^{kip1}, les immunobuvardages ont été réalisés avec l'anti-HA et l'anti-p27kip1 C-19. B : Les cellules 293 T ont été transfectées par la méthode du phosphate de calcium (100ng d'ADN/100mm) afin de surexprimer la forme sauvage de p27^{Kip1} ainsi que la forme double mutante p27^{Kip1} Δ 96/100-R152A. Les cellules ont alors été incubées à différents temps avec de la cycloheximide (30 µg/ml final dans le milieu de culture) afin d'évaluer les niveaux de stabilité des deux formes surexprimées. Les cellules ont été lysées dans un tampon Laemmli puis 15 µg d'extraits protéigues ont été chargés sur gel SDS-PAGE 12.5 % afin d'évaluer les niveaux de p27^{Kip1} sauvage et double mutant par immunobuvardage. Le graphique représente les ratios des données de densitométrie des signaux de p27^{Kip1} sur ceux de l'actine



représentation schématique de la séquence de p27Kip1sauvage



Figure 3-4-3





Figure 3-4-3

En effet, le mutant de substitution de l'arginine 152 en alanine montre une perte du fragment de 20 kDa généré par la cathepsine B (figure 3.4.2A). Par ailleurs, le mutant de délétion du penta-peptide KGACK en position 96-100 de p27^{Kip1}, voit la perte de son petit fragment de 12 kDa généré par la cathepsine B. Après avoir généré puis cloné la forme de p27^{Kip1} portant les deux types de mutations, le mutant p27^{Kip1}-∆96-100/R152A, nous avons pu constater la perte des deux fragments majoritairement formés suite à un essai de clivage avec la cathepsine B recombinante. La perte des fragments de clivage est observable avec les deux anticorps anti-HA (en N-terminale) et anti-p27^{Kip1} (C-19).

La génération de cette forme double mutante nous permet de pouvoir caractériser l'implication de ces clivages dans la stabilité de l'inhibiteur de complexes Cdk-cyclines p27^{Kip1}. Nous avons donc transfecté de manière transitoire les formes de p27^{Kip1} sauvage et mutante dans les cellules 293T. Après 24 h d'expression des plasmides, les cellules ont été traitées à la cycloheximide afin d'inhiber la synthèse protéique. La figure 3.4.2B permet de constater que la forme double mutante de p27^{Kip1} possède une stabilité plus grande que la forme sauvage. Au final, toutes ces observations semblent suggérer que les clivages de p27^{Kip1} par la cathepsine B participent à la dégradation de cet important inhibiteur du cycle cellulaire.

4 DISCUSSION

La majorité des études caractérisant l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de la cathepsine B dans les cancers colorectaux ont été réalisées sur des échantillons de tumeurs humaines issues de résections chirurgicales. Cependant, très peu d'études se sont intéressées au statut de cette protéase et à sa contribution dans l'épithélium colorectal cancéreux. Dans ce travail, nous avons porté attention à l'implication de la cathepsine B dans les processus tumorigéniques colorectaux dans un contexte de ciblage cellulaire strictement épithélial et ce, à l'aide de modèles de lignées cancéreuses en culture dont les principales caractéristiques sont listées dans le **tableau 1** du chapitre Matériel et méthodes. Toutes les lignées cancéreuses colorectales utilisées ont été prélevées d'adénocarcinomes colorectaux humains à différents degrés d'avancement.

4.1 Hétérogénéité d'expression de la cathepsine B dans les cellules cancéreuses colorectales et augmentation dans les tumeurs

Les cancers colorectaux sont très hétérogènes de par la nature des altérations génétiques qu'on peut y rencontrer ainsi que par leur aspect morphologique et leur capacité d'expansion. L'utilisation des différents modèles cellulaires colorectaux dans l'étude de leur potentiel tumoral in vitro et in vivo reflète souvent cette plasticité génétique observée dans les différents types de cancers colorectaux. En effet ces lignées cellulaires sont toutes issues d'un type de cancer colorectal qui possède ses propres caractéristiques. Dans la majorité des cas, ces lignées ont un aspect morphologique propre à chacune mais aussi, elles ont des capacités prolifératives et migratoires différentes les unes des autres. Dans une étude comparative visant à analyser le comportement tumoral des 12 lignées cancéreuses colorectales humaines, ces différentes lignées ont été injectées dans un modèle orthotopique murin Balb/c nue de manière sous-cutanée. Quatre de ces douze lignées sont communes à notre étude. Les résultats de ces expériences ont montré une grande hétérogénéité dans l'index de prolifération de ces différentes lignées ainsi que dans leur capacité à former des métastases (Flatmark et al., 2004).

Dans le cas de notre étude, l'hétérogénéité des données d'expression de la cathepsine B dans les différentes lignées utilisées est associée en partie aux différentes capacités invasives et métastatiques des lignées cancéreuses colorectales utilisées. Tout d'abord, la provenance histologique (selon l'axe proximal distal du colon) de chaque lignée est différente. Par ailleurs, il en va de même pour leurs altérations génétiques qui sont très différentes (voir table 1). Plusieurs études ont caractérisé l'implication de l'activation du sentier KRAS/MAP Kinase dans les processus de migration et d'invasion des cellules cancéreuses colorectales (Reddy et al., 2003). Par exemple l'expression de certaines métalloprotéases comme MMP2 et MMP9 peut être induite par la voie MEK/ERK (Reddy et al., 1999). On sait que l'activation constitutive de KRAS est observée dans environ 40% des cancers colorectaux. L'analyse par PCR quantitative de l'expression des ARN messagers de la cathepsine B pleine longueur nous montre, là aussi, des différences au sein des lignées testées, ce qui démontre que la régulation transcriptionnelle de la cathepsine B ne s'opère pas de la même façon dans les différentes lignées colorectales. Il est connu que le promoteur du gène codant pour la cathepsine B possède de nombreuses séquences répétées de type EBS pour Ets-1 Binding Sequences, séquences capables de lier les facteurs de transcriptions Ets qui sont connus pour être activés par certaines kinases dont les MAP Kinases ERK1/2 dépendantes de KRAS.(Paumelle et al., 2002) Il a par ailleurs été montré que dans les cellules endothéliales et certaines cellules épithéliales cancéreuses, ces facteurs Ets-1 ont un rôle pro-invasif par la transactivation des gènes codant pour les MMP1, MMP3 et MMP9 ainsi que uPA, VEGF et VEGFR (Dittmer, 2003). Ainsi, nous avons vérifié si l'expression de la cathepsine B pouvait être associée au niveau d'activation des kinases ERK1 et ERK2. Nos résultats ne montrent aucune corrélation significative entre le statut d'activation de ces kinases et les niveaux d'expression de la cathepsine B observés dans les lignées cancéreuses colorectales par RT-PCR semiquantitative (résultats préliminaires non montrés). Bien que le traitement au U0126 à 20 µM pendant 24 h chez certaines lignées colorectales comme les Lovo ou les HCT116 révèle des niveaux réduits d'ARNm cathepsine B (résultat non montrés).

nous ne pouvons pas établir de corrélation entre la mutation activatrice de l'oncogène KRAS, le niveau d'activité des ERK1/2 et l'expression des transcrits de la cathepsine B dans les cellules cancéreuses colorectales (figure 3.1.1). Ces observations sont de plus confirmées par l'analyse du niveau transcriptionnel de la cathepsine B dans un panel d'échantillons de 40 tumeurs colorectales humaines, mutées ou non pour l'oncogène KRAS (figure 3.1.4). Au contraire, par des études d'immunohistochimie dans une banque de tumeurs colorectales, le groupe d'Ogino a rapporté une corrélation positive entre les hauts niveaux d'expression de la cathepsine B et la présence des mutations activatrices de KRAS et de BRAF (Chan et al., 2010). Néanmoins, dans cette étude, les auteurs ont utilisé un substrat fluorescent et spécifique de la cathepsine B. En conséquence, les données de fluorescence reflètent surtout l'activité protéolytique de la cathepsine B. Dans notre étude, l'évaluation des transcrits du gène CTSB par PCR quantitative ne constitue pas une mesure de l'activité de la protéase. Par ailleurs dans l'étude d'Ogino, sur 558 patients chez lesquels une masse tumorale a été résectée, 18 % des tumeurs montrent une expression très faible en cathepsine B tandis que 82 % des tumeurs en exprime de grandes guantités. Ces observations montrent là encore l'hétérogénéité des niveaux de cathepsine B dans les masses tumorales colorectales. Néanmoins, les hauts niveaux d'expression de cette protéase corrèlent avec l'agressivité des tumeurs et leur caractère morbide (Chan et al., 2010).

De manière intéressante, trois des sept lignées cancéreuses colorectales analysées (Lovo, SW480 et Colo205) sont issues de cancers très avancés et métastatiques (Drewinko et al., 1976). Parmi ces trois lignées, les SW480 issues d'une tumeur primaire ayant déjà généré des métastases, (Semple et al., 1978) et les Colo205 provenant d'un ascite métastatique mésentérique (Leibovitz et al., 1976) possèdent les plus hauts niveaux d'expression de la cathepsine B. En accord avec ces résultats, notre analyse dans les tumeurs humaines montrent que le niveau d'induction des transcrits de la cathepsine B sont très élevés dans les tumeurs de stade avancé (IV) qui ont été testées (figure 3.1.4).

De manière surprenante, notre analyse de l'expression de la cathepsine B dans les différentes lignées cellulaires (figure 3.1.1) montre que les cellules épithéliales intestinales normales HIEC, sont celles qui expriment les plus hauts niveaux d'ARNm et de protéine ctsB. La lignée HIEC reste la seule lignée épithéliale intestinale humaine normale non différenciée et non immortalisée actuellement disponible (Perreault and Beaulieu, 1996). Nous les avons donc utilisées comme contrôle de « cellules normales intestinales » pour comparer l'expression de la cathepsine B avec les lignées cancéreuses colorectales choisies. Or, ces cellules expriment de hauts niveaux de la cathepsine B, plus importants que les lignées cancéreuses. L'origine iléale mais surtout fœtale de ces cellules pourrait peut-être expliquer pourquoi la cathepsine B est si fortement exprimée dans ces cellules. Le groupe de Jean-François Beaulieu a récemment rapporté que la lignée HIEC exprime fortement certains marqueurs d'autophagie comme les protéines LC3-II et BECN-1 (Groulx et al., 2012). L'autophagie est un processus responsable de la dégradation et du recyclage de certaines protéines, de certains composants cellulaires ou encore de certaines organelles comme les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Levine and Klionsky, 2004). Les compartiments intracellulaires responsables de la dégradation terminale sont les lysosomes après leur fusion avec les autophagosomes. La forte expression de la cathepsine B dans cette lignée de cellules intestinales pourrait être la conséquence d'un fort niveau d'autophagie intrinsèque à ces cellules. Par ailleurs, mes analyses de la détection de l'activité de la cathepsine B à l'aide d'un substrat fluorogénique spécifique ainsi que les marquages de la protéine même, par immunofluorescence, montrent une forte densité de vésicules de type lysosomale positives pour la cathepsine B (comarquage avec le LysoTracker®) (Figure 3-1-2A et B).

Ainsi, il s'avère inapproprié de comparer l'expression de la cathepsine B dans les lignées cancéreuses (colorectales et adultes) versus les cellules HIEC (iléales et fœtales). En revanche, une augmentation de l'expression de la cathepsine B est clairement observée sur des échantillons de tumeurs colorectales versus du tissu normal. Néanmoins, nous ne pouvons exclure la part d'expression stromale de la cathepsine B dans ces tumeurs. En effet, cette protéase est surexprimée dans le

stroma tumoral notamment dans les cancers du sein et les cancers colorectaux ainsi que par les cellules immunitaires associées à ces types de tumeurs. (Campo et al., 1994; Gocheva et al., 2010; Hazen et al., 2000). Nos résultats montrent une augmentation de l'expression de la cathepsine B tant dans les adénomes que dans les adénocarcinomes colorectaux. Bien qu'aucune corrélation n'ait pu être faite entre les niveaux d'induction du gène codant pour la cathepsine B et les mutations des oncogènes KRAS et BRAF, nous avons observé une association entre les hauts niveaux d'induction du gène CTSB et les mutations APC. Le gène APC, communément qualifié de « gatekeeper ou gardien » du cancer colorectal, est muté dans 60 à 80% de ces cancers (Fearnhead et al., 2001; Morin et al., 1997). La mutation ou la perte d'un ou des deux allèles d'APC représente une des voies majeures d'initiation tumorale et donc de développement d'adénomes colorectaux, incluant la formation de cryptes aberrantes et dysplasiques (Smith et al., 1994). La protéine APC est un régulateur négatif de la signalisation du sentier des Wnt/β-caténine qui contrôle la prolifération des cellules souches et progénitrices intestinales (Pinto et al., 2003). En effet, APC forme un complexe avec l'axine et la GSK3β qui phosphoryle la β-caténine, induisant sa dégradation par le protéasome (Bienz and Clevers, 2000). En condition physiologique normale, les facteurs Wnt déstabilisent et inhibent ce complexe, ce qui a pour conséquence de stabiliser la β-caténine qui s'accumule, transloque au noyau et s'hétérodimérise avec les facteurs de transcription de la famille des TCF/LEF, TCF4 dans l'intestin (van Es et al., 2012). Le complexe transcriptionnel β -caténine/TCF4 active la transcription de gènes pro-prolifératifs comme c-MYC et cycline D1 notamment (Lin et al., 2000; van de Wetering et al., 2002). Lors de mutations inactivatrices dans APC, les niveaux de la β-caténine sont très élevés ce qui conduit à une cathepsine B pourrait être un des facteurs pro-tumoral primordial pour l'établissement de polypes intestinaux chez l'humain comme le suggèrent les données de sa forte expression chez les patients démontrant de pertes alléliques du gène APC. Par ailleurs, une étude faite chez la souris APC∆580 (arborant le phénotype min) et qui consistait à cibler des acteurs importants du développement tumoral qui sont sécrétés par les tumeurs mêmes confirme nos observations. Dans cette étude, les auteurs ont identifié 51 protéines présentes dans le plasma des souris expérimentales et dont les ARN messagers sont, eux aussi, surexprimés par les tissus tumoraux. Parmi ces 51 cibles, les cathepsine B et Z/X font partie des 10 candidats dont les niveaux plasmatiques sont les plus forts (Hung et al., 2009). Bien que le promoteur du gène *CTSB* ne contienne pas d'éléments de réponse aux complexes β -caténine/TCF4 (Yan and Sloane, 2003), ces données suggèrent tout de même que les altérations alléliques du gène *APC* rencontrées dans les dysplasies colorectales conduit indirectement mais précocement à une augmentation de l'expression et de la sécrétion de la cathepsine B. Pour conclure, une étude de gounaris et collaborateurs, stipule que les souris de type APCmin qui sont aussi invalidées pour le gène de la cathepsine B, ont une charge tumorales réduite par rapport à leur contrôles APCmin homozygote sauvage pour le gène *ctsB*.

4.2 La sécrétion de la cathepsine B dans les lignées colorectales normales et cancéreuses.

L'expression de protéases de type cathepsine et notamment la cathepsine B peut amener des conséquences néfastes pour la cellule et l'organisme surtout dans le cas de leur déroutage et de leur sécrétion. Dans des pathologies telles que les cancers, la stratégie adoptée par les cellules transformées et tumorales est d'augmenter l'export de leur contenu protéasique afin de faciliter leur migration et la croissance du bourgeon tumoral par dégradation de la matrice environnante. Dans ces processus, le relargage de protéases par le stroma, en concomitance avec l'épithélium dysplasique, n'est pas à exclure. Plusieurs études ont confirmé qu'il existe un dialogue moléculaire précis entre l'épithélium lésé et son stroma sous-jacent dans l'établissement de programmes protéolytiques spécifiques permettant l'envahissement des cellules épithéliales. De plus, certaines études *in vitro* ont pu montrer que les capacités invasives de cellules HT-29 était accrues lorsque ces cellules étaient co-cultivées avec des fibroblastes du stroma colorectal (Krueger et al., 2005). Dans mon étude, nous avons porté attention aux niveaux de sécrétion de la cathepsine B par les différentes lignées cancéreuses colorectales. Au préalable à ces expériences, nous avons pu nous procurer une autre lignée intestinale normale humaine auprès de la compagnie ATCC. La lignée CRL-1831 a été isolée depuis un épithélium de colon fœtal humain. Ces cellules, tout comme les HIEC, sont des cellules non-immortalisées, prolifératives et non différenciées. Cependant, le fait qu'elles proviennent du même organe que les lignées cancéreuses (côlon et non iléon) nous laisse supposer que ces cellules sont de meilleurs contrôles pour l'évaluation de la sécrétion de la cathepsine B en comparaison aux lignées cancéreuses bien qu'elles restent d'origine fœtale. L'analyse des sécrétats des différentes lignées montre une expression extracellulaire de la cathepsine B par toutes les lignées cancéreuses ainsi que les cellules normales CRL-1831. De manière curieuse, ces cellules non transformées ont, elles aussi, la capacité d'exporter de la cathepsine B hors de leurs lysosomes. D'après les analyses par immunobuvardage de la sécrétion de la cathepsine B nous ne pouvons établir de corrélation effective entre l'état transformé des cellules cancéreuses et l'augmentation des niveaux de sécrétion de l'enzyme. Bien que la pro-cathepsine B soit plus exprimée dans certaines lignées cancéreuses comme les Caco 2/15, les SW480 et SW620. En ce qui concerne la présence de bandes spécifiques de la cathepsine B aux alentours des 25 et 30 kDa qui sont les formes actives de l'enzyme, nous pouvons observer leur présence dans les sécrétats des cellules CRL1831. Cette observation ne nous permet pas d'établir de corrélation entre les niveaux de transformation cellulaire et l'augmentation de l'activité extra cellulaire de la cathepsine B. Enfin, notons que deux lignées cancéreuses possèdent de hauts niveaux des formes actives de la cathepsine B dans leur concentrat. Ce sont les lignées Caco2/15 et SW480. Il est suggéré que ces deux lignées puissent avoir une forte activité cathepsine B dans leur milieu extracellulaire.

4.3 Caractérisation d'un variant d'épissage de la cathepsine B dans les cellules cancéreuses colorectales

La présence d'une activité nucléaire de type cathepsine B dans le noyau des cellules Caco -2/15 suggère une expression nucléaire de formes non lysosomales de cette enzyme dans les cellules cancéreuses colorectales. Une étude de Mehtani et collaborateurs a pu montrer la présence de variants d'épissage des transcrits cathepsine B dans des extraits de tumeurs colorectales. Parmi ces variants, les formes ctsB (-2) et ctsB (-2;-3) ont pu être observées. Le transcrit ctsb (-2;-3) génère une forme délocalisée de l'enzyme qui a été observée associée au compartiment nucléaire des cellules la surexprimant (Mehtani et al., 1998). Ainsi, cette forme enzymatique appelée ctsB Δ 52 pourrait être à l'origine de l'activité observée dans les noyaux des cellules Caco-2/15. Nos observations ont pu révéler l'existence de ce variant d'épissage dans toutes les lignées étudiées et les tendances d'expression des deux formes, pleine et épissée de l'ARNm, semblent se suivre. Cependant, nous avons constaté une tendance à exprimer de plus hauts niveaux du transcrit ctsb (-2;-3) par les cellules cancéreuses par rapport à la forme pleine longueur (figure 3.1.5A). Ces résultats corroborent les observations des groupes de Frankvater et de Baici, qui ont démontré la forte expression de ce variant dans des tumeurs originaires de mélanomes, hépatomes et adénocarcinomes colorectaux (Berardi et al., 2001; Gong et al., 1993). Les expériences de surexpression de la forme ctsB∆52 dans les cellules 293T ont permis de confirmer sa présence dans des enrichissements nucléaires de cellules 293T. Cette observation confirme les résultats du groupe de Baici quant à la présence de ctsB₄52 dans le noyau des cellules COS7 et HeLa, après surexpression ectopique (Baici et al., 2006; Zwicky et al., 2003). Une expérience préliminaire d'immunofluorescence dans les cellules Caco2/15 montre que cette forme variante de la cathepsine B se localise spécifiquement dans des organites qui semblent être des mitochondries. D'autres analyses de co-marquage avec des marqueurs spécifiques devront être faites pour confirmer la localisation mitochondriale de cette forme de cathepsine B dans les cellules cancéreuses colorectales tel que montrer dans les COS7 par Baici et collaborateurs. La perte

des 51 premiers acides aminés de la séquence peptidique de la cathepsine B induit la perte du peptide signal d'entrée au réticulum endoplasmique de l'ARNm, par conséquent cette enzyme ne pourra être traduite dans ce compartiment (Mehtani et al., 1998). La nouvelle conformation en trois dimensions de la forme épissée ctsB Δ 52 amène une autre conséquence intéressante : le démasquage d'une séquence hydrophobique en N-terminal possiblement reconnue par certaines familles de récepteurs membranaires externes mitochondriaux comme les TOM's (Zwicky et al., 2003). Ce phénomène induit, par conséquent, un ciblage massif de cette isoforme vers les mitochondries des cellules la surexprimant. Cependant, contrairement à ce qui avait été rapporté (Baici et al., 2006), nous n'avons pas pu confirmer de manière claire que les cellules 293T surexprimant la forme ctsB₄52 entrent en processus de mort cellulaire programmée puisque l'activation de caspases pro-apoptotiques 3 et 9 n'a pu être détectée. De manière intéressante, nous avons observé que l'activité protéolytique du variant ctsB vis-à-vis du substrat séléctif fluorogénique z-RR-AMC était bien détectable mais nettement inférieure à l'activité de la forme pleine longueur de l'enzyme (figure 3.1.5C). Nos résultats contredisent les observations du groupe Baici qui a stipulé que cette forme ne montrait aucune activité protéolytique de par son manque de maturation et de conformation typique mais qui a cependant un rôle sur la viabilité de ces cellules indépendamment de sa fonction de protéase (Zwicky et al., 2003). Cependant, le groupe de Frankvater, a rapporté que cette isoforme de cathepsine possédait bel et bien une activité protéasique intrinsèque (Mehtani et al., 1998). Il se pourrait que la faible activité observée dans nos expériences pour ce variant, soit la conséquence d'un autre niveau de contrôle négatif de l'activité enzymatique cathepsine B à des fins pro-oncogéniques. Enfin, il est important de préciser que le substrat fluorogénique utilisé est composé d'un doublet d'arginine ciblé préférentiellement par la cathepsine B mais pouvant l'être aussi par d'autre protéases. Bien que ce composé dont le clivage est inhibé par le Ca074 soit considéré comme spécifique par son fabriquant (BioVision), il est préférable de qualifié ce substrat de substrat sélectif vis-à-vis de la cathepsine B.

En résumé, nos résultats montrent l'augmentation de l'expression du variant ctsB (-2 ;-3) dans les cellules cancéreuses colorectales. Les ratios d'expression de la forme épissée sur la forme pleine longueur sont augmentés dans les cellules cancéreuses colorectales comparativement aux HIEC. Cette forme variante ctsB (-2 ;-3) est une enzyme active dont l'activité est inférieure à celle observée pour la forme pleine longueur. Ceci pourrait potentiellement contribuer à contrôler un possible effet délétère de ce variant sur la survie de ces cellules. Il se pourrait par ailleurs que cette faible activité puisse amener cette enzyme à cliver de manière spécifique et hautement contrôlée certains facteurs nucléaires présents dans les cellules cancéreuses colorectales. On a, par ailleurs, observé une interaction par co-immunoprécipitation entre le variant ctsB Δ 52 et l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1} après surexpression des deux formes dans les cellules 293T. Nous reviendrons plus loin sur ces mécanismes dans la partie concernant la régulation de p27^{Kip1} par la cathepsine B.

4.4 Les souris invalidées pour le gène de la cathepsine B ne sont pas plus ou moins sensibles au traitement combiné azoxyméthane-DSS

Le croisement de modèles murins de carcinogénèse mammaire (lignée *MMTV-PyMT*) et pancréatique (lignée murine KrasLSL.G12D/+; p53R172H/+; PdxCretg/+ aussi connue sous le nom de souris KPC) avec la lignée de souris invalidée pour le gène *ctsb* montre une réduction de la charge tumorale et métastatique en absence d'expression de la cathepsine B (Gopinathan et al., 2012; Vasiljeva et al., 2008). Par ailleurs, dans le contexte de néoplasie intestinale bénigne, le croisement de la lignée *APC^{Min/+}* avec les *ctsb^{-/-}* montre, là aussi, une réduction du nombre et de la taille des polypes intestinaux (Gounaris et al., 2008). Ces études montrent donc que la cathepsine B est non seulement impliquée dans la progression tumorale et métastatique mais aussi dans l'initiation de néoplasies épithéliales. Dans le cadre de nos études, il existe chez la souris, un modèle de tumorigénèse colorectale associée à une colite consistant à traiter la lignée syngénique C57Bl6 avec le carcinogène azoxyméthane (AOM) suivi d'un traitement chronique au sel de dextran DSS. Ces traitements génèrent en quelques semaines une importante polypose de type tubulo-villeuse dans la zone

recto-anale du côlon (Tanaka et al., 2003). Nous avons donc traité les souris ctsb-/et leurs contrôles (ctsb-/+, ctsb+/+) à l'AOM+DSS afin d'évaluer l'impact de l'absence de cathepsine B sur le développement de tumeurs dans le côlon. De manière surprenante, nous n'avons pas, malheureusement, observé de baisse significative de la charge en polypes chez les souris expérimentales ctsb^{-/-} comparativement à leurs contrôles. Cependant, les données générées par le groupe expérimental présentent de grandes variations de charges tumorales en fonction des individus traités. Plusieurs points sont cependant à prendre en compte, notamment d'un point de vue expérimental. Les travaux du groupe de la Dr N. Beauchemin ont montré certaines variations dans la susceptibilité de différents fonds génétiques murins vis-à-vis du traitement à l'azoxyméthane (Meunier et al., 2010). Par exemple, les souris de fond génétique C57Bl6 sont assez résistantes à l'AOM mais un traitement pro-inflammatoire chronique augmente de manière importante l'apparition des néoplasies causée par ce carcinogène (Tanaka et al., 2003). Le DSS est un composé ajouté à l'eau de boisson des souris à une concentration finale 1,5%. Les doses de DSS administrées aux souris C57Bl6 varient en général de 1% à 3%. La variabilité de nos résultats nous suggère que l'accès à l'eau de boisson n'était peut-être pas équitablement réparti entre les différents individus cohabitant dans les mêmes cages. En effet, la relation de dominance de certains individus par rapport à d'autres amène un ordre de priorité pour l'accès à l'eau et aux denrées. Une autre observation qu'on a pu faire est que les femelles semblent moins sensibles que les mâles, ce qui pourrait être attribuable à l'effet protecteur des œstrogènes dans la carcinogénèse colorectale (Kennelly et al., 2008). Bien que les résultats présentés montrent les tendances pour les deux sexes confondus, nous remarquons une légère diminution de la charge tumorale chez les femelles ctsb-/comparativement aux femelles sauvages. Enfin, un dernier point à prendre en compte réside dans la possibilité que la perte de cathepsine B soit compensée par l'augmentation de l'expression et/ou de l'activité d'une autre cathepsine. Cela a d'ailleurs déjà été observé lors du croisement de ces souris ctsb-/- avec les souris APC^{Min/+} (Gounaris et al., 2008); les polypes n'exprimant pas la cathepsine B montrent une augmentation importante de l'expression de la cathepsine Z. Les cathepsine B, C et Z sont les trois membres de la famille cathepsine à montrer une activité carboxy-exo-dipeptidasique en plus d'une activité endo-peptidasique (Jevnikar et al., 2008). De manière intéressante, les souris doublement invalidées pour les gènes *ctsz* et *ctsb* sont mieux protégées de l'émergence de métastases pulmonaires d'origine mammaire comparativement aux souris inactivées pour un seul de ces deux gènes (Sevenich et al., 2010). Toutes ces observations tendent donc à suggérer que la cathepsine Z peut compenser pour la perte de cathepsine B dans certains contextes. Il se pourrait que dans nos modèles AOM-DSS, le ciblage des deux cathepsines B et Z puisse apporter de meilleurs résultats quant à la baisse des charges tumorales colorectales.

4.5 Cathepsine B et développement tumoral : approche ARN interférence stable

Durant la progression du cancer colorectal, il a été rapporté que l'expression et l'activité de la cathepsine B sont augmentées et délocalisées (Hazen et al., 2000). Dans la muqueuse colorectale saine, l'activité de l'enzyme est uniquement retrouvée dans l'épithélium de surface corrélant avec les processus apoptotiques et la desquamation naturelle de la muqueuse. Cependant, dans les tumeurs colorectales, qu'elles soient bénignes ou malignes, l'activité de l'enzyme a été retrouvée dans la totalité de l'épithélium et plus particulièrement aux pôles basolatéraux des colonocytes. Cette délocalisation semble suggérer l'engagement de l'épithélium dans des processus de dégradation de sa lame basale et d'invasion du stroma. Par ailleurs, certaines études ont montré que la transformation de colonocytes en culture induit la relocalisation des lysosomes vers la périphérie cellulaire facilitant ainsi la diffusion passive de la pro-cathepsine B vers le milieu extracellulaire via son interaction avec les tétramères d'annexine II dans les cavéoles membranaires (Cavallo-Medved et al., 2003; Mai et al., 2000). De plus, la présence importante de cathepsine B dans le plasma de patients atteints de cancers colorectaux est un indicateur de mauvais pronostique de survie de ces patients (Campo et al., 1994; Chan et al., 2010). Toutes ces observations semblent suggérer que la cathepsine B est un acteur important dans la tumorigénicité des colonocytes durant la progression de la maladie. Par conséquent, cibler de manière spécifique son expression ou son activité pourrait contribuer à diminuer le caractère agressif des cellules cancéreuses colorectales. Ainsi, pour d'étudier l'impact de la baisse de l'expression de la cathepsine B dans le comportement tumorigénique des cellules cancéreuses colorectales, nous avons utilisé une approche d'ARN interférence par shARN dans les lignées HT-29 et DLD-1.

4.5.1 Mise au point du shARN dirigé contre la cathepsine B

L'insertion de la séquence du shARN dans un vecteur lentiviral de type pLenti-U6 a permis d'infecter de manière stable les deux lignées HT-29 et DLD-1. Nous avons pu ainsi évaluer l'efficacité du ciblage de cette séquence sur l'expression de l'ARN messager pleine longueur de la cathepsine B ainsi que sur les niveaux de la protéine enzymatiquement mature (25 et 30 kDa). Les résultats montrent une très bonne efficacité du shARN par la réduction massive des niveaux de production de la cathepsine B pleine longueur (figure 3.2B). Bien que n'ayant pas les outils nécessaires à la détection de la forme ctsB∆52 endogène dans les deux lignées, nous avons évalué l'efficacité du shARN sur l'expression transitoire de ce variant dans la lignée 293T. Dans ces expériences, les niveaux de production de la protéine ctsB∆52 (38kDa) sont là aussi drastiquement diminués (figure 3.1.5D). Ces observations suggèrent que la forme endogène ctsB∆52 est aussi touchée par le shARN dans les lignées HT-29 et DLD-1.

4.5.2 La cathepsine B intracellulaire favorise la croissance de colonies cellulaires en indépendance d'ancrage

Les expériences décomptes cellulaires sur plastique des deux lignées sousexprimant la cathepsine B montrent une implication modeste de cette enzyme dans ces conditions et ce phénomène est plus prononcé dès l'atteinte de la confluence des cellules (figure 3.2.1 A et B). Les cathepsines B et L sont les deux protéases majoritairement rencontrées dans les lysosomes (Turk et al., 2000). On peut penser que le ciblage de la cathepsine B par le shARN peut affecter une

partie plus ou moins importante de l'activité globale des lysosomes. Il a d'ailleurs été montré que l'invalidation des deux gènes ctsb et ctsl chez la souris est létale in utero. Chez la souris adulte, l'induction du double KO entraine de sévères anomalies cérébrales et de la dégénérescence neuronale associées à d'importantes désorganisations lysosomales (Felbor et al., 2002). Dans nos modèles de cellules en monocouche, il semblerait que ces dernières puissent compenser en partie les effets de la perte d'expression de la cathepsine B dans des conditions riches en nutriments et en facteurs de croissance. Nous avons, dans un second temps, voulu mimer plus finement les conditions de croissance de colonies cellulaires tumorales colorectales, cette fois-ci dans un contexte d'indépendance d'ancrage en milieu semi-solide dans lequel les colonies en formation ont un accès plus restreint aux nutriments. Cet effet étant plus prononcé pour les cellules situé à l'intérieur des colonies. L'ancrage à la matrice extracellulaire des colonocytes normaux ainsi que leurs jonctions cellulaires est important dans l'établissement de signaux de survie (Fouquet et al., 2004; Okayama, 2012). L'anoïkose est le processus apoptotique induit par la perte d'ancrage des entérocytes et des colonocytes. Beaucoup d'études ont montré que les cellules cancéreuses colorectales sont résistantes à ces processus de mort cellulaire programmée par la perte d'ancrage à leur matrice (Coll et al., 2002; Demers et al., 2009; Rosen et al., 2000; Windham et al., 2002). Nous avons utilisé les deux lignées cellulaires HT-29 et DLD-1 sous-exprimant la cathepsine B ainsi que leurs populations contrôles respectives dans des expériences de croissance de colonies en milieu d'agarose semi-solide. Contrairement aux expériences de croissance sur plastique, nous avons observé une importante réduction du nombre de colonies formées par les cellules sous-exprimant la cathepsine B. Ces résultats montrent donc que cette protéase joue un rôle important dans l'établissement de colonies tumorales colorectales en conditions d'indépendance d'ancrage. Dans le but de vérifier si la forme de cathepsine B qui joue un rôle dans ces phénomènes est sécrétée, nous avons réalisé les mêmes expériences mais en traitant les deux lignées cellulaires avec un inhibiteur spécifique de la cathepsine B qui n'a pas la possibilité de pénétrer les membranes plasmiques, le

Ca074. Il a été démontré que cette forme d'inhibiteur ne peut se lier qu'à des formes extracellulaires et sécrétées de la cathepsine B (Buttle et al., 1992). Nos observations ne montrent pas d'incidences de la perte d'activité cathepsine B sécrétée dans l'établissement de colonies en indépendance d'ancrage puisque le nombre de colonies formées par les cellules traitées de manière quotidienne au Ca074 est identique à celui des cellules traitées avec le véhicule DMSO. Ces résultats suggèrent donc qu'une forme intracellulaire, lysosomale ou non, de la cathepsine B intervient dans ces processus de croissance en indépendance d'ancrage. Il existe, par ailleurs, un dérivé perméable aux membranes plasmiques de l'inhibiteur Ca074, le Ca074-Méthyl-Ester (Ca074-Me). Cet inhibiteur a la particularité de ne pouvoir inhiber que des formes intracellulaires de cathepsine B. Dans le milieu extracellulaire, son groupement méthyl-ester ne permet pas sa pleine activité d'inhibition (Buttle et al., 1992) mais au contraire lui permet de traverser la membrane plasmique. Ayant franchi la barrière lipidique, l'inhibiteur se trouve dans le cytoplasme sous la forme non méthylée et pleinement fonctionnelle. Dans la littérature, beaucoup d'études ont utilisé cet inhibiteur perméant pour étudier le caractère tumorigénique de certaines lignées tumorales (Sever et al., 2002; Shimizu et al., 2012; Szpaderska and Frankfater, 2001). Cependant dans nos modèles cellulaires colorectaux, cette forme perméante détériore de manière importante la viabilité des cellules traitées, même à de très faibles concentrations (résultat non montré). La cathepsine B étant la principale protéase lysosomale, il se peut que cibler son activité dans les lysosomes puisse être délétère pour la cellule cancéreuse. Néanmoins, nous ne pouvons pas, par conséquent, utiliser cet inhibiteur pour confirmer l'implication de formes intracellulaires de la cathepsine B dans la croissance de colonies en indépendance d'ancrage.

4.5.3 La cathepsine B promeut l'invasion des cellules cancéreuses colorectales

La cathepsine B a la capacité de dégrader plusieurs protéines matricielles telles que la fibronectine, les laminines, les collagènes de type I, IV et XVII et la
ténascine C (Obermajer et al., 2008). Par ailleurs, cette protéase peut aussi dégrader certaines protéines membranaires comme la E-cadhérine (Gocheva et al., 2006). Ces observations suggèrent donc que le déroutage de la cathepsine B observé dans les cellules cancéreuses peut mener au remaniement d'éléments de la matrice extracellulaire et de récepteurs membranaires favorisant les capacités d'invasion de ces cellules. Les travaux du groupe de Bonnie Sloane ont montré que les cavéoles membranaires sont des zones riches en enzymes protéolytiques. La petite chaîne p11 de l'hétérotétramère d'annexine II, un élément de structure de la cavéole a été identifiée comme étant le partenaire d'interaction de la procathepsine B, de la plasmine, du plasminogène et de l'activateur du plasminogène tPA (Cavallo-Medved et al., 2005). D'autre part, le groupe de Jasti Rao a montré que dans des cellules tumorales gliales hautement invasives, la sous-unité de l'intégrine β 1 lie le collagène l et est impliquée dans l'augmentation de sécrétion de la pro-cathepsine B (Rao, 2003). Par ailleurs, ce même groupe démontre un rôle de l'activité cathepsine B membranaire et sécrétée dans le déclenchement des cascades d'évènements protéolytiques dans les gliomes invasifs. Dans le but d'évaluer les capacités invasives des cellules HT-29 et DLD-1 sous-exprimant la cathepsine B, nous avons utilisé les deux lignées dans des expériences de transmigration in vitro au travers d'une membrane de matriGel® dans des modèles de chambres de Boyden (Boyden, 1962). Les résultats obtenus dans ces expériences montrent que les populations HT-29 et DLD-1 sous-exprimant la cathepsine B ont un index d'invasion diminué par rapport à leurs populations exprimant le shARN contrôle. Par ailleurs, de manière intéressante, le traitement de ces deux lignées non infectées avec l'inhibiteur non perméant Ca074 réduit de manière comparable les capacités d'invasion de ces cellules. Ces observations suggèrent une implication importante des formes sécrétées et/ou associées aux membranes plasmiques de la cathepsine B dans les processus de remodelagede la matrice extracellulaire. Par ailleurs, certaines métalloprotéases comme les MMP2 et MMP9 ont été caractérisées comme étant des acteurs important de l'invasion des cellules cancéreuses colorectales (Lemieux et al., 2009; Tutton et al., 2003). Certaines études tendent à suggérer une implication de l'activité de la cathepsine B dans l'activation des systèmes protéolytiques de type MMP dans des formes de gliomes très invasifs (Rao, 2003).

4.5.4 La cathepsine B promeut le potentiel tumoral des cellules cancéreuses colorectales chez la souris

Jusqu'ici, nos résultats avec les lignées cellulaires en culture montrent qu'une baisse d'expression de la cathepsine B atténue leur capacité à croître en indépendance d'ancrage et leur capacité invasive. Ainsi, nos résultats suggèrent que la cathepsine B pourrait être une cible intéressante pour réduire le potentiel tumoral de cellules cancéreuses colorectales. Pour vérifier cela, nous avons évalué la capacité de nos populations cellulaires sous-exprimant ou non la cathepsine B à former des tumeurs chez la souris nue. Les expériences d'injection sous-cutanée de la lignée HT-29 sous-exprimant ou non la cathepsine B ont montré que les cellules qui sous-expriment la protéase avaient une capacité réduite à former des tumeurs in vivo. Dans ce contexte, les conditions de microenvironnement tumoral (acidification du milieu, activation des facteurs paracrines, néoangiogénèse, etc..) permettent de mieux se rendre compte du rôle primordial de cette protéase dans l'établissement des processus de croissance des tumeurs colorectales. Considérant la réduction significative des volumes tumoraux avec les cellules sous-exprimant la cathepsine B, nous avons évalué les niveaux d'expression de certaines protéines importantes pour la progression du cycle cellulaire des cellules cancéreuses colorectales. Premièrement, les analyses par buvardage de type Western ont confirmé la baisse drastique d'expression de la cathepsine B dans les tumeurs shctsB par rapport aux tumeurs contrôles. Par ailleurs, les niveaux de phosphorylation et d'activation des kinases ERK1/2 et Akt, des kinases importantes dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses colorectales (Migliardi et al., 2012), ne semblent pas varier. De manière intéressante, les niveaux d'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1} sont hautement augmentés dans la totalité des tumeurs sous-exprimant la cathepsine B. Au contraire, les niveaux d'expression des autres inhibiteurs du cycle p21^{Cip1} et p57^{Kip2} restent inchangés. Ces observations suggèrent donc que le

retard de croissance des tumeurs sous-exprimant la cathepsine B pourrait être causé par une hausse des niveaux de l'inhibiteur p27^{Kip1}. L'importance de p27^{Kip1} dans la tumorigénèse colorectale est aujourd'hui reconnue. En 1997, les travaux du groupe de Loda ont permis de démontrer le rôle central que jouent les processus de dégradation de p27^{Kip1} dans l'agressivité des tumeurs colorectales humaines. Dans un groupe de 149 patients atteints de carcinomes colorectaux de stade 1 à 4, l'absence ou les faibles niveaux p27^{Kip1} sont observés dans des tumeurs où l'activité de dégradation spécifique de p27^{Kip1} (en partie dépendante du protéasome) est importante et vice versa. Ces observations sont indépendantes du stade d'avancement de la tumeur (Loda et al., 1997). De plus les patients chez lesquels les tumeurs expriment faiblement p27^{Kip1} ont un risque accrû de décéder plus rapidement que les patients chez lesquels les tumeurs expriment plus fortement p27^{Kip1}. Nos observations faites dans les tumeurs sousexprimant la cathepsine B rejoignent les données de l'étude de Loda puisque les cellules cancéreuses colorectales sous-exprimant la cathepsine B possèdent de plus haut niveaux de p27^{Kip1} (expériences de xénogreffes chez la souris nude) et sont, en parallèle, moins tumorigéniques. Ceci suggère que d'autres processus de dégradation de p27^{Kip1}, indépendants du protéasome, pourraient aussi contribuer à diminuer le niveau de cet inhibiteur durant la tumorigénèse colorectale.

4.5.5 La cathepsine B promeut le développement de métastases pulmonaires d'origine colorectale

En parallèle aux expériences d'injection sous-cutanée des cellules HT-29 chez la souris nue, des injections dans la veine de la queue ont été réalisées chez les souris SCID beiges immunodéficientes. Ces expériences ont été réalisées afin de caractériser le possible rôle pro-métastatique de la cathepsine B dans les cellules cancéreuses colorectales. Dans ce contexte expérimental, les cellules cancéreuses sont directement injectées dans la circulation systémique de l'animal. Les cellules tumorales injectées directement dans le sang n'ont pas à franchir de lame basale mais pourront par contre extravaser puis coloniser certains tissus

cibles comme les poumons via la veine cave. Dans ces expériences, deux groupes de souris ont été injectés à quatre jours d'intervalle avec les mêmes populations de cellules HT-29. Après le sacrifice des souris, nous avons constaté que les individus injectés avec la population sous-exprimant la cathepsine B ont une charge métastatique pulmonaire sensiblement réduite par rapport aux individus contrôles. Ces observations confirment que la protéase à cystéine cathepsine B est impliquée dans l'établissement de métastases pulmonaires à partir de cellules cancéreuses colorectales chez la souris et que cibler son expression pourrait être une approche thérapeutique intéressante pour le traitement des cancers colorectaux métastatiques chez l'humain. À l'heure actuelle, plusieurs évidences et données expérimentales supportent d'ailleurs l'hypothèse selon laquelle la cathepsine B est pro-métastatique dans d'autres types de cancers. Par exemple, dans le cas du modèle murin de cancer mammaire MMTV-PyMT croisé avec la lignée ctsb-/-, la déficience en cathepsine B chez les individus homozygotes invalidés entraine un ralentissement de la croissance des tumeurs mais encore, une réduction de leur potentiel métastatique pulmonaire (Gocheva et al., 2006; Vasiljeva et al., 2008). Une des caractéristiques frappantes chez ces souris est la redistribution de la cathepsine Z à la surface des cellules tumorales. De ce fait, la cathepsine Z est suspectée de participer à la compensation de la perte de la cathepsine B dans ces cellules (Vasiljeva et al., 2006). Cette hypothèse a pu être validée par le modèle de double invalidation des gènes ctsb et ctsz sur fond génétique MMTV-PyMT qui montre une plus importante réduction de la charge métastatique pulmonaire que chez les individus uniquement invalidés pour la cathepsine B (Sevenich et al., 2010). Par ailleurs, la simple invalidation du gène de la cathepsine Z dans ce contexte génétique, n'a que très peu d'effets quant aux capacités métastatiques des cellules tumorales mammaires. Ces données supportent par conséquent un rôle primordial de la cathepsine B dans l'établissement de métastases dans ce modèle de carcinogénèse.

4.5.6 Régulation de l'inhibiteur p27^{Kip1} par la cathepsine B dans les cellules cancéreuses colorectales

L'inhibiteur p27^{Kip1} participe au contrôle de la sortie de la quiescence et de l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire. En réponse à une stimulation mitogénique, p27^{Kip1} est dégradé, facilitant l'activation des complexes cyclines D/cdk4,6 et cycline E/cdk2 et par conséquent, la progression à travers la phase G1 et l'entrée en phase S (Rivard et al., 1999; Takuwa and Takuwa, 1997). Deux mécanismes majeurs de dégradation de p27Kip1 impliquant le protéasome ont été antérieurement décrits. En phase G1 précoce, la protéine p27Kip1 est dégradée dans le cytoplasme par le complexe promoteur d'ubiquitination KPC (Kip1 ubiquitination-promoting complex) (Hara et al., 2001; Kamura et al., 2004). Lors de la transition G1/S et lors de la phase G2, p27Kip1 est dégradé dans le compartiment nucléaire par le complexe d'ubiquitination SCFSKP2 (Nakavama et al., 2004). Mise à part ces deux mécanismes protéasome-dépendants, peu de choses est connu concernant la dégradation de p27Kip1 dans le contexte tumorigénique. Certaines dégradations indépendantes du protéasome ont été aussi décrites concernant p27^{Kip1}. Par exemple, dans les méningiomes choroïdaux, p27Kip1 peut subir une dégradation dépendante d'une cystéine protéase de type calpaïne et ce, dépendamment de l'activité MAP kinase (Delmas et al., 2003). Un clivage caspase-dépendant de p27^{Kip1} a été aussi rapporté dans la lignée de myélome humain U266 en condition de blocage du cycle en phase G1 précoce. Ce clivage génère un fragment p23 qui est séquestré dans le cytoplasme ; cependant, p27^{Kip1} conserve ses qualités d'inhibiteur puisque son domaine de liaison aux complexes CDK/cycline reste intact (Loubat et al., 1999). De manière intéressante, une petite portion de p27^{Kip1} a été retrouvée dans les lysosomes des cellules Hela, NIH-3T3 et COS7 ce qui suggère là aussi que le protéasome n'est pas le seul compartiment de dégradation de p27^{Kip1}. L'utilisation d'un inhibiteur d'activité protéasique lysosomale tels que la leupeptine ou encore un perturbateur du pH lysosomal comme la chloroquine augmente les niveaux de p27^{Kip1} suggérant que cet inhibiteur pourrait être en partie dégradé dans les lysosomes (Fuster et al., 2010). Cependant, l'activité protéasique responsable de

cette dégradation lysosomale n'a pas été identifiée dans cette étude. Par ailleurs, nos expériences d'immuno-localisation de la cathepsine B et de p27^{Kip1} nous révèlent que ces deux protéines colocalisent dans des vésicules de type endolysosomale dans les cellules cancéreuses colorectales Caco-2/15. Des expériences de double hybride chez la levure à partir d'une librairie d'ADN complémentaires de cellules Caco-2/15 nous avaient déjà suggéré l'interaction directe entre l'inhibiteur p27^{Kip1} et la cathepsine B (résultats non publiés de Jim Boulanger). Rappelons aussi que mes résultats obtenus chez les souris nues ont montré des niveaux de p27^{Kip1} augmentés dans les tumeurs sous-cutanées formées à partir de cellules HT-29 sous-exprimant la cathepsine B. Prises ensemble, ces observations suggèrent qu'un mécanisme de dégradation de p27^{Kip1} implique la cathepsine B dans le contexte tumoral colorectal. En accord avec cela, nos expériences in vitro de dégradation de p27Kip1 par la cathepsine B recombinante démontrent que cette protéase a effectivement la capacité de cliver p27^{Kip1} et de générer deux fragments majoritaires très précocement. Par ailleurs, il est important de noter que dans ces expériences de clivage de p27^{Kip1} nous n'observons jamais de disparition totale de la forme pleine longueur de p27 au profit des fragments de clivages. Les guantités de substrats p27^{Kip1} utilisées sont sans doute en excès par rapport aux quantités d'enzymes. Cependant, quelles que soit les conditions, la présence constante des deux fragments p10 et p20 renforce une spécificité de clivage par la cathepsine B. Plusieurs expériences ont été tentées pour confirmer de manière claire l'interaction de p27^{Kip1} avec la forme pleine longueur de la cathepsine B qui est majoritairement lysosomale. Cependant, par immunoprécipitation de p27Kip1 dans les cellules 293T surexprimant les deux protéines, les signaux correspondant à la cathepsine B sont masqués par la présence des chaines d'immunoglobulines utilisées lors de l'immunoprécipitation. En revanche une colocalisation des deux protéines a été possible par immunofluorescence en microscopie confocale dans les cellules cancéreuses Caco2/15. Enfin, l'identification des sites putatifs de clivage de p27^{Kip1} par la cathepsine B a permis de générer par clonage une forme double mutante de p27^{Kip1} non clivable par cette protéase. Nos expériences de traitement

à la cycloheximide (CHX) dans les cellules 293T surexprimant les deux formes de p27^{Kip1} ont montré que cette forme mutante pour les sites de clivage de la cathepsine B possède une stabilité augmentée par rapport à la forme sauvage. De plus, certaines données préliminaires concernant la fonctionnalité du double mutant p27Kip1 par des expériences d'essais kinase sur des substrats de CKD2, nous suggèrent que ce double mutant conserve ses capacité à inhiber les complexes de cyclines associées à CDK2. Pour résumer, nos résultats supportent l'hypothèse selon laquelle différentes fractions de p27^{Kip1} seraient amenés à être clivées par des formes alternatives de cathepsine B selon leurs localisations nucléaires et/ou lysosomales. Non seulement les données de digestion de p27Kip1 ainsi que sa fine colocalisation lysosomale suggèrent que ces portions sont clivées par la forme traditionnelle pleine longueur de la cathepsine B au sein des lysosomes. Mais aussi il n'est pas à exclure que la forme ctsB (-2/-3) puisse être à l'origine d'un clivage nucléaire de l'inhibiteur p27^{Kip1}. Il a déjà été montré que certains facteurs nucléaires peuvent être clivés par des cathepsines nucléaires ou associées aux membranes externes des noyaux (Boudreau et al., 2007; Goulet et al., 2004; Tedelind et al., 2011; Tedelind et al., 2010). Cependant, dans le cas de délocalisation des cathepsines, le changement de pH peut amener des modifications de leur spécificité de clivages. Une réduction de leur activité globale peut aussi être observée (Goulet et al., 2004).

5 CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

5.1 Conclusions

Au cours de ma thèse, nous avons tout d'abord démontré que l'expression de la cathepsine B est très hétérogène selon les lignées cancéreuses colorectales testées. Cependant, il nous a été permis de montrer une augmentation du niveau des transcrits cathepsine B dans les tissus tumoraux de patients atteints de cancer colorectal comparativement aux marges de résection des tumeurs. Les données concernant la sécrétion de la cathepsine B démontrent que les lignées cancéreuses colorectales sécrètent aussi plus de formes actives de la protéase que les cellules normales. Ainsi, les cellules tumorales ont une tendance accrue à activer la cathepsine B dans le milieu environnant. Par ailleurs, en plus des formes extracellulaires de cathepsine B, nous avons pu mettre en évidence la présence et l'activité de l'enzyme dans les compartiments nucléaires de certaines lignées cancéreuses colorectales. Ces déroutages de la cathepsine B dans ces lignées cancéreuses colorectales, nous a amenés à penser que cette enzyme pourrait être impliquée dans plusieurs mécanismes moléculaires distincts favorisant l'expansion tumorale colorectale.

Par une approche de ciblage de l'expression de la cathepsine B par interférence ARN ainsi que par une approche pharmacologique d'inhibition des formes intracellulaires ou extracellulaires, nous avons pu mettre en évidence plusieurs rôles distincts de la cathepsine B dans la tumorigénèse colorectale. L'utilisation du shARN dirigé contre toutes les formes de cathepsine B montre que des formes intracellulaires (lysosomales ou non) sont fortement impliquées dans la croissance en indépendance d'ancrage des cellules cancéreuses colorectales, tandis que les formes extracellulaires favorisent essentiellement l'invasion de ces cellules. Par ailleurs, l'injection de cellules cancéreuses colorectales sous-exprimant la cathepsine B chez la souris nue montre une croissance retardée des tumeurs et une capacité réduite à former des métastases pulmonaires. L'analyse biochimique de ces tumeurs sous-cutanées révèle une augmentation des niveaux protéiques de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1}, ce qui permet d'expliquer en partie le retard de leur croissance.

Nos résultats permettent enfin de suggérer un nouveau mécanisme de régulation de la protéine p27^{Kip1} dans les cellules tumorales par sa dégradation dépendante de la cathepsine B. De manière *in vitro* et *in cellulo*, nous avons pu montrer que la cathepsine B à la capacité de couper p27^{Kip1} en générant deux fragments majoritaires de 20 et 12 kDa respectivement. De plus, la génération d'un mutant de p27^{Kip1} non clivable par la cathepsine B augmente de manière significative sa stabilité. Nous avons par ailleurs observé la colocalisation lysosomale des protéines p27^{Kip1} et cathepsine B dans les cellules cancéreuses Caco-2/15. Ces données sont donc en accord les observations du groupe de J. Fuster qui soutient qu'une petite quantité de p27^{Kip1} est ciblée aux lysosomes pour sa dégradation (Fuster et al., 2010).

5.2 Perspectives

Le retard de croissance des tumeurs sous-exprimant la cathepsine B ainsi que la baisse des charges métastatiques pulmonaires chez la souris nous montrent que cette protéase est une cible potentiellement importante pour le traitement du cancer colorectal. Il serait intéressant de tester l'action inhibitrice de l'activité de la cathepsine B par certains inhibiteurs pharmacologiques sur l'établissement de métastases pulmonaires d'origine colorectale chez la souris. L'inhibition des formes sécrétées de cette protéase par des inhibiteurs non perméants comme le Ca074 pourrait permettre de combattre les tumeurs et leurs métastases en limitant de possibles effets secondaires dû à l'inhibition des formes lysosomales. Cependant, nos données concernant l'utilisation du modèle murin d'invalidation génique de la cathepsine B soulèvent certaines interrogations. En effet, l'absence de variation dans la susceptibilité au traitement AOM/DSS entre les souris invalidées et leurs contrôles nous amène à penser que la perte du gène pourrait être compensée par l'augmentation de l'expression d'une autre cathepsine à cystéine. Plusieurs études suggèrent que la cathepsine Z, possédant une forte homologie avec la cathepsine B, pourrait jouer ce rôle de compensateur lors de la perte de cette dernière (Gounaris et al., 2008; Sevenich et al., 2010). Il serait intéressant d'évaluer l'expression et la localisation de la cathepsine Z dans les cellules cancéreuses sous-exprimant la cathepsine B ainsi qu'au niveau de la muqueuse intestinale des souris invalidées pour le gène *ctsb*. Ces données pourraient permettre à plus long terme d'améliorer la conception d'inhibiteurs de cathepsines à plus large spectre permettant de cibler l'action spécifique de plusieurs membres de la famille dans des mécanismes cellulaires précis comme l'expansion tumorale.

Les données concernant l'expression et l'activité de la cathepsine B dans les huit lignées colorectales étudiées nous suggèrent que la maturation de cette enzyme ne s'opère pas de manière identique dans ces lignées cancéreuses. Les niveaux d'acidification des espaces périmembranaires ainsi que l'expression des activateurs (e.g. la cathepsine D, l'élastase neutrophile, tPA, etc...) et inhibiteurs endogènes (e.g. cystatines) sont tous des paramètres qui nous permettraient d'éclaircir les mécanismes de suractivation de la cathepsine B dans les cellules cancéreuses colorectales.

Concernant les données de dégradation de p27^{Kip1} par la cathepsine B, nous avons pu démontrer que l'activité protéolytique de cette enzyme participe à la déstabilisation de p27^{Kip1}. Il est clairement établi que le système ubiquitineprotéasome est un déstabilisateur important de la protéine p27^{Kip1} (Hara et al., 2001; Kamura et al., 2004; Loda et al., 1997; Nakayama et al., 2001; Yew, 2001). Nos données, avec d'autres de la littérature, suggèrent que plusieurs systèmes protéolytiques participent à la réduction des niveaux de cet important inhibiteur du cycle cellulaire pour une prolifération tumorale adéquate. À court terme, il serait nécessaire d'évaluer la stabilité des formes endogènes de p27^{Kip1} dans les lignées cancéreuses colorectales exprimant de hauts niveaux de cathepsine B intracellulaire. De plus il serait intéressant d'évaluer l'effet de l'inhibiteur Ca074 et de son homologue perméant Ca074-Me sur la stabilité de p27^{Kip1} endogène. Par ailleurs, est-ce que l'inhibition du protéasome par le MG132 entre en synergie avec l'inhibition intracellulaire de la cathepsine B par le Ca074-Me sur la

restauration des niveaux de p27^{Kip1} ? Enfin, comme la dégradation de p27^{Kip1} par la cathepsine B génère majoritairement deux fragments stables, il serait intéressant d'évaluer les rôles possibles de ces fragments dans les cellules. En premier lieu, il serait nécessaire d'identifier ces fragments de digestion par spectrométrie de masse afin d'avoir une idée précise du mécanisme de dégradation de p27Kip1 par la cathepsine B. Par la suite, dans l'optique de déterminer un rôle putatif de ces fragments de digestion au niveau cellulaire, il serait intéressant de cloner des formes étiquetées de ces fragments dans des vecteurs de surexpression stable de type lenti ou rétroviral puis d'analyser leur stabilités respectives par des traitements à la cyclohéximide. Par la suite, il serait pertinent d'analyser la localisation subcellulaire de ces fragments, ce qui pourrait nous aider à déterminer un possible rôle intracellulaire. Quel serait l'effet de la surexpression stable de ces fragments sur la croissance cellulaire ? Nous savons que l'un des deux fragments possède toujours le domaine inhibiteur des CDK's, cependant seraient-ils toujours capables d'inhiber la prolifération ou au contraire pourrait-il favoriser la transformation cellulaire s'ils sont délocalisés ? S'il s'avère que l'un des fragments de p27Kip1 puisse favoriser la transformation cellulaire, il serait intéressant de cloner la forme non clivable de p27Kip1 en vecteur de surexpression stable et d'en évaluer les effets sur les niveaux de transformation cellulaire comparativement à la forme sauvage et clivable de p27^{Kip1}. Enfin, pour conclure, il serait nécessaire de comparer les profils d'expression des fragments de digestion, par immunobuvardage, dans les lignées cancéreuses colorectales comparativement à des échantillons de tumeurs colorectales issues des patients. Ceci permettrait d'y confirmer la présence de ces processus de dégradations par la cathepsine B chez ces patients. D'un point de vue clinique l'émergence de ces fragments de p27^{Kip1} pourrait nous indiquer le stade de progression de la maladie et de ce fait participer à l'élaboration d'outils diagnostiques qui permettraient de mieux déceler et caractériser les cancers colorectaux chez l'humain.

6 ANNEXES

Figure 6.1: Stratégie d'amplification par PCR des deux formes de Cathepsine B et localisation intracellulaire après leur surexpression dans les cellules caco2/15. En B : immunofluorescence dirigée contre l'étiquette HA en rouge. Les noyaux ont été colorés au réactif de DAPI. Sur la photo de gauche le plasmide codant la forme pleine longueur étiquetée a été transfecté dans les cellules caco 2/15, sur la photo de droite est transfecté la forme HA-Ctsb Δ 52.









Figure 6.5.22 : Tableaux des conditions d'utilisation des anticorps en Immunobuvardage et en Immunofluorescence et choix des amorces pour les PCR quantitatives

anticorps	Espèce et isotype	Clône immunogène	type	dilution	origine
mCtsB	lgG Chèvre	Clône NS20 His18-Phe339 P07858	poly	1/500	R&D Cat no AF965
huCtsB	lgG Chèvre	Clône NS20 Arg18-Phe339 P07858	poly	1/500 IF: 1/50	R&D Cat no AF963
p27 ^{Kip1} (C-19)	IgG Lapin	C-term p27kip1 humain	poly	1/1000 IF: 1/100	Santa Cruz Cat : sc-528
p21 ^{Cip1} (N-20)	IgG Lapin	N-term p21cip1 humain	poly	1/1000	Santa Cruz Cat : sc-469
Cycline B1	lgG1 Souris	N/A	mono	1/1000	Santa Cruz Cat : sc-245
р57 ^{кір2} (С-20)	IgG Lapin	C-term p57kip2 humain	poly	1/500	Santa Cruz Cat : sc-1040
LamineB(M-20)	lgG Chèvre	C-term LamB1 souris	poly	1/2000	Santa Cruz Cat : sc-6217
Calpaïne2 (H240)	IgG Lapin	a.a. 61-299 humain	poly	1/200	Santa Cruz Cat : sc- 30064
Etiquette HA(F7)	IgG _{2a} souris	Influenza hemaglutinine	mono	1/1000	Santa Cruz Cat : sc-7392
ERK2 (C-14)	IgG lapin	C-term ERK2 rat	poly	1/1000	Santa Cruz Cat : sc-154
pAKT(S473)	IgG Lapin	Phospho-Ser 473 Souris	poly	1/500	Cell signaling #9271
pERK1/2(Thr202- Tyr204)	IgG Lapin	Phospho Thr202-Tyr204 ERK1/2 Humain	poly	1/1000	Cell signaling #9101

Gène	Amorce sens	Amorce antisens	Numéro d'accession
cts B	5'-GAGCTGGTCAACTATGTCAACA-3'	5'-CCAGGACTGGCACAGGC-3'	NM.147783
ctsB (-2,-3)	5'-CAGCGCTGGGCCGGGCAC-3'	5'-GCTCATGTCCACGTTGTAGAAGT-3'	NM.147782
Rplp0	5'-GCAGCATCTACAACCCTGAAG-3'	5'-CACTGGCAACATTGCGGAC-3'	NM.001002
huPBGD	5'AGCTTGCTCGCATACAGACG-3'	5'-AGCTCCTTGGTAAACAGGCTT-3'	NM.001024382

7 REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres de mon jury de thèse, les Prs Caroline Saucier, Audrey Claing, Jean-Bernard Denault et Nathalie Rivard pour avoir accepté d'évaluer mes travaux.

Je remercie, par ailleurs, tous les membres de l'équipe Rivard : Anne, Séb Mongrain, Marie-Josée, Hugo, Jim, Étienne, Séb Bergeron, « Capt'n »Babao, M-C, Mélanie, Jess, Gene, Amélie, Morgane, Guillaume. Merci pour toutes ces années passées en votre compagnie, je n'oublierai jamais tous ces bons moments. Un merci particulier à Sébastien Cagnol, Sébastien Mongrain, Marie-Josée Langlois et Jim Boulanger pour leur aide et leurs contributions dans ces travaux.

Je tiens à remercier aussi François Boudreau, directeur du programme de Biologie Cellulaire, pour l'aide qu'il m'a apporté tout au long de mon Doctorat.

Un gros Merci à tout le département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire de l'Université de Sherbrooke. Merci à Suzanne, Hèlène, Francine et Lise pour votre aide dans les démarches administratives et pour les commandes de produits.

Une pensée amicale et une «gros» merci pour Roser Bùsca, Gilles Ponzio, Philippe Lenormand et Jacques Pouysségur pour m'avoir fait découvrir ce monde passionnant qu'est la recherche.

Je tiens, ensuite à remercier chaleureusement, les copains Sherbrookois : Fred, Mike, Simon, Sèb, Fabrice, Myriam, Foued, Thomas, André-Jean, Dave, Toon, Sonia, Laëtitia, Dom, Vince, Melissa, Xavier, Pascal, Faïza, Arnaud, Picou Pik, Martin et tous les autres...Merci pour les bonnes «bouffes», les soirées Poker et les sorties. Je n'oublierais jamais les innombrables soirées passées chez les Coloc's. Merci pour tout les mecs ! Une pensée particulière pour ma famille qui m'a accompagné tout au long de cette épreuve. Merci pour tout, pour vos encouragements et votre aide. Merci à mes parents : Jean-Paul et Elisabeth, merci à ma sœur Fanny et à mon frère Nicolas. Je remercie aussi avec tout mon amour mes deux petites filles Morgane et Emma qui partagent ma vie et qui la remplissent de bonheur.

Je remercie aussi Miss «Annegio», penser à toi m'aura beaucoup aider à franchir ces obstacles, merci infiniement pour tout!

Enfin, je tiens à remercier la personne sans laquelle cette aventure n'aurait été possible, ma directrice de recherche Nathalie Rivard. Merci Nathalie pour m'avoir offert l'opportunité de travailler avec toi. J'ai pu apprendre tellement de choses à tes cotés. Je te remercie aussi de m'avoir fait tenir le cap tout au long de ces années. Je me souviens que bien des fois où je n'avais pas le moral, tu m'as toujours redonnée le gout de persévérer. Merci pour tout !

8 REFERENCES

1. Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. Nature reviews Cancer 7, 834-846.

2. Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., and Kholodenko, B.N. (2012). Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. Biochemical Society transactions 40, 139-146.

3. Baici, A., Muntener, K., Willimann, A., and Zwicky, R. (2006). Regulation of human cathepsin B by alternative mRNA splicing: homeostasis, fatal errors and cell death. Biological chemistry 387, 1017-1021.

4. Barault, L., Charon-Barra, C., Jooste, V., de la Vega, M.F., Martin, L., Roignot, P., Rat, P., Bouvier, A.M., Laurent-Puig, P., Faivre, J., et al. (2008a). Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. Cancer research 68, 8541-8546.

5. Barault, L., Veyrie, N., Jooste, V., Lecorre, D., Chapusot, C., Ferraz, J.M., Lievre, A., Cortet, M., Bouvier, A.M., Rat, P., et al. (2008b). Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. International journal of cancer Journal international du cancer 122, 2255-2259.

6. Baumgrass, R., Williamson, M.K., and Price, P.A. (1997). Identification of peptide fragments generated by digestion of bovine and human osteocalcin with the lysosomal proteinases cathepsin B, D, L, H, and S. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 12, 447-455.

7. Beaulieu, J.F., and Quaroni, A. (1991). Clonal analysis of sucraseisomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. The Biochemical journal 280 (Pt 3), 599-608. **8.** Bengsch, F., Buck, A., Gunther, S.C., Seiz, J.R., Tacke, M., Pfeifer, D., von Elverfeldt, D., Sevenich, L., Hillebrand, L.E., Kern, U., et al. (2013). Cell type-dependent pathogenic functions of overexpressed human cathepsin B in murine breast cancer progression. Oncogene.

9. Bergeron, S., Lemieux, E., Durand, V., Cagnol, S., Carrier, J.C., Lussier, J.G., Boucher, M.J., and Rivard, N. (2010). The serine protease inhibitor serpinE2 is a novel target of ERK signaling involved in human colorectal tumorigenesis. Molecular cancer 9, 271.

10. Berquin, I.M., Cao, L., Fong, D., and Sloane, B.F. (1995). Identification of two new exons and multiple transcription start points in the 5'-untranslated region of the human cathepsin-B-encoding gene. Gene 159, 143-149.

11. Besson, A., Dowdy, S.F., and Roberts, J.M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. Developmental cell 14, 159-169.

12. Bishop, J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. Cell 64, 235-248.

13. Blackburn, E.H. (2011). Walking the walk from genes through telomere maintenance to cancer risk. Cancer Prev Res (Phila) 4, 473-475.

14. Bloom, J., and Pagano, M. (2003). Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. Seminars in cancer biology 13, 41-47.

15. Boudreau, F., Lussier, C.R., Mongrain, S., Darsigny, M., Drouin, J.L., Doyon, G., Suh, E.R., Beaulieu, J.F., Rivard, N., and Perreault, N. (2007). Loss of cathepsin L activity promotes claudin-1 overexpression and intestinal neoplasia. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 21, 3853-3865.

16. Boulanger, J., Vezina, A., Mongrain, S., Boudreau, F., Perreault, N., Auclair, B.A., Laine, J., Asselin, C., and Rivard, N. (2005). Cdk2-dependent phosphorylation of homeobox transcription factor CDX2 regulates its nuclear translocation and proteasome-mediated degradation in human intestinal epithelial cells. The Journal of biological chemistry 280, 18095-18107.

17. Bova, G.S., Carter, B.S., Bussemakers, M.J., Emi, M., Fujiwara, Y., Kyprianou, N., Jacobs, S.C., Robinson, J.C., Epstein, J.I., Walsh, P.C., et al. (1993). Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. Cancer research 53, 3869-3873.

18. Brazil, D.P., and Hemmings, B.A. (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. Trends in biochemical sciences 26, 657-664.

19. Buck, M.R., Karustis, D.G., Day, N.A., Honn, K.V., and Sloane, B.F. (1992). Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. The Biochemical journal 282 (Pt 1), 273-278.

20. Campo, E., Munoz, J., Miquel, R., Palacin, A., Cardesa, A., Sloane, B.F., and Emmert-Buck, M.R. (1994). Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. The American journal of pathology 145, 301-309.

21. Cao, L., Taggart, R.T., Berquin, I.M., Moin, K., Fong, D., and Sloane, B.F. (1994). Human gastric adenocarcinoma cathepsin B: isolation and sequencing of full-length cDNAs and polymorphisms of the gene. Gene 139, 163-169.

22. Carey, W.D. (1977). Colon physiology. A review. Cleveland Clinic quarterly 44, 73-81.

23. Cavallo-Medved, D., Dosescu, J., Linebaugh, B.E., Sameni, M., Rudy, D., and Sloane, B.F. (2003). Mutant K-ras regulates cathepsin B localization on the surface of human colorectal carcinoma cells. Neoplasia 5, 507-519.

24. Cavallo-Medved, D., Rudy, D., Blum, G., Bogyo, M., Caglic, D., and Sloane, B.F. (2009). Live-cell imaging demonstrates extracellular matrix degradation in association with active cathepsin B in caveolae of endothelial cells during tube formation. Experimental cell research 315, 1234-1246.

25. Chan, A.T., Baba, Y., Shima, K., Nosho, K., Chung, D.C., Hung, K.E., Mahmood, U., Madden, K., Poss, K., Ranieri, A., et al. (2010). Cathepsin B expression and survival in colon cancer: implications for molecular detection of neoplasia. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the

American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 19, 2777-2785.

26. Chandrasekar, N., Mohanam, S., Gujrati, M., Olivero, W.C., Dinh, D.H., and Rao, J.S. (2003). Downregulation of uPA inhibits migration and PI3k/Akt signaling in glioblastoma cells. Oncogene 22, 392-400.

27. Chapman, H.A., Riese, R.J., and Shi, G.P. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. Annual review of physiology 59, 63-88.

28. Chen, J., Li, Y., Yu, T.S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., and Parada, L.F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. Nature 488, 522-526.

29. Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. Science 303, 1010-1014.

30. Crosnier, C., Stamataki, D., and Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. Nature reviews Genetics 7, 349-359.

31. Dalet-Fumeron, V., Boudjennah, L., and Pagano, M. (1996). Competition between plasminogen and procathepsin B as a probe to demonstrate the in vitro activation of procathepsin B by the tissue plasminogen activator. Archives of biochemistry and biophysics 335, 351-357.

32. Dalet-Fumeron, V., Guinec, N., and Pagano, M. (1993). In vitro activation of pro-cathepsin B by three serine proteinases: leucocyte elastase, cathepsin G, and the urokinase-type plasminogen activator. FEBS letters 332, 251-254.

33. DeClerck, Y.A., Mercurio, A.M., Stack, M.S., Chapman, H.A., Zutter, M.M., Muschel, R.J., Raz, A., Matrisian, L.M., Sloane, B.F., Noel, A., et al. (2004). Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. The American journal of pathology 164, 1131-1139.

34. Deschenes, C., Vezina, A., Beaulieu, J.F., and Rivard, N. (2001). Role of p27(Kip1) in human intestinal cell differentiation. Gastroenterology 120, 423-438.

35. Diaz, V.M., Planaguma, J., Thomson, T.M., Reventos, J., and Paciucci, R. (2002). Tissue plasminogen activator is required for the growth, invasion, and angiogenesis of pancreatic tumor cells. Gastroenterology 122, 806-819.

36. Driessens, G., Beck, B., Caauwe, A., Simons, B.D., and Blanpain, C. (2012). Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. Nature 488, 527-530.

37. Duval, A., and Hamelin, R. (2002). Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers. Annales de genetique 45, 71-75.

38. Eeckhout, Y., and Vaes, G. (1977). Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. The Biochemical journal 166, 21-31.

39. Emmert-Buck, M.R., Roth, M.J., Zhuang, Z., Campo, E., Rozhin, J., Sloane, B.F., Liotta, L.A., and Stetler-Stevenson, W.G. (1994). Increased gelatinase A (MMP-2) and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer samples. The American journal of pathology 145, 1285-1290.

40. Engel, J., Eckel, R., Kerr, J., Schmidt, M., Furstenberger, G., Richter, R., Sauer, H., Senn, H.J., and Holzel, D. (2003). The process of metastasisation for breast cancer. Eur J Cancer 39, 1794-1806.

41. Fang, J.Y., and Richardson, B.C. (2005). The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. The lancet oncology 6, 322-327.

42. Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61, 759-767.

43. Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. International journal of cancer Journal international du cancer 127, 2893-2917.

44. Fero, M.L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C.E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L.H., Broudy, V., Perlmutter, R.M., et al. (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. Cell 85, 733-744.

45. Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nature reviews Cancer 3, 453-458.

46. 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. (2001a). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. Nature cell biology 3, 433-438.

47. Fodde, R., Smits, R., and Clevers, H. (2001b). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. Nature reviews Cancer 1, 55-67.

48. Friberg, S., and Mattson, S. (1997). On the growth rates of human malignant tumors: implications for medical decision making. Journal of surgical oncology 65, 284-297.

49. Frosch, B.A., Berquin, I., Emmert-Buck, M.R., Moin, K., and Sloane, B.F. (1999). Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica 107, 28-37.

50. Fukushima, H., Yamamoto, H., Itoh, F., Horiuchi, S., Min, Y., Iku, S., and Imai, K. (2001). Frequent alterations of the beta-catenin and TCF-4 genes, but not of the APC gene, in colon cancers with high-frequency microsatellite instability. Journal of experimental & clinical cancer research : CR 20, 553-559.

51. Gelb, B.D., Shi, G.P., Chapman, H.A., and Desnick, R.J. (1996). Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. Science 273, 1236-1238.

52. Gera, J.F., Mellinghoff, I.K., Shi, Y., Rettig, M.B., Tran, C., Hsu, J.H., Sawyers, C.L., and Lichtenstein, A.K. (2004). AKT activity determines sensitivity to

mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and cmyc expression. The Journal of biological chemistry 279, 2737-2746.

53. Gopinathan, A., Denicola, G.M., Frese, K.K., Cook, N., Karreth, F.A., Mayerle, J., Lerch, M.M., Reinheckel, T., and Tuveson, D.A. (2012). Cathepsin B promotes the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. Gut 61, 877-884.

54. Goss, K.H., and Groden, J. (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 18, 1967-1979.

55. Gounaris, E., Tung, C.H., Restaino, C., Maehr, R., Kohler, R., Joyce, J.A., Ploegh, H.L., Barrett, T.A., Weissleder, R., and Khazaie, K. (2008). Live imaging of cysteine-cathepsin activity reveals dynamics of focal inflammation, angiogenesis, and polyp growth. PloS one 3, e2916.

56. Grady, W.M. (2004). Genomic instability and colon cancer. Cancer metastasis reviews 23, 11-27.

57. Guanti, G., Resta, N., Simone, C., Cariola, F., Demma, I., Fiorente, P., and Gentile, M. (2000). Involvement of PTEN mutations in the genetic pathways of colorectal cancerogenesis. Human molecular genetics 9, 283-287.

58. Gupta, G.P., and Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. Cell 127, 679-695.

59. Guzinska-Ustymowicz, K. (2006). MMP-9 and cathepsin B expression in tumor budding as an indicator of a more aggressive phenotype of colorectal cancer (CRC). Anticancer research 26, 1589-1594.

60. Hara, T., Kamura, T., Nakayama, K., Oshikawa, K., and Hatakeyama, S. (2001). Degradation of p27(Kip1) at the G(0)-G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. The Journal of biological chemistry 276, 48937-48943.

61. Harris, C.C. (1996). p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. Carcinogenesis 17, 1187-1198.

62. Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. Biochemistry Biokhimiia 62, 1180-1190.

63. Hazen, L.G., Bleeker, F.E., Lauritzen, B., Bahns, S., Song, J., Jonker, A., Van Driel, B.E., Lyon, H., Hansen, U., Kohler, A., et al. (2000). Comparative localization of cathepsin B protein and activity in colorectal cancer. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 48, 1421-1430.

64. He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science 281, 1509-1512.

65. Heldin, C.H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature 390, 465-471.

66. Hendrix, A., Gespach, C., Bracke, M., and De Wever, O. (2011). The tumor ecosystem regulates the roads for invasion and metastasis. Clinics and research in hepatology and gastroenterology 35, 714-719.

67. Hengst, L., and Reed, S.I. (1996). Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. Science 271, 1861-1864.

68. Herman, J.G., Umar, A., Polyak, K., Graff, J.R., Ahuja, N., Issa, J.P., Markowitz, S., Willson, J.K., Hamilton, S.R., Kinzler, K.W., et al. (1998). Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 6870-6875.

69. Hershko, D., Bornstein, G., Ben-Izhak, O., Carrano, A., Pagano, M., Krausz, M.M., and Hershko, A. (2001). Inverse relation between levels of p27(Kip1) and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas. Cancer 91, 1745-1751.

70. Herszenyi, L., Plebani, M., Carraro, P., De Paoli, M., Roveroni, G., Cardin, R., Foschia, F., Tulassay, Z., Naccarato, R., and Farinati, F. (2000). Proteases in gastrointestinal neoplastic diseases. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 291, 171-187.

71. Hirano, A., Emi, M., Tsuneizumi, M., Utada, Y., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Akiyama, F., Sakamoto, G., Haga, S., Kajiwara, T., et al. (2001). Allelic losses of loci at 3p25.1, 8p22, 13q12, 17p13.3, and 22q13 correlate with postoperative recurrence in breast cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 7, 876-882.

72. Hughes, S.J., Glover, T.W., Zhu, X.X., Kuick, R., Thoraval, D., Orringer, M.B., Beer, D.G., and Hanash, S. (1998). A novel amplicon at 8p22-23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 12410-12415.

73. Humphries, A., and Wright, N.A. (2008). Colonic crypt organization and tumorigenesis. Nature reviews Cancer 8, 415-424.

74. Issa, J.P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. Nature reviews Cancer 4, 988-993.

75. Itahana, K., Dimri, G., and Campisi, J. (2001). Regulation of cellular senescence by p53. European journal of biochemistry / FEBS 268, 2784-2791.

76. Kelly, P.N., Dakic, A., Adams, J.M., Nutt, S.L., and Strasser, A. (2007). Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. Science 317, 337.

77. Kim, J., Yu, W., Kovalski, K., and Ossowski, L. (1998). Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. Cell 94, 353-362.

78. Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 87, 159-170.

79. Kirana, C., Shi, H., Laing, E., Hood, K., Miller, R., Bethwaite, P., Keating, J., Jordan, T.W., Hayes, M., and Stubbs, R. (2012). Cathepsin D Expression in Colorectal Cancer: From Proteomic Discovery through Validation Using Western

Blotting, Immunohistochemistry, and Tissue Microarrays. International journal of proteomics 2012, 245819.

80. Klein, C.A. (2008). Cancer. The metastasis cascade. Science 321, 1785-1787.

81. Koblinski, J.E., Ahram, M., and Sloane, B.F. (2000). Unraveling the role of proteases in cancer. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 291, 113-135.

82. Koblinski, J.E., Dosescu, J., Sameni, M., Moin, K., Clark, K., and Sloane, B.F. (2002). Interaction of human breast fibroblasts with collagen I increases secretion of procathepsin B. The Journal of biological chemistry 277, 32220-32227.

83. Kondo, Y., and Issa, J.P. (2004). Epigenetic changes in colorectal cancer. Cancer metastasis reviews 23, 29-39.

84. Kostoulas, G., Lang, A., Nagase, H., and Baici, A. (1999). Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. FEBS letters 455, 286-290.

85. Krasinskas, A.M. (2011). EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. Pathology research international 2011, 932932.

86. Krueger, S., Kalinski, T., Wolf, H., Kellner, U., and Roessner, A. (2005). Interactions between human colon carcinoma cells, fibroblasts and monocytic cells in coculture--regulation of cathepsin B expression and invasiveness. Cancer letters 223, 313-322.

87. Lam, E.W., and La Thangue, N.B. (1994). DP and E2F proteins: coordinating transcription with cell cycle progression. Current opinion in cell biology 6, 859-866.

88. Langlois, M.J., Bergeron, S., Bernatchez, G., Boudreau, F., Saucier, C., Perreault, N., Carrier, J.C., and Rivard, N. (2010). The PTEN phosphatase controls intestinal epithelial cell polarity and barrier function: role in colorectal cancer progression. PloS one 5, e15742.

89. Laurent-Puig, P., Agostini, J., and Maley, K. (2010). [Colorectal oncogenesis]. Bulletin du cancer 97, 1311-1321.

90. Laurent-Puig, P., Beroud, C., and Soussi, T. (1998). APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. Nucleic acids research 26, 269-270.

91. Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Muller, R., and Pouyssegur, J. (1996a). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. The Journal of biological chemistry 271, 20608-20616.

92. Lavoie, J.N., Rivard, N., L'Allemain, G., and Pouyssegur, J. (1996b). A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry. Progress in cell cycle research 2, 49-58.

93. Leach, F.S., Elledge, S.J., Sherr, C.J., Willson, J.K., Markowitz, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. Cancer research 53, 1986-1989.

94. Lefloch, R., Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2008). Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. Molecular and cellular biology 28, 511-527.

95. Lievre, A., Bachet, J.B., Le Corre, D., Boige, V., Landi, B., Emile, J.F., Cote, J.F., Tomasic, G., Penna, C., Ducreux, M., et al. (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer research 66, 3992-3995.

96. Lopez-Otin, C., and Overall, C.M. (2002). Protease degradomics: a new challenge for proteomics. Nature reviews Molecular cell biology 3, 509-519.

97. Luo, M., and Hajjar, K.A. (2013). Annexin A2 System in Human Biology: Cell Surface and Beyond. Seminars in thrombosis and hemostasis.

98. Mach, L., Mort, J.S., and Glossl, J. (1994). Noncovalent complexes between the lysosomal proteinase cathepsin B and its propeptide account for

stable, extracellular, high molecular mass forms of the enzyme. The Journal of biological chemistry 269, 13036-13040.

99. Maciewicz, R.A., Wotton, S.F., Etherington, D.J., and Duance, V.C. (1990). Susceptibility of the cartilage collagens types II, IX and XI to degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B and L. FEBS letters 269, 189-193.

100. Mai, J., Finley, R.L., Jr., Waisman, D.M., and Sloane, B.F. (2000). Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. The Journal of biological chemistry 275, 12806-12812.

101. Massague, J., and Chen, Y.G. (2000). Controlling TGF-beta signaling. Genes & development 14, 627-644.

102. Meunier, C., Cai, J., Fortin, A., Kwan, T., Marquis, J.F., Turbide, C., Van Der Kraak, L., Jothy, S., Beauchemin, N., and Gros, P. (2010). Characterization of a major colon cancer susceptibility locus (Ccs3) on mouse chromosome 3. Oncogene 29, 647-661.

103. Miquel, C., Borrini, F., Grandjouan, S., Auperin, A., Viguier, J., Velasco, V., Duvillard, P., Praz, F., and Sabourin, J.C. (2005). Role of bax mutations in apoptosis in colorectal cancers with microsatellite instability. American journal of clinical pathology 123, 562-570.

104. Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science 275, 1787-1790.

105. Mort, J.S., and Buttle, D.J. (1997). Cathepsin B. The international journal of biochemistry & cell biology 29, 715-720.

106. Mort, J.S., Magny, M.C., and Lee, E.R. (1998). Cathepsin B: an alternative protease for the generation of an aggrecan 'metalloproteinase' cleavage neoepitope. The Biochemical journal 335 (Pt 3), 491-494.

107. Muntener, K., Zwicky, R., Csucs, G., and Baici, A. (2003). The alternative use of exons 2 and 3 in cathepsin B mRNA controls enzyme trafficking and

triggers nuclear fragmentation in human cells. Histochemistry and cell biology 119, 93-101.

108. Nalepa, G., and Wade Harper, J. (2003). Therapeutic anti-cancer targets upstream of the proteasome. Cancer treatment reviews 29 Suppl 1, 49-57.

109. Obaya, A.J., and Sedivy, J.M. (2002). Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. Cellular and molecular life sciences : CMLS 59, 126-142.

110. 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.

111. Olschwang, S., Hamelin, R., Laurent-Puig, P., Thuille, B., De Rycke, Y., Li, Y.J., Muzeau, F., Girodet, J., Salmon, R.J., and Thomas, G. (1997). Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 12122-12127.

112. Page, A.E., Hayman, A.R., Andersson, L.M., Chambers, T.J., and Warburton, M.J. (1993). Degradation of bone matrix proteins by osteoclast cathepsins. The International journal of biochemistry 25, 545-550.

113. Palmqvist, R., Stenling, R., Oberg, A., and Landberg, G. (1999). Prognostic significance of p27(Kip1) expression in colorectal cancer: a clinico-pathological characterization. The Journal of pathology 188, 18-23.

114. Parsons, R., Myeroff, L.L., Liu, B., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1995). Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. Cancer research 55, 5548-5550.

115. Peifer, M. (2002). Developmental biology: colon construction. Nature 420, 274-275, 277.

116. Perreault, N., and Beaulieu, J.F. (1996). Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. Experimental cell research 224, 354-364.

117. Peters, J.M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. Nature reviews Molecular cell biology 7, 644-656.

118. Pineau, P., Nagai, H., Prigent, S., Wei, Y., Gyapay, G., Weissenbach, J., Tiollais, P., Buendia, M.A., and Dejean, A. (1999). Identification of three distinct regions of allelic deletions on the short arm of chromosome 8 in hepatocellular carcinoma. Oncogene 18, 3127-3134.

119. Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. Genes & development 17, 1709-1713.

120. Podgorski, I., Linebaugh, B.E., Sameni, M., Jedeszko, C., Bhagat, S., Cher, M.L., and Sloane, B.F. (2005). Bone microenvironment modulates expression and activity of cathepsin B in prostate cancer. Neoplasia 7, 207-223.

121. Podsypanina, K., Du, Y.C., Jechlinger, M., Beverly, L.J., Hambardzumyan, D., and Varmus, H. (2008). Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. Science 321, 1841-1844.

122. Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature 359, 235-237.

123. Poznic, M. (2009). Retinoblastoma protein: a central processing unit. Journal of biosciences 34, 305-312.

124. Premzl, A., Turk, V., and Kos, J. (2006). Intracellular proteolytic activity of cathepsin B is associated with capillary-like tube formation by endothelial cells in vitro. Journal of cellular biochemistry 97, 1230-1240.

125. Premzl, A., Zavasnik-Bergant, V., Turk, V., and Kos, J. (2003). Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. Experimental cell research 283, 206-214.

126. Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M., and Lopez-Otin, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. Nature reviews Genetics 4, 544-558.

127. Quesada, V., Ordonez, G.R., Sanchez, L.M., Puente, X.S., and Lopez-Otin, C. (2009). The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. Nucleic acids research 37, D239-243.

128. Radisky, E.S., and Radisky, D.C. (2010). Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. Journal of mammary gland biology and neoplasia 15, 201-212.

129. Rao, J.S. (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. Nature reviews Cancer 3, 489-501.

130. Rapisarda, A., and Melillo, G. (2012). Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy. Advances in cancer research 114, 237-267.

131. Reinheckel, T., Deussing, J., Roth, W., and Peters, C. (2001). Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. Biological chemistry 382, 735-741.

132. Reinheckel, T., Peters, C., Kruger, A., Turk, B., and Vasiljeva, O. (2012). Differential Impact of Cysteine Cathepsins on Genetic Mouse Models of De novo Carcinogenesis: Cathepsin B as Emerging Therapeutic Target. Frontiers in pharmacology 3, 133.

133. Reiser, J., Adair, B., and Reinheckel, T. (2010). Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. The Journal of clinical investigation 120, 3421-3431.

134. Resta, S.C. (2009). Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling. The Journal of physiology 587, 4169-4174.

135. Richman, S.D., Seymour, M.T., Chambers, P., Elliott, F., Daly, C.L., Meade, A.M., Taylor, G., Barrett, J.H., and Quirke, P. (2009). KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not

preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 27, 5931-5937.

136. Rivard, N., Boucher, M.J., Asselin, C., and L'Allemain, G. (1999). MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. The American journal of physiology 277, C652-664.

137. Rundhaug, J.E. (2003). Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer: commentary re: A. C. Lockhart et al., Reduction of wound angiogenesis in patients treated with BMS-275291, a broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. Clin. Cancer Res., 9: 00-00, 2003. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 9, 551-554.

138. Schepers, A.G., Snippert, H.J., Stange, D.E., van den Born, M., van Es, J.H., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2012). Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. Science 337, 730-735.

139. Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., and Graham, F.L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 16, 869-871.

140. Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes & development 13, 1501-1512.

141. Sloane, B.F., Moin, K., Sameni, M., Tait, L.R., Rozhin, J., and Ziegler, G. (1994). Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene. Journal of cell science 107 (Pt 2), 373-384.

142. Sordat, B.C., and Tran-Thang, C. (1994). Laminin degradation by human colon carcinoma cells: a role for urinary and tissue plasminogen activators. Invasion & metastasis 14, 223-233.

143. Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. Cancer research 58, 1130-1134.

144. Stern, C.D. (1992). Vertebrate gastrulation. Current opinion in genetics & development 2, 556-561.

145. Takuwa, N., and Takuwa, Y. (1997). Ras activity late in G1 phase required for p27kip1 downregulation, passage through the restriction point, and entry into S phase in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. Molecular and cellular biology 17, 5348-5358.

146. Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nature reviews Cancer 2, 442-454.

147. Thomas, G.V., Szigeti, K., Murphy, M., Draetta, G., Pagano, M., and Loda, M. (1998). Down-regulation of p27 is associated with development of colorectal adenocarcinoma metastases. The American journal of pathology 153, 681-687.

148. Tian, J.Q., and Quaroni, A. (1999). Involvement of p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) in intestinal epithelial cell differentiation. The American journal of physiology 276, C1245-1258.

149. Troeberg, L., and Nagase, H. (2012). Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. Biochimica et biophysica acta 1824, 133-145.

150. Tsai, H.L., Hsieh, J.S., Yu, F.J., Wu, D.C., Chen, F.M., Huang, C.J., Huang, Y.S., Huang, T.J., and Wang, J.Y. (2007). Perforated colonic cancer presenting as intra-abdominal abscess. International journal of colorectal disease 22, 15-19.

151. Tu, C., Ortega-Cava, C.F., Chen, G., Fernandes, N.D., Cavallo-Medved, D., Sloane, B.F., Band, V., and Band, H. (2008). Lysosomal cathepsin B participates in the podosome-mediated extracellular matrix degradation and invasion via secreted lysosomes in v-Src fibroblasts. Cancer research 68, 9147-9156.

152. Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. Nature reviews Drug discovery 5, 785-799.

153. Turk, B., Turk, D., and Turk, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. Biochimica et biophysica acta 1477, 98-111.

154. Turk, B., Turk du, S.A., and Turk, V. (2012). Protease signalling: the cutting edge. The EMBO journal 31, 1630-1643.

155. van der Stappen, J.W., Williams, A.C., Maciewicz, R.A., and Paraskeva, C. (1996). Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D. International journal of cancer Journal international du cancer 67, 547-554.

156. Vasiljeva, O., Korovin, M., Gajda, M., Brodoefel, H., Bojic, L., Kruger, A., Schurigt, U., Sevenich, L., Turk, B., Peters, C., et al. (2008). Reduced tumour cell proliferation and delayed development of high-grade mammary carcinomas in cathepsin B-deficient mice. Oncogene 27, 4191-4199.

157. Victor, B.C., Anbalagan, A., Mohamed, M.M., Sloane, B.F., and Cavallo-Medved, D. (2011). Inhibition of cathepsin B activity attenuates extracellular matrix degradation and inflammatory breast cancer invasion. Breast cancer research : BCR 13, R115.

158. Wagner, J., and Laemmli, U.K. (1976). Studies on the maturation of the head of bacteriophage T4. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences 276, 15-28.

159. Weinberg, R.A. (2008). Mechanisms of malignant progression. Carcinogenesis 29, 1092-1095.

160. Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., et al. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. Nature genetics 38, 787-793.

161. Willstätter R, B.E. (1929). Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukozyten. . Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 180.

162. Worthley, D.L., and Leggett, B.A. (2010). Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists 31, 31-38.

163. Yan, S., Berquin, I.M., Troen, B.R., and Sloane, B.F. (2000). Transcription of human cathepsin B is mediated by Sp1 and Ets family factors in glioma. DNA and cell biology 19, 79-91.

164. Yan, S., Jane, D.T., Dufresne, M.J., and Sloane, B.F. (2003). Transcription of cathepsin B in glioma cells: regulation by an E-box adjacent to the transcription initiation site. Biological chemistry 384, 1421-1427.

165. Yan, S., and Sloane, B.F. (2003). Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. Biological chemistry 384, 845-854.

166. Yang, W., Bancroft, L., Liang, J., Zhuang, M., and Augenlicht, L.H. (2005). p27kip1 in intestinal tumorigenesis and chemoprevention in the mouse. Cancer research 65, 9363-9368.

167. Yaremko, M.L., Wasylyshyn, M.L., Paulus, K.L., Michelassi, F., and Westbrook, C.A. (1994). Deletion mapping reveals two regions of chromosome 8 allele loss in colorectal carcinomas. Genes, chromosomes & cancer 10, 1-6.

168. Yew, P.R. (2001). Ubiquitin-mediated proteolysis of vertebrate G1- and S-phase regulators. Journal of cellular physiology 187, 1-10.

169. Yin, M., Soikkeli, J., Jahkola, T., Virolainen, S., Saksela, O., and Holtta, E. (2012). TGF-beta signaling, activated stromal fibroblasts, and cysteine cathepsins B and L drive the invasive growth of human melanoma cells. The American journal of pathology 181, 2202-2216.

170. Yoo, C.B., and Jones, P.A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. Nature reviews Drug discovery 5, 37-50.

171. Young, B., Heath, J.W., Stevens, A., Lowe, J.S., Wheater, P.R., and Burkitt, H.G. (2000). Wheater's functional histology : a text and colour atlas, 4th edn (Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone).

172. Zwicky, R., Muntener, K., Csucs, G., Goldring, M.B., and Baici, A. (2003). Exploring the role of 5' alternative splicing and of the 3'-untranslated region of cathepsin B mRNA. Biological chemistry 384, 1007-1018.