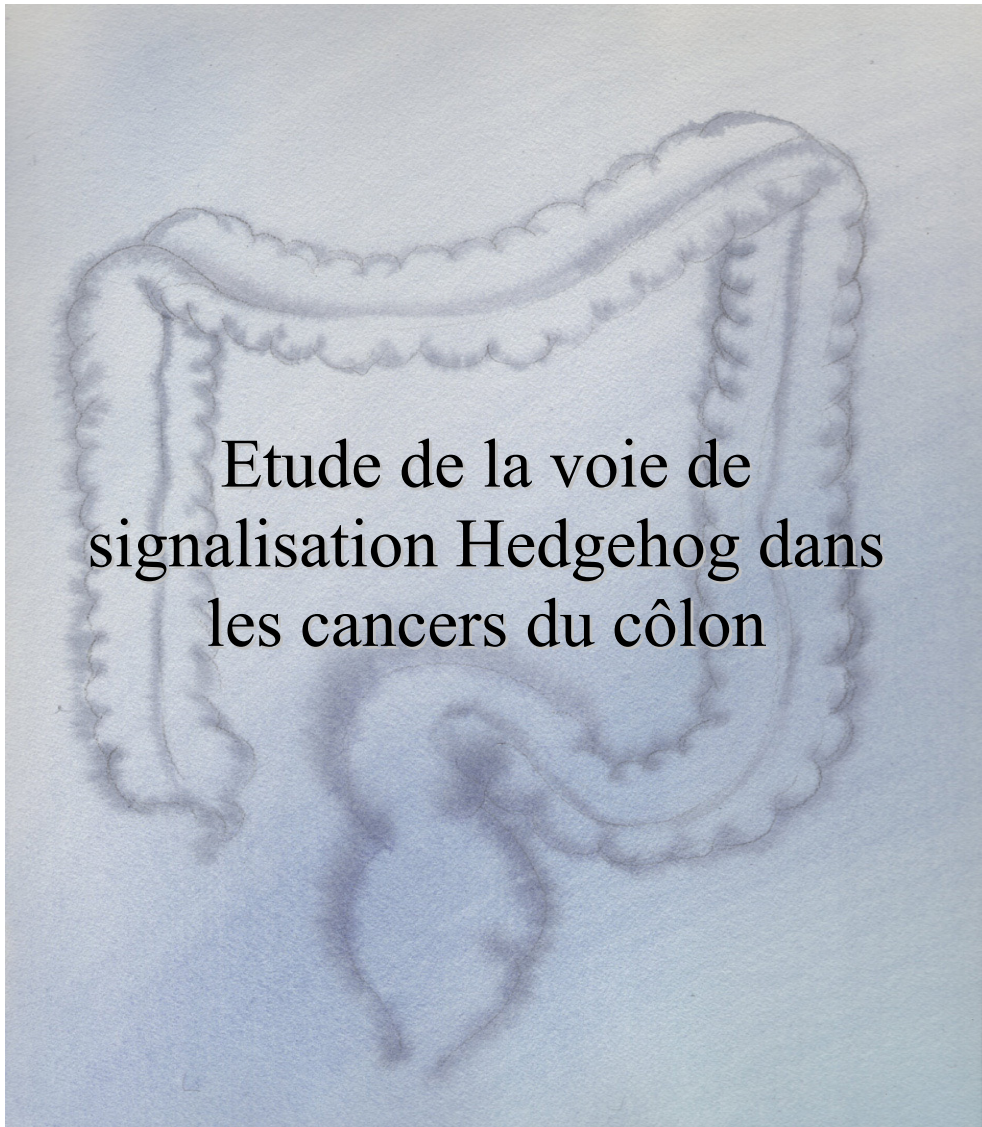




Faculté des Sciences
Laboratoire d'Oncologie Moléculaire
Promoteur : Dr R. Winkler

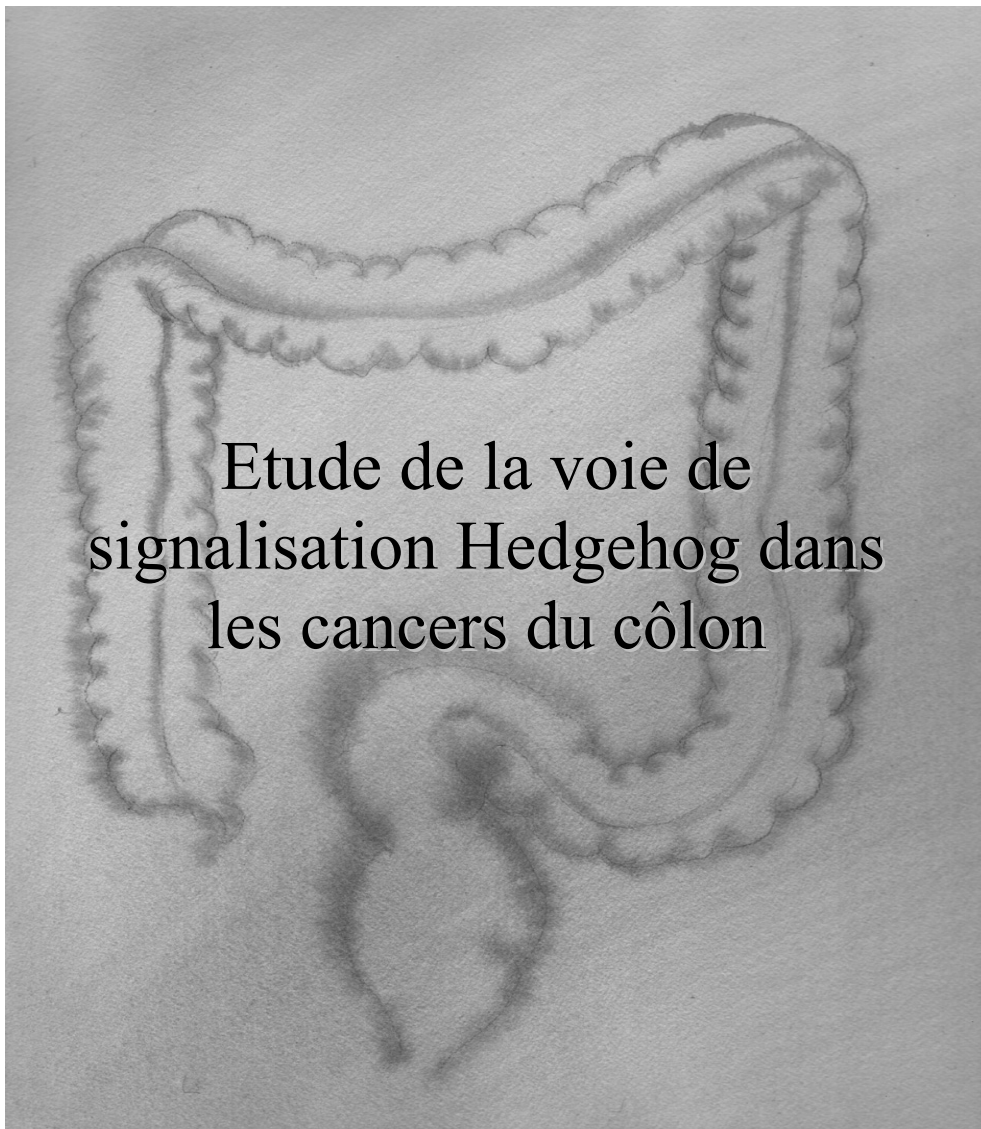


Etude de la voie de signalisation Hedgehog dans les cancers du côlon

Guillaume Chatel
Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences

Année académique 2008-2009

Faculté des Sciences
Laboratoire d'Oncologie Moléculaire
Promoteur : Dr R. Winkler



Guillaume Chatel
Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences

Année académique 2008-2009

Remerciements

Que le chemin fût long, tortueux et semé d'embûches pour arriver à ce manuscrit. J'en retire néanmoins une expérience professionnelle et humaine exceptionnelle. Je tiens donc à remercier les personnes qui m'ont permis de réaliser ce travail et accompagnées tout au long de ce chemin.

Tout d'abord, je remercie le Dr R. Winkler de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et permis d'accomplir cette thèse. Nos premiers contacts se sont faits par *e-mail* et elle m'a immédiatement accordé sa confiance pour faire mes premiers pas au laboratoire. S'en sont suivies plusieurs années côte à côte durant lesquelles nous avons eu l'opportunité de nous connaître, d'échanger nos points de vue (plus ou moins divergents) ou encore de réaliser moult commandes. Je te suis reconnaissant pour tout ce que ces années m'ont apporté. Sans ta main tendue, tout cela ne serait pas arrivé.

Je tiens également à remercier chaleureusement le Pr J. Boniver. Ses interventions dans mon parcours ont été primordiales à l'aboutissement de ce travail. De plus, les nombreuses interactions avec les équipes du premier étage ainsi que les réunions annuelles de Soll Cress m'ont été d'une grande utilité.

Je remercie également les Drs M-P. Defresne et L. de Leval pour l'aide technique fournie au sein de leur laboratoire.

Je remercie les membres de mon comité de doctorat, les Drs B. Nusgens, B. Peers et J. Closset qui ont suivi l'évolution de cette thèse et apporté leurs critiques constructives.

Je profite de cette occasion pour exprimer ma profonde reconnaissance aux Pr P. Doireau, Dr M. Clastre, Pr P. Gantet et Pr J. Memelink. Ils ont façonné ma vision de la recherche, m'ont permis de réaliser tout ce chemin et surtout, toujours encouragé à aller au bout de ce travail.

Lors de mon arrivée au laboratoire, celui-ci était constitué de 3 mousquetaires. Leurs capacité et volonté d'aller au bout de leur thèse m'ont, sans aucun doute, montré la voie à suivre. Merci Douglas pour ces moments passés ensemble dans et en dehors du laboratoire. J'ai toujours apprécié nos discussions et j'ai toujours été admiratif de ta rigueur scientifique. Merci Laurence pour ta présence et nos nombreux échanges scientifiques. Cela a toujours été un réel bonheur d'être à tes côtés au labo mais aussi à l'occasion des pauses et autres activités « extra-labo ». Nous avons probablement passé plus de temps à nous poser des questions sur nos travaux respectifs qu'à trouver des réponses mais cela s'est toujours déroulé dans la bonne humeur. Merci Dominique pour ses années passées ensemble. J'ai vraiment apprécié ton professionnalisme et ton sens de l'organisation durant le temps où nous nous sommes côtoyés. Ces qualités ont été bénéfiques à chacun d'entre nous au labo.

J'ai également une pensée particulière pour Naima. Bien que travaillant dans un autre labo, elle a toujours fait partie du labo à mes yeux. Naima, cela a toujours été un plaisir de converser avec toi et de partager nos déracinements.

Au cours de ce travail, il m'a été offert d'encadrer 4 étudiants dans la réalisation de leur travail de fin d'année. Chacun d'entre eux m'a apporté une aide précieuse. Leur implication dans leur travail a toujours été totale et à la hauteur de mes attentes. Cette expérience de supervision m'a été d'un grand bénéfice. Je vous remercie donc Caroline, Olivier, Corinne et Alexandra d'avoir partagé un bout de chemin avec moi. Je tiens à remercier plus particulièrement Corinne pour son professionnalisme, sa patience et son écoute qui m'ont été plus que bénéfiques.

Le laboratoire d'Oncologie Moléculaire s'est enrichi, les années passant, de nouveaux doctorants, Jean-Christophe, Grégory et Benjamin. Merci à tous les 3 pour les bons moments passés ensemble. Durant mon exil hollandais ou durant les derniers mois de rédaction, votre présence a été des plus agréables.

Au cours des 6 années passées au CHU, mes nombreux allers-retours d'un laboratoire à l'autre, m'ont permis de rencontrer une multitude de personnes. Ce fut toujours plaisant de partager quelques mots au coin d'un couloir ou lors d'un repas. Il m'est impossible de dresser une liste exhaustive de toutes ces personnes mais je les remercie de leur compagnie au cours de ces années.

J'ai une pensée particulière pour Hayet, Thibaut et l'équipe de santé publique (Vanessa, Pierre-René, Véronique, Maryline, Nathalie, Analisa, Fred, Olivier B, Olivier E, Florent, Anita, Annick) avec qui j'ai passé de très bons moments au CHU.

Je remercie ma famille pour son soutien mais surtout d'être toujours restée unie dans les épreuves et la distance qui nous sépare. Mes escapades aux 4 coins de France et de l'île de La Réunion m'ont été d'un grand bénéfice tout au long de ces années.

Je remercie les personnes qui ont eu la patience de relire ce manuscrit et qui se reconnaîtront.

Enfin, comment puis-je finir sans remercier la seule et unique personne qui m'a amené jusqu'ici : Annick. C'est un réel bonheur de vivre à tes côtés au quotidien et d'avoir avec nous maintenant, Elise et... Ces années de thèse constitueront une étape importante pour nous mais je pense que c'est surtout le début d'une longue aventure.

Ce doctorat a pu se matérialiser grâce au soutien financier du FNRS (FRIA, Televie) et du fonds Léon Fredericq.

Dessin de couverture : Caroline Vanden Driessche

Table des Matières

Remerciements	ii
Table des Matières	iv
Liste des abréviations	vii
Introduction	1

I. GÉNÉRALITÉS SUR LES CANCERS.....	1
II. LES CANCERS DU CÔLON.....	3
A- LES DIFFÉRENTS TYPES DE CANCERS DU CÔLON	3
B- INSTABILITÉ GÉNOMIQUE ET MÉTHYLATION DE L'ADN DANS LES CANCERS DU COLÔN..	4
C- LA SÉQUENCE ADÉNOME-CARCINOME DANS LES CANCERS DU CÔLON.....	5
III. STRUCTURE DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL.....	7
IV. VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE DANS LE COLÔN.....	8
A- LA VOIE DE SIGNALISATION WNT	8
1- Description de la voie WNT	9
2- La voie WNT dans le côlon adulte	10
3- La voie WNT dans les cancers du côlon	11
B- LA VOIE DE SIGNALISATION TGF- β	12
1- Description de la voie TGF- β	13
2- La voie TGF- β dans le côlon	14
3- La voie TGF- β dans les cancers du côlon.....	14
C- LA VOIE DE SIGNALISATION HH	15
1- Description de la voie HH	16
a- La voie HH chez la drosophile	17
b- Fonctionnement de la voie HH chez les mammifères	19
<i>Les ligands HH.....</i>	<i>20</i>
<i>PTCH et SMO : réception du signal HH à la membrane.....</i>	<i>21</i>
<i>Transduction du signal par SMO, point de divergence entre drosophile et mammifères.....</i>	<i>23</i>
<i>COS2 n'est pas indispensable</i>	<i>23</i>
<i>Importance du cilium primaire dans la transduction du signal</i>	<i>23</i>
<i>Rôle accru de SUFU chez les mammifères.....</i>	<i>24</i>
<i>Les facteurs de transcription GLI et ZIC</i>	<i>24</i>
<i>GLI2 et GLI3</i>	<i>25</i>
<i>GLII.....</i>	<i>26</i>
<i>ZIC.....</i>	<i>27</i>
<i>Gènes cibles de la voie HH</i>	<i>27</i>

2-	La voie HH dans les intestins	28
3-	La voie HH dans les cancers.....	29
a-	Les cancers de type I	30
b-	Les cancers de type II.....	31
c-	Rôle de la voie HH dans le développement des cancers	31
d-	Les inhibiteurs de la voie HH.....	32
D-	INTERACTIONS CROISÉES DES VOIES DE SIGNALISATION WNT, TGF- β ET HH	33

But du travail.....	35
---------------------	----

Résultats	36
-----------------	----

I. ETUDE DE L'EXPRESSION DES MEMBRES DE LA VOIE DE SIGNALISATION HH DANS LES CANCERS DU CÔLON..... 36

A-	LES LIGNÉES CELLULAIRES	36
1-	Le ligand HH	36
2-	PTCH et SMO.....	39
3-	Les facteurs de transcription GLI	39
a-	GLI1.....	39
b-	GLI2	40
c-	GLI3.....	40
d-	Activité des facteurs de transcription GLI	42
4-	Régulateurs négatifs de la voie HH	43
a-	SUFU	43
b-	HHIP.....	44
c-	Les facteurs de transcription ZIC	45
B-	LES TUMEURS PRIMAIRES	45
C-	CONCLUSION	47

II. EFFET DE LA CYCLOPAMINE SUR LES LIGNÉES DE CANCERS DU CÔLON .49

A-	LES CELLULES CONTRÔLES PANC1	49
B-	LES LIGNÉES DE CANCERS DU CÔLON.....	50
C-	TEST DE SURVIE CELLULAIRE	51
D-	CONCLUSION	53

III. EFFET DE LA SUREXPRESSION DE GLI1 DANS LA LIGNÉE DE CANCER DE CÔLON HCT116..... 54

A-	GÈNES CIBLES DE GLI1 DANS LA LIGNEE HCT116.....	54
1-	Génération de lignées exprimant stablement GLI1	54
2-	<i>BMP4</i> : gène cible de GLI1 dans les cellules HCT116	55
B-	ACTIVITÉ PHOSPHATASE ALCALINE	57
C-	CONCLUSION	60

Discussion et perspectives.....	61
---------------------------------	----

Matériel et méthodes	68
----------------------------	----

I.	MATÉRIEL	68
A-	LIGNÉES CELLULAIRES	68
B-	TUMEURS PRIMAIRES	68
C-	PLASMIDES	69
II.	MÉTHODES	69
A-	RT-PCR SUR LES ARNm EXTRAITS DES LIGNÉES CELLULAIRES ET TUMEURS PRIMAIRES	69
B-	<i>WESTERN BLOT</i>	70
C-	TEST DE VIABILITÉ CELLULAIRE	71
D-	GÉNÉRATION DE LIGNÉES HCT116 SUREXPRESSANT STABLEMENT GLI1	71
E-	<i>MICROARRAY</i>	71
F-	PHOSPHATASE ALCALINE.....	72
 Bibliographie.....		 73
 Publications personnelles		 90
 Annexes.....		 91

Liste des abréviations

aa	acides aminés
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALK	<i>Activin receptor-like kinase</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
β -TRCP	<i>Beta-transducin repeat-containing protein</i>
BCC	Carcinomes à cellules basales
BCL2	<i>B-cell leukemia 2</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
CDO/BOC	<i>Cell adhesion molecule-related downregulated by oncogenes/Brother of CDO</i>
Ci	<i>Cubitus interruptus</i>
CIMP	Phénotype de méthylateur d'îlots CpG
CIN	Instabilité chromosomique
CK8	<i>Cytokeratin 8</i>
CKI	<i>Casein kinase I</i>
COS2	<i>Costal2</i>
CSC	Cellules souches cancéreuses
C-terminal	Carboxy-terminal
DHH	<i>Desert hedgehog</i>
DISP/DISP1	<i>Dispatched</i> (Drosophile/Humain)
DKK1	<i>Dickkopf</i>
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
FAP	Polypose adénomateuse familiale
FRZB	<i>Frizzled</i>
FU	<i>Fused</i>
GATA2	<i>GATA-binding protein 2</i>
GLI1	<i>Glioma-associated oncogene homolog</i>
GLI2-3	<i>GLI-kruppel family member 2-3</i>
GRK2	<i>G protein-dependant receptor kinase 2</i>
GSK3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3-beta</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HH	<i>Hedgehog</i>
HHIP	<i>Hedgehog-interacting protein</i>
HNPCC	Cancer colorectal héréditaire sans polypose
HPE	Holoproencéphalie
ID3	<i>Inhibitor of DNA-binding 3</i>
IFT	<i>Intraflagellar transport</i>
IGF2	<i>Insulin-like growth factor 2</i>
IHH	<i>Indian hedgehog</i>
JPS	Syndrome de polypose juvénile
kDa	kilo Dalton
KIF	<i>Kinesin family member</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>

Liste des abréviations

LRP	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 5</i>
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
MSH2	<i>MutS homolog 2</i>
MSI	Instabilité des microsatellites
MTT	Bromure de 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) - 2,5 diphényl tétrazolium
N-terminal	Amino-terminal
p53	protéine p53
pb	paire de base
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PTC/PTCH	<i>Patched</i> (Drosophile/Humain)
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne après rétrotranscription
SAP18	<i>Sin3-associated polypeptide 18KD</i>
SCF	<i>Skp cullin F-box</i>
SCLC	Cancer du poumon à petites cellules
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SLIMB	<i>Supernumerary limbs</i>
SMAD	<i>SMA and MAD-related protein 4</i>
SMO	<i>Smoothened</i>
SU(FU)/SUFU	<i>Suppressor of fused</i> (Drosophile/Humain)
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TCF/LEF	<i>T-cell factor/Lymphoid enhancer factor</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
WHO	Organisation mondiale de la santé
WNT	<i>Wingless-type MMTV integration site family member</i>
ZIC	<i>Zinc finger protein of cerebellum</i>

Introduction

Actuellement, dans le monde, environ six millions de personnes décèdent des suites d'un cancer tous les ans (WHO). La lutte contre le cancer est devenue lors de ces dernières décennies un enjeu majeur en termes de santé publique. La recherche s'organise autour de trois questions qui sont étroitement liées : Quelles sont les causes du cancer ? Quels mécanismes moléculaires interviennent dans la tumorigenèse ? Quelles thérapies utiliser chez les personnes atteintes de cancers ?

I. Généralités sur les cancers

Du point de vue cellulaire, le cancer se définit comme une pathologie ayant pour origine des altérations génétiques de cellules somatiques qui entraînent des modifications physiologiques de celles-ci. Ces modifications conduisent à la formation de cellules cancéreuses dont l'une des caractéristiques est de proliférer de façon incontrôlée.

On distingue 2 catégories de gènes ciblés par des altérations génétiques dans les cancers : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes sont les gènes qui, une fois modifiés, vont coder pour des protéines favorisant le développement de la tumeur. A l'inverse, les gènes suppresseurs de tumeur sont nécessaires au fonctionnement normal d'une cellule. L'expression ou le produit de ceux-ci sont perdus ou altérés suite à des mutations dans les cellules cancéreuses. Le nombre de mutations nécessaire au développement d'un cancer reste inconnu. D'après une estimation de Loeb L., ce nombre serait au minimum de trois (Loeb, 1991). De plus, selon ce même auteur, ces mutations doivent être favorisées par un phénotype « mutateur ». En effet, dans une cellule saine, le rythme normal de mutation ne permettrait pas l'accumulation d'un nombre suffisant de mutations nécessaires à la tumorigenèse ; d'autant plus que les cellules, dans lesquelles une mutation apparaît, disposent de systèmes de réparation de l'ADN. En outre, les cellules porteuses de mutations sont éliminées par apoptose (mort cellulaire programmée). Le phénotype « mutateur » définit donc un état cellulaire favorable à l'accumulation de

mutations, ce qui entraîne le développement de tumeurs dans une proportion supérieure à celle qui pourrait être attendue avec une fréquence de mutation normale.

La tumorigenèse, mécanisme permettant la formation de cellules cancéreuses à partir de cellules somatiques, est un processus à étapes. Dans certains types de cancers comme les cancers du côlon, les étapes sont visibles d'un point de vue anatomo-pathologique. De la même façon, les altérations génétiques vont avoir pour conséquence de modifier la physiologie des cellules par étapes et non en une seule fois. En adéquation avec cette idée, Hanahan et Weinberg ont proposé que la formation d'une tumeur nécessite l'acquisition de 6 propriétés cellulaires (Fig.1) (Hanahan and Weinberg, 2000) : 1- *Autosuffisance en signaux de croissance*. La tumeur produit elle-même des signaux de croissance afin de ne pas dépendre totalement de son microenvironnement de ce point de vue 2- *Insensibilité aux signaux inhibant la croissance*. La prolifération des cellules est contrôlée au niveau du cycle cellulaire. Il existe des signaux qui bloquent le cycle cellulaire. Les cellules tumorales doivent échapper à ces signaux afin de proliférer 3- *Potentiel réplcatif illimité*. Bien qu'étant dotées de capacités réplcatives élevées, les cellules finissent toujours par arrêter de se multiplier par un mécanisme appelé sénescence. Celui-ci semble être en partie dépendant de l'érosion des télomères qui progresse au fur et à mesure des cycles de divisions. Une des caractéristiques des cellules tumorales est de limiter l'érosion des télomères et d'échapper ainsi aux mécanismes de sénescence. Cela permet aux cellules tumorales d'avoir la capacité de proliférer indéfiniment. 4- *Echappement à l'apoptose*. Parallèlement à la prolifération, l'inhibition de l'apoptose contribue également à l'expansion d'une population cellulaire. Les tumeurs doivent devenir insensibles aux signaux initiant ce mécanisme 5- *Induction de l'angiogenèse*. Les cellules nécessitent un apport en oxygène et en nutriments afin de survivre. Cet apport se fait par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins. Lorsque la tumeur devient volumineuse, elle nécessite une irrigation plus importante. Elle doit être capable d'initier la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par un mécanisme appelé angiogenèse. 6- *Invasion des tissus et métastases*. Durant le développement de la plupart des tumeurs, des cellules vont se détacher de la tumeur et être à l'origine de la formation de tumeurs dans d'autres organes. C'est cette dernière étape qui est souvent fatale au patient. Hanahan et Weinberg proposent que ces 6 propriétés soient communes à la plupart, voire à la totalité des tumeurs.

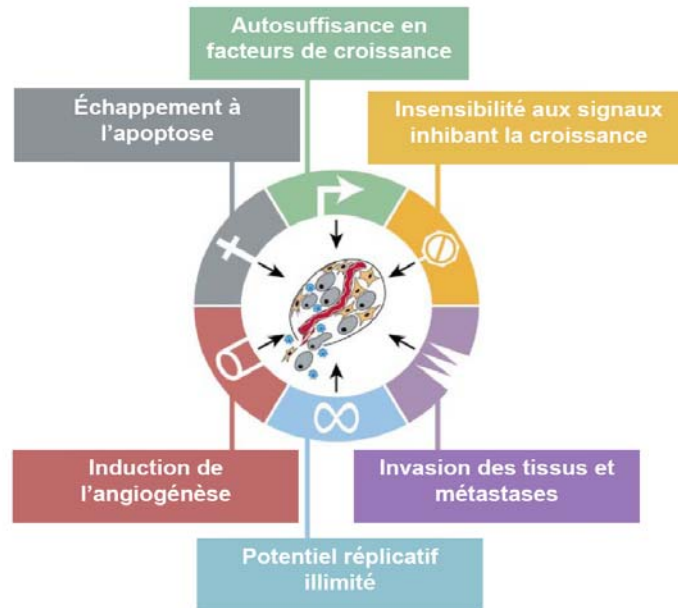


Figure 1 Modifications acquises au cours de la tumorigenèse selon Hanahan et Weinberg (2000). Selon cette théorie les cellules doivent accumuler 6 modifications, quel que soit le moyen, pour former un cancer. Ceci serait valable pour la plupart, voire tous les cancers.

II. Les cancers du côlon

Le cancer du côlon est le 3^{ème} type de cancer le plus répandu dans le monde avec 945.000 cas et 492.000 décès par an (WHO). L'incidence de ces cancers est largement plus élevée dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (Weitz *et al.*, 2005). Parmi les facteurs de risque, l'alimentation et la prédisposition génétique sont les plus importants (Fabre *et al.*, 2000).

A- Les différents types de cancers du côlon

Dans 5-10% des cas, les cancers du côlon sont d'origine héréditaire (Fig.2). Les principaux syndromes de prédisposition aux cancers du côlon sont la polypose adénomateuse familiale (FAP), le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC) et le syndrome de polypose juvénile (JPS) (Weitz *et al.*, 2005). Le premier est dû à des mutations du gène suppresseur de tumeur *adenomatous polyposis coli (APC)* conduisant à une inactivation du produit du gène. Dans le deuxième cas, ce sont les mutations de gènes de réparation de l'ADN

(*MSH2*, *MLH1*) qui sont impliquées (Lynch and Lynch, 1998). Pour les JPS, des mutations de *SMAD4* ont été mises en évidence dans un tiers des cas (Howe *et al.*, 1998).

Certains cancers du côlon se développent suite à des maladies inflammatoires telles que la colite ulcéreuse ou la maladie de Crohn. Toutefois, ces cas ne concernent qu'1 à 2% des cancers du côlon (Weitz *et al.*, 2005).

Les cancers du côlon sont donc sporadiques dans 88-94% des cas. Cependant, il est important de souligner que dans certains cas, le fait d'avoir un membre de sa famille déjà atteint augmente le risque de développer la maladie. Cela semble indiquer qu'une origine génétique puisse exister. Ces cas sont évalués à 20% au minimum des cas de cancers sporadiques (Weitz *et al.*, 2005).

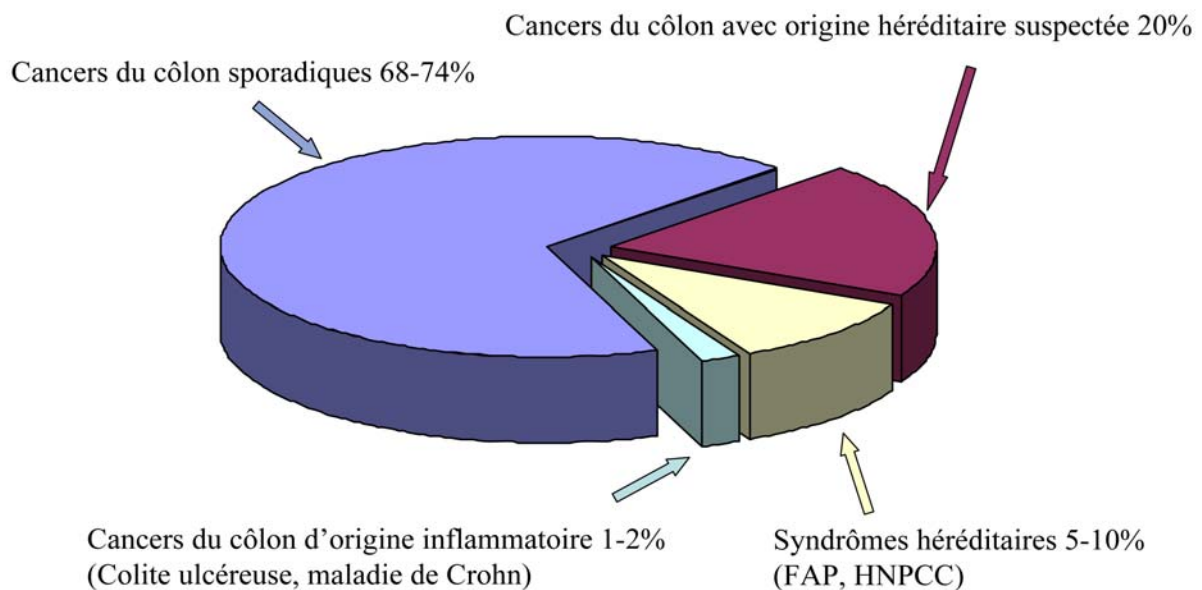


Figure 2 Répartition des différents types de cancers du côlon.

B- Instabilité génomique et méthylation de l'ADN dans les cancers du côlon

Comme expliqué précédemment, l'accumulation de mutations n'est possible que dans les cellules ayant un phénotype « mutateur » (Loeb, 1991). Dans les cancers du côlon, il existe principalement 2 types d'instabilité génomique associés à ce phénotype : l'instabilité chromosomique (CIN) et l'instabilité des microsatellites (MSI) (Worthley *et al.*, 2007). Les CIN représentent la majorité des cas de cancers du côlon avec 70-85% des cas tandis que les

MSI se retrouvent dans 20% des cas. De nouveau, les formes héréditaires de cancers du côlon ont été instructives puisque les HNPCC se caractérisent par des mutations des gènes de réparation de l'ADN, *MSH2* et *MLH1* (Li, 2008). Les conséquences sont l'accumulation d'erreurs et donc de mutations dans les séquences génomiques, notamment dans les séquences microsatellites d'où le nom de MSI.

A cette instabilité génomique vont s'ajouter des anomalies de méthylation de l'ADN. Cette modification épigénétique est fréquente dans les cancers du côlon. Certaines tumeurs du côlon présentent des hyperméthylations des cytosines des dinucléotides CpG, notamment dans les îlots riches en CpG situés dans les régions régulatrices des gènes. Ces tumeurs sont appelées CIMP (CpG Island methylator phenotype) (Toyota *et al.*, 1999). Selon les études, 24 à 50% des cancers sporadiques du côlon sont CIMP+ (Worthley *et al.*, 2007). Ces méthylations, en modifiant l'expression de gènes, sont également impliquées dans la tumorigenèse colorectale. Il a notamment été montré récemment que la majorité des cancers sporadiques du côlon MSI+ était associée à des méthylations du promoteur du gène *MLH1* (Weisenberger *et al.*, 2006). La méthylation aberrante est donc également favorable à la mise en place du phénotype « mutateur » dans les cancers du côlon.

C- La séquence adénome-carcinome dans les cancers du côlon

L'étude des formes héréditaires de cancers du côlon a permis de mieux comprendre les mécanismes responsables du développement des cancers colorectaux sporadiques. En effet, il a été mis en évidence que les FAP sont dues à des mutations du gène *APC*. Celui-ci a été cloné et séquencé en 1991 (Grodin *et al.*, 1991, Kinzler *et al.*, 1991). Depuis, il a été montré qu'*APC* était muté dans une majorité des cancers sporadiques (Nagase and Nakamura, 1993). Le produit du gène *APC* est impliqué dans la voie de signalisation WNT. Il est intéressant de constater que dans les tumeurs où *APC* n'est pas muté, d'autres gènes codant des membres de la voie WNT présentent des mutations. C'est le cas des gènes codant pour la β -caténine ou l'*AXIN2* (Liu *et al.*, 2000, Morin *et al.*, 1997). L'altération de la voie de signalisation WNT est indispensable à la tumorigenèse colorectale mais cette altération génétique n'est pas la seule à y être impliquée. L'équipe de Vogelstein a identifié au moins 3 autres gènes qui sont la cible de mutations dans les cancers du côlon : *KRAS*, *SMAD4* et *p53* (Vogelstein *et al.*, 1988).

La bonne connaissance de l'évolution phénotypique des cancers du côlon a conduit l'équipe de Vogelstein à proposer un modèle de développement des cancers du côlon qui allie modifications génétiques et phénotype (Fig.3). Ce modèle, bien que très simplifié, a été le premier à illustrer la nécessité d'accumuler un certain nombre d'altérations génétiques lors de la progression tumorale (Fearon and Vogelstein, 1990).

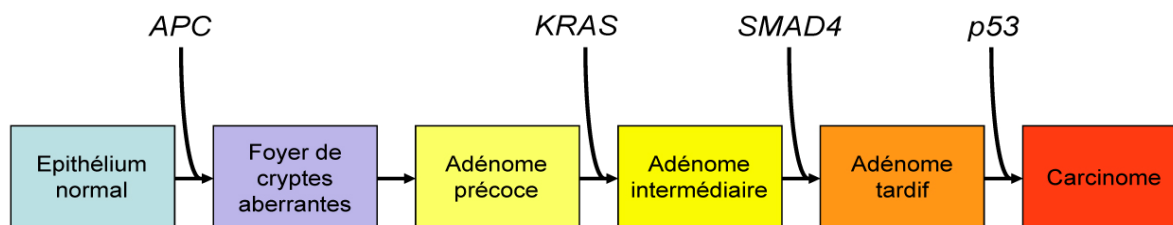


Figure 3 Modèle de tumorigenèse colorectale selon Fearon et Vogelstein (1990) appelé aussi séquence adénome-carcinome.

A partir de l'épithélium vont se former des foyers de cryptes aberrantes. Certaines d'entre elles évolueront vers des adénomes et enfin des carcinomes. Le passage vers chaque stade est associé à des modifications génétiques, les mutations d'*APC* étant impliquées dans l'initiation de la tumorigenèse.

Les cancers du côlon se développent à partir de l'épithélium, dans un premier temps par formation de foyers de cryptes aberrantes. A partir de ces foyers, il peut y avoir développement d'un adénome puis enfin d'un carcinome. Durant ces différentes étapes, il y a accumulation de mutations au niveau des gènes *APC*, *KRAS*, *SMAD4* et *p53* (Fig.3). L'ordre d'apparition des mutations est fonction de la fréquence des mutations lors des différents stades de la tumorigenèse. Si l'on prend l'exemple de *p53*, celui-ci est muté dans 11-13% des adénomes précoces, 47% des adénomes tardifs et 74% des carcinomes (Vogelstein *et al.*, 1988). L'accumulation de ce type d'altération intervient donc majoritairement avant la formation des adénomes tardifs, ce qui place la mutation de *p53* au niveau des adénomes tardifs dans la séquence adénome-carcinome (Fig.3). Cependant, dans certaines tumeurs, cette mutation peut survenir avant ou après ce stade. L'ordre dans lequel ces mutations apparaissent n'est donc pas le même pour toutes les tumeurs. De plus, toutes ces mutations ne sont pas forcément retrouvées dans une même tumeur (Smith *et al.*, 2002). Le modèle proposé par Vogelstein n'illustre pas cette complexité d'autant qu'il apparaît de plus en plus évident que d'autres voies de signalisation interviennent dans la tumorigenèse du côlon.

III. Structure de l'épithélium intestinal

Dans tout organe, la fonction d'une cellule, la communication entre cellules ou encore l'agencement des cellules sont contrôlés par des voies de signalisation bien précises. Ce sont ces mêmes voies qui sont également altérées dans les cancers. Avant de présenter les voies de signalisation importantes dans l'homéostasie du côlon, il est important d'introduire la structure du côlon sain chez l'adulte et notamment de l'épithélium à partir duquel se développent les tumeurs.

Le côlon, comme tous les organes du tractus gastro-intestinal, est formé de 4 couches concentriques. En partant de l'extérieur vers l'intérieur, se trouvent une couche externe (séreuse), une couche constituée de muscles lisses innervés (musculeuse), une couche intermédiaire (sous-muqueuse) où se trouve le tissu stromal et enfin la couche interne (muqueuse) qui est composée de l'épithélium et de muqueuse. La surface du côlon est plate, formée uniquement de cryptes et non de villosités comme dans l'intestin grêle (Fig.4).

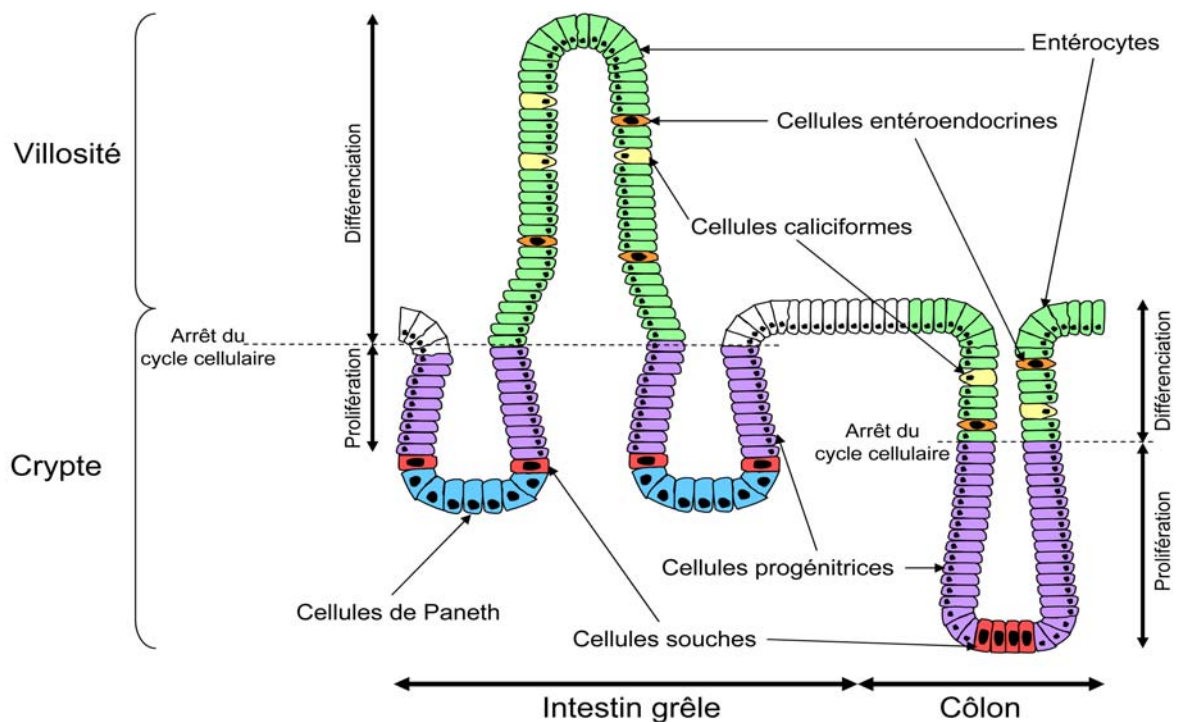


Figure 4 Structure de l'épithélium intestinal (Adaptée de Sancho *et al.*, 2004).

L'intestin grêle et le côlon présentent un épithélium polarisé avec des cellules prolifératives localisées à la base des cryptes. Au fur et à mesure que les cellules migrent vers la partie apicale, elles se différencient pour former les entérocytes et les cellules sécrétrices (cellules caliciformes, cellules entéroendocrines). L'intestin grêle se caractérise par sa structure en villosités et la présence de cellules de Paneth. Le côlon présente une surface plane et les cellules de Paneth sont absentes.

L'épithélium, garant de la fonction intestinale, est constitué de 2 types de cellules : les cellules sécrétrices et les entérocytes. Parmi les cellules sécrétrices se retrouvent les cellules de Goblet, les cellules de Paneth (uniquement dans l'intestin grêle) ainsi que les cellules entéroendocrines. Ces cellules sécrètent respectivement du mucus, des substances bactéricides et des hormones. Les entérocytes sont, quant à eux, impliqués dans l'absorption des nutriments. Que ce soit dans l'intestin grêle ou le côlon, le renouvellement des cellules en surface est rapide, de l'ordre de 5 jours. Les systèmes de production et de différenciation des cellules sont les mêmes dans les 2 organes. Des cellules souches situées à la base des cryptes fournissent par divisions les cellules progénitrices pouvant donner naissance aux différents types cellulaires de l'épithélium. La prolifération et la différenciation des cellules se font le long de la crypte, les cellules prolifératives se trouvant à la base et les cellules différenciées au sommet des cryptes.

IV. Voies de signalisation cellulaire dans le côlon

Les voies de signalisation impliquées dans le côlon, que ce soit dans son fonctionnement normal ou lors de la tumorigenèse colorectale, sont les voies WNT, TGF- β , NOTCH, HH ainsi que les voies des Récepteurs Tyrosine Kinase impliquant les Eph/Ephrin ou KRAS. La voie de signalisation HH (Hedgehog) sera présentée en détail, celle-ci étant l'objet de cette étude. Durant la progression de notre travail, des interactions croisées de la voie HH avec les voies WNT et TGF- β ont été mises en évidence. Ces 2 voies de signalisation seront donc également décrites.

A- La voie de signalisation WNT

La voie WNT est, dans l'état actuel des connaissances, la voie de signalisation la plus importante dans le côlon. Elle est impliquée dans le développement de cet organe, son homéostasie mais aussi et surtout dans le développement de la majorité, voire de tous les cancers du côlon.

1- Description de la voie WNT

La voie de signalisation WNT dite canonique est la voie principale de transduction du signal WNT (Fig.5). Il existe également une voie WNT dite non-canonique mais qui est moins connue et peu décrite dans le côlon (Gregorieff and Clevers, 2005).

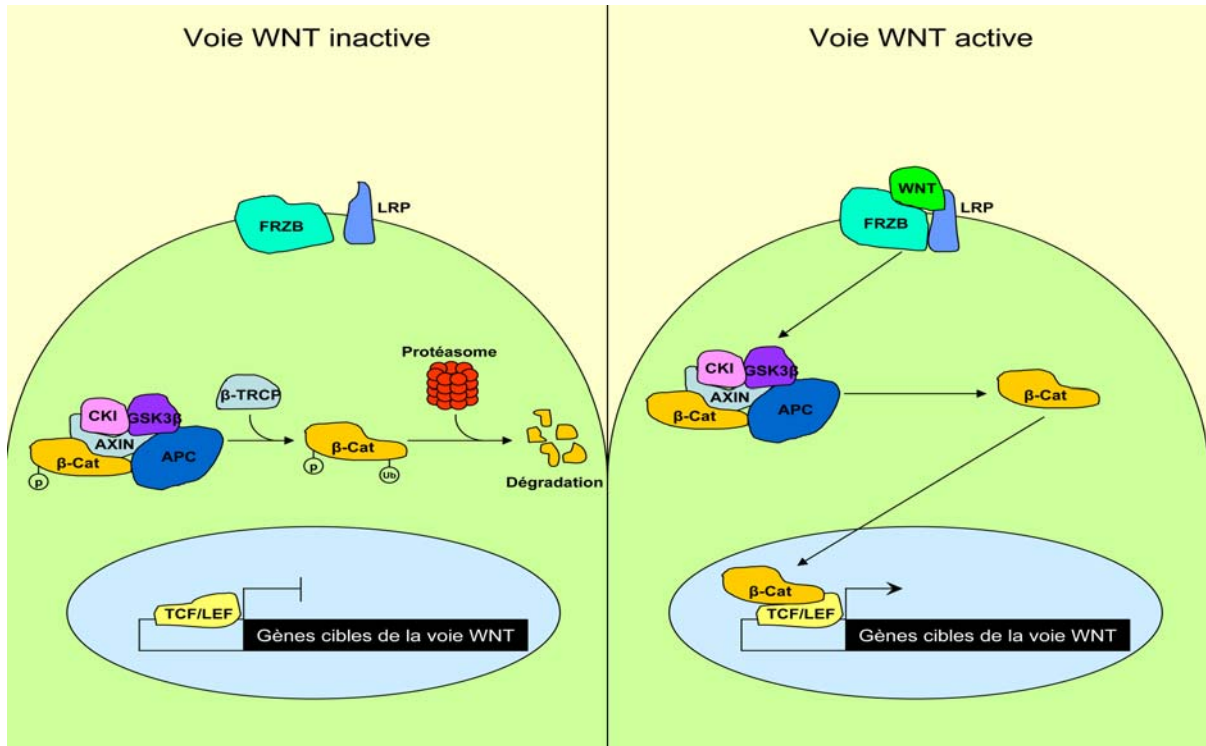


Figure 5 Représentation schématique de la voie de signalisation canonique WNT.

Lorsque la voie WNT est inactive, le facteur de transcription β -caténine (β -cat) est associé à un complexe cytoplasmique comprenant l'AXIN, APC et 3 kinases, GSK3 β , PKA et CKI. La phosphorylation par les kinases entraîne l'ubiquitination de la β -caténine par β -TRCP et sa dégradation par le protéasome. Lorsque le ligand WNT se fixe aux récepteurs membranaires, la β -caténine est libérée du complexe cytoplasmique et va activer l'expression des gènes cibles en s'associant aux protéines TCF/LEF.

Le point central de la voie de signalisation WNT canonique est un complexe protéique cytoplasmique dont l'élément important est le facteur de transcription β -caténine (Fig.5). Celui-ci, lorsque la voie WNT est latente, est localisé dans le cytoplasme associé aux protéines APC et AXIN. Le rôle précis de chacune de ces protéines n'est pas connu mais le complexe ainsi formé permet le recrutement des kinases CK1 et GSK3 β qui phosphorylent la partie N-terminale de la β -caténine (Amit *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2002, Rubinfeld *et al.*, 1996). La phosphorylation induit la reconnaissance du facteur de transcription par l'ubiquitine ligase E3, β -TRCP, conduisant à son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Hart *et al.*, 1999, Kitagawa *et al.*, 1999, Winston *et al.*, 1999).

A ce jour, 19 ligands WNT ont été identifiés. Afin d'être active, la protéine WNT doit être palmitoylée (Willert *et al.*, 2003). Le ligand va interagir avec son récepteur FRZB et le corécepteur LRP. Cette interaction va avoir pour conséquence la dissociation de la β -caténine du complexe cytoplasmique APC/AXIN/kinase (Clevers, 2006). Le facteur de transcription est transloqué dans le noyau où il active l'expression des gènes cibles de la voie WNT en interagissant avec des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF comme TCF4 dans le côlon (Behrens *et al.*, 1996, Molenaar *et al.*, 1996).

2- La voie WNT dans le côlon adulte

Au cours du développement embryonnaire, la voie WNT est impliquée dans la formation de l'endoderme ainsi que dans la formation du tube digestif (Gregorieff and Clevers, 2005). Le rôle de la voie WNT ne se limite pas à la vie embryonnaire mais s'étend également au tube gastro-intestinal adulte et plus particulièrement aux intestins adultes.

La voie WNT est importante dans la prolifération des cellules de la crypte du côlon (Fig.6). Ceci a été montré tant par des approches inhibitrices qu'activatrices de la voie.

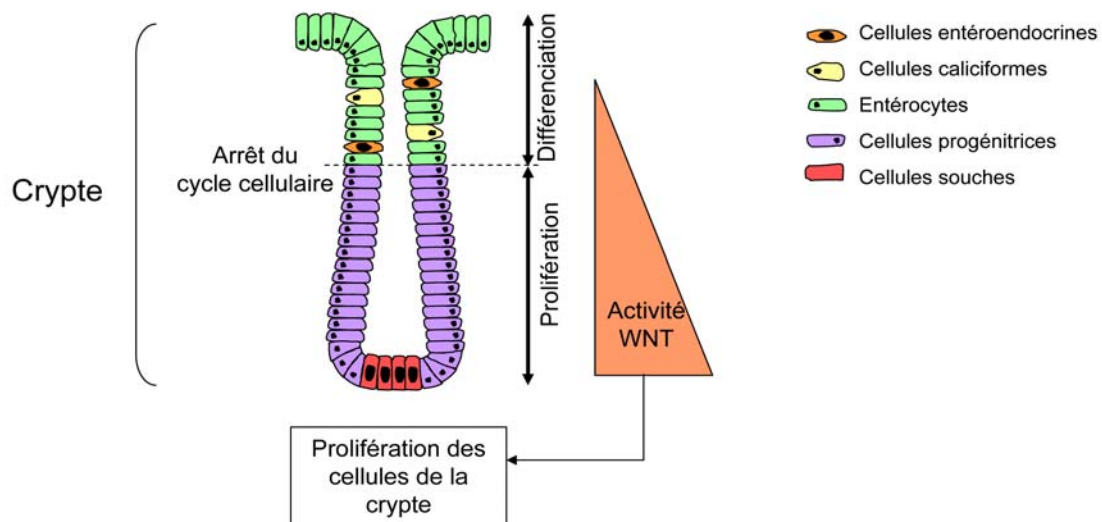


Figure 6 Rôle de la voie WNT dans le côlon adulte.

La voie WNT est activée au niveau des cryptes intestinales et forme un gradient, l'activité étant maximale à la base des cryptes. Elle est impliquée dans la prolifération des cellules qui s'y trouvent.

Chez la souris, la délétion du gène *TCF7/L2* codant pour la protéine TCF4, provoquant l'inhibition de la voie WNT, conduit à une perte du compartiment des cellules prolifératrices dans l'intestin grêle alors que les cellules différenciées ne sont pas affectées (Korinek *et al.*,

1998). Cependant, dans cette étude, le côlon ne semble pas affecté. En revanche, l'utilisation d'un dominant négatif de TCF4 permet l'arrêt du cycle cellulaire dans une lignée cellulaire de cancers du côlon (van de Wetering *et al.*, 2002). De même, la surexpression de DKK1, un inhibiteur de WNT, conduit à une perte des cellules prolifératives au niveau de l'intestin grêle et du côlon chez la souris (Kuhnert *et al.*, 2004). D'autres expériences ont ciblé une activation de la voie WNT comme l'introduction de mutations inactivatrices du gène d'*APC*. Dans ce cas, l'épithélium présente une hyperprolifération allant donc dans le sens d'une implication de la voie WNT dans la prolifération des cellules du côlon (Sansom *et al.*, 2004). En accord avec ces observations, une localisation nucléaire de la β -caténine, indiquant l'activation de la voie WNT, est observée dans les cellules situées à la base des cryptes du côlon (van de Wetering *et al.*, 2002). Il est tout à fait possible que la voie WNT soit activée dans les cellules souches du côlon mais cela reste encore à démontrer. L'identification récente d'un marqueur des cellules souches du côlon devrait permettre de répondre à cette question (Barker *et al.*, 2007).

3- La voie WNT dans les cancers du côlon

Comme il a été indiqué précédemment, l'altération de la voie WNT est la caractéristique principale des cancers du côlon (Tab.1). Dans 80% des cas, le gène *APC* y est muté (Nagase and Nakamura, 1993). Ces mutations entraînent la production d'une protéine tronquée incapable de fixer l'*AXIN* ou la β -caténine (Nathke, 2004). Le gène codant la β -caténine est, quant à lui, muté dans la moitié des cas où le gène *APC* n'est pas altéré. Ces mutations entraînent une modification des sites de phosphorylation de la β -caténine par les kinases CK1 et GSK3 β (Morin *et al.*, 1997). Enfin, des mutations de l'*AXIN* ont été détectées dans quelques cas de cancers du côlon. Ces mutations rendent impossible la dimérisation de cette molécule (Liu *et al.*, 2000).

Gène	Type de mutation	Conséquences sur la voie WNT	Proportion cancers du côlon sporadiques	Références
<i>APC</i>	Inactivante	Stabilisation β -catenin / Activation voie WNT	80%	Nagase et Nakamura, 1993
β -caténine	Activante	Stabilisation β -catenin / Activation voie WNT	10%	Morin <i>et al.</i> , 1997
<i>AXIN2</i>	Inactivante	Stabilisation β -catenin / Activation voie WNT	qq cas décrits seulement	Liu <i>et al.</i> , 2000

Tableau 1 Mutations des membres de la voie WNT dans les cancers du côlon sporadiques.

Toutes les mutations, que ce soit d'*APC*, de β -caténine ou de l'*AXIN* ont pour conséquence la stabilisation de la β -caténine. Celle-ci peut alors entrer dans le noyau et activer les gènes cibles de la voie WNT en s'associant avec TCF. Les gènes codant pour la

cycline D1 et pour C-MYC font partie de ces gènes cibles. Ils sont impliqués dans la prolifération cellulaire en agissant sur le cycle cellulaire. Une importance toute particulière de C-MYC a récemment été mise en évidence dans des mutants conditionnels d'*APC* et de *MYC* dans les intestins adultes de souris. L'épithélium intestinal est désorganisé avec une forte prolifération cellulaire dans les souris *Apc*^{-/-}. En revanche, les souris *Apc*^{-/-} *Myc*^{-/-} ont un épithélium normal, indiquant que C-MYC est indispensable à la transduction du signal lorsque la voie WNT est activée (Sansom *et al.*, 2007).

L'importance de la voie WNT dans la formation des cancers de l'intestin a été appuyée par des expériences sur les souris. Les souris *APC*^{Min/+}, dont un allèle du gène *APC* comporte une mutation non sens, sont prédisposées à former des adénomes intestinaux par carcinogenèse chimique (Moser *et al.*, 1990). Cependant, dans ces souris, la majorité des adénomes est localisé dans l'intestin grêle et peu dans le côlon. Dans une autre étude, un mutant conditionnel d'*APC* a été généré afin d'obtenir une mutation non sens des 2 allèles *APC*. Pour ce faire, des sites loxP ont été introduits au niveau du gène endogène *APC*. L'expression de l'enzyme Cre par infection rétrovirale dans le côlon de souris adultes a pour conséquence la production d'une protéine APC tronquée. Cette stratégie permet de contourner le problème de létalité des souris *Apc*^{-/-}. Ce mutant conditionnel développe des adénomes au niveau du côlon, 4 semaines après l'induction de l'expression de l'enzyme Cre (Shibata *et al.*, 1997). Il est intéressant de noter que cette prédisposition s'étend à d'autres espèces puisque chez le *zebrafish*, une mutation du gène homologue à *APC* entraîne également une prédisposition aux adénomes intestinaux (Haramis *et al.*, 2006).

Toutes ces études établissent un lien direct entre la suractivation de la voie WNT et l'initiation des cancers colorectaux, la formation des adénomes constituant une des premières étapes de la tumorigenèse dans cet organe.

B- La voie de signalisation TGF- β

La voie TGF- β est impliquée dans un grand nombre de fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la mobilité ou encore l'adhésion des cellules. Dans le côlon, l'inactivation de la voie TGF- β constitue une étape importante de la tumorigenèse. Cette voie sera brièvement présentée en focalisant sur 2 ligands : TGF- β et BMP.

1- Description de la voie TGF- β

Les ligands TGF- β peuvent être subdivisés en 3 sous-groupes : TGF- β , activin/inhibin/nodal/myostatin et BMP (Lin *et al.*, 2006). La transduction du signal par les dimères (hétéro- ou homodimères) de ligands se fait par l'intermédiaire de 2 récepteurs appelés récepteurs de types I et II. Les récepteurs de type I sont au nombre de 7 tandis que 5 récepteurs de type II ont été mis en évidence à ce jour. Il existe plusieurs combinaisons de ligands et de récepteurs de types I et II (Tab.2).

Ligands	Récepteurs de type I	Récepteurs de type II	R-SMADs
TGF- β	ALK5	TGF β RII	SMAD2, SMAD3
Activin/inhibin/Nodal/myostatin	ALK4, ALK7	ACTRIIA, ACTRIIB	SMAD2, SMAD3
BMP	ALK1, ALK2, ALK3, ALK6	BMPRII, ACTRIIA, ACTRIIB	SMAD1, SMAD5, SMAD8
BMP4	ALK3, ALK6	BMPRII, ACTRIIB	SMAD1, SMAD5, SMAD8

Tableau 2 Tableau récapitulant les combinaisons de ligands, récepteurs et R-SMAD de la voie TGF- β (Adapté de Shi et Massagué, 2003).

Une fois le ligand fixé aux récepteurs, le récepteur de type II va phosphoryler le récepteur de type I (Fig.7). La propagation du signal passe ensuite par l'intermédiaire des protéines SMAD, qui seront phosphorylées à leur tour.

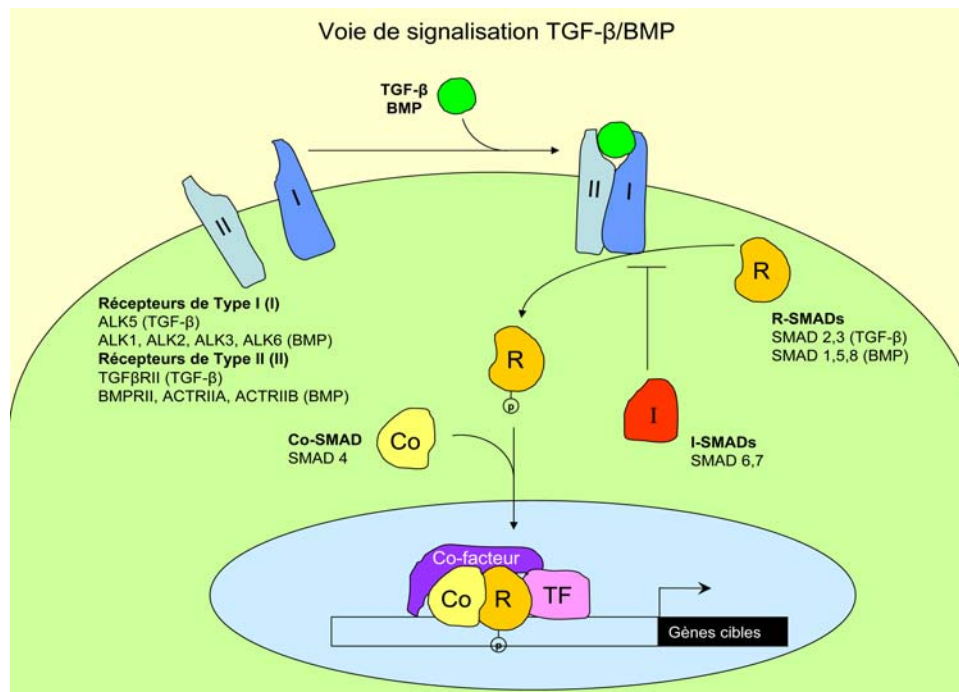


Figure 7 Représentation schématique de la voie de signalisation TGF- β .

Lorsque les ligands TGF- β ou BMP se fixent à leurs récepteurs, le récepteur de type II va phosphoryler les R-SMADs. Ceux-ci vont s'associer à SMAD4 et entrer dans le noyau où ils vont activer l'expression des gènes cibles en combinaison avec d'autres facteurs de transcription (TF) et co-facteurs. Les I-SMADs inhibent la voie en bloquant la phosphorylation des R-SMADs.

Il existe 3 classes de protéines SMAD : R-SMAD (SMAD1, 2, 3, 5 et 8), Co-SMAD (SMAD4) et I-SMAD (SMAD6 et 7). Seules les R-SMADs seront phosphorylées pour former des complexes avec SMAD4 dans le cytoplasme. Cette interaction va entraîner une localisation nucléaire des SMADs, qui avec l'aide d'autres cofacteurs et/ou facteurs de transcription, vont activer l'expression des gènes cibles de la voie TGF- β . Les I-SMADs, quant à elles, ont un rôle inhibiteur sur la voie. Elles agissent, soit en tant que compétitrices des R-SMADs, soit en dirigeant les récepteurs vers un processus de dégradation (Shi and Massague, 2003). Alors que SMAD4 et les I-SMADs sont communes à tous les ligands, les R-SMADs impliquées dans la transduction des signaux TGF- β et BMP diffèrent. SMAD2 et 3 sont spécifiques des ligands TGF- β tandis que SMAD1, 5 et 8 sont spécifiques des ligands BMP (Tab.2).

2- La voie TGF- β dans le côlon

Dans le côlon adulte, les ligands TGF- β et BMP ont été mis en évidence et leur profil d'expression est semblable. Dans les intestins adultes du rat, le TGF- β et le récepteur de type II TGF β RII sont exprimés par les entérocytes. Dans les deux cas, il existe un gradient d'expression avec une expression plus importante au niveau des cellules différenciées situées au sommet des villosités (Barnard *et al.*, 1989, Koyama and Podolsky, 1989, Winesett *et al.*, 1996). Ce profil d'expression est identique pour les récepteurs ALK3, ALK6 et BMPRII spécifiques des ligands BMP ainsi que pour la BMP2 (Hardwick *et al.*, 2004). En revanche, selon plusieurs études, le ligand BMP4 est exprimé principalement dans les cellules du mésenchyme sous-jacent à l'épithélium (Batts *et al.*, 2006, Haramis *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2007). Conformément aux profils d'expression, la voie BMP est activée dans les entérocytes différenciés où elle semble notamment contrôler l'apoptose (Hardwick *et al.*, 2004).

3- La voie TGF- β dans les cancers du côlon

Les premières preuves d'une altération de la voie TGF- β dans les cancers du côlon viennent de l'étude de la perte de chromosome 18q, qui entraîne des mutations de *SMAD4* (Thiagalingam *et al.*, 1996, Vogelstein *et al.*, 1988). Cette altération génétique fait partie des 4 altérations génétiques majeures décrites par Fearon et Vogelstein dans leur modèle de

tumorigenèse colorectale (Fearon and Vogelstein, 1990). Elle se retrouve dans les adénomes tardifs mais aussi et surtout dans les carcinomes (75%). La perte de SMAD4, point central de la transduction du signal, entraîne l'inactivation de la voie TGF- β , constituant une étape importante dans le passage d'un adénome à un carcinome. Cette observation est appuyée par l'étude des mutants *Smad4* chez la souris. Les souris *Smad4*^{+/-} développent des polypes ressemblant à ceux trouvés chez les personnes atteintes du syndrome de polypose juvénile (JPS) qui ont un risque accru de développement de cancers du côlon (Brosens *et al.*, 2007, Howe *et al.*, 1998, Takaku *et al.*, 1999). Chez ces souris, cependant, les polypes sont situés dans l'intestin grêle et non dans le côlon. Les souris *Apc*^{+/-}*Smad4*^{+/-} développent des adénomes qui progressent vers des carcinomes agressifs alors que les souris *Apc*^{+/-}, pour rappel, développent des adénomes (Takaku *et al.*, 1998). SMAD4 étant un composant commun aux ligands TGF- β et BMP, ces expériences ne permettent pas de déterminer lequel de ces ligands est responsable de ces phénotypes.

Il a été montré que le gène codant le récepteur TGF β RII, spécifique du ligand TGF- β , est muté dans 90% des cancers du côlon où il y a instabilité des microsatellites. Dans ce cas, les mutations interviennent dans les adénomes tardifs (Grady *et al.*, 1998). *SMAD2* est également muté dans une faible proportion de cancers du côlon (Eppert *et al.*, 1996).

Les membres spécifiques de la transduction du signal par les ligands BMP ont également été étudiés dans les cancers du côlon. Le gène codant pour le récepteur ALK3 est muté dans les JPS, où les patients sont prédisposés à développer des cancers du côlon, et directement impliqué dans le développement de ce syndrome (Haramis *et al.*, 2004, Howe *et al.*, 2001). Des pertes d'expression du ligand BMP2 dans des FAP et du récepteur de type II BMPRII dans les carcinomes de côlons ont également été mises en évidence (Hardwick *et al.*, 2004, Kodach *et al.*, 2008). Par mesure du taux de phosphorylation des protéines SMAD, Kodach *et al.* estiment à 80% le pourcentage de carcinomes dans lesquels la voie BMP est inactive alors que dans les adénomes, la voie est active dans la majorité des cas.

Toutes ces observations montrent que l'inactivation de la voie TGF- β /BMP intervient au moment de la transition adénome-carcinome au cours de la tumorigenèse.

C- La voie de signalisation HH

Les premiers éléments de la voie de signalisation HH ont été mis en évidence chez la drosophile. Le nom Hedgehog (HH), qui signifie hérisson en anglais, fait référence au

phénotype d'un mutant présentant une surface épineuse visible au microscope (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Ce n'est qu'au début des années 1990 que HH sera décrit comme une protéine sécrétée, impliquée dans la polarisation des segments lors du développement embryonnaire de la drosophile. La voie de signalisation HH est conservée et joue un rôle important dans le développement embryonnaire chez de nombreuses espèces. Elle est également impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire chez l'adulte (Ingham and McMahon, 2001).

1- Description de la voie HH

De manière simplifiée, les facteurs HH sont sécrétés et agissent par voie paracrine et/ou autocrine en fonction du contexte cellulaire. En l'absence de ligand HH, le récepteur membranaire Patched (PTCH) inhibe la protéine membranaire Smoothened (SMO). La fixation de HH à PTCH lève l'inhibition de SMO, conduisant à l'activation des facteurs de transcription Ci/GLI (Fig.8).

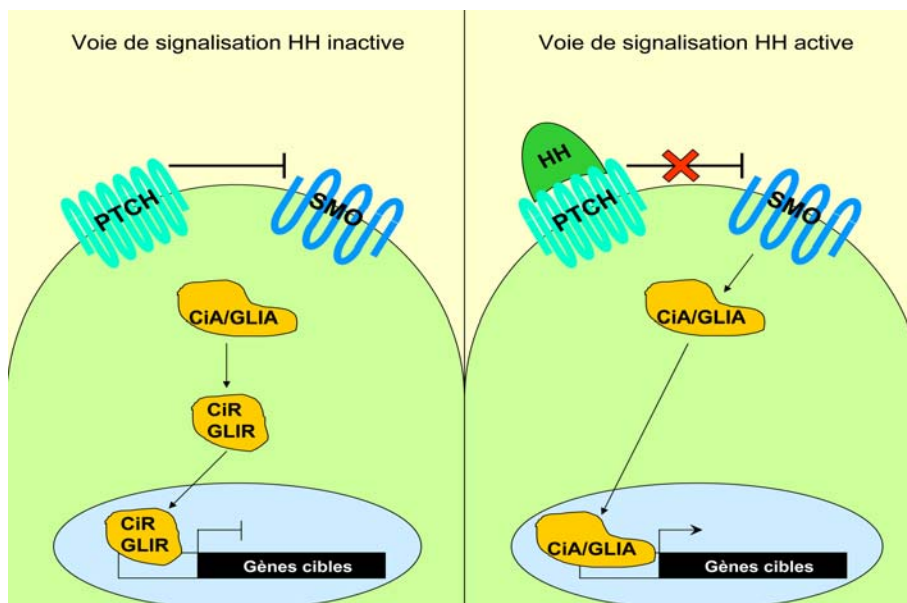


Figure 8 Représentation schématique simplifiée de la voie de signalisation HH.

Lorsque la voie HH est inactive, le récepteur PTCH inhibe la protéine membranaire SMO. Les facteurs de transcription activateurs CiA (drosophile) et GLIA (mammifères) sont localisés dans le cytoplasme. Ils y sont clivés pour former CiR et GLIR qui, une fois dans le noyau, vont réprimer l'expression des gènes cibles. Lorsque le ligand HH se fixe à PTCH, l'inhibition de SMO est levée. SMO va alors permettre à CiA et GLIA d'activer l'expression des gènes cibles de la voie.

Cette représentation est très simplifiée, de nombreuses autres protéines intervenant dans ce système. Le fonctionnement de la voie HH a longtemps été considéré comme plus ou

moins identique chez la drosophile et les mammifères y compris au moment où nous avons initié ce travail. La voie HH sera d'abord présentée chez la drosophile avant de se focaliser sur les mammifères et plus particulièrement sur l'humain où elle a gagné en complexité.

a- La voie HH chez la drosophile

Au cours de sa synthèse, la protéine HH subit plusieurs modifications post-traductionnelles afin d'être active (Fig.9). La partie C-terminale est éliminée par clivage, générant ainsi une protéine appelée HH-N (Lee *et al.*, 1994). A cette dernière, un groupement palmitoyl et un groupement cholestérol sont ajoutés respectivement dans les parties N et C-terminales (Pepinsky *et al.*, 1998, Porter *et al.*, 1996).

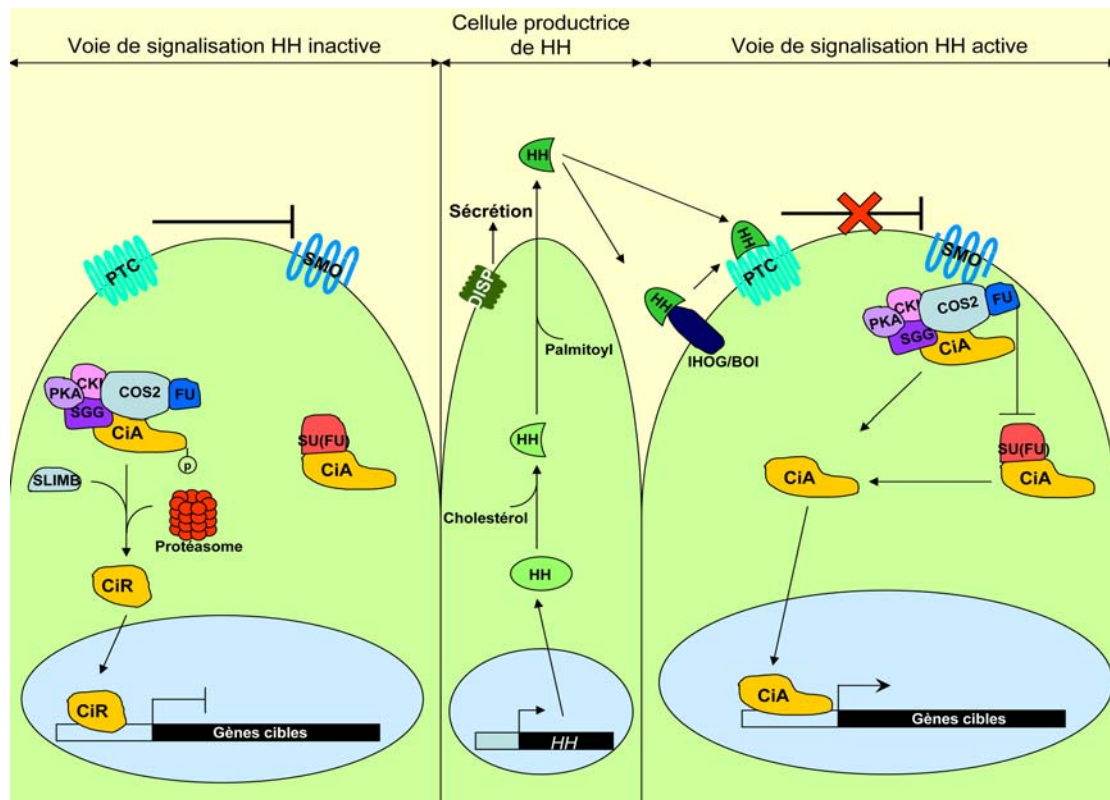


Figure 9 Représentation schématique de la voie de signalisation HH chez la drosophile.

La voie de signalisation HH fonctionne principalement de façon paracrine. Le ligand HH doit d'abord être clivé et modifié (ajout de groupements palmytoyl et cholestérol) avant d'être sécrété par les cellules productrices. Lorsque la voie est inactive, le récepteur PTC inhibe la protéine membranaire SMO. Dans ces conditions, le facteur de transcription CiA est associé soit à SU(FU) soit à un complexe protéique comprenant COS2, FU et les kinases SGG, CKI et PKA. CiA est clivé en un facteur de transcription répresseur CiR qui inhibe l'expression des gènes cibles. L'activation de la voie HH se fait par l'intermédiaire de la fixation de HH à PTC. Celle-ci va lever l'inhibition de SMO par PTC. L'interaction entre SMO et COS2 est alors un élément clé de la transduction du signal. Elle va entraîner la libération de CiA du complexe comprenant COS2. L'interaction entre SU(FU) et CiA est également inhibée par FU. Libéré des 2 types de complexes, CiA va activer l'expression des gènes cibles de la voie HH dans le noyau.

Ces modifications sont indispensables à la sécrétion et à la diffusion de HH-N dans le milieu extracellulaire et plus généralement, à son activité (Wendler *et al.*, 2006). La sécrétion de HH-N nécessite également la présence de la protéine Dispatched dont la structure est proche de celle du récepteur Patched (Burke *et al.*, 1999). Le mécanisme précis d'action de Dispatched n'est pas connu.

Au niveau des cellules répondant au signal HH, les protéines PTC et SMO sont responsables, respectivement, de la perception du signal HH dans le milieu extracellulaire et de la transduction du signal. Cette dernière conduit à l'activation du facteur de transcription CiA (Cubitus interruptus-Activateur) (Robbins *et al.*, 1997, Sisson *et al.*, 1997). Lorsque la voie est inactive, CiA est associé à 2 types de complexes (Fig.9). Un premier complexe (complexe I) est formé de Costal2 (COS2), de la kinase Fused (FU) et de CiA. Le complexe I est également associé à 3 autres kinases : PKA, CKI et GSK3 β (Aikin *et al.*, 2008). Dans le complexe II, Ci-A est associé à une autre protéine nommée SU(FU).

Lorsque la voie HH est inactive, PTC inhibe SMO. Dans ces conditions, le complexe I est principalement cytoplasmique, empêchant l'entrée de Ci-A dans le noyau. Une fraction de Ci-A est phosphorylé par les kinases PKA, CKI et GSK3, ce qui conduit à un clivage spécifique du facteur de transcription en une forme appelée Ci-R (Ci-Répresseur) (Jiang and Struhl, 1998). Ce clivage est dépendant de l'ubiquitine ligase E3, SLIMB, qui est membre du complexe SCF. Ci-R est ensuite transloqué dans le noyau où il réprime l'expression des gènes cibles de la voie HH. Les facteurs de transcription Ci-A associés à SU(FU) dans le complexe II ne sont pas clivés mais restent dans le cytoplasme (Methot and Basler, 2000).

La fixation de HH à PTC lève l'inhibition de SMO, permettant la transduction du signal (Fig.9). Celle-ci débute par la phosphorylation de SMO dans sa partie C-terminale intracellulaire par les kinases PKA et CK1 (Denef *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2004). La phosphorylation entraîne une accumulation de SMO à la membrane. Le mécanisme de transduction du signal en aval n'est pas complètement élucidé mais il est évident maintenant que COS2 y joue un rôle majeur (Hooper and Scott, 2005, Kalderon, 2005, Varjosalo and Taipale, 2008). COS2 est indispensable à la phosphorylation de SMO ainsi qu'à son accumulation à la membrane. COS2 est lui aussi phosphorylé. Ces événements vont entraîner la libération de Ci-A du complexe I. Au niveau du complexe II, Ci-A se dissocie de SU(FU) par un mécanisme qui fait intervenir FU (Lum *et al.*, 2003). Cela va conduire à l'accumulation de Ci-A dans le noyau et à l'activation de l'expression des gènes cibles de la voie HH.

Les principales interrogations et controverses concernant la transmission du signal HH dans les cellules de la drosophile incluent (1) la façon dont le signal est transmis entre PTC et SMO, (2) l'importance, la composition et la cinétique d'activation des complexes I et II en réponse à une activation de la voie et (3) l'implication d'autres protéines dans la transduction du signal entre SMO et Ci.

b- Fonctionnement de la voie HH chez les mammifères

Le fonctionnement général de la voie HH est comparable chez les mammifères et la drosophile mais des différences ont été mises en évidence ces dernières années (Fig.10). La liste des principaux membres de la voie HH chez la drosophile et leurs homologues chez les mammifères sont présentés dans le tableau 3.

Localisation	Fonction	Drosophile	Mammifères
Milieu extracellulaire	Ligand	HH	SHH, IHH, DHH
membrane	Sécrétion HH	DISP	DISP1
	Diffusion HH	DLP	Glypican
	Récepteur	PTC	PTCH1, PTCH2
	Transduction du signal	SMO	SMO
	Fixation à HH	IHOG/BOI	BOC/CDO
	Fixation à HH		HHIP
Milieu intracellulaire	Transduction du signal	COS2	KIF27
	Kinase	FU	FU
	Transduction du signal	SU(FU)	SUFU
	Kinase	PKA	PKA
	Kinase	CKI	CKI
	Kinase	SGG	GSK3 β
	Facteur de transcription	Ci	GLI1, GLI2, GLI3
	Ubiquitine ligase	SLIMB	β -TRCP

Tableau 3 Tableau récapitulant la correspondance entre membres de la voie HH chez la drosophile et les mammifères.

Il apparaît clairement que la voie a gagné en complexité chez les mammifères. Celle-ci est illustrée par le nombre plus important de membres de la voie HH chez les mammifères. Ainsi, il existe 3 ligands, SHH (Sonic hedgehog), IHH (Indian hedgehog) et DHH (Desert hedgehog) codés par des gènes différents. Deux gènes homologues de *PTC* ont été identifiés chez les mammifères, *PTCH1* et *PTCH2*. De même, les fonctions de Ci sont assurées chez les mammifères par 3 facteurs de transcription distincts GLI1, GLI2 et GLI3. Enfin, HHIP est un membre de la voie HH qui existe chez les mammifères mais dont aucun homologue n'a été mis en évidence jusqu'à maintenant chez la drosophile.

Il existe, en outre, 3 différences fonctionnelles majeures entre drosophile et mammifères : COS2 qui n'est pas indispensable à la transduction du signal, l'implication du cilium dans la transduction et un rôle plus important de SUFU chez les mammifères que chez la drosophile. Ces 3 différences seront détaillées par la suite.

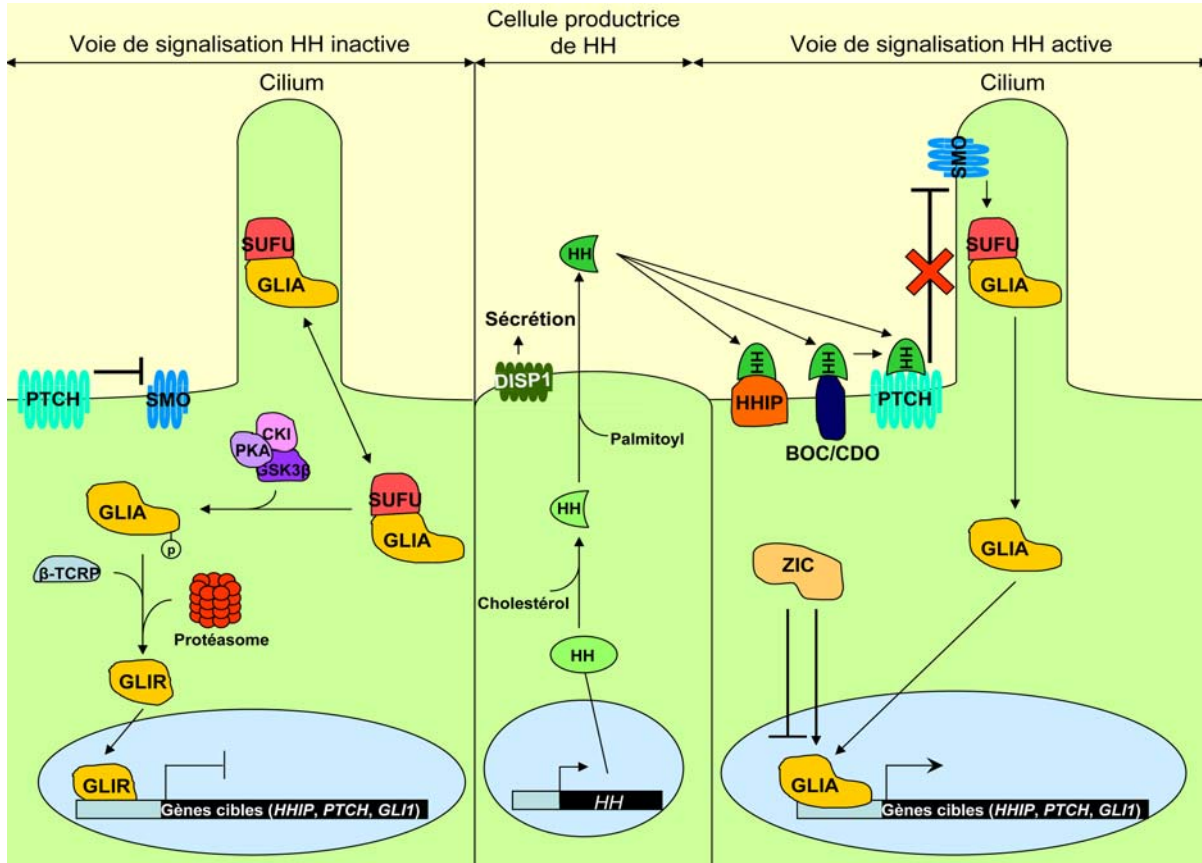


Figure 10 Représentation schématique de la voie de signalisation HH chez les mammifères.

La voie de signalisation HH fonctionne principalement de façon paracrine. Le ligand HH doit d'abord être clivé et modifié (ajout de groupements palmitoyl et cholestérol) avant d'être sécrété par les cellules productrices. Contrairement à la drosophile, le cilium primaire est une structure cellulaire nécessaire au bon fonctionnement de la voie HH chez les mammifères. Lorsque la voie est inactive, le récepteur PTCH inhibe la protéine membranaire SMO. SMO est alors localisée hors du cilium primaire. Dans le cytoplasme, le facteur de transcription GLIA est associé à SUFU. Une partie de GLIA est clivée en un facteur de transcription répresseur GLIR qui inhibe l'expression des gènes cibles de la voie HH dans le noyau. L'activation de la voie HH se fait par l'intermédiaire de la fixation de HH à PTCH. Elle va lever l'inhibition de SMO par PTCH et entraîner son accumulation dans le cilium primaire. SMO va transduire le signal en permettant la dissociation du complexe GLIA/SUFU afin d'accumuler GLIA qui va alors activer l'expression des gènes cibles de la voie HH dans le noyau.

Les ligands HH

C'est en 1993 que les gènes humains orthologues du gène *hh* de la drosophile sont clonés (Echelard *et al.*, 1993). Les 3 protéines SHH, IHH et DHH subissent les mêmes

modifications post-traductionnelles que HH chez la drosophile : clivage de la partie C-terminale, ajout d'un groupement cholestérol permettant l'ancrage et la sécrétion de la protéine dans la membrane et ajout d'un groupement palmitoyl nécessaire à une activité optimale (Robbins and Hebrok, 2007). En outre, plusieurs protéines participent au bon fonctionnement de la voie en agissant sur HH au niveau des cellules productrices et réceptrices ainsi que dans le milieu extracellulaire (Fig.10). Au niveau des cellules productrices, DISP1 est indispensable à la sécrétion de HH (Ma *et al.*, 2002). La diffusion de HH dans le milieu extracellulaire est contrôlée par la présence de glypicans même si chez la drosophile et la souris, leurs effets semblent diamétralement opposés (Bellaïche *et al.*, 1998, Capurro *et al.*, 2008, Gallet *et al.*, 2008, Koziel *et al.*, 2004). Enfin, les protéines CDO/BOC sont requises pour la fixation de HH au niveau des cellules réceptrices (Tenzen *et al.*, 2006). Tous ces éléments sont présents également chez la drosophile. En revanche, un certain nombre de protéines identifiées chez les mammifères ne semblent pas être présentes chez la drosophile. C'est le cas de HHIP qui se fixe à HH au niveau des cellules réceptrices et permet de réduire son action. L'expression de HHIP est notamment augmentée lorsque la voie HH est activée. C'est un des mécanismes de rétrocontrôle négatif de la voie permettant de limiter l'action de HH (Chuang and McMahon, 1999).

Les 3 formes de HH sont capables d'activer la voie de signalisation HH même si l'amplitude d'activation diffère d'une forme à l'autre. De manière générale, à concentration identique, SHH est plus puissant qu'IHH et IHH l'est davantage que DHH (Pathi *et al.*, 2001). C'est donc l'expression spatio-temporelle des différents membres qui définit leur spécificité d'action. Ainsi, DHH est principalement exprimé dans les gonades, IHH dans les tissus endodermiques primitifs, le tractus gastro-intestinal et les chondrocytes alors que l'expression de SHH est plus répandue. Dans certains cas, 2 ligands HH peuvent agir sur le même tissu notamment au cours du développement embryonnaire (Varjosalo and Taipale, 2008).

PTCH et SMO : réception du signal HH à la membrane

PTCH, protéine à 12 domaines trans-membranaires, est le récepteur de HH. Il existe 2 gènes *Patched* chez les mammifères, *PTCH1* et *PTCH2*. Les souris *Ptch1*^{-/-} présentent une activation complète de la voie HH conformément au modèle selon lequel PTCH inhibe SMO responsable de l'activation de la voie (Goodrich *et al.*, 1997). A l'inverse, le mutant *Ptch2*^{-/-} a un phénotype normal en apparence (Nieuwenhuis *et al.*, 2006). Le gène *PTCH1* des

mammifères est considéré comme l'orthologue du gène *Ptc* de la drosophile et est donc accepté comme le récepteur principal de HH. PTCH2 pourrait être plus particulièrement impliqué dans l'interaction avec le ligand DHH (Nieuwenhuis *et al.*, 2006). De manière générale, PTCH1 a été largement plus étudié que PTCH2. Dans la suite de ce travail, le terme PTCH fera référence à PTCH1.

La fonction de PTCH serait associée au transport de petites molécules à travers la membrane (Fig.11) (Taipale *et al.*, 2002). Cette hypothèse a été proposée quand il a été montré que PTCH inhibait complètement SMO même lorsqu'il était exprimé en quantité moindre que SMO. De plus, PTCH, qui n'interagit pas directement avec SMO, a une structure proche de protéines impliquées dans le transport transmembranaire chez les bactéries. Conformément à cette hypothèse, de petites molécules ont été identifiées comme interagissant et régulant SMO. C'est le cas notamment des oxystéroïls et de la vitamine D3 (Bijlsma *et al.*, 2006, Corcoran and Scott, 2006).

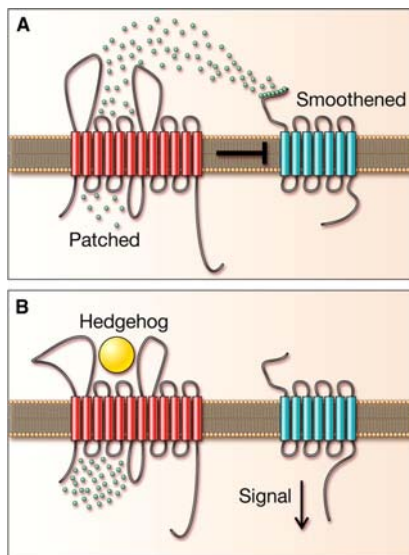


Figure 11 Modèle d'action du récepteur PTCH (van den Brink, 2007).

(A) Lorsque la voie de signalisation HH est inactive, PTCH pompe de petites molécules vers le milieu extracellulaire. Ces molécules inhibent SMO en s'y fixant. (B) Lorsque le ligand HH se fixe à PTCH, les molécules restent dans le cytoplasme. SMO n'est alors plus inhibé et peut transmettre le message d'activation de la voie HH.

SMO fait partie de la famille des récepteurs à 7 domaines trans-membranaires. Jusqu'à maintenant, aucune liaison directe d'un ligand n'a pu être mise en évidence, ce qui est en accord avec une régulation indirecte par HH via le récepteur PTCH. SMO est responsable de la transduction du signal mais il existe une différence importante entre la drosophile et les mammifères.

Transduction du signal par SMO, point de divergence entre drosophile et mammifères

COS2 n'est pas indispensable

Comme chez la drosophile, la phosphorylation de SMO constitue une étape importante de l'activation de la voie HH. Cependant, les sites de phosphorylation de la partie C-terminale de SMO présents chez la drosophile ne sont pas conservés chez les mammifères. De plus, chez la drosophile, SMO contient 2 domaines d'interaction avec COS2. Un des 2 domaines est absent et le second n'est pas indispensable à la fonction de SMO chez les mammifères (Jia *et al.*, 2003, Varjosalo *et al.*, 2006). Enfin, les protéines murines KIF7 et KIF27, homologues de COS2, ne sont pas importantes pour le fonctionnement de la voie HH (Varjosalo *et al.*, 2006). Récemment, il a été démontré que SMO est phosphorylé par GRK2 dans les cellules de mammifères. Cette phosphorylation entraîne son endocytose via le recrutement de la β -arrestin2 (Chen *et al.*, 2004). Ce mécanisme est indispensable à la transduction du signal et notamment à la localisation de SMO dans le cilium primaire (Kovacs *et al.*, 2008).

Importance du cilium primaire dans la transduction du signal

Le cilium primaire est une projection de la membrane plasmique vers le milieu extracellulaire. Il se compose notamment d'un axonème qui croît à partir du centriole (Satir and Christensen, 2007). L'implication du cilium dans la voie de signalisation HH est apparue lors de l'étude de mutants de souris pour des gènes codant des protéines essentielles à la structure de l'organelle comme IFT88 et IFT172. Ces mutants présentent un phénotype caractéristique d'une perte de la voie HH (Huangfu *et al.*, 2003). En effet, en présence de SHH, SMO s'accumule au niveau du cilium (Corbit *et al.*, 2005). De même, SUFU et les facteurs de transcription GLI sont localisés au niveau de cette structure (Haycraft *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter qu'à l'inverse, chez la drosophile, le cilium ne semble pas être impliqué dans le fonctionnement de la voie HH (Nybakken *et al.*, 2005).

Rôle accru de SUFU chez les mammifères

Enfin, il existe une dernière différence majeure entre drosophile et mammifères. Chez la drosophile, le mutant *SU(FU)* ne présente pas de phénotype marquant alors que chez la souris, la perte de *SUFU* se caractérise par un phénotype mimant une activation de la voie HH comme chez les souris *Ptch*^{-/-} (Cooper *et al.*, 2005, Preat, 1992). Alors que *SUFU* a un rôle secondaire dans la voie HH chez la drosophile, elle a une importance plus marquée chez les mammifères. Chez les mammifères, comme chez la drosophile, c'est un régulateur négatif de la voie HH. Il agit en se fixant aux facteurs de transcription GLI et en modulant leur activité de 2 façons au moins. D'une part, *SUFU* est capable de séquestrer les facteurs de transcription dans le cytoplasme (Fig.10) (Kogerman *et al.*, 1999). D'autre part, dans le noyau, elle va interagir avec la protéine SAP18 et permettre le recrutement de HDACs, celles-ci étant associées à une répression de l'expression des gènes (Cheng and Bishop, 2002).

Les facteurs de transcription GLI et ZIC

Les facteurs de transcription GLI et ZIC font partie de la famille des facteurs de transcription à doigts de Zinc de type C2H2. Du point de vue homologie de séquence, Ci est plus proche de GLI que des facteurs de transcription ZIC (Fig.12). Chez les mammifères, la fonction de Ci est assurée par les 3 facteurs de transcription GLI 1-3.

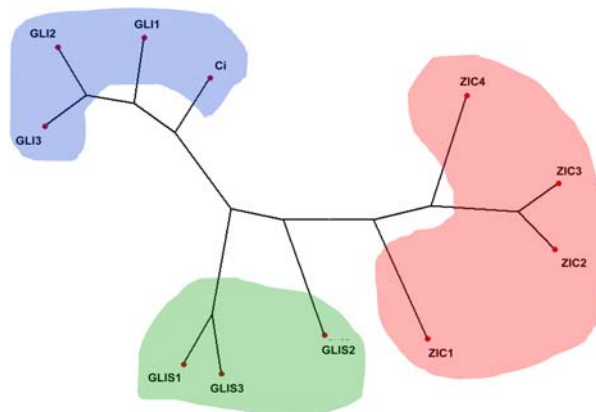


Figure 12 Arbre phylogénétique incluant les familles de protéines GLI (Bleu), GLIS (Vert) et ZIC (Rouge).

L'arbre a été construit sur la base des séquences des motifs à doigts de Zinc des facteurs de transcription humains GLI1, GLI2, GLI3, GLIS1, GLIS2, GLIS3, ZIC1, ZIC2, ZIC3, ZIC4 et de la drosophile Ci. Les séquences ont été alignées en utilisant clustalw et l'arbre a été construit selon la méthode *Neighbor-Joining* en utilisant le programme PhyloDraw. Cet arbre permet de voir notamment que Ci est plus proche des facteurs de transcription GLI que ZIC.

GLI2 et GLI3

La structure de GLI2 et celle de GLI3 sont comparables à celle de Ci. Tous deux possèdent un domaine activateur C-terminal et un domaine répresseur de la transcription N-terminal (Fig.13).

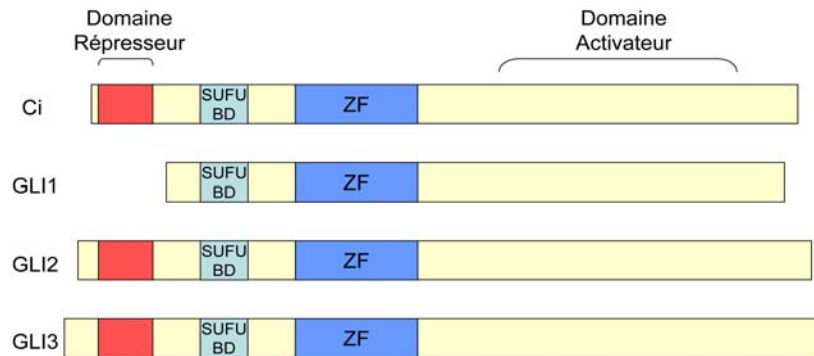


Figure 13 Représentation schématique des facteurs de transcription Ci (drosophile) et GLI (mammifères).

Ces facteurs de transcription possèdent 5 motifs à doigts de Zinc de type C2H2. Ils possèdent également un site de fixation à SUFU (SUFU BD). GLI2 et GLI3 possèdent un domaine activateur et un domaine répresseur de la transcription comme leur homologue chez la drosophile Ci. En revanche GLI1 ne possède qu'un domaine activateur.

GLI2 et GLI3 sont les facteurs de transcription impliqués dans la transduction précoce du signal HH. Cependant ils agissent différemment (Fig.14). Lorsque la voie est inactive, GLI3 perd par clivage son domaine activateur ce qui donne naissance à GLI3R qui agit comme répresseur de la transcription, inhibant l'expression des gènes cibles de la voie HH (Altaba, 1999, Wang *et al.*, 2000). C'est la phosphorylation de GLI3 qui va permettre sa reconnaissance par β -TRCP conduisant à son clivage. Les kinases impliquées dans la phosphorylation de GLI3 sont les mêmes que celles qui agissent chez la drosophile à savoir PKA, GSK3 β et CKI (Varjosalo and Taipale, 2008). Il est important de préciser que le cilium est nécessaire au clivage de GLI3 (May *et al.*, 2005). Bien que GLI2 et GLI3 aient des structures proches, aucun clivage de GLI2 conduisant à la formation de GLI2R n'a pu être mis en évidence. Lorsque la voie est activée, le clivage de GLI3 est inhibé et il peut alors agir comme activateur (GLI3A) (Bai *et al.*, 2004). Cependant, le pouvoir activateur de GLI3A est restreint, ce qui tend à penser que le rôle principal de GLI3 est d'agir comme répresseur. En revanche, dans ces conditions, GLI2 agit comme un activateur, induisant l'expression des gènes cibles de la voie HH (GLI2A) (Bai *et al.*, 2002, Sasaki *et al.*, 1999). En résumé, GLI2 est impliqué dans l'activation de la voie HH sous sa forme GLI2A alors que la fonction principale de GLI3 est d'agir comme répresseur (GLI3R), lorsque la voie est inactive.

GLI1

Contrairement à GLI2 et à GLI3, GLI1 ne possède pas de domaine répresseur (Fig.13) (Sasaki *et al.*, 1999). Le facteur de transcription GLI1 est impliqué dans les événements tardifs de la transduction du signal HH. Son expression est fortement stimulée lorsque la voie de signalisation HH est activée (Fig.14). Il a été montré que son expression était régulée par GLI2 et GLI3 et était dépendante de ces facteurs de transcription lors de l'activation de la voie HH (Buttitta *et al.*, 2003, Dai *et al.*, 1999, Ikram *et al.*, 2004). Les souris *Gli1*^{-/-} ne présentent pas de phénotype particulier (Park *et al.*, 2000). Par contre, la surexpression de GLI1 mime une activation de la voie HH, ce qui implique que GLI1 est capable d'activer la plupart, voire l'ensemble des gènes cibles de la voie HH (Hynes *et al.*, 1997, Lee *et al.*, 1997).

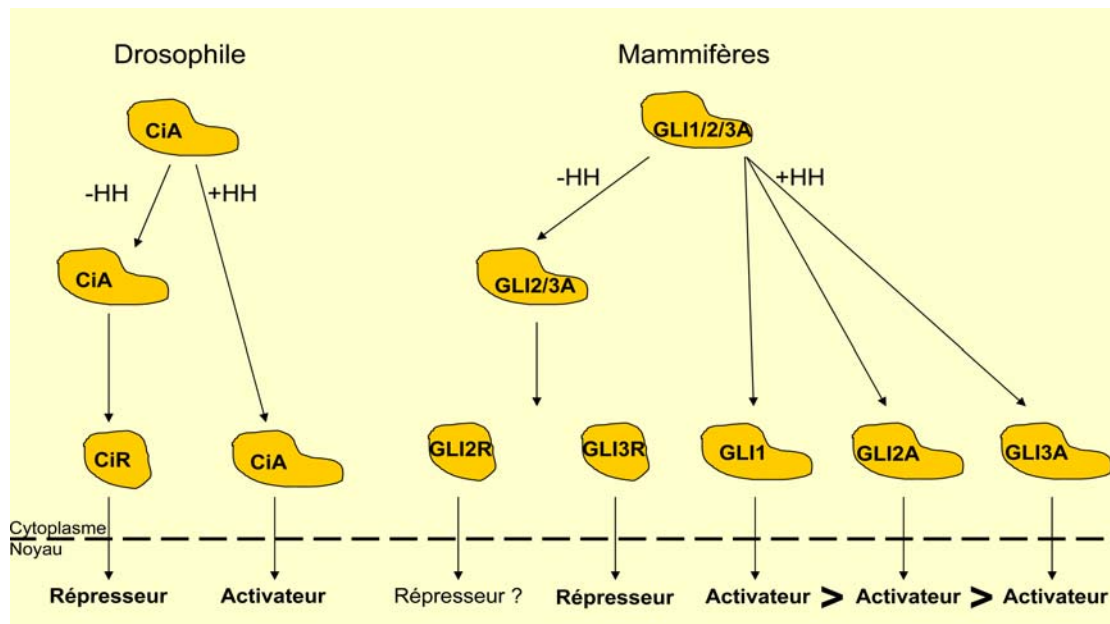


Figure 14 Régulation des protéines Ci/GLI chez la drosophile et les mammifères (Adaptée de Koebernick et Pieler, 2002).

Chez la Drosophile, en absence de HH, CiA est clivé pour générer CiR qui agit comme un facteur de transcription répresseur. En présence de HH, le clivage est inhibé et CiA agit comme activateur de la transcription. Chez les mammifères, la fonction de Ci est assurée par 3 facteurs de transcription différents, GLI1, GLI2 et GLI3. Lorsque HH est absent, GLI3A est clivé pour former GLI3R, répresseur de la transcription. Bien que GLI2 présente une structure proche de GLI3 et Ci, aucun clivage *in vivo* n'a pu être mis en évidence jusqu'à maintenant. En présence de HH, l'expression de GLI1 est stimulée et il agit comme un activateur de la transcription. GLI2A et GLI3A agissent également comme activateurs de la transcription, le clivage de GLI3A étant inhibé. Le potentiel activateur de GLI1 est supérieur à celui de GLI2A et celui de GLI2A supérieur à celui de GLI3A.

ZIC

De nombreuses protéines ont été montrées comme régulant l'activité des facteurs de transcription GLI. Parmi elles se retrouvent les facteurs de transcription *ZIC*. Ils sont impliqués principalement dans le développement du système nerveux central, des muscles ou encore du squelette chez l'embryon (Grinberg and Millen, 2005). Le génome des mammifères contient 5 gènes *ZIC*. Les souris mutées pour chacun de ces gènes présentent des phénotypes différents ce qui semble indiquer que leurs fonctions ne sont pas redondantes (Grinberg and Millen, 2005). Les souris *Zic2*^{-/-} présentent un phénotype caractéristique d'holoprocéphalie (HPE) (Aruga *et al.*, 2002). Dans une faible proportion d'HPE humain, *ZIC2* est également muté (Brown *et al.*, 1998). De plus, dans un quart des cas d'HPE humains, *SHH* est muté, renforçant le lien entre les protéines *ZIC* et la voie de signalisation HH (Roessler *et al.*, 1996). Les protéines *ZIC* sont capables d'interagir avec les facteurs de transcription GLI par l'intermédiaire de leur domaine à doigts de Zinc (Koyabu *et al.*, 2001, Zhu *et al.*, 2008). Cette interaction permet de moduler positivement ou négativement l'activité des facteurs de transcription GLI en fonction du type cellulaire (Fig.10) (Mizugishi *et al.*, 2001).

Gènes cibles de la voie HH

Les facteurs de transcription GLI se fixent aux promoteurs des gènes qu'ils régulent par l'intermédiaire de la séquence cis-régulatrice GACCACCCA (Kinzler and Vogelstein, 1990). Les travaux qui se sont donné pour but d'identifier les gènes cibles soit de HH soit des facteurs de transcription GLI ont abouti à des résultats très différents. L'utilisation de méthodes différentes mais aussi et surtout de modèles cellulaires différents peut expliquer ces résultats. Les gènes cibles de la voie HH sont dépendants du contexte cellulaire. Les seuls gènes cibles communs à toutes les études sont les gènes codant des protéines impliquées dans la voie de signalisation HH elle-même. C'est le cas notamment des gènes *PTCH* et *HHIP* dont le produit, par l'intermédiaire de la fixation au ligand HH, va générer un rétrocontrôle négatif en limitant le nombre de molécules disponibles pour activer la voie HH (Agren *et al.*, 2004, Chuang and McMahon, 1999). *GLI1* est également un gène cible, son expression étant régulée par *GLI2* et *GLI3* comme cela a été mentionné précédemment.

2- La voie HH dans les intestins

Les souris mutées *Ihh*^{-/-}, *Shh*^{-/-}, *Ptch*^{-/-}, *Gli1*^{-/-}, *Gli2*^{-/-} et *Gli3*^{-/-} présentent toutes des défauts du tractus gastro-intestinal (Lees *et al.*, 2005), indiquant que la voie de signalisation HH est impliquée dans le développement des organes le constituant. Les souris *Shh*^{-/-} et *Ihh*^{-/-} présentent toutes les deux une mauvaise rotation des intestins ou encore une couche musculaire circulaire plus mince que chez les souris normales (Ramalho-Santos *et al.*, 2000). Cependant, chaque mutant possède certains défauts qui lui sont propres. Les souris *Shh*^{-/-} se caractérisent notamment par une différenciation anormale de certains neurones entériques alors que chez les souris *Ihh*^{-/-}, ils sont totalement absents. De même, seules les souris *Ihh*^{-/-} présentent une déficience de la différenciation des entérocytes et une altération partielle de la structure en villosités. Plus récemment, une autre approche a été utilisée pour étudier le rôle de la voie HH dans les intestins. Le gène *Hhip* a été couplé au promoteur de la villin afin de surexprimer HHIP dans les cellules épithéliales intestinales (Madison *et al.*, 2005), conduisant à l'inhibition de la voie HH. Chez ces souris, l'architecture des villosités de l'intestin grêle a été complètement perdue. En ce qui concerne le côlon, aucune observation n'a pu être faite. Il semble donc, d'après ces études réalisées sur la souris, que la voie de signalisation HH soit importante dans la formation de la structure en villosités des intestins lors de l'embryogenèse.

Chez les mammifères adultes, *IHH* et *SHH* sont exprimés dans l'épithélium mais avec un profil d'expression différent (Fig.15). *SHH* est exprimé dans l'intestin grêle et le côlon à la base des cryptes. Cette expression est très faible et pour le côlon, elle n'est observable que dans certaines cryptes (van den Brink *et al.*, 2002). Cependant, malgré la détection du transcrit, la protéine SHH n'a pu être détectée. Pour *IHH*, tant le transcrit que la protéine sont exprimés au niveau des cellules différenciées du côlon au sommet des cryptes (van den Brink *et al.*, 2004). Ces observations ont été faites chez l'homme et les rongeurs. Alors que les ligands HH sont exprimés dans l'épithélium, *PTCH* est exprimé uniquement par les cellules adjacentes à l'épithélium dans le côlon (Fig.15). Cela indique que la voie HH agit principalement de façon paracrine dans le côlon (van den Brink, 2007). Il a également été montré chez la souris que *PTCH*, les gènes codant les facteurs de transcription *GLI* ainsi que *HHIP* étaient principalement exprimés dans le mésenchyme de l'intestin grêle renforçant l'idée d'un fonctionnement paracrine de la voie HH dans les intestins en général (Madison *et al.*, 2005). Ces travaux ont montré aussi que *BMP4* avait le même profil d'expression que

PTCH. D'autres études ont également montré que l'expression de *BMP4* était contrôlée par la voie HH dans les intestins chez la souris ainsi que chez le poulet (Roberts *et al.*, 1995, Sukegawa *et al.*, 2000). Le gène codant pour *BMP4* est donc considéré comme un gène cible de la voie HH dans les intestins d'autant plus que les facteurs de transcription GLI sont capables d'activer un gène rapporteur dont l'expression est sous le contrôle du promoteur *BMP4* (Kawai and Sugiura, 2001).

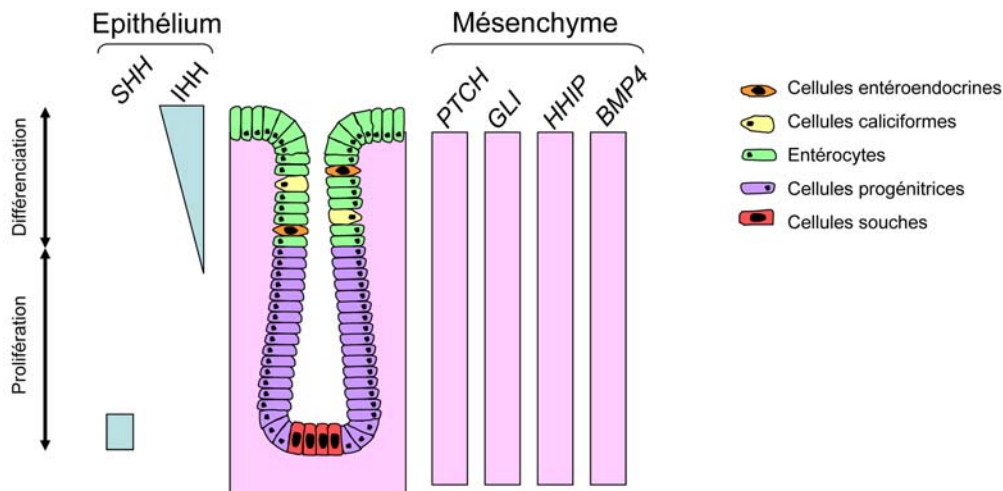


Figure 15 Distribution de l'expression des membres de la voie HH dans le côlon adulte. L'expression de *SHH*, *GLI*, *HHIP* et *PTCH* a été déterminée par hybridation *in situ* tandis que l'expression d'*IHH* a été observée par immunohistochimie (van den Brink, 2007 ; Madison *et al.*, 2005). Chez la souris, l'expression de *BMP4*, gène cible de la voie HH dans les intestins, présente le même profil d'expression que *PTCH* par hybridation *in situ*.

3- La voie HH dans les cancers

Les premières observations montrant un lien entre voie HH et cancers ont été faites en 1996. Depuis, il a été montré que la voie HH est impliquée dans le développement de plusieurs types de cancers. Lorsque c'est le cas, il s'agit de suractivation de la voie dont la cause permet de séparer les cancers en 2 catégories : d'un côté, les cancers de type I où une mutation est à l'origine d'une suractivation de la voie HH (activation indépendante du ligand) et de l'autre, les cancers de type II où la suractivation est due à une surproduction de ligand (activation dépendante du ligand) (Fig.16). Les nombreux travaux réalisés permettent d'envisager d'inhiber la voie de signalisation HH dans le cadre de thérapies contre certains cancers.

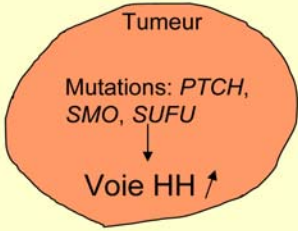
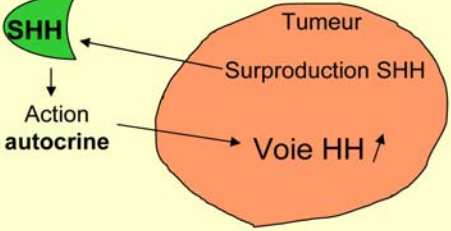
Cancers de type I	Cancers de type II
Environnement tumoral 	Environnement tumoral 
Carcinomes à cellules basales Médulloblastomes Rhabdomyosarcomes	Cancers du poumon à petites cellules Cancers du pancréas Cancers de la prostate Cancers du sein

Figure 16 Classification des cancers en fonction du mode de dérégulation conduisant à une activation de la voie de signalisation HH.

Les cancers de type I présentent une activation de la voie HH suite à la mutation d'un membre de la voie HH. Des mutations de *PTCH*, *SMO* et *SUFU* ont été décrites dans ces cancers. Les cancers de type II surexpriment SHH ce qui conduit à une suractivation de la voie HH dans les cellules tumorales suite à un effet autocrine.

a- Les cancers de type I

La première implication de la voie HH dans le développement des cancers provient de travaux sur les patients atteints du syndrome de Gorlin. Ces patients développent de multiples carcinomes à cellules basales (BCC) et ont une prédisposition au développement de médulloblastomes (tumeur du cervelet) et de rhabdomyosarcomes (tumeur des muscles striés). Le syndrome de Gorlin est dû à des mutations du gène *PTCH* (Hahn *et al.*, 1996, Johnson *et al.*, 1996). Les souris *Ptch*^{+/-} développent des lésions cutanées semblables à celles des BCC et sont également susceptibles de développer des médulloblastomes faisant de ces souris un modèle murin du syndrome de Gorlin (Goodrich *et al.*, 1997, Hahn *et al.*, 1998). Dans 70% des formes sporadiques de BCC, des mutations des membres de la voie de signalisation HH sont détectées (Tang *et al.*, 2007). Il s'agit principalement de mutations inactivatrices de *PTCH* ou activatrices de *SMO*. Conformément à ces observations, des surexpressions de *PTCH* et *GLII*, gènes cibles de la voie ont été mises en évidence dans l'immense majorité des BCC (Dahmane *et al.*, 1997, Uden *et al.*, 1997). L'activation de la voie HH constitue donc une étape indispensable au développement des BCC. A l'instar des BCC, des mutations des membres de la voie HH ont été mises en évidence dans les médulloblastomes. Il s'agit de mutations inactivatrices de *PTCH* et *SUFU* (Raffel *et al.*, 1997, Taylor *et al.*, 2002).

Dans les cancers de type I tels que les BCC et médulloblastomes, la mutation d'un membre de la voie HH est directement à l'origine du développement de la tumeur.

b- Les cancers de type II

Jusqu'à présent, dans les cancers autres que les cancers de type I, aucune mutation d'un membre de la voie HH n'a pu être clairement mise en évidence. Cependant, ces dernières années, des suractivations de la voie HH ont été montrées dans plusieurs types de cancers tels que les cancers du poumon à petites cellules (SCLC), du sein, de la prostate ou du pancréas (Karhadkar *et al.*, 2004, Kubo *et al.*, 2004, Sanchez *et al.*, 2004, Thayer *et al.*, 2003, Watkins *et al.*, 2003). Les premiers cancers où une suractivation de la voie HH a été montrée sont les SCLC (Watkins *et al.*, 2003). Dans les tumeurs primaires de SCLC, 50% des cas montrent une surexpression de SHH et GLI1 alors que ceux-ci ne sont pas exprimés dans le poumon sain. L'activation de la voie HH dans le poumon normal adulte est uniquement observée lors de réparation de lésions. L'implication de la voie HH dans les SCLC a été confirmée grâce aux travaux sur des lignées cellulaires. Les membres de la voie HH sont exprimés dans ces lignées. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie HH inhibe la croissance des cellules *in vitro* et en souris nues.

En général, la plupart des travaux montrant une suractivation de la voie HH dans les cancers de type II se basent sur les observations suivantes : surexpression de ligand HH, surexpression des gènes cibles (généralement *GLI1* et/ou *PTCH*), blocage de l'activation par un inhibiteur de la voie HH, la cyclopamine majoritairement. Il est intéressant de noter que seule la surexpression de SHH, mais pas celles d'IHH ou de DHH, semble être impliquée dans les cancers de type II.

c- Rôle de la voie HH dans le développement des cancers

Le rôle de l'activation de la voie HH au cours de la tumorigenèse n'a pas encore été élucidé. Des gènes codant pour les protéines impliquées dans la prolifération (Cyclines D et E) et la survie cellulaire (BCL2) comptent parmi les gènes cible de la voie HH chez la drosophile et dans les kératinocytes humains (Duman-Scheel *et al.*, 2002, Regl *et al.*, 2004).

Ces 2 mécanismes jouant un rôle majeur dans la tumorigenèse, ils pourraient être le moyen par lequel la voie HH agit sur le développement des tumeurs. Récemment, il a également été montré, dans les médulloblastomes, que N-MYC était indispensable à la prolifération des cellules tumorales dépendante de l'activation de la voie HH (Hatton *et al.*, 2006).

Selon une théorie récente, il existe, dans les tumeurs, des cellules souches cancéreuses (CSC), sous-population de cellules qui seraient à l'origine de l'ensemble des cellules tumorales (Reya *et al.*, 2001). Il a été montré que la voie de signalisation HH était suractivée dans les CSC de cancers du sein au regard de la surexpression de *PTCH*, *GLI1* et *GLI2* (Liu *et al.*, 2006). Cette observation est d'autant plus intéressante que la voie HH est également impliquée dans le maintien des cellules souches normales du sein. L'activation de la voie HH dans les tumeurs pourrait participer à la tumorigenèse en maintenant la population de CSC.

d- Les inhibiteurs de la voie HH

La suractivation de la voie HH dans de nombreux cancers a conduit à cibler cette voie dans un but thérapeutique. Le premier inhibiteur connu de la voie est la cyclopatamine (Incardona *et al.*, 1998). Cet alcaloïde a été extrait de *Veratum californicum*, une plante dont la consommation par les brebis provoquait la naissance d'agneaux atteints d'holoproencéphalie, syndrome directement lié à une inhibition de la voie HH (Keeler and Binns, 1968). La cyclopatamine inhibe la voie HH en se fixant directement à SMO (Chen *et al.*, 2002). Depuis, de nombreux inhibiteurs agissant via SMO ont été développés (Fig.17).

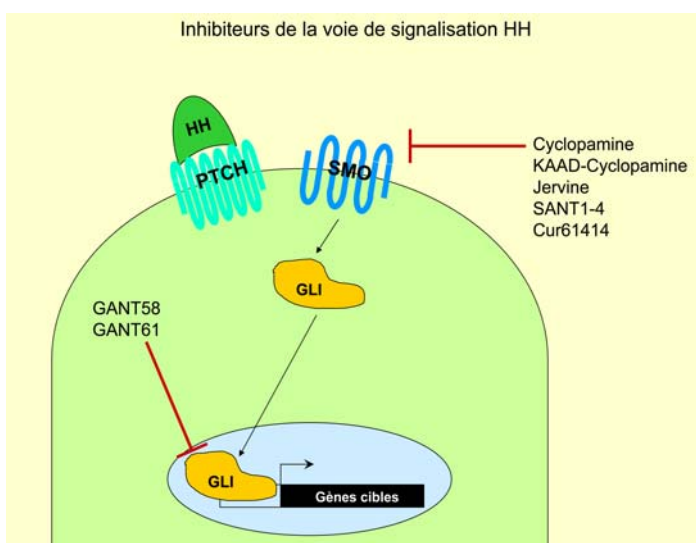


Figure 17 Inhibiteurs de la voie de signalisation HH.

La majorité des inhibiteurs décrits jusqu'à maintenant bloquent la voie de signalisation HH en se fixant à SMO. Récemment les inhibiteurs GANT58 et GANT61, agissant sur les facteurs de transcription GLI, ont été identifiés.

L'un d'eux est d'ores et déjà en phase clinique I pour le traitement des BCC (Garber, 2008). Le ciblage de SMO n'est pas forcément la meilleure approche thérapeutique

notamment dans le cas des médulloblastomes où des mutations de SUFU ont été identifiées. SUFU agissant en aval de SMO, les inhibiteurs tels que la cyclophamide ne sont pas capables d'inhiber la voie HH. Le ciblage des facteurs de transcription GLI est donc une alternative de plus en plus envisagée. Lauth *et al.* ont récemment isolé 2 inhibiteurs de la voie HH, GANT58 et GANT61, agissant sur GLI (Lauth *et al.*, 2007).

D- Interactions croisées des voies de signalisation WNT, TGF- β et HH

Les voies de signalisation WNT, TGF- β et HH sont importantes dans l'homéostasie de l'épithélium du côlon. Ces 3 voies de signalisation co-existent dans la crypte avec une voie WNT présente à la base des cryptes alors que les voies TGF- β et HH sont au sommet de la structure. Il n'est donc pas étonnant que des interactions croisées entre ces voies aient été mises en évidence (Fig.18).

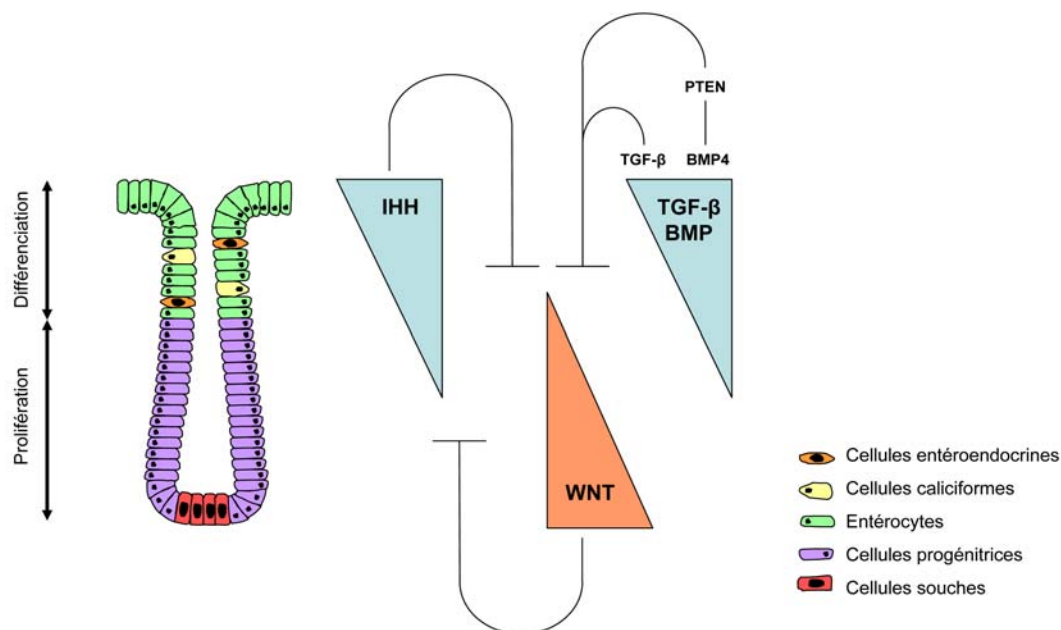


Figure 18 Interactions croisées des voies de signalisation HH, WNT et TGF- β dans le côlon adulte.

La voie WNT est active dans les cellules prolifératives des cryptes alors que les voies HH et TGF- β sont caractéristiques des cellules situées au sommet des cryptes. Celles-ci agissent négativement sur la voie WNT afin de limiter son activité à la base des cryptes. De même, la voie WNT agit négativement sur la voie HH en inhibant l'expression d'IHH.

L'interaction croisée la plus étudiée jusqu'à maintenant est celle entre les voies WNT et TGF- β . Il a notamment été montré que la voie TGF- β était capable d'inhiber la voie WNT. Plusieurs études ont mis en évidence un antagonisme entre TGF- β et la voie WNT dans

l'intestin (Gregorieff and Clevers, 2005). Plusieurs mécanismes ont été proposés. L'un d'eux établit que SMAD3 est capable d'interagir avec la β -caténine, dissociant ainsi le complexe TCF4- β -caténine (Sasaki *et al.*, 2003). BMP4 a également été montré comme inhibant la voie WNT. Cependant, dans ce cas, le mécanisme proposé est indirect. En effet, il implique une activation de PTEN qui serait à l'origine d'une répression de l'activité β -caténine/TCF par la voie PI3kinase/AKT (He *et al.*, 2004). La voie WNT est également capable d'agir sur la voie BMP en contrôlant l'expression d'antagonistes de BMP dans les cryptes (Kosinski *et al.*, 2007). Au cours de la tumorigenèse colorectale, la voie WNT est activée alors que la voie TGF- β est inhibée, ce qui est cohérent par rapport aux régulations antagonistes de ces 2 voies. Néanmoins, lorsque la voie TGF- β est active dans les cancers du côlon, elle pourrait participer au développement de la tumeur en coopérant avec la voie WNT, un certain nombre de gènes cibles de la voie WNT étant également des cibles de la voie TGF- β (Labbe *et al.*, 2007).

La voie HH interagit également avec les voies WNT et TGF- β . Peu de choses sont connues sur l'interaction croisée des voies HH et TGF- β . Le gène codant pour le ligand BMP4 est, par exemple, un gène cible de la voie HH comme cela a été montré dans les intestins du poulet (Sukegawa *et al.*, 2000). Les premiers éléments concernant l'interaction entre les voies HH et WNT ont été publiés en 2001. Il a été montré que SUFU était capable d'interagir avec la β -caténine et d'inhiber son activité transcriptionnelle (Meng *et al.*, 2001). Pendant la réalisation de ce travail, les travaux de van den Brink *et al.* ont suggéré également une inhibition de la voie WNT par la voie HH. En effet, la surexpression d'IHH dans la lignée cellulaire de cancer du côlon DLD1 s'accompagne d'une baisse de l'activité de la voie WNT suite à la répression de l'expression de TCF4 dans le noyau. A l'inverse, la surexpression d'un dominant négatif de TCF4 induit l'expression d'IHH, suggérant une inhibition croisée des voies HH et WNT dans ces cellules (van den Brink *et al.*, 2004).

But du travail

Par le passé, le laboratoire d'Oncologie Moléculaire s'est intéressé à la surexpression du gène *IGF2* dans les cancers du côlon. Ce gène, codant pour un facteur de croissance, est surexprimé dans 30% des cancers du côlon (Lambert *et al.*, 1990). Les surexpressions peuvent être particulièrement fortes avec des transcrits *IGF2* 800 fois plus abondants dans la tumeur par rapport au tissu sain d'un même patient. De fortes surexpressions d'*IGF2* se retrouvent également dans les rhabdomyosarcomes qui se développent chez les souris *Ptch*^{+/-} où la voie de signalisation HH est suractivée (Hahn *et al.*, 2000). Cette observation a suscité notre intérêt pour la voie HH mais nous n'avons pu établir aucun lien entre la voie de signalisation HH et l'expression d'*IGF2* dans les cancers du côlon. Néanmoins, la caractérisation de la voie HH dans les cancers du côlon a été poursuivie, cette étude présentant un intérêt majeur. En effet la voie de signalisation HH joue un rôle essentiel dans le développement du tractus gastro-intestinal et est un acteur critique de l'homéostasie de l'épithélium du côlon. De plus, la littérature émergente démontre une implication grandissante de la voie HH dans de nombreux cancers alors que dans le cas des cancers du côlon, les résultats sont peu nombreux et contradictoires.

La **section I des résultats** traite de l'étude de l'expression des membres de la voie HH dans les cancers du côlon. Cette étude s'est principalement focalisée sur les lignées cellulaires de cancers du côlon et indique que la voie HH n'est pas activée, contrairement à ce qui a pu être montré dans d'autres cancers du tractus gastro-intestinal. Des résultats obtenus à partir de tumeurs primaires sont également présentés.

La cyclopamine, inhibiteur de la voie de signalisation HH, a ensuite été utilisée dans les lignées cellulaires de cancers du côlon. Ces expériences ont permis de confirmer que la voie de signalisation HH était inactive dans les lignées (**Section II des résultats**). Une partie des résultats des sections 1 et 2 ont fait l'objet d'un article (Annexe 1).

Enfin, la voie de signalisation HH a été activée artificiellement, en surexprimant *GLI1*, dans la lignée cellulaire de côlon HCT116 afin de déterminer son effet dans des cellules de côlon. Ces résultats, présentés dans la **section III**, montrent que la *BMP4* est un gène cible de la voie HH dans les cellules humaines de côlon et que la différenciation y est stimulée.

Résultats

I. Etude de l'expression des membres de la voie de signalisation HH dans les cancers du côlon

Afin d'étudier la voie de signalisation HH dans les cancers du côlon, nous avons décidé d'utiliser comme modèle d'étude des lignées cellulaires dérivées de cancers du côlon. Les résultats d'une analyse préliminaire de quelques tumeurs primaires de côlon sont également présentés.

A- Les lignées cellulaires

Les lignées cellulaires présentent l'avantage de fournir une source infinie de matériel biologique. De plus, dans le cadre de l'étude de l'implication de la voie HH dans les cancers, il a été observé que la voie était activée dans les lignées cellulaires au même titre que dans les tumeurs primaires. C'est notamment le cas dans les cancers du pancréas, du poumon à petites cellules, de la prostate ou encore du sein (Kubo *et al.*, 2004, Sanchez *et al.*, 2004, Thayer *et al.*, 2003, Watkins *et al.*, 2003). Nous avons utilisé 7 lignées cellulaires dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau I de la section matériel et méthodes.

1- Le ligand HH

Concernant les ligands HH, nous nous sommes intéressés uniquement à SHH et IHH. En effet, aucune expression et *a fortiori* fonction n'ont été décrites pour DHH dans le tractus gastro-intestinal que ce soit chez l'adulte ou chez l'embryon, contrairement à IHH et à SHH.

Dans un premier temps, l'expression de la protéine HH a été étudiée par *Western Blot* en utilisant un anticorps reconnaissant les 3 formes de HH. En effet, cet anticorps commercial

(Santa Cruz Biotechnology) est dirigé contre le peptide correspondant aux acides aminés 41 à 200 de la partie N-terminale de la protéine humaine SHH. Cette région présente 93% d'identité avec la partie N-terminale d'IHH (Fig.1A et 1B). Afin de tester l'anticorps, un vecteur d'expression pJT4-SHH codant pour la protéine SHH de poulet a été transfecté dans la lignée cellulaire NIH3T3. Par *Western Blot*, l'anticorps utilisé permet de détecter 2 bandes correspondant aux formes native et clivée de SHH dans les cellules transfectées par rapport aux cellules non transfectées. L'une est d'environ 45 kDa, poids moléculaire de la protéine SHH non clivée et l'autre est de 20 kDa, ce qui correspond à la forme clivée active de HH (Fig.1C).

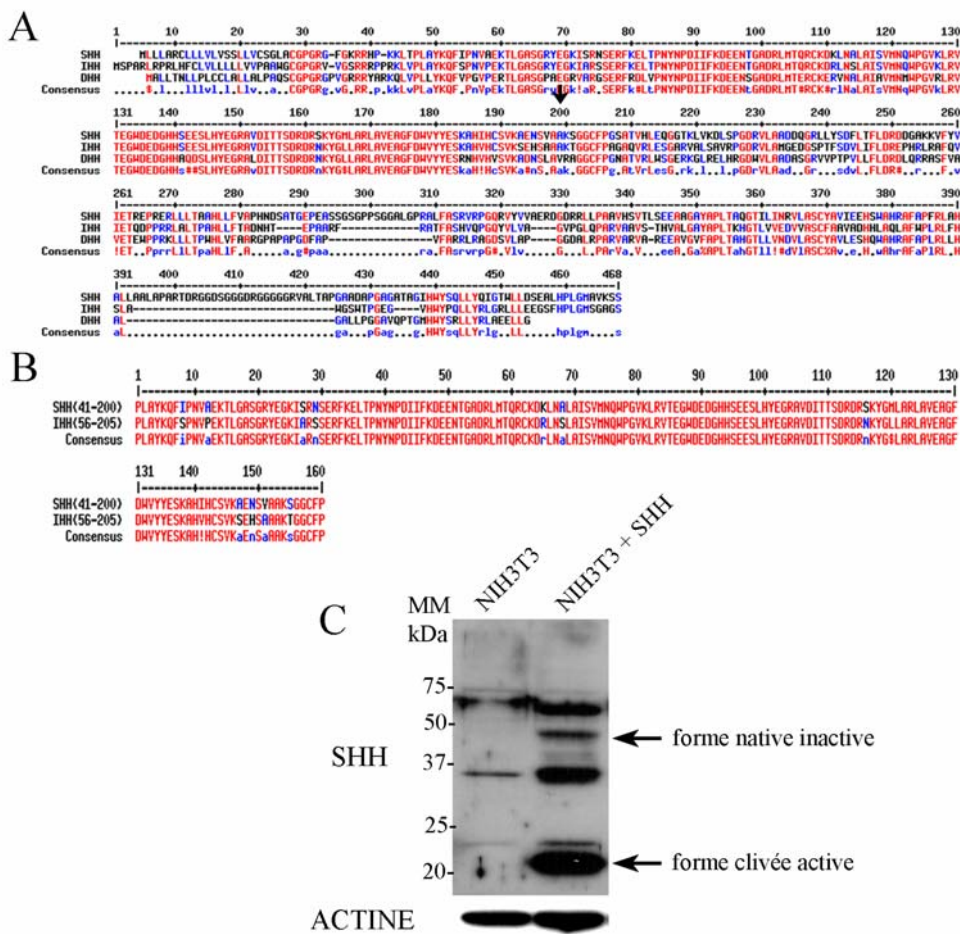


Figure 1 Les différentes formes de HH.
 (A) Alignement des séquences protéiques humaines de SHH (Q15465), IHH (Q14623) et DHH (O43323) grâce au programme Multalin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>). Les différentes formes de HH sont homologues dans leurs parties N-terminales qui correspondent à la forme clivée active de HH. La flèche indique le site de clivage. (B) Alignement de la séquence protéique de SHH, reconnue par l'anticorps anti-SHH, avec la séquence correspondante d'IHH. L'identité est de 93%. (C) *Western Blot* réalisé avec l'anticorps anti-SHH (H-160) de Santa Cruz Biotechnology. Les cellules NIH3T3 ont été transfectées ou non avec le plasmide pJT4-SHH codant pour la protéine SHH du poulet. Les formes native (45kDa) et clivée (20kDa) de SHH sont indiquées par une flèche. L'actine a été utilisée comme standard interne.

La Fig.2A montre l'expression de la forme clivée de HH dans les lignées cellulaires de cancers du côlon, la forme non clivée de 45 kDa n'y étant pas détectée par *Western Blot*. Les lignées cellulaires, en fonction de leur niveau d'expression de HH, peuvent être subdivisées en 3 groupes : absence d'expression (Colo320 et HCT116), expression modérée (Colo205 et SW480) et forte expression (HT29, WiDr et Caco-2). Afin d'exercer un effet autocrine (ou paracrine), les facteurs HH doivent être sécrétés dans le milieu extracellulaire. Pour vérifier que les facteurs HH étaient bien sécrétés, les milieux dans lesquels les cellules ont été cultivées pendant 5 jours ont été collectés et analysés par *Western Blot* (Fig.2B). Les résultats montrent que les cellules qui expriment HH le sécrètent également. Parmi les cellules à expression modérée, les cellules Colo205 accumulent, en 5 jours de culture, une quantité de protéine HH se rapprochant des quantités sécrétées par les lignées exprimant fortement HH dans le cytoplasme.

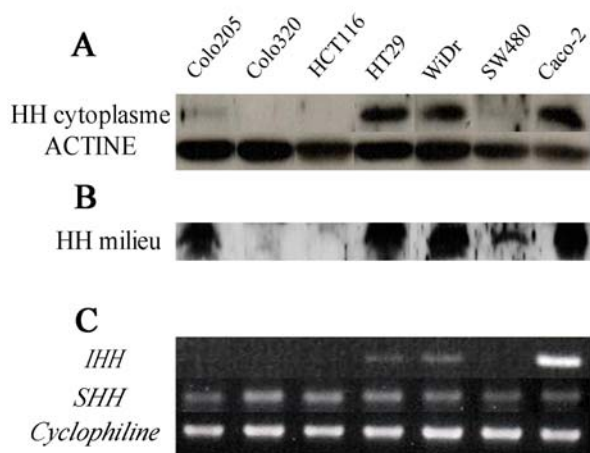


Figure 2 Expression de HH dans les lignées cellulaires de cancers du côlon.

L'expression de la protéine HH a été mise en évidence par *Western Blot* grâce à l'anticorps anti-SHH (H-160, Santa Cruz biotechnology). Des extraits cytoplasmiques (A) ou des milieux conditionnés (B) de lignées cellulaires de cancers du côlon ont été utilisés. L'actine a été utilisée comme standard interne. (C) l'expression des transcrits *SHH* et *IHH* a été déterminée par RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques. La *cyclophiline* a été utilisée comme standard interne.

L'anticorps utilisé ne permettant pas de discriminer les différentes formes de HH, les expressions d'*IHH* et de *SHH* ont été évaluées par RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques de chaque forme. Le résultat présenté dans la Figure 2C montre la présence de transcrits *SHH* dans toutes les lignées, alors que l'ARNm *IHH* n'est détecté que dans les 3 lignées dans lesquelles une forte expression de la protéine HH a été observée : HT29, WiDr et Caco-2 (Fig.2A). Cette corrélation suggère que la majorité des protéines HH mises en évidence par *Western Blot* correspond à *IHH*.

Les résultats de l'étude de l'expression et de la sécrétion de HH indiquent que la voie HH pourrait être activée de façon autocrine dans 5 des 7 lignées de cancers du côlon étudiées.

2- PTCH et SMO

L'activation autocrine de la voie HH requiert l'expression des protéines membranaires PTCH et SMO, responsables de la transmission du signal induit par le ligand HH présent dans le milieu extracellulaire. L'expression de ces 2 membres clés de la voie HH a été étudiée par RT-PCR (Fig.3). *PTCH* est exprimé dans toutes les lignées tandis que *SMO* est exprimé seulement dans 4 des 7 lignées : Colo320, HCT116, SW480 et Caco-2. De façon assez surprenante, *SMO* n'est pas exprimé dans les cellules Colo205, HT29 et WiDr. Ce résultat indique que la voie HH, malgré la présence de HH dans le milieu, ne peut être activée de façon autocrine dans ces lignées.

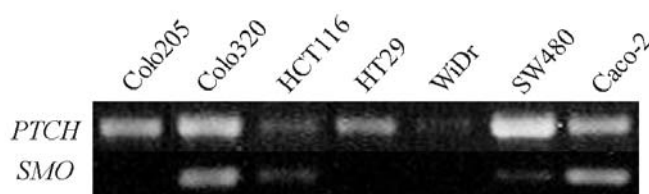


Figure 3 Expression de *PTCH* et *SMO* dans les lignées cellulaires de cancers du côlon. L'expression des transcrits *PTCH* et *SMO* a été déterminée par RT-PCR.

3- Les facteurs de transcription GLI

Les facteurs de transcription GLI1-3 participent à la transduction du signal HH en régulant l'expression des gènes cibles de la voie. Leurs expressions ont été caractérisées dans les lignées cellulaires de côlon par RT-PCR ainsi que par *Western Blot* dans les cas de GLI1 et GLI3. Enfin, l'activité des facteurs de transcription a été évaluée à l'aide du vecteur rapporteur 3'GLIBS.

a- GLI1

Les résultats de RT-PCR montrent que le transcrit *GLI1* est exprimé dans toutes les lignées à l'exception de SW480 (Fig.4A). Une faible expression est détectée dans les lignées Colo205 et Caco-2 tandis que les autres lignées présentent des niveaux d'expression plus importants. La présence de la protéine GLI1 a été analysée par *Western Blot* afin de confirmer le résultat de RT-PCR. Comme contrôle positif, le vecteur d'expression pCDNA3.1-GLI1, codant pour la protéine GLI1 humaine, a été transfecté dans les cellules HCT116. Une bande

de 150 kDa, taille attendue pour GLI1, est clairement visible dans les cellules transfectées. En revanche, aucun signal n'est observé dans les extraits des cellules HCT116 parentales ainsi que dans les autres lignées cellulaires de cancers du côlon (Fig.4B). Un autre anticorps anti-GLI1 (N-16 ; Santa Cruz Biotechnology) a également été testé sans succès (résultat non montré). Ce résultat indique que la protéine GLI1 est absente ou alors présente en faible quantité dans les lignées cellulaires de côlon.



Figure 4 Expression de GLI1 dans les lignées cellulaires de cancers du côlon. (A) L'expression des transcrits *GLI1* a été déterminée par RT-PCR. (B) L'anticorps anti-GLI1 (H-300, Santa Cruz Biotechnology) a été utilisé pour réaliser un *Western Blot*. Aucune expression de la protéine GLI1 n'est observée dans les lignées cellulaires de cancers du côlon contrairement aux cellules HCT116 transfectées avec le vecteur d'expression pCDNA3.1-GLI1.

b- GLI2

L'expression de *GLI2* a été analysée uniquement par RT-PCR. *GLI2* est exprimé dans 5 des 7 lignées cellulaires étudiées. Dans trois lignées (HCT116, HT29, WiDr), l'expression est faible tandis que dans 2 autres lignées (Colo320 et SW480), l'expression est plus forte (Fig.5).

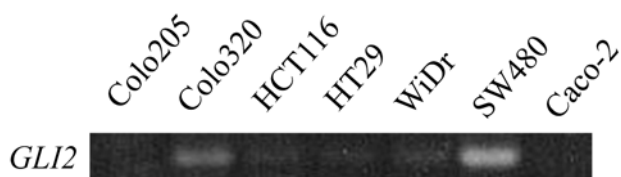


Figure 5 Expression de *GLI2* dans les lignées cellulaires de cancers du côlon. L'expression des transcrits *GLI2* a été déterminée par RT-PCR.

c- GLI3

Les résultats de RT-PCR montrent que *GLI3* est exprimé dans 2 lignées seulement, Colo320 et SW480 (Fig.6A). Contrairement à GLI1 et GLI2, le rôle principal de GLI3 est d'agir comme un régulateur négatif de la voie HH lorsque celle-ci est inactive. La protéine

GLI3 a été montrée comme étant activatrice sous sa forme entière (GLI3A) tandis qu'elle a un effet répresseur lorsqu'elle est clivée (GLI3R). Le clivage de GLI3 est inhibé en présence de HH (Altaba, 1999, Bai *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2000).

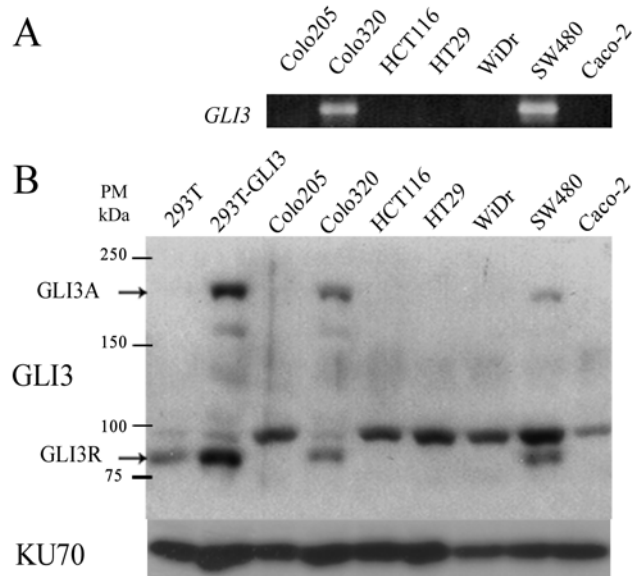


Figure 6 Expression de GLI3 dans les lignées cellulaires de cancers du côlon (A) L'expression des transcrits *GLI3* a été déterminée par RT-PCR. (B) L'anticorps anti-GLI3 (H-280, Santa Cruz Biotechnology) a été utilisé pour réaliser un *Western Blot*. Les cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur d'expression pREP4-GLI3. La forme native activatrice de GLI3 (GLI3A) ainsi que la forme clivée répresseur de GLI3 (GLI3R) sont indiquées par des flèches. KU70 a été utilisée comme standard interne.

L'expression de GLI3 a été déterminée par *Western Blot* afin de détecter les formes de GLI3 présentes dans les lignées cellulaires du côlon. Un anticorps (H-280, Santa Cruz Biotechnology) reconnaissant la partie N-terminale de GLI3 (acides aminés 1-280) a été utilisé. Il permet de détecter la protéine entière GLI3A de 190 kDa et la forme clivée GLI3R de 83 kDa. Pour disposer d'un contrôle positif, le vecteur d'expression pREP4-GLI3, codant pour la protéine GLI3 humaine, a été transfecté dans la lignée 293T. Celle-ci exprime GLI3 de façon endogène (Agren *et al.*, 2004). Des extraits protéiques enrichis en protéines nucléaires ont été préparés. L'anticorps révèle 3 bandes : 2 bandes ont les tailles attendues de 190 et 83 kDa ; la 3^{ème} bande a une taille de 95 kDa (Fig.6B). Après transfection de pREP4-GLI3, seule l'intensité des bandes de 190 et de 83 kDa augmente, confirmant que ces dernières correspondent aux formes GLI3A et GLI3R. En revanche, l'intensité de la troisième bande ne change pas et correspond donc à une fixation non spécifique de l'anticorps. Dans les lignées cellulaires Colo320 et SW480, les 2 formes de la protéine GLI3 sont détectées ce qui signifie que GLI3 est clivée dans ces lignées, du moins partiellement. Le clivage de GLI3 dans les lignées Colo320 et SW480 semble donc indiquer que la voie HH y est inactive.

d- Activité des facteurs de transcription GLI

La combinaison de facteurs de transcription GLI varie d'une lignée à l'autre. Par exemple, la lignée Caco-2 n'exprime que *GLI1* alors que la lignée Colo320 exprime les 3 facteurs de transcription GLI. Les vecteurs 3'GLIBS et m3'GLIBS ont été utilisés pour déterminer l'activité des facteurs de transcription GLI (Fig.7A).

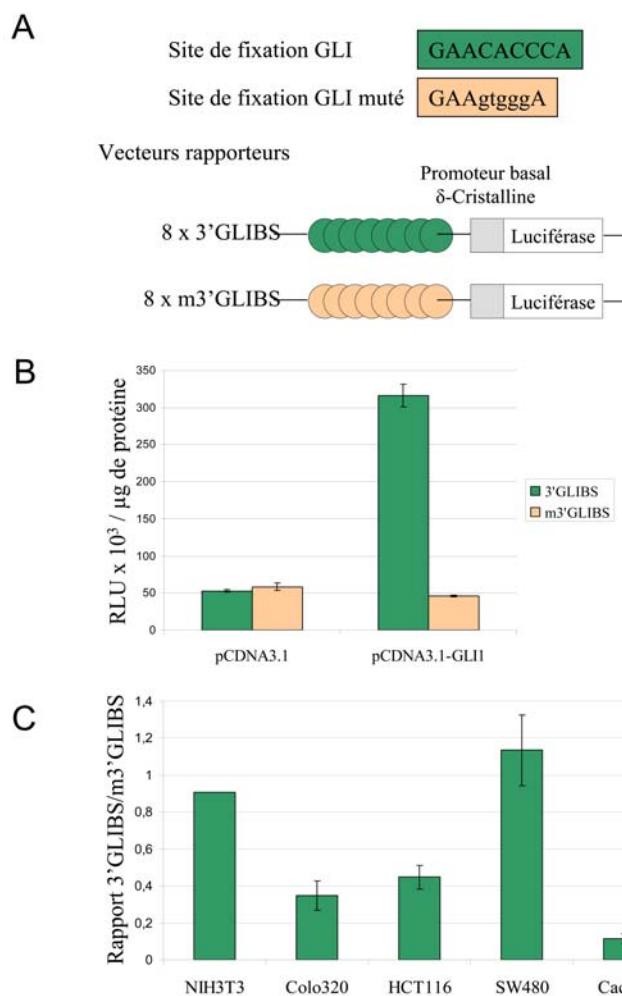


Figure 7 Activité des facteurs de transcription GLI dans les lignées cellulaires de cancers du côlon.

(A) Représentation schématique des vecteurs rapporteurs 3'GLIBS et m3'GLIBS qui contiennent chacun 8 sites de fixation, normaux ou mutés respectivement, pour les facteurs de transcription GLI. Ces sites sont placés en amont du promoteur minimal du gène δ -Cristalline qui dirige l'expression du gène rapporteur luciférase (Sasaki *et al.*, 1997). (B) Stimulation de l'expression du vecteur 3'GLIBS par GLI1 dans la lignée murine NIH3T3. Le vecteur m3'GLIBS est insensible à GLI1. Les résultats sont la moyenne de 3 mesures d'une même expérience +/- SE. (C) Rapport 3'GLIBS/m3'GLIBS dans la lignée NIH3T3 et les lignées cellulaires de cancers du côlon. Les résultats sont la moyenne de 3 expériences indépendantes +/- SE à l'exception de la lignée NIH3T3 où il s'agit du résultat d'une seule expérience.

Les facteurs de transcription GLI se fixent sur la séquence consensus GACCACCCA au niveau du promoteur de leurs gènes cibles. Sasaki *et al.* ont construit un vecteur rapporteur luciférase appelé 3'GLIBS répondant aux facteurs de transcription GLI. Une version du vecteur possédant des sites de fixation GLI mutés, m3'GLIBS, a également été construite (Fig.7A) (Sasaki *et al.*, 1997). Lorsque le vecteur 3'GLIBS est utilisé, l'expression de la luciférase est fortement stimulée par le facteur de transcription GLI1. En revanche, le vecteur m3'GLIBS est insensible à GLI1 (Fig.7B). Les facteurs de transcription GLI2 et GLI3 se fixent sur les mêmes sites que GLI1 mais leur capacité à activer l'expression de la luciférase du vecteur 3'GLIBS est moins importante (Bhatia *et al.*, 2006). Le rapport de l'activité

luciférase des vecteurs 3'GLIBS et m3'GLIBS a été mesuré dans les lignées cellulaires Colo320, HCT116, SW480 et Caco-2. Ce rapport n'a pu être évalué dans les lignées Colo205, HT29 et WiDr, l'efficacité de transfection dans ces lignées étant très faible. Les résultats montrent que l'activité du vecteur 3'GLIBS n'est pas stimulée par rapport à l'activité du vecteur m3'GLIBS. Le rapport est égal à 1 dans la lignée SW480 comme dans la lignée NIH3T3 tandis qu'il est inférieur à 1 dans les lignées Colo320, HCT116 et Caco-2. Ces résultats indiquent donc que les facteurs de transcription GLI endogènes n'activent pas la transcription dans les lignées cellulaires de cancers du côlon.

4- Régulateurs négatifs de la voie HH

L'absence d'expression de certains membres de la voie HH (HH, SMO par exemple), le clivage de GLI3 ou encore l'absence d'activité des facteurs de transcription GLI laissent penser que la voie de signalisation HH est inactive dans les lignées cellulaires de cancers du côlon étudiées. Il était donc intéressant de compléter la caractérisation de la voie HH en étudiant l'expression de régulateurs négatifs de la voie HH que sont SUFU, HHIP et ZIC.

a- SUFU

SUFU est une protéine capable de se fixer aux facteurs de transcription GLI et d'inhiber leur activité (Stone *et al.*, 1999). Stone *et al.* ont identifié deux transcrits alternatifs de *SUFU* (Fig.8A).

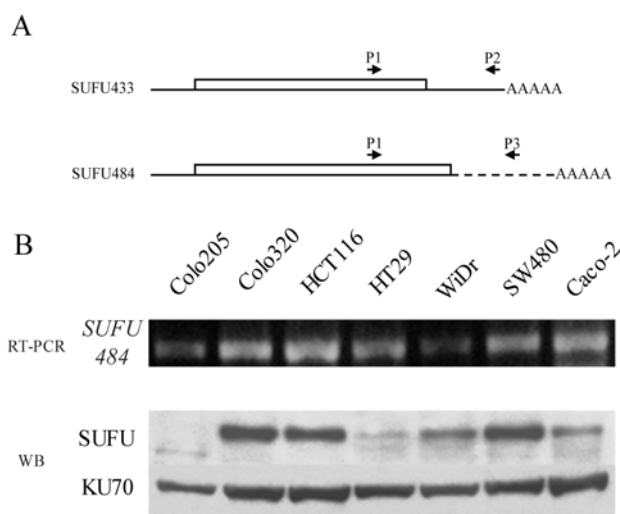


Figure 8 Expression de SUFU dans les lignées cellulaires de cancers du côlon.

(A) Représentation schématique des transcrits *SUFU484* et *SUFU433* ainsi que des paires d'amorces permettant leur détection par RT-PCR (Stone *et al.*, 1999). (B) L'expression de *SUFU484* a été déterminée par RT-PCR en utilisant les amorces P1 et P3. (C) L'anticorps anti-SUFU (C-15 ; Santa Cruz Biotechnology) a été utilisé pour détecter SUFU par *Western Blot* (WB). KU70 a été utilisée comme standard interne.

L'un code pour une protéine de 484 aa (SUFU484) tandis que le second code pour une protéine plus courte de 433 aa (SUFU433). Le transcrit *SUFU484* est le transcrit majoritaire dans la plupart des organes, dont le côlon. En utilisant les amorces décrites par Stone et *al.* (Fig.8A), nous avons analysé par RT-PCR l'expression de *SUFU484* dans les lignées cellulaires de cancers du côlon (Fig.8B). *SUFU484* est exprimé dans toutes les lignées de cancers du côlon. De même, la protéine correspondante de 54 kDa a été détectée par *Western Blot* dans toutes les cellules (Fig.8C). On peut remarquer une bande de taille inférieure dans les extraits protéiques des cellules Colo205. Cette bande pourrait correspondre à une fixation non spécifique de l'anticorps. Elle pourrait également être une forme tronquée de la protéine due à une mutation du gène correspondant. Récemment, de nouveaux transcrits alternatifs codant pour des protéines différentes de SUFU484 ont été identifiés (Grimm *et al.*, 2001). Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour connaître l'origine de la bande observée avec l'anticorps anti-SUFU dans la lignée Colo205. Colo205 est une lignée où *SMO*, *GLI2* et *GLI3* ne sont pas exprimées et où le taux de *GLII* est faible. Une perte de fonction du SUFU n'aurait *a priori* que peu de conséquences sur l'état d'activation de la voie dans cette lignée.

b- HHIP

La protéine HHIP participe au rétrocontrôle négatif de la voie HH. L'activation de la voie HH stimule l'expression de HHIP dont le rôle est d'atténuer le signal en se liant au ligand HH et en l'empêchant de se fixer à son récepteur (Chuang and McMahon, 1999).

L'expression de *HHIP* a été étudiée par RT-PCR (Fig.9). *HHIP* n'est exprimé que dans les lignées Colo320 et SW480. Ce profil d'expression fait penser à celui de *GLI3*, également inhibiteur de la voie quand il est clivé.

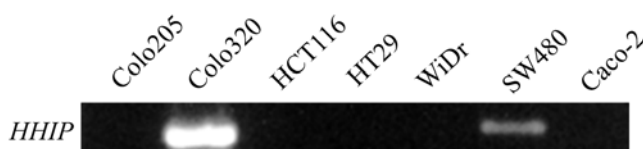


Figure 9 Expression de *HHIP* dans les lignées cellulaires de cancers du côlon. L'expression des transcrits *HHIP* a été déterminée par RT-PCR.

c- Les facteurs de transcription ZIC

Selon Mizugishi *et al.*, l'activité des facteurs de transcription GLI peut être régulée, négativement ou positivement, selon le type cellulaire, par les facteurs de transcription ZIC1-3 (Mizugishi *et al.*, 2001). Les niveaux d'expression de ZIC1-3 ont été étudiés dans les lignées cellulaires de cancers du côlon par RT-PCR (Fig.10). Alors que ZIC1 et ZIC3 ne sont pas exprimés, une expression de ZIC2 est détectable dans toutes les lignées. L'expression est faible dans les lignées cellulaires Colo320 et WiDr mais particulièrement élevée dans les lignées Colo205 et HCT116.

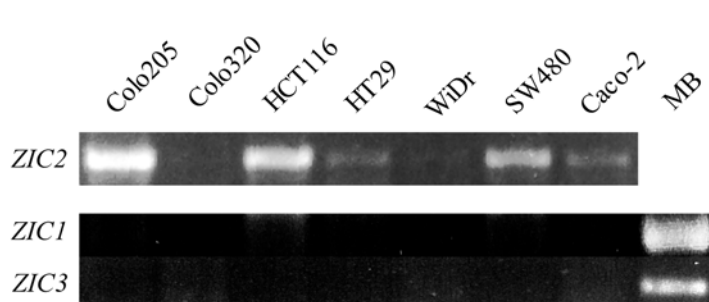


Figure 10 Expression de ZIC1-3 dans les lignées cellulaires de cancers du côlon.

L'expression des transcrits ZIC1, ZIC2 et ZIC3 a été déterminée par RT-PCR grâce à des amorces spécifiques. Pour ZIC1 et ZIC3, des ARN extraits d'un médulloblastome (MB) ont été utilisés comme contrôle positif.

B- Les tumeurs primaires

Afin de compléter l'étude de l'expression des membres de la voie HH dans les cancers du côlon, l'expression des transcrits de certains membres a été étudiée dans des tumeurs primaires de côlons. Des résections de tumeurs ainsi que les tissus sains correspondants de 8 patients ont été collectés au CHU de Liège. Les caractéristiques des tumeurs et des patients sont reprises dans le tableau 2 (Section matériel et méthodes). La faible quantité d'ARN extrait des tissus ne permettant pas d'étudier l'expression de tous les membres de la voie HH, nous nous sommes focalisés sur *IHH*, *SHH*, *PTCH*, *SMO*, *HHIP* et *ZIC2*. Les expressions ont été caractérisées par RT-PCR.

Les tissus prélevés chez les patients comportent plusieurs types cellulaires. Dans le côlon des mammifères, la voie de signalisation HH fonctionne de façon paracrine. Les ligands IHH et SHH sont exprimés dans l'épithélium alors que les autres membres de la voie sont exprimés dans les cellules adjacentes (Madison *et al.*, 2005, van den Brink, 2007). La cytokératine 8 (CK8) a été utilisée comme marqueur épithélial pour s'assurer de la présence de la fine couche d'épithélium qui peut être facilement perdue lors de la manipulation des

tissus. Ce marqueur a été choisi car son expression et sa spécificité cellulaire ne sont pas altérées dans les cancers du côlon (Ditzel *et al.*, 2002). Dans les cas des patients 3, 4 et 6, l'expression de *CK8* est très faible dans le tissu sain par rapport à la tumeur. Seul le cas du patient 4 est présenté dans la Figure 11. Ce résultat indique qu'il n'y a pas ou peu d'épithélium dans les résections provenant de ces patients. A l'inverse, chez le patient 2, l'expression de *CK8* est diminuée dans la tumeur par rapport au tissu sain, ce qui indique que la résection de tumeur extraite de ce patient contient une faible proportion de cellules épithéliales. Au microscope il apparaît que ce prélèvement contient un ganglion. Les prélèvements des patients 2, 3, 4 et 6 ont été considérés comme étant non informatifs.

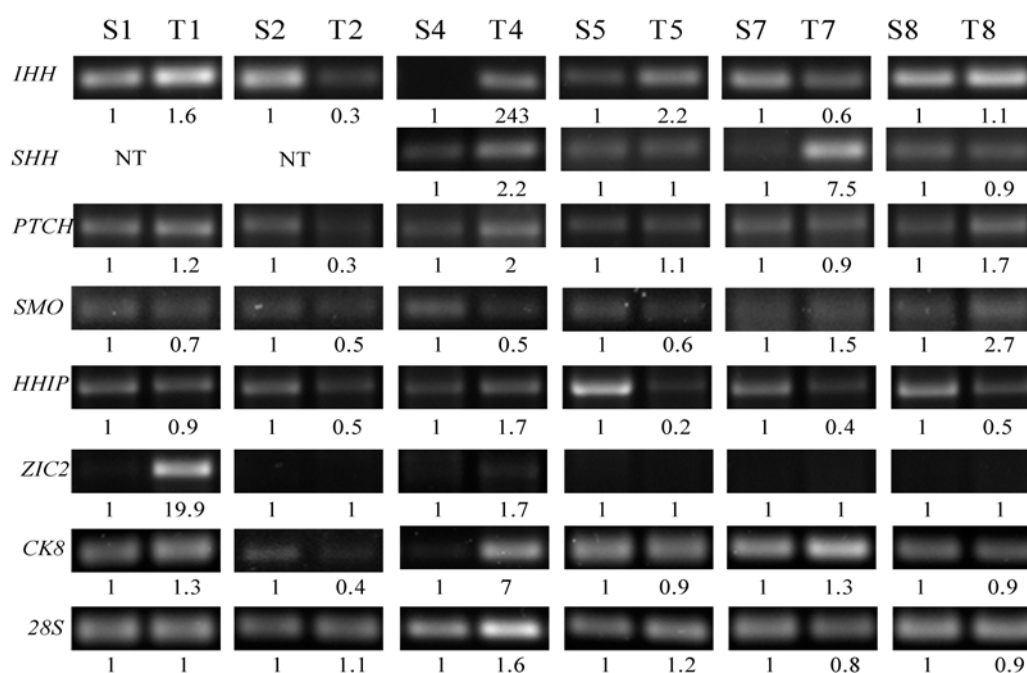


Figure 11 Expression des membres de la voie de signalisation HH dans les tumeurs primaires de cancers du côlon.

L'expression des gènes *IHH*, *SHH*, *PTCH*, *SMO*, *HHIP* et *ZIC2* a été analysée par RT-PCR dans les tissus sains (S) et tumeurs (T) de patients atteints de cancers du côlon. L'intensité des bandes a été quantifiée à l'aide du programme "Quantity One". Les valeurs indiquées correspondent au rapport de l'intensité des bandes dans les tumeurs *versus* le tissu sain. L'expression de *CK8* est utilisée comme marqueur épithélial alors que l'ARNr 28S est utilisé comme standard interne.

Les prélèvements des tissus sains et cancéreux des patients 1, 5, 7 et 8 contiennent des niveaux d'expression comparables de *CK8* (Fig.11). Une augmentation de l'expression de HH est observée dans les tumeurs des patients 5 (*IHH*) et 7 (*SHH*) tandis qu'une légère diminution d'expression d'*IHH* est visible chez le patient 7. En ce qui concerne *SMO*, le patient 8 présente une surexpression de 2,7 fois dans la tumeur par rapport au tissu sain. L'observation la plus marquante est la diminution d'expression de *HHIP* dans 3 des 4 tumeurs. Par contre, l'expression de *PTCH* est comparable dans les tumeurs et les tissus sains.

Enfin, une seule tumeur primaire (patient 1) présente une expression de *ZIC2* (Fig.11), contrairement aux lignées cellulaires de cancers du côlon où l'expression est systématique (Fig.10). Aucune expression de *ZIC2* n'est observable dans les tissus sains de patients.

C- Conclusion

La voie de signalisation HH est suractivée dans un certain nombre de cancers (Rubin and de Sauvage, 2006). Dans les cancers de type I, la suractivation est due à des mutations de *PTCH*, *SMO* ou encore *SUFU* tandis que dans les cancers de type II, elle résulte de la surproduction de ligand HH. L'expression des membres clés de la voie HH a été caractérisée dans 7 lignées cellulaires de cancers du côlon (Tab.1).

	Colo205	Colo320	HCT116	HT29	WiDr	SW480	Caco-2
HH (Protéine)	+	-	-	+++	+++	+	+++
IHH	-	-	-	+	+	-	+
SHH	+	+	+	+	+	+	+
PTCH	+	+	+	+	+	+	+
SMO	-	+	+	-	-	+	+
GLI1	+	+	+	+	+	-	+
GLI2	-	+	+	+	+	+	-
GLI3	-	+	-	-	-	+	-
GLI3 clivage	-	oui	-	-	-	oui	-
SUFU (Protéine)	tronquée?	+	+	+	+	+	+
SUFU484	+	+	+	+	+	+	+
HHIP	-	+	-	-	-	+	-
ZIC1	-	-	-	-	-	-	-
ZIC2	+	+	+	+	+	+	+
ZIC3	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 1 Tableau récapitulant la caractérisation de la voie de signalisation HH dans les lignées cellulaires de cancers du côlon.

Les résultats indiquent que la voie de signalisation HH ne peut pas être activée de façon autocrine dans les lignées cellulaires de cancers du côlon. En effet, la protéine HH n'est pas présente dans les lignées cellulaires HCT116 et Colo320 tandis que dans les lignées Colo205, HT29 et WiDr, *SMO* n'est pas exprimé alors qu'il est indispensable à la transduction du signal. En ce qui concerne SW480, *GLII* n'est pas exprimé. L'absence de *GLI1* va à l'encontre d'une possible activation de la voie HH dans cette lignée, puisque *GLI1* est le facteur de transcription principal qui active les gènes cibles de la voie. De plus, son expression a été montrée comme stimulée lorsque la voie HH est activée. Enfin, la lignée Caco-2 présente certaines caractéristiques de cellules dont la voie HH est suractivée avec une expression de protéine HH et l'expression des membres *PTCH* et *GLII* qui sont aussi des

gènes cibles de la voie. Cependant, les facteurs de transcription *GLI2* et *GLI3* ne sont pas exprimés et il n'y a pas d'activité GLI dans cette lignée, comme l'indique la transfection des vecteurs rapporteurs 3'GLIBS et m3'GLIBS dans ces cellules. L'activité de 3'GLIBS est même 10 fois plus faible que l'activité m3'GLIBS dans les cellules Caco-2. Cette observation tend à penser qu'il pourrait y avoir une inhibition de la transcription via les sites de fixation à GLI dans ces cellules.

L'analyse d'un large panel de membres de la voie HH montre qu'aucune des lignées cellulaires de côlon étudiées n'a le profil d'une lignée où la voie HH est activée de façon autocrine comme c'est le cas dans les lignées cellulaires des cancers de type II. Il est difficile de dégager un mécanisme d'inactivation de la voie HH commun à toutes les lignées. Le profil d'expression des membres de la voie HH diffère d'une lignée à l'autre, semblant indiquer des dérégulations de l'expression des gènes. Seule l'expression de *ZIC2* dans toutes ces lignées constitue un dénominateur commun. *ZIC2* inhibe l'activation des facteurs de transcription GLI dans la lignée cellulaire humaine 293T. Mais cet effet semble dépendre du type cellulaire car dans le cas des cellules C3H10T1/2, l'action de *ZIC2* est synergique avec celle de *GLI1* (Mizugishi *et al.*, 2001).

L'étude réalisée sur les lignées cellulaires a été étendue à 8 tumeurs colorectales prélevées sur des patients au CHU de Liège. En utilisant le marqueur épithélial de côlon CK8, il a été montré que 4 cas ne pouvaient pas être utilisés pour comparer les expressions dans les tumeurs et les tissus sains. Ce résultat met en exergue l'importance de l'utilisation d'un marqueur épithélial pour ce type d'études. Parmi les 4 cas restants, le premier constat que l'on peut faire est que *SHH*, *IHH*, *PTCH*, *SMO* et *HHIP* sont exprimés dans les tissus sains de côlon. Ce résultat concorde avec une activation paracrine de la voie HH dans le côlon adulte normal telle qu'elle a pu être décrite chez la souris par exemple (Madison *et al.*, 2005). Bien que l'expression de *HH*, *HHIP* ou *SMO* varie sensiblement dans certaines tumeurs, l'expression de *PTCH* reste inchangée dans les tumeurs en comparaison des tissus sains. Ce résultat est intéressant puisqu'il indique que la voie HH n'est pas suractivée ou inhibée dans les tumeurs colorectales étudiées, l'augmentation de l'expression de *PTCH* étant un indicateur de l'activation de la voie HH. Une étude sur un plus grand nombre de tumeurs doit être envisagée afin de rendre cette observation significative.

II. Effet de la cyclopamine sur les lignées de cancers du côlon

La cyclopamine a été découverte en 1968 et son effet bloquant de la voie de signalisation HH a été montré en 1998 (Cooper *et al.*, 1998, Incardona *et al.*, 1998, Keeler and Binns, 1968). Cette inhibition se fait par l'intermédiaire d'une fixation à SMO. Ce mode d'action est intéressant car il permet à la cyclopamine de bloquer des activations de la voie HH dues, soit à la présence de ligands (cancers de type II), soit à des mutations de *PTCH* ou *SMO* (cancers de type I).

Les résultats de la 1^{ère} partie de ce travail indiquent que la voie de signalisation HH n'est pas activée dans les lignées cellulaires de cancers du côlon. Le profil d'expression des membres de la voie HH n'est effectivement pas en adéquation avec une activation autocrine de la voie HH dans ces cellules. Cependant, il n'est pas exclu que des mutations puissent être à l'origine de suractivation de la voie HH dans certaines cellules. Par exemple, dans la lignée HCT116, alors qu'il n'y a pas d'expression des ligands HH, les autres membres de la voie sont exprimés. Dans cette lignée, on ne peut donc pas exclure une suractivation de la voie HH indépendante du ligand par mutations de *PTCH* ou *SMO*. La cyclopamine a donc été utilisée sur les lignées de cancers du côlon afin de vérifier que la voie HH n'est pas suractivée dans les lignées, soit par surexpression de ligand, soit par mutation de *PTCH* ou *SMO*.

A- Les cellules contrôles PANC1

La lignée cellulaire PANC1 a été utilisée comme contrôle positif pour le traitement des cellules à la cyclopamine. Dans ces cellules dérivées d'un adénocarcinome du pancréas, la voie de signalisation HH est suractivée par un mécanisme dépendant du ligand (Berman *et al.*, 2003).

L'expression des différents membres de la voie HH a d'abord été mise en évidence par RT-PCR dans la lignée PANC1 (Fig.12A). Les membres clés de la voie, qui incluent *SHH*, *PTCH*, *SMO* et les facteurs de transcription *GLI1* et *GLI2*, sont exprimés dans ces cellules. En revanche, *GLI3* et *IHH* n'y sont pas exprimés. Ce profil d'expression des membres de la voie HH est en accord avec la littérature et concorde avec une suractivation de la voie.

Afin de montrer l'inhibition de la voie HH par la cyclopamine dans les cellules PANC1, l'expression des gènes cibles *PTCH* et *GLI1* a été évaluée par RT-PCR. Comme condition contrôle, les cellules ont été traitées avec du DMSO, solvant de la cyclopamine, ou

à la tomatidine, un alcaloïde ayant une structure proche de celle de la cyclopamine mais incapable d'inhiber le signal HH (Cooper *et al.*, 1998). Les résultats sont présentés dans la figure 12B et les quantifications du signal dans les figures 13A et B. Par comparaison aux contrôles DMSO ou tomatidine, la cyclopamine inhibe l'expression de *PTCH* et *GLII* d'environ 50% et 90% respectivement, indiquant que la voie HH est bien activée dans la lignée PANC1.

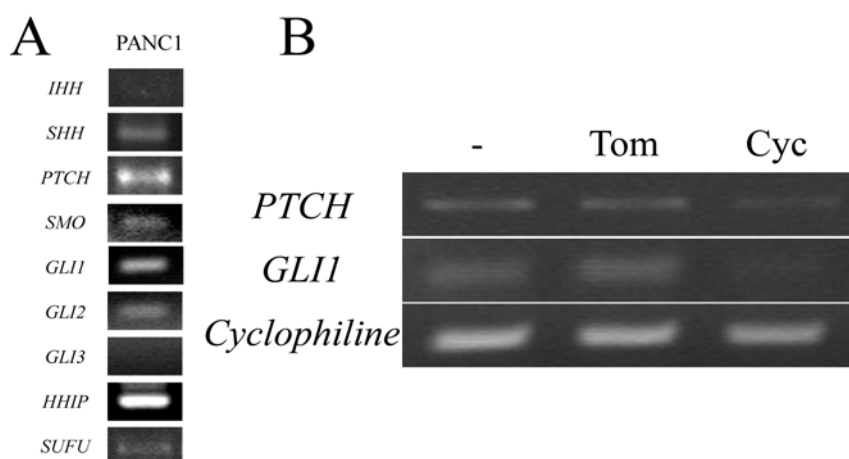


Figure 12 Effet de la cyclopamine sur l'expression des gènes cibles *PTCH* et *GLII* de la voie HH dans la lignée cellulaire PANC1.

(A) L'expression des membres de la voie HH a été caractérisée par RT-PCR dans la lignée PANC1. (B) Les cellules PANC1 ont été traitées soit avec du DMSO (-), 10 μ M de tomatidine (Tom) ou 10 μ M de cyclopamine (Cyc) pendant 48h. Les expressions de *PTCH* et *GLII* ont ensuite été analysées par RT-PCR. La *cyclophiline* a été utilisée comme standard interne.

B- Les lignées de cancers du côlon

Les lignées cellulaires de cancers du côlon ont également été traitées à la cyclopamine, à la tomatidine ou au DMSO et l'expression de *PTCH* et de *GLII* (à l'exception de *GLII* dans les SW480 où ce gène n'est pas exprimé) a été estimée par RT-PCR (Fig.13A et B). Aucune inhibition de l'expression de *PTCH* et *GLII* n'est visible en réponse à un traitement à la cyclopamine par comparaison aux traitements au DMSO ou à la tomatidine. Une légère diminution de l'expression de *PTCH* et *GLII* est observée dans la lignée HCT116 mais elle n'est pas significative. De plus, cette diminution est également visible avec le traitement à la tomatidine. De façon assez surprenante, un traitement des cellules Colo320 avec la tomatidine entraîne une augmentation d'expression de *GLII* de 400%, mais aucune modification d'expression de *PTCH* n'est observée.

Le gène *HHIP* est aussi considéré comme un gène cible de la voie HH (Chuang and McMahon, 1999). L'expression de *HHIP* a également été analysée par RT-PCR dans les lignées PANC1, Colo320 et SW480 (Fig.13C). Le traitement des cellules à la cyclopatamine n'entraîne pas d'inhibition de l'expression de *HHIP* que ce soit dans les lignées cellulaires de côlons ou, de façon plus surprenante, dans la lignée cellulaire de pancréas.

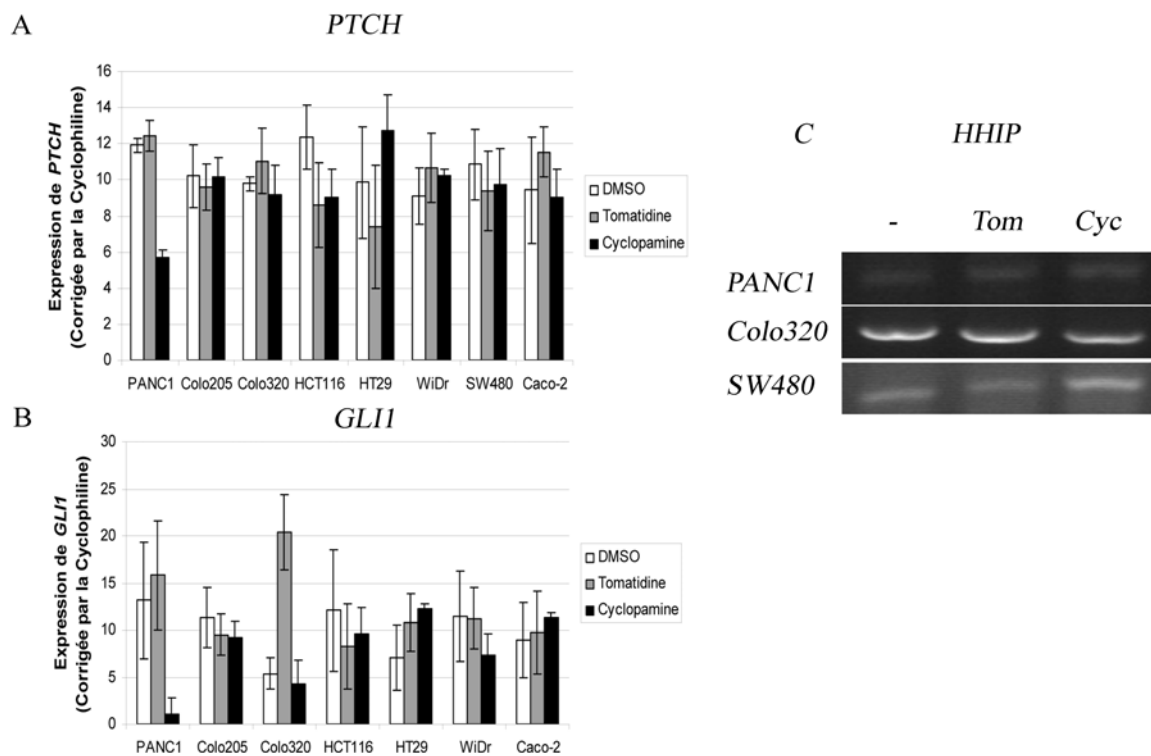


Figure 13 Effet de la cyclopatamine sur l'expression des gènes cibles *PTCH*, *GLII* et *HHIP* de la voie HH dans les lignées cellulaires de cancers du côlon. Les cellules ont été traitées soit avec du DMSO, 10µM de tomatidine (Tom) ou 10µM de cyclopatamine (Cyc) pendant 48H. Les expressions de *PTCH* (A) et *GLII* (B) ont ensuite été analysées par RT-PCR. L'intensité des bandes a été quantifiée à l'aide du programme "Quantity One". Les résultats ont été corrigés avec la *Cyclophiline* et représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes +/- SE. (C) Après traitement des cellules PANC1, Colo320 et SW480, l'expression de *HHIP* a été analysée par RT-PCR.

Le traitement à la cyclopatamine ne modulant pas l'expression de *PTCH* et de *GLII*, cela confirme que la voie de signalisation HH n'est pas activée dans les lignées cellulaires de cancers du côlon.

C- Test de survie cellulaire

Dans les cancers du pancréas où la voie HH est activée, la cyclopatamine inhibe la prolifération des cellules et stimule l'apoptose (Thayer *et al.*, 2003). Cet effet a également été observé dans d'autres types de cancers, tels que les cancers du poumon à petites cellules, les

cancers du foie et les cancers de l'estomac (Huang *et al.*, 2006, Ma *et al.*, 2005, Watkins *et al.*, 2003). Nous avons donc cherché à savoir si les lignées cellulaires de cancers du côlon sont sensibles ou non aux effets anti-prolifératif et pro-apoptotique de la cyclopatamine.

Les cellules contrôles PANC1 ainsi que les cellules de cancers du côlon ont été traitées à la cyclopatamine, à la tomatidine et au DMSO puis la viabilité cellulaire a été évaluée par un test MTT après 48h de traitement (Fig.14).

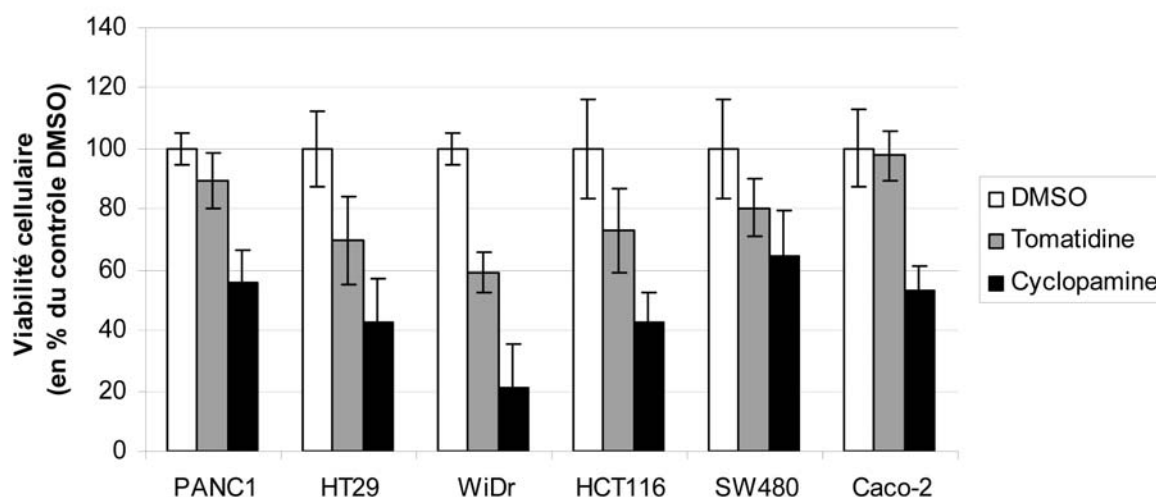


Figure 14 Viabilité cellulaire des lignées de cancers du côlon traitées à la cyclopatamine. La viabilité cellulaire a été évaluée avec un test MTT après traitement des cellules avec du DMSO, 10µM de tomatidine ou 10µM de cyclopatamine pendant 48h. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences +/- SD.

Dans la lignée PANC1, la viabilité cellulaire est réduite de moitié suite au traitement à la cyclopatamine par comparaison aux conditions contrôles DMSO ou tomatidine. Cette réduction a déjà été décrite et a été directement liée à l'inhibition de la voie HH (Berman *et al.*, 2003). Pour les lignées de cancers du côlon, 3 d'entre elles exprimant SMO (SMO+), HCT116, SW480 et Caco-2 ainsi que 2 autres n'exprimant pas SMO (SMO-), HT29 et WiDr ont été testées. La cyclopatamine réduit la viabilité cellulaire des lignées SMO+ alors que les résultats précédents ont montré que la voie HH n'y était pas inhibée au regard de l'expression de *PTCH* et de *GLII* (Fig13A et B). Cependant, la cyclopatamine ainsi que la tomatidine inhibent également la viabilité cellulaire des lignées SMO-, HT29 et WiDr.

La cyclopatamine a un effet toxique sur les lignées cellulaires de cancers du côlon mais cet effet est indépendant de SMO et de la voie HH.

D- Conclusion

Les résultats de la première partie semblent indiquer que la voie de signalisation HH n'est pas activée dans les lignées cellulaires de cancers du côlon. Afin d'en obtenir la confirmation, les lignées ont été traitées à la cyclopamine. Cette dernière est capable de bloquer la voie HH quand celle-ci est activée par le ligand ou par mutation de *PTCH* ou *SMO*. Les résultats montrent que, dans les lignées cellulaires de côlon, l'expression de *PTCH* et de *GLII* n'est pas inhibée par la cyclopamine, contrairement à la lignée cellulaire PANC1 où la voie HH est activée et qui est sensible à la cyclopamine. Ce résultat confirme donc que la voie de signalisation HH n'est pas activée dans les lignées cellulaires de cancers du côlon.

De façon surprenante, la cyclopamine a un effet toxique sur les lignées cellulaires de côlon. Cet effet est observé dans toutes les lignées testées, qu'elles expriment ou non *SMO*. Dans le cas des cellules HT29 et WiDr (*SMO*-), la cyclopamine peut donc affecter la survie cellulaire indépendamment de la présence de *SMO*. Dans le cas des cellules *SMO*+ (HCT116, SW480 et Caco-2), il est également probable que l'effet toxique de la cyclopamine soit indépendant d'une altération de la voie HH. De tels effets ont déjà été décrits dans d'autres lignées cellulaires. La tomatidine inhibe, par exemple, la croissance de la lignée cellulaire SIIA et la cyclopamine inhibe celle de la lignée de cancer du pancréas ASPC-1 qui n'exprime pas *SMO* (Kayed *et al.*, 2004, Ma *et al.*, 2005). Afin d'éviter toute toxicité de la cyclopamine qui ne soit pas liée à l'inhibition de la voie HH, de plus faibles concentrations devraient être testées. Il a, par exemple, été montré que la cyclopamine pouvait inhiber l'induction de l'expression de *PTCH* par SHH dans les cellules MEF à une concentration de 1µM (Lipinski *et al.*, 2007). Cependant, l'utilisation d'autres inhibiteurs de la voie HH reste la meilleure alternative pour éviter les problèmes de toxicité non spécifiques de ces alcaloïdes.

III. Effet de la surexpression de GLI1 dans la lignée de cancer de côlon HCT116

Les résultats décrits dans les deux premières parties de ce travail indiquent que la voie de signalisation HH n'est pas activée dans les lignées cellulaires de cancers du côlon. Les cancers du côlon semblent donc différents des autres cancers du tractus gastro-intestinal où la voie de signalisation HH est suractivée comme dans les cancers de l'œsophage, du pancréas ou encore de l'estomac (Berman *et al.*, 2003). L'absence d'activation de la voie HH dans les cancers du côlon concorde avec la fonction de cette voie dans le côlon. Que ce soit chez l'embryon ou chez l'adulte, la voie de signalisation HH est associée à la différenciation des tissus qui composent le côlon (Ramalho-Santos *et al.*, 2000, van den Brink *et al.*, 2004).

Afin de comprendre les conséquences que pourrait avoir l'activation de la voie HH dans des cellules de côlon, la voie a été activée dans les cellules HCT116 en y transfectant stablement un vecteur d'expression du facteur de transcription GLI1. Cette approche a été choisie car GLI1 est le facteur de transcription capable d'activer l'expression de l'ensemble des gènes cibles de la voie HH. Son potentiel activateur est plus important que celui de GLI2. Sa surexpression mime une activation de la voie HH sans nécessiter de ligand ou une voie de signalisation HH fonctionnelle.

A- Gènes cibles de GLI1 dans la lignée HCT116

1- Génération de lignées exprimant stablement GLI1

Le plasmide pCDNA3.1-GLI1, comportant l'ADNc *GLI1* sous le contrôle d'un promoteur SV40, a été transfecté dans les cellules HCT116. En parallèle, les cellules contrôles ont été transfectées par le vecteur vide pCDNA3.1. Après sélection au G418, les colonies de cellules ont été prélevées et ont été mises en culture individuellement. L'expression de *GLI1* a été analysée par *Western Blot*. Sur 72 clones testés, seulement deux d'entre eux montrent une expression de GLI1, II53 et II57 (Fig.15A). Afin de confirmer l'activité du facteur de transcription GLI1 dans ces cellules, les vecteurs 3'GLIBS (sites de fixation GLI) et m3'GLIBS (sites de fixation GLI mutés) ont été utilisés (Fig.7A). Le rapport entre les activités induites par ces vecteurs indique l'activité de GLI1. Comme le montre la

figure 15B, dans les lignées contrôles I1 et I2, le rapport 3'GLIBS/m3'GLIBS est inférieur à 1 comme cela a déjà été observé dans la lignée HCT116 parentale (Fig.7). En revanche, dans les lignées stables II53 et II57, ce rapport augmente de, respectivement, 3 et 1,5 fois par comparaison au rapport des lignées contrôles I1 et I2. Par contre, seul le clone II53 présente un rapport supérieur à 1, c'est-à-dire où l'activité du vecteur 3'GLIBS est supérieure au vecteur possédant les sites de fixation GLI mutés (m3'GLIBS). Afin de confirmer que GLI1 active ses gènes cibles, l'expression de *PTCH* endogène a été analysée par RT-PCR (Fig.15A). L'expression de *PTCH* est effectivement augmentée dans la lignée II53 par rapport aux cellules I1 et I2, mais pas dans la lignée II57.

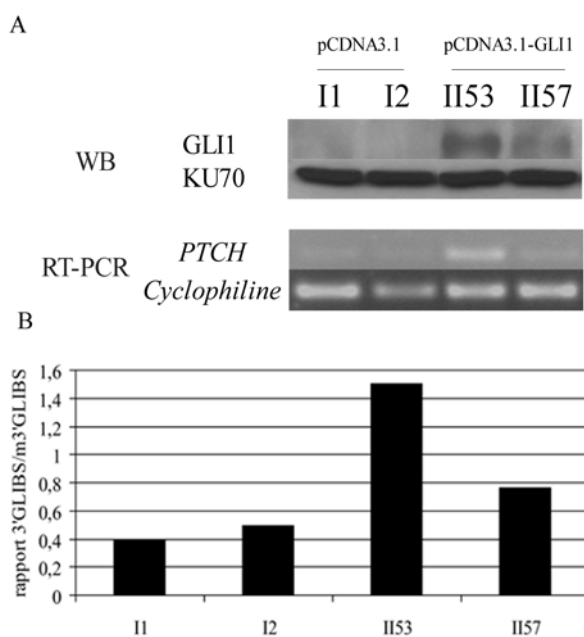


Figure 15 Lignées cellulaires HCT116 II53 et II57 surexprimant stablement GLI1.

(A) Expression de GLI1 (WB : *Western Blot*) et *PTCH* (RT-PCR) dans les lignées transformées par pCDNA3.1 (I1, I2) et pCDNA3.1-GLI1 (II53, II57). KU70 et *cyclophiline* sont utilisés comme standard interne. (B) Rapport entre les activités luciférase des vecteurs rapporteurs 3'GLIBS et m3'GLIBS. Une seule expérience a été réalisée.

Les résultats montrent que la lignée II53 exprime stablement GLI1 et le facteur de transcription y est fonctionnel tandis que dans la lignée II57, l'expression de *GLI1* est plus faible et la quantité et/ou l'activité du facteur de transcription ne permettent pas d'activer l'expression de *PTCH* et donc des gènes cibles de la voie HH.

2- *BMP4* : gène cible de GLI1 dans les cellules HCT116

Afin de déterminer les gènes cibles de GLI1 dans les cellules de côlon HCT116, un *microarray* a été réalisé. Pour ce faire, les lignées stables I2 et II53 ont été choisies, la stratégie étant de confirmer *a posteriori* dans d'autres lignées stables l'expression de gènes potentiellement intéressants. Le *microarray* a été réalisé grâce à la plateforme Affymetrix du GIGA (Université de Liège). Les gènes différemment exprimés 2 fois ou plus ont ainsi pu être

mis en évidence dans la lignée II53 par rapport à la lignée I2. Après normalisation, 92 gènes dont l'expression est stimulée et 394 gènes sous-exprimés dans la lignée II53 par rapport à la lignée I2 ont pu être identifiés (Annexe 2).

Ne disposant que d'une seule lignée surexprimant stablement GLI1, de nouvelles lignées ont été générées par transfection stable du vecteur pCDNA3.1-GLI1. Après sélection, 4 nouvelles lignées montrent une expression de GLI1 par *Western Blot* (Fig.16A). Comme pour les lignées II53 et II57, l'activité GLIBS a été testée ainsi que l'expression du gène cible *PTCH* (Fig.16A). Les nouvelles lignées stables GLI1 I, VII, IX et X présentent des niveaux d'expression de GLI1 proches, tant au niveau protéique que du transcrite (Fig.16A). Le rapport de l'activité luciférase 3'GLIBS/m3'GLIBS est particulièrement élevé, atteignant un maximum de 7 pour les lignées I et X (Fig.16B). Dans ces lignées I et X, l'expression de *PTCH* est stimulée. En revanche, l'expression de *PTCH* n'est pas ou peu stimulée dans les lignées VII et IX par comparaison aux lignées contrôles I1 et I2 (Fig.16A). Bien que l'activité GLI soit importante dans ces lignées au vu du rapport 3'GLIBS/m3'BLIBS, GLI1 n'y active pas l'expression de *PTCH*. Les lignées I et X ont donc été sélectionnées pour confirmer l'expression des gènes cibles identifiés avec le stable II53 grâce au *microarray*.

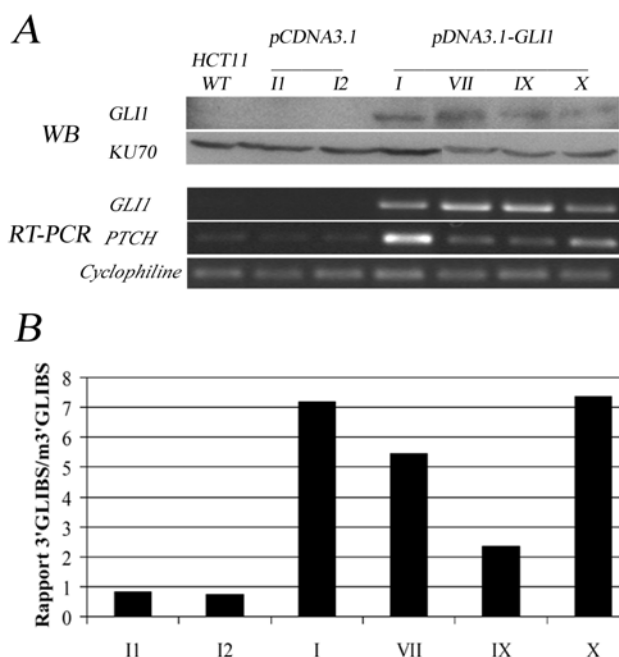


Figure 16 Lignées cellulaires HCT116 I, VII, IX et X surexprimant stablement GLI1.

(A) Expression de GLI1 (WB : *Western Blot* et RT-PCR) et *PTCH* (RT-PCR) dans les lignées transformées par pCDNA3.1 (I1, I2) et pCDNA3.1-GLI1 (I, VII, IX et X). KU70 et *cyclophiline* sont utilisés comme standard interne. (B) Rapport entre les activités luciférase des vecteurs rapporteurs 3'GLIBS et m3'GLIBS. Une seule expérience a été réalisée.

L'expression de certains gènes identifiés à l'aide du *microarray* a été vérifiée par RT-PCR dans la lignée HCT116 parentale ainsi que dans les lignées stables contrôles I2, I8, I10 et les lignées I, X, II53 et II57 surexprimant GLI1. Les RT-PCR montrent que l'expression de *BMP4* et d'*ID3* est stimulée dans toutes les lignées stables GLI1, à l'exception de la lignée II57, par comparaison aux lignées contrôles (Fig.17). Ce résultat, pour la lignée

II57, était attendu dans la mesure où l'expression de *PTCH* n'est pas stimulée dans cette lignée (Fig.15A). Il a été établi que *BMP4* est un gène cible de la voie HH au cours du développement du côlon (Sukegawa *et al.*, 2000). Il a également été montré que GLI1 pouvait stimuler l'activité du promoteur *BMP4* dans les cellules COS-7 (Kawai and Sugiura, 2001). Le gène *ID3* est connu pour être un gène cible de la voie BMP4 tout comme *GATA2* (Hollnagel *et al.*, 1999, Maeno *et al.*, 1996). *GATA2* ne se trouve pas dans la liste des gènes du *microarray* car les gènes qui présentaient une intensité de signal proche du bruit de fond ont été supprimés pour générer une liste de gènes réduite. L'expression de *GATA2* a été analysée par RT-PCR (Fig.17). Elle est, tout comme *BMP4* et *ID3*, stimulée dans les lignées stables GLI1 par comparaison aux lignées contrôles.

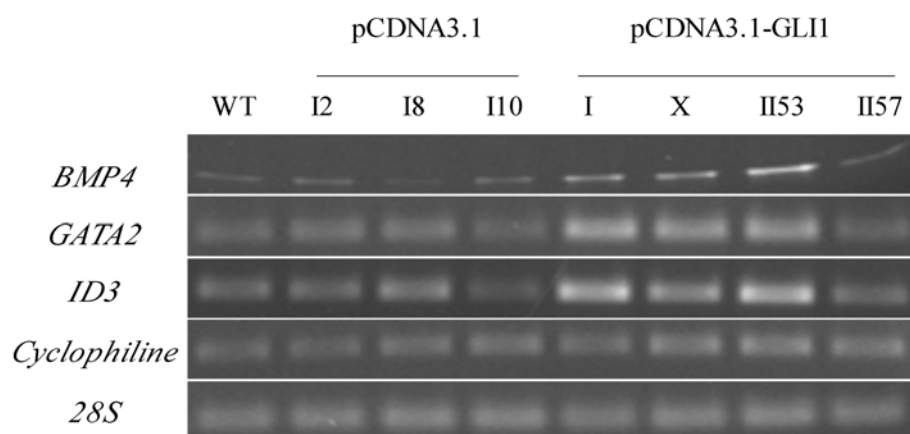


Figure 17 Stimulation de l'expression de *BMP4*, *GATA2* et *ID3* dans les lignées HCT116 surexprimant stablement GLI1.

L'expression des gènes *BMP4*, *GATA2* et *ID3* a été déterminée par RT-PCR dans les lignées HCT116 parentale, stables pCDNA3.1 (I1, I8, I10) et pCDNA3.1-GLI1 (I, X, II53 et II57). *Cyclophiline* et *28S* ont été utilisés comme standard interne.

GLI1 est donc capable de stimuler l'expression de la *BMP4* dans la lignée colorectale HCT116. Le fait que les expressions d'*ID3* et de *GATA2*, gènes cibles de BMP4, soient également stimulées, semble indiquer que la surexpression de BMP4 s'accompagne d'une activation de la voie BMP.

B- Activité phosphatase alcaline

En 2004, van den Brink *et al.* ont montré que la voie HH, par l'intermédiaire d'IHH, était impliquée dans la différenciation des cellules HT29 induite par le butyrate de sodium (van den Brink *et al.*, 2004). Il était donc intéressant de voir si dans les cellules HCT116

surexprimant GLI1, la différenciation des cellules était modifiée, HCT116 étant une lignée cellulaire connue pour être très peu différenciée (Chantret *et al.*, 1988). Dans le côlon adulte, l'expression et l'activité de la phosphatase alcaline sont localisées au niveau du sommet des cryptes (Hodin *et al.*, 1995). La phosphatase alcaline est couramment utilisée comme marqueur de différenciation du côlon.

L'activité phosphatase alcaline a été analysée dans les lignées stables HCT116 surexprimant GLI1 par la technique du BlueBB-Naphtol. La lignée MS-5, cellules stromales de moelle osseuse, a été utilisée comme contrôle positif pour le test d'activité phosphatase alcaline. Sur la figure 18, le marquage bleu révélant une activité phosphatase alcaline est visible de façon homogène sur toutes les cellules avec des intensités variables.

Activité phosphatase alcaline

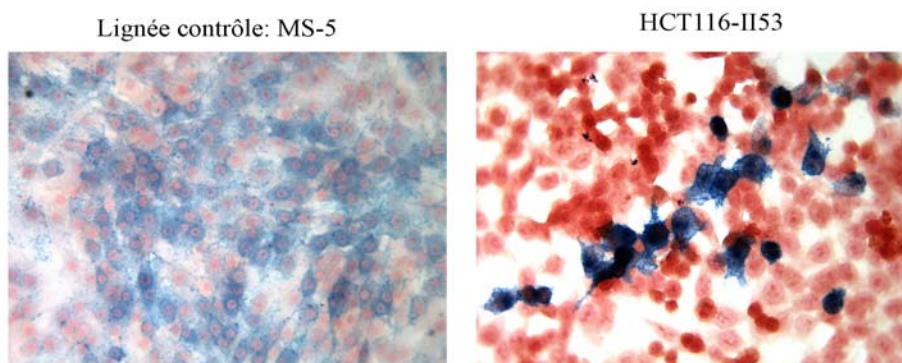


Figure 18 Activité phosphatase alcaline dans les lignées MS-5 et HCT116-II53. L'activité phosphatase alcaline a été déterminée par la méthode BlueBB-Naphtol. Les cellules ont été observées au microscope au grossissement 200X (MS-5) et 500X (HCT116-II53).

Contrairement à la lignée contrôle, le marquage bleu dans la lignée HCT116 est hétérogène (Fig.18). Les cellules positives à la phosphatase alcaline sont minoritaires mais le marquage bleu est particulièrement intense sur certaines cellules. Dans les lignées parentale ou contrôles I2, I8 et I10, il est possible de voir des cellules positives isolées au milieu de cellules négatives (Fig19). Il en est de même dans les lignées stables GLI1 I, X et II53 mais le nombre de cellules positives est visuellement beaucoup plus important. Afin de transcrire numériquement l'activité phosphatase alcaline observée par la méthode du BlueBB-Naphtol, les résultats ont été exprimés en nombre de cellules positives par champ (grossissement 200X au microscope) (Fig.20). Il apparaît que le nombre de cellules positives pour la phosphatase alcaline est significativement plus important dans les lignées HCT116 transfectées stablement par GLI1, I, X et II53 par comparaison aux cellules contrôles HCT116 parentale ou I2, I8 et I10. La lignée II57 a une activité phosphatase alcaline comparable aux lignées contrôles.

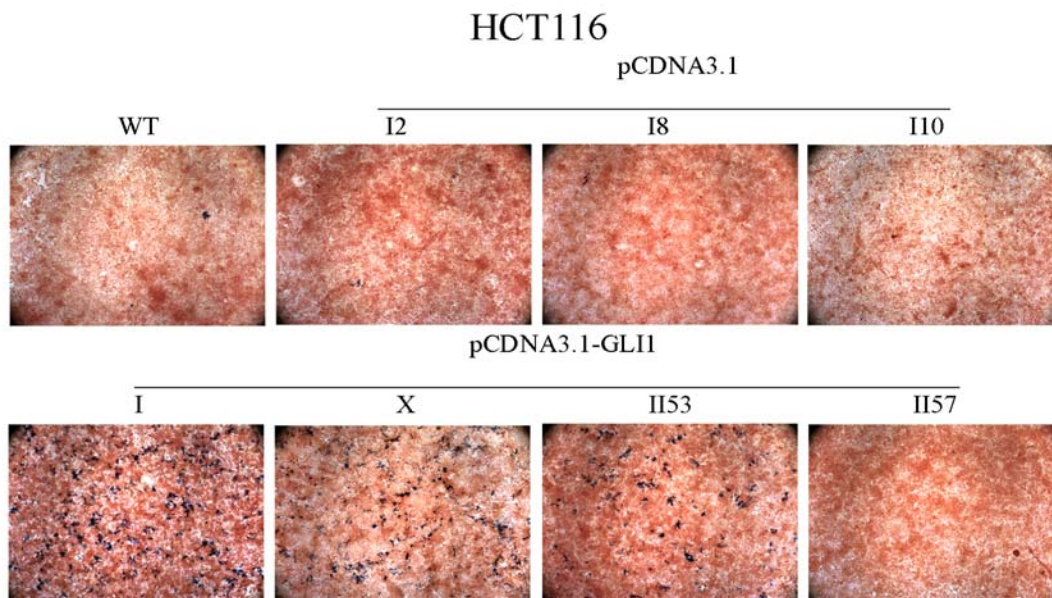


Figure 19 Activité phosphatase alcaline dans les lignées HCT116 surexprimant stablement GLI1. L'activité phosphatase alcaline a été déterminée par la méthode BlueBB-Naphtol dans la lignée HCT116 parentale ainsi que dans les lignées transfectées stablement par pCDNA3.1 (I2, I8, I10) ou par pCDNA3.1-GLI1 (I, X, II53, II57). Les images présentées ont été observées au microscope au grossissement 50X.

Il y a donc une très bonne corrélation entre la surexpression de GLI1 et l'activité phosphatase alcaline, indiquant un lien entre la voie de signalisation HH et la différenciation des cellules du côlon.

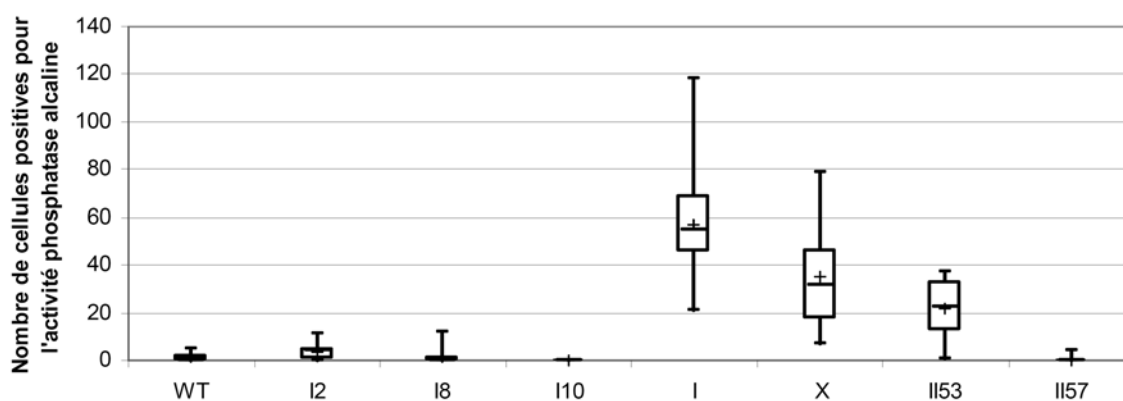


Figure 20 Représentation graphique de l'activité phosphatase alcaline dans les lignées HCT116 surexprimant stablement GLI1. Les cellules positives (activité phosphatase alcaline) ont été comptabilisées au microscope (grossissement 200X) dans 20 champs aléatoires différents. Les résultats sont présentés sous forme de boîtes à moustaches (*Box Plot*). La boîte est délimitée par les premier et troisième quartiles. Les tirets supérieurs et inférieurs indiquent les valeurs maximales et minimales respectivement. La barre centrale et le signe + indiquent respectivement la médiane et la moyenne des valeurs.

C- Conclusion

Ces dernières années, il a été montré que la voie de signalisation HH était activée de façon autocrine dans de nombreux cancers dont les cancers du tractus gastro-intestinal (Berman *et al.*, 2003). Cependant, les résultats que nous avons obtenus indiquent qu'il n'en est pas de même pour les cancers du côlon. Dans le côlon, que ce soit chez l'embryon ou chez l'adulte, la voie de signalisation HH est associée à la différenciation cellulaire. C'est notamment le cas d'IHH qui est exprimé dans les cellules différenciées du côlon adulte situées au sommet des cryptes (van den Brink *et al.*, 2004).

La voie HH a été activée dans les cellules de cancers du côlon HCT116 par transfection stable du facteur de transcription GLI1. Plusieurs lignées stables ont pu être isolées. Parmi celles-ci, deux lignées (VII, IX), bien que surexprimant GLI1, ne présentent pas d'augmentation d'expression du gène cible *PTCH*. Il semblerait que dans ces lignées, un mécanisme empêche GLI1 d'activer ses gènes cibles. Quant aux autres lignées (II53, I, X), GLI1 y est exprimé et est capable d'activer *PTCH*. La surexpression de GLI1 s'accompagne d'une augmentation de l'activité phosphatase alcaline, un marqueur de différenciation des colonocytes. L'activation de la voie HH dans des cellules de cancers du côlon est donc associée à la différenciation à l'instar des cellules de côlon normal. Cependant, cette activité est limitée à un nombre restreint de cellules, indiquant que seulement peu de cellules sont différenciées. Il serait intéressant de savoir si toutes les cellules des lignées stables expriment correctement GLI1 ou si l'expression de GLI1 est restreinte à une sous-population de cellules.

Un *microarray* a permis d'identifier la *BMP4* comme un gène cible majeur de la voie HH dans les cellules du côlon. Il a déjà été montré que la voie HH contrôlait l'expression de *BMP4* dans les cellules adjacentes à l'épithélium intestinal chez le poulet et le xénope (Ishizuya-Oka *et al.*, 2006, Roberts *et al.*, 1995). De plus, 2 gènes cibles de la voie BMP4, *GATA2* et *ID3*, sont surexprimés dans les lignées stables GLI1 suggérant que la voie BMP puisse être activée suite à la surexpression du ligand BMP4. Afin de déterminer si l'expression de *GATA2* et *ID3* est dépendante de la BMP4, il serait intéressant d'utiliser un inhibiteur de la voie BMP comme la noggine par exemple. L'activation de la voie BMP est une caractéristique des entérocytes différenciés dans le côlon adulte (Hardwick *et al.*, 2004). L'activation de la voie BMP, tout comme la stimulation de l'activité phosphatase alcaline, par GLI1 dans les cellules HCT116 plaide en faveur d'une implication de la voie HH dans la différenciation des cellules du côlon.

Discussion et perspectives

La voie de signalisation HH est impliquée essentiellement dans le développement embryonnaire mais continue de jouer un rôle chez l'adulte en participant aux mécanismes de réparation (poumons), au maintien de cellules souches (sein) ou encore à l'homéostasie tissulaire (côlon). Ces dernières années, cette voie de signalisation a également été impliquée dans le développement des cancers. Le but de ce travail était donc de savoir si la voie de signalisation HH était impliquée dans les cancers du côlon.

La voie HH n'est pas activée de façon autocrine dans les cancers du côlon

Dans le côlon adulte, la voie de signalisation HH fonctionne de façon paracrine, les ligands produits par les cellules épithéliales activant l'expression des gènes cibles dans les cellules adjacentes à l'épithélium. Dans les cancers, à l'inverse, ce sont principalement des activations autocrines de la voie HH qui ont été décrites. Les cancers où la voie de signalisation HH est activée de façon constitutive se divisent en 2 groupes selon que l'activation est dépendante (type II) ou non (type I) du ligand. Les cancers de type I présentent principalement des mutations de *PTCH*, *SMO* ou *SUFU*. Deux études rapportent avoir recherché des mutations de *PTCH* et *SMO* dans des cellules cancéreuses de côlon mais le résultat fut négatif (Guleng *et al.*, 2006, Xie *et al.*, 1997). Jusqu'à maintenant, aucune mutation de membres de la voie HH n'a été mise en évidence dans les cancers du côlon. L'hypothèse d'une activation de la voie HH dépendante du ligand (cancers de type II) a été proposée mais est sujette à controverse. Malgré la présence de ligand HH, deux observations indiquent que la voie HH n'est pas activée de façon autocrine dans les lignées cellulaires de cancers du côlon que nous avons étudiées. Tout d'abord, un membre essentiel de la voie HH est systématiquement absent quelle que soit la lignée. L'absence de *SMO*, de HH ou encore de *PTCH* est incompatible avec une possible activation de la voie HH. Ensuite, dans toutes les lignées, l'expression des gènes cibles de la voie HH, *GLII* et *PTCH*, n'est pas inhibée par la cyclopamine, inhibiteur de la voie HH.

La première étude qui s'est intéressée à la voie HH dans les cancers du côlon a également conclu à son inactivité sur base de l'absence d'expression de *PTCH* dans les lignées cellulaires ainsi que l'insensibilité de ces mêmes lignées à la cyclopamine (Berman *et al.*, 2003). Ce résultat est cependant surprenant dans la mesure où plusieurs équipes, y compris la nôtre, ont ensuite mis en évidence l'expression de *PTCH* dans les lignées cellulaires de cancers du côlon (Chatel *et al.*, 2007, Qualtrough *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2002, Zhu *et al.*, 2004).

Par contre, 2 équipes concluent à une activation autocrine de la voie HH. L'une s'est basée sur l'analyse par immunohistochimie de l'expression de SHH, PTCH et SMO dans les cellules tumorales du côlon par rapport aux tissus sains (Oniscu *et al.*, 2004). Le nombre de cas examinés est cependant limité. De plus, l'anticorps anti-SHH n'est probablement pas spécifique de SHH et reconnaît IHH puisqu'il est dirigé contre la partie N-terminale de SHH (van den Brink and Peppelenbosch, 2006). De manière générale, les anticorps disponibles sur le marché, notamment ceux fournis par Santa Cruz Biotechnology, doivent être utilisés avec précaution. Plusieurs études ont, en effet, rapporté des résultats contradictoires avec ces anticorps (van den Brink, 2007). L'indisponibilité de bons anticorps constitue, pour l'instant, un frein à l'étude de la voie HH dans les tumeurs primaires.

Une seconde équipe a conclu à l'activation autocrine de la voie HH en se basant cette fois sur la capacité de la cyclopamine à induire l'apoptose dans les lignées cellulaires de cancers du côlon (Qualtrough *et al.*, 2004). On peut regretter cependant que cette étude n'ait pas corrélé leurs résultats avec une diminution d'expression de *PTCH*. Ceci est d'autant plus vrai que la cyclopamine diminue la viabilité des lignées cellulaires de cancers du côlon que nous avons étudiées.

Les résultats obtenus au cours de notre étude suggèrent que la cyclopamine a un effet toxique indépendant de son action sur la voie HH. Cette conclusion se base surtout sur le fait que la cyclopamine réduit la viabilité de lignées cellulaires telles que HT29 ou WiDr où SMO, la cible de la drogue, n'est pas exprimée. Cette observation n'est pas une exception puisque la viabilité des lignées cellulaires de cancers du pancréas, ASPC-1 et BxPc-3 ou du sein, MCF7, SKBR3 et MDA231, qui n'expriment pas SMO, est également inhibée par la cyclopamine (Kayed *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2008). La concentration de cyclopamine utilisée dans l'immense majorité des études est de 10µM. Il conviendrait d'utiliser cet inhibiteur à une concentration plus faible. Récemment, il a été montré qu'à une concentration de 1µM, la cyclopamine inhibait totalement la voie HH (Lipinski *et al.*, 2007). L'identification récente de nouveaux inhibiteurs devrait aussi améliorer l'étude de la voie de

signalisation HH. Les inhibiteurs GANT58 et GANT61, agissant sur GLI1 en aval de SMO, sont notamment très prometteurs (Lauth *et al.*, 2007). Dans la mesure où la cyclopamine ne permet pas de bloquer la voie HH lorsqu'elle est activée par des dérégulations en aval de SMO, comme des mutations de *SUFU* par exemple, ces inhibiteurs ou l'utilisation de siRNA dirigés contre GLI1 pourraient permettre de se prononcer plus catégoriquement sur l'activation autocrine ou non de la voie HH dans les cancers du côlon.

Rôle de la voie HH dans les cellules de côlon

La voie de signalisation HH est principalement associée à la différenciation de l'intestin. Elle intervient dans l'organisation radiale des différentes couches cellulaires des intestins au cours de l'embryogenèse, notamment en régulant l'expression de la *BMP4*, ainsi que dans la différenciation des entérocytes (Madison *et al.*, 2005, Sukegawa *et al.*, 2000). Nos résultats indiquent que la voie HH pourrait aussi induire la différenciation des cellules de cancers du côlon. Nous avons mis en évidence l'induction de l'expression du gène *BMP4* dans les cellules HCT116 où la voie HH a été activée constitutivement par surexpression de GLI1 à partir d'un vecteur d'expression. L'activation de la voie HH induit également l'expression des gènes cibles de la voie BMP4, *ID3* et *GATA2*. La surexpression de BMP4 en réponse à GLI1 s'accompagne donc d'une activation de la voie BMP ce qui est en accord avec le fait que la voie BMP est fonctionnelle dans la lignée HCT116 (Beck *et al.*, 2006). Les BMP peuvent agir soit comme suppresseurs soit comme promoteurs de la tumorigenèse du côlon. En effet, la BMP2 inhibe la croissance des cellules HCT116 (Beck *et al.*, 2006, Hardwick *et al.*, 2004). A l'inverse, BMP4 n'a aucun effet sur la prolifération mais stimule le potentiel invasif de ces cellules par un mécanisme indépendant de SMAD4 et donc de la voie BMP classique (Deng *et al.*, 2007, Deng *et al.*, 2009).

Nous avons montré que la surexpression de GLI1 est également corrélée avec l'augmentation de l'activité phosphatase alcaline dans les cellules HCT116. La phosphatase alcaline est un marqueur de différenciation des entérocytes. Il résulte de cette observation que l'activation de la voie HH dans les cellules HCT116 a des effets semblables à ceux de la voie HH dans le côlon adulte. Il existe deux modèles de différenciation de lignées cellulaires de côlon : le traitement de la lignée HT29 au butyrate de sodium ainsi que la mise en culture prolongée de la lignée Caco-2 (Augeron and Laboisse, 1984, Grasset *et al.*, 1985, Wice *et al.*, 1985). Dans les 2 cas, les cellules finissent par se polariser, par exprimer les marqueurs de différenciation des entérocytes et elles cessent de proliférer. Il est intéressant de constater que

la différenciation, dans ces 2 modèles, est accompagnée d'une surexpression d'IHH (Saaf *et al.*, 2007, van den Brink *et al.*, 2004). Plusieurs membres de la voie HH sont même surexprimés comme *PTCH*, *SMO*, *GLI3* et *DISP1* dans les cellules Caco-2. En outre, la cyclopamine est capable d'inhiber l'expression des marqueurs de différenciation des cellules HT29 traitées au butyrate de sodium. Ce dernier résultat est surprenant car *SMO* n'est pas exprimé dans les cellules HT29 disponibles au laboratoire. Il aurait été intéressant de voir si le butyrate de sodium induisait l'expression de *SMO* dans les HT29. L'activation de la voie de signalisation HH dans les cellules tumorales du côlon est donc associée à la différenciation des cellules, ce qui ne plaide pas en faveur d'une implication de la voie dans les cancers du côlon.

La voie de signalisation HH, au même titre que la voie TGF- β , est caractéristique des cellules différenciées tandis que la voie WNT est active dans les cellules prolifératives. Ce sont l'interaction et l'équilibre entre ces voies qui déterminent la structure du côlon adulte et probablement aussi, du développement des cancers du côlon. Parmi les gènes réprimés par la surexpression de *GLI1* dans la lignée HCT116 et identifiés par le *microarray* se trouve *TCF7/L2* qui code pour la protéine TCF4, co-facteur transcriptionnel clé de la voie WNT (Annexe 2). Cet effet est probablement indirect dans la mesure où *GLI1* est un facteur de transcription uniquement activateur. L'équipe du Dr M. Katano a pu montrer que la surexpression de *GLI1* dans les lignées HCT116 et SW480 entraîne une inhibition de l'activité de la voie WNT (Akiyoshi *et al.*, 2006). L'inhibition de TCF4 pourrait être le mécanisme de cette inhibition. Dans les cellules HT29 traitées au butyrate de sodium, une diminution de l'expression du TCF4 nucléaire a également été mise en évidence. Ce n'est pas la première fois que des interactions croisées entre les voies HH et WNT sont décrites puisqu'il a été établi que *SUFU*, par exemple, interagissait avec la β -caténine ou que *SFRP1*, inhibiteur de la voie WNT, était un gène cible de la voie HH (Katoh and Katoh, 2006, Meng *et al.*, 2001). La voie HH, à l'instar de la voie TGF- β /BMP, agit donc négativement sur la voie WNT dans le côlon. En accord avec toutes ces observations, il a été montré récemment que l'activation de la voie HH par inactivation de *PTCH* dans les intestins de souris adultes conduisait à une inhibition de la voie WNT et à une activation de la voie BMP (van Dop *et al.*, 2009).

Les ligands HH et activation paracrine de la voie HH dans le côlon

Dans le côlon adulte, les ligands SHH et IHH sont exprimés dans les cellules épithéliales (van den Brink, 2007). Notre étude de l'expression du ligand dans des tumeurs primaires confirme l'expression d'origine épithéliale de SHH et d'IHH. En effet, dans les tissus sains des patients dont le marqueur épithélial (CK8) est absent, il n'y a pas ou peu d'expression d'IHH et de SHH. Chez les patients où cela était possible, l'expression des ligands a été comparée dans le tissu sain et la tumeur. Chez le patient 7, une surexpression de SHH a pu être observée. En étudiant un panel plus large de tumeurs, 2 autres équipes ont observé des surexpressions de SHH dans des adénocarcinomes colorectaux (Douard *et al.*, 2006, Monzo *et al.*, 2006). Cependant, l'augmentation d'expression de SHH n'a pas été corrélée à une éventuelle augmentation d'expression de *PTCH*, gène cible de la voie HH. En ce qui concerne le patient 7 de notre étude, la surexpression de SHH n'est pas assortie d'une augmentation d'expression de *PTCH*. Dès lors, la surexpression ne s'accompagne pas d'une suractivation de la voie HH dans les cellules tumorales.

Les niveaux et le profil des ligands HH exprimés dans les lignées cellulaires de cancers du côlon varient énormément. Les lignées exprimant les plus grandes quantités de protéine HH sont celles où le transcrite *IHH* a été détecté, ce qui laisse penser qu'IHH est le ligand que l'on retrouve en plus grande quantité dans les cellules du côlon. Dans le côlon adulte normal, seule la protéine IHH a pu être mise en évidence alors que SHH n'a pas pu être détecté par immunohistochimie (van den Brink *et al.*, 2004, van den Brink *et al.*, 2002). Outre l'aspect quantitatif, les profils d'expression de SHH et IHH dans l'espace divergent puisque IHH est exprimé par les cellules différenciées au sommet des cryptes tandis que SHH est exprimé par les cellules prolifératives situées à la base de la crypte. Il est intéressant de constater, dans ce contexte, que toutes les lignées expriment le transcrite *SHH*, caractéristique des cellules prolifératives du côlon normal, et que la protéine SHH est même détectable dans les lignées Colo205 et SW480.

La persistance de l'expression de la protéine SHH dans certaines lignées comme Colo205 et SW480 ainsi que la détection de légères surexpressions de SHH dans des tumeurs primaires sont intéressantes. Bien que nous ayons exclu la possibilité d'une activation autocrine de la voie HH dans les cancers du côlon, un effet paracrine du ligand est tout à fait envisageable, à l'image de ce qui se passe dans le côlon adulte. Cette hypothèse a été testée récemment. En effet, l'équipe du Dr F. de Sauvage a récemment mis en évidence un rôle paracrine de la voie HH dans le développement des tumeurs. En effet, les cellules HT29, qui

expriment HH, injectées aux souris nues forment de plus petites tumeurs si des fibroblastes déficients en SMO, donc incapables de répondre à HH, sont co-injectés (Yauch *et al.*, 2008). Il résulte de cette expérience que l'activation de la voie de signalisation HH serait nécessaire dans les cellules adjacentes aux cellules tumorales pour créer un microenvironnement favorable à la progression tumorale. En revanche, le mécanisme qui inhibe la croissance tumorale en l'absence d'une activation de la voie HH dans le microenvironnement reste à identifier.

Perspectives

Nos travaux montrent que la voie HH n'est pas activée de façon autocrine dans les cancers du côlon. Il serait intéressant de confirmer nos observations dans des tumeurs primaires de cancers du côlon. L'étude préliminaire que nous avons réalisée n'a pas porté sur un nombre suffisant de cas pour être significative. La caractérisation complète de la voie HH dans un nombre important de tumeurs serait nécessaire. Idéalement, la technique d'immunohistochimie pourrait être utilisée mais elle ne sera informative que si des anticorps spécifiques sont disponibles.

Malgré la démonstration que la voie HH n'est pas activée de façon autocrine, l'implication de la voie HH dans les cancers du côlon n'est pas exclue, comme le montre l'identification récente d'un rôle paracrine de HH dans le développement des tumeurs. En outre, la voie HH pourrait être impliquée dans le développement des cancers du côlon par un autre mécanisme. En effet, la voie HH pourrait intervenir dans le maintien des cellules souches cancéreuses (CSC) de côlon. La théorie des CSC a été proposée pour expliquer les résultats d'expériences sur les leucémies (Reya *et al.*, 2001). Brièvement, les CSC seraient une sous-population de cellules cancéreuses capables d'auto-renouvellement qui donneraient naissance à l'ensemble des autres cellules qui composent la tumeur. Ces dernières, en revanche, seraient incapables d'auto-renouvellement. L'équipe du Dr J. Dick a été la première à isoler une sous-population de cellules de leucémie myéloïde aigue humaine capable de reformer une tumeur lorsqu'elle est implantée dans des souris NOD-SCID (Lapidot *et al.*, 1994). Depuis, des sous-populations de cellules ayant les propriétés de CSC ont été identifiées dans des tumeurs solides comme dans les cancers du sein, du poumon, de la prostate, du cerveau ou encore du côlon (Dalerba *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2005, O'Brien *et al.*, 2007, Ricci-Vitiani *et al.*, 2007). Les CSC pourraient donc être une caractéristique de la plupart, voire de toutes les tumeurs. Il a été suggéré récemment que la voie de signalisation HH est

suractivée dans les CSC de cancers du sein, des gliomes ou encore des myélomes (Clement *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2006, Peacock *et al.*, 2007).

De manière générale, le but est maintenant de déterminer si, au cours de la tumorigenèse colorectale, la voie de signalisation HH est inactivée, à l'image de la voie TGF- β , ou si la voie HH est impliquée dans la tumorigenèse mais de manière détournée. Le ciblage thérapeutique de la voie HH dans les cancers de la peau (BCC) est en phase I d'essai clinique (Garber, 2008). Il est d'ailleurs systématiquement envisagé dès qu'une étude montre une suractivation de la voie HH dans un type de cancer. Cependant, le cas des cancers du côlon semble très complexe et il est trop tôt pour envisager une telle thérapie. La voie HH est importante dans le maintien de l'épithélium du côlon adulte et la manière dont la voie HH serait impliquée dans la tumorigenèse colorectale reste à démontrer.

Matériel et méthodes

Une partie des informations concernant les techniques utilisées au cours de ce travail est présente dans l'article (Annexe 1).

I. Matériel

A- Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées au cours de ce travail sont présentées dans le tableau suivant :

Nom	Description	Age	H/F	MSI/MSS	Milieu de culture
Colo205	Carcinome de côlon / Humain	70	M	MSS	RPMI1640 + L-Glutamine (2mM) + Pen-Strep (100µg/ml) + 10% FBS
Colo320	Carcinome de côlon / Humain	55	F	MSS	RPMI1640 + L-Glutamine (2mM) + Pen-Strep (100µg/ml) + 10% FBS
HCT116	Carcinome de côlon / Humain	-	M	MSI	McCoy's5A + L-Glutamine (2mM) + Pen-Strep (100µg/ml) + 10% FBS
HT29	Carcinome de côlon / Humain	44	F	MSS	McCoy's5A + L-Glutamine (2mM) + Pen-Strep (100µg/ml) + 10% FBS
WiDr	Carcinome de côlon / Humain	44	F	MSS	EMEM + L-Glutamine (2mM) + Pen-Strep (100µg/ml) + 10% FBS
SW480	Carcinome de côlon / Humain	50	M	MSS	Leibovitz + L-Glutamine (2mM) + Pen-Strep (100µg/ml) + 10% FBS
Caco-2	Carcinome de côlon / Humain	72	M	MSS	DMEM + L-Glutamine (2mM) + Pen-Strep (100µg/ml) + aa non essentiels + pyruvate de sodium (1mM) + bicarbonate de sodium (0,15%) + 20% FBS
NIH3T3	Embryon / Souris	-	-	-	DMEM + L-Glutamine (2mM) + Pen-Strep (100µg/ml) + 10% FBS
293T	Rein / Humain	-	-	-	DMEM + L-Glutamine (2mM) + Pen-Strep (100µg/ml) + 10% FBS
MS-5	Moelle osseuse / Souris	-	-	-	IMDM + L-Glutamine (2mM) + 10% FBS

Tableau 1 Caractéristiques et conditions de culture des lignées cellulaires.

B- Tumeurs primaires

Les prélèvements de tumeurs primaires et tissus sains de mêmes patients ont été réalisés par le laboratoire d'anatomie pathologique de l'Université de Liège. L'utilisation de ces prélèvements a été approuvée par le comité d'éthique facultaire. Chaque prélèvement de 1 cm environ a été plongé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C. Les caractéristiques des patients sont reprises dans le tableau ci-joint :

Patient	Référence	H/F	Age	Localisation	Stade	Date prélèvement	description
1	03B13603	H	60	recto-sigmoïde	pT ₃ N ₀ M _x	22/10/2003	adénocarcinome, moyennement différencié
2	03B13667	F	83	iléo-colique	pT ₃ N ₁ M _x	22/10/2003	adénocarcinome, bien différencié, dégénérescence de type colloïde, 1/10 ganglion lymphatique isolés massivement infiltré
3	03B14640	F	27	recto-sigmoïde	pT ₂ N ₀ M _x	13/11/2003	adénocarcinome, moyennement différencié
4	03B15317	H	84	rectum	pT ₂ N ₀ M _x	26/11/2003	adénome tubulo-villeux, dysplasie modérée à sévère
5	03B15597	F	69	sigmoïde	pT ₃ N ₀ M _x	02/12/2003	adénocarcinome, moyennement différencié
6	03B15633	H	80	transverse	pT ₄ N ₀ M _x	02/12/2003	adénocarcinome, moyennement différencié
7	04B07419	H	62	sigmoïde	pT ₃ N ₀ M _x	01/06/2004	adénocarcinome, moyennement différencié
8	04B07724	H	80	colon droit	pT ₃ N ₀ M _x	09/06/2004	adénocarcinome, moyennement différencié

Tableau 2 Tumeurs primaires colorectales

C- Plasmides

Le plasmide pJT4-SHH est un don du Dr D. Noji (Université de Tokushima) tandis que les plasmides 3'GLIBS et m3'GLIBS ont été obtenus auprès de Dr H. Sasaki (Université d'Osaka) (Sasaki *et al.*, 1997). Le plasmide pCDNA3.1-GLI1 a été généré en insérant l'ADNc humain de GLI1 (pGLI.K12 coupé par HindIII/XbaI) dans le vecteur pCDNA3.1 (Invitrogen ; HindIII/XbaI). Le plasmide pREP4-GLI3 a été obtenu en insérant l'ADNc humain de GLI3 (pGLI3 coupé par XbaI/Sall) dans le vecteur pREP4 (Invitrogen ; XhoI/NheI). Les plasmides pGLI.K12 et pGLI3 sont des dons du Pr B. Vogelstein (John Hopkins Center).

II. Méthodes

A- RT-PCR sur les ARNm extraits des lignées cellulaires et tumeurs primaires

Les ARN des lignées cellulaires et tissus humains ont été extraits par la méthode du Tripure conformément aux recommandations du fabricant (Roche). Les tissus humains ont d'abord été broyés mécaniquement à l'aide d'un "dismembrator" (Mikrodismembrator braunBiotech) avant d'être resuspendus dans le Tripure. Les ARN ont été traités à la DNase I (1u/μg d'ARN) pendant 30 min à 37°C, afin d'éviter les contaminations d'ADN génomique. Enfin, les ARN ont été purifiés au phénol/chloroforme et précipités à l'éthanol.

Les RT-PCR ont été réalisées telles que décrites dans l'article (Annexe 1). L'étape de RT a été réalisée avec des amorces spécifiques (amorce antisens) à l'exception des RT-PCR *PTCH*, *GLII* et *Cyclophiline* dans les expériences où les cellules ont été traitées à la cyclophamide. Dans ce dernier cas, des hexanucléotides ont été utilisés comme amorce lors de l'étape de RT. Les amorces utilisées au cours de ce travail sont présentées dans le tableau suivant :

Gène	Amorce sens	Amorce antisens	T°C Hybridation	Références
<i>SHH</i>	5'-GACGACGGCGCCAAGAAGGT-3'	5'-ATGAGAATGGTGCCCTGGGC-3'	60°C	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2001 Pr JJ Cassiman (KUL) Stone DM <i>et al.</i> , 1999 Stone DM <i>et al.</i> , 1999 Solmi <i>et al.</i> , 2004 Locklin <i>et al.</i> , 2001 Maguer-Satta <i>et al.</i> , 2003
<i>IHH</i>	5'-CGGCTGACAATCACACGGAGC-3'	5'-GAAGCTGCCCTCTTCTAGCAG-3'	58°C	
<i>PTCH</i>	5'-CATCAACTGGAACGAGGACA-3'	5'-AGGGGCTTGTAACAGCAG-3'	53°C	
<i>SMO</i>	5'-CTGGTGTGGTTTGGTTTGTG-3'	5'-TGGTCTCGTTGATCTTGCTG-3'	59°C	
<i>GLI1</i>	5'-CGGGTCTCAAACTGCCAGCTT-3'	5'-GGCTGGGTCAGTGGCCCTC-3'	57°C	
<i>GLI2</i>	5'-CTAGCATCAGCGAGAACGTG-3'	5'-AAAGCCTAACTGGCCTCCTC-3'	54°C	
<i>GLI3</i>	5'-CAGATGTGACGGAGAAAGCC-3'	5'-GATGATAGTATTCTGCTGGG-3'	55°C	
<i>ZIC2</i>	5'-CAGTACGGCCCATGAATA-3'	5'-CTCATGGACCTTCATGTGCTTC-3'	54°C	
<i>SUFU484</i>	5'-CCAATCAACCCTCAGCGGCAGAATG-3'	5'-GTAGGTGAGAAAGAGGGCTGTC-3'	55°C	
<i>SUFU433</i>	5'-CCAATCAACCCTCAGCGGCAGAATG-3'	5'-CGAGGCCAGCAGCTCGTTC-3'	55°C	
<i>HHIP</i>	5'-AAAACAGATCATCAGCCAGAA-3'	5'-TAAATGCCCATTTGGAATAGAAT-3'	56°C	
<i>BMP4</i>	5'-AGCGCCCGCCAGCCGGCCAACAC-3'	5'-CCTGCTCCCGAAGAGCCGAAGCTC-3'	61°C	
<i>ID3</i>	5'-TGAGCTTGCTGGACGAC-3'	5'-CCTGGCATAGTTTGGAGAG-3'	51°C	
<i>GATA2</i>	5'-CCCTAAGCAGCGCAGCAAGGC-3'	5'-TGACTTCTCCTGCATGCACT-3'	55°C	
<i>CK8</i>	5'-CAATAAGCGTACAGATGGAGAAC-3'	5'-GTTGGCAATATCCTCGTACTGTG-3'	57°C	
<i>28S</i>	5'-GTTCAACCCTAATAGGGAACGTGA-3'	5'-GGATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGT-3'	68°C	
<i>Cyclophiline</i>	5'-TCTCTTTGAGCTGTTTGCAGAC-3'	5'-AAACTTAACTCTGCAATCCAGC-3'	55°C	

Tableau 3 Les amorces

B- Western Blot

Les *Western Blot* ont été décrits dans le matériel et méthodes de l'article (Annexe 1). Les anticorps utilisés et les conditions dans lesquelles ils ont été utilisés sont présentés dans le tableau suivant :

Anticorps anti-	Dilution anticorps primaire	Anticorps secondaire	Dilution anticorps secondaire
SHH (H-160, Santa Cruz Biotechnology)	1/500	IgG de chèvre anti-lapin (Dako)	1/1500
GLII (H-300, Santa Cruz Biotechnology)	1/500	IgG de chèvre anti-lapin (Dako)	1/2000
GLI3 (H-280, Santa Cruz Biotechnology)	1/500	IgG de chèvre anti-lapin (Dako)	1/2000
SUFU (C-15, Santa Cruz Biotechnology)	1/500	IgG de lapin anti-chèvre (Dako)	1/1000
ACTIN (MP biomedical)	1/10000	IgG de chèvre anti-souris (Dako)	1/2000
KU70 (C-19, Santa Cruz Biotechnology)	1/1000	IgG de lapin anti-chèvre (Dako)	1/4000

Tableau 4 Les anticorps

C- Test de viabilité cellulaire

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 20000 cellules par puits. Elles ont ensuite été traitées au DMSO, à la tomatidine ou à la cyclopamine pendant 48h tel que cela a été décrit dans l'article (Annexe 1). Le test de viabilité a été réalisé en remplaçant le milieu par du milieu RPMI1640 sans rouge phénol contenant du MTT (bromure de 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) - 2,5 diphényl tetrazolium ; 5mg/ml) et les cellules ont été incubées à 37°C. Les cristaux bleus de formazan, formés suite à la réduction du MTT par la succinate déshydrogénase mitochondriale, ont été dissous dans une solution de 0,04 mM HCl-Isopropanol. La densité optique a été mesurée à l'aide d'un Titertek Multiscan MCC/340 à 570 et 690nm (bruit de fond).

D- Génération de lignées HCT116 surexprimant stablement GLI1

Les plasmides pCDNA3.1 ou pCDNA3.1-GLI1 ont été transfectés dans les cellules HCT116 à l'aide du FuGene6 (Roche) selon les recommandations du fabricant. Après 24h, le milieu a été remplacé par du milieu contenant 300 µg/ml de G418 (MP Biomedicals). Le milieu a été changé tous les 3 jours. Après 2 à 3 semaines, les colonies formées ont été prélevées et individuellement mises en culture dans une boîte 24 puits. Tout en conservant le milieu de sélection, les cultures cellulaires ont progressivement été amenées dans des boîtes 25cm².

E- *Microarray*

Les ARN ont été extraits à l'aide du kit RNeasy midi kit (Qiagen). Le *microarray* a été réalisé par la plateforme Génomique du GIGA. L'intégrité des ARN a été vérifiée à l'aide du bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies). Les ADNc ont été générés au moyen du Kit Superscript II RT (Invitrogen). Le marquage à la biotine a été réalisé à l'aide du kit Bioarray High Yield RNA Transcript (Enzo Life Science). Finalement, les ADNc ont été hybridés aux puces "Human Genome U133A" (Affymetrix). Les résultats ont été obtenus à l'aide du programme CGOS (Affymetrix).

L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du programme MATLAB. Brièvement, les gènes dont l'intensité du signal sur chaque puce était inférieure à 2 n'ont pas été considérés. Lorsque dans l'une des 2 puces l'intensité du signal était inférieure à 30 (valeur *background*), la valeur de l'intensité a été augmentée à 30. L'intensité des signaux a été normalisée par la méthode de Lowess (Yang *et al.*, 2002). Les valeurs d'intensité obtenues après normalisation ont été utilisées pour identifier les gènes dont l'expression est modulée 2 fois ou plus.

F- Phosphatase alcaline

Les cellules ont été cultivées sur des lames Lab-tek jusqu'à confluence. Après avoir enlevé le milieu de culture, les cellules ont été fixées à l'éthanol 70% pendant 5 min avant d'être placées dans un dessiccateur.

Les cellules ont été ensuite incubées 90 min dans une solution contenant 1mg/ml de *fast blue BB salt* dissous dans du tampon Tris 0,2M pH9,1, 0,5% (v/v) de diméthylformamide et 0,03% de Naphtol AS phosphate. Après avoir été rincées à l'eau distillée, les cellules ont été contre-colorées avec du rouge nucléaire. Finalement, les lames ont été montées avec de l'entellan puis observées au microscope.

Bibliographie

Agren,M., Kogerman,P., Kleman,M.I., Wessling,M., and Toftgard,R. (2004) Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene* **330**:101-114.

Aikin,R.A., Ayers,K.L., and Therond,P.P. (2008) The role of kinases in the Hedgehog signalling pathway. *EMBO Rep.* **9**:330-336.

Akiyoshi,T., Nakamura,M., Koga,K., Nakashima,H., Yao,T., Tsuneyoshi,M., Tanaka,M., and Katano,M. (2006) Gli1, downregulated in colorectal cancers, inhibits proliferation of colon cancer cells involving Wnt signalling activation. *Gut* **55**:991-999.

Altaba,A. (1999) Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* **126**:3205-3216.

Amit,S., Hatzubai,A., Birman,Y., Andersen,J.S., Ben-Shushan,E., Mann,M., Ben-Neriah,Y., and Alkalay,I. (2002) Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* **16**:1066-1076.

Aruga,J., Inoue,T., Hoshino,J., and Mikoshiba,K. (2002) Zic2 controls cerebellar development in cooperation with Zic1. *J.Neurosci.* **22**:218-225.

Augeron,C. and Laboisse,C.L. (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.* **44**:3961-3969.

Bai,C.B., Auerbach,W., Lee,J.S., Stephen,D., and Joyner,A.L. (2002) Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* **129**:4753-4761.

Bai,C.B., Stephen,D., and Joyner,A.L. (2004) All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev.Cell* **6**:103-115.

Barker,N., van Es,J.H., Kuipers,J., Kujala,P., van den,B.M., Cozijnsen,M., Haegbarth,A., Korving,J., Begthel,H., Peters,P.J., and Clevers,H. (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**:1003-1007.

Barnard,J.A., Beauchamp,R.D., Coffey,R.J., and Moses,H.L. (1989) Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type beta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**:1578-1582.

Batts,L.E., Polk,D.B., Dubois,R.N., and Kulessa,H. (2006) Bmp signaling is required for intestinal growth and morphogenesis. *Dev.Dyn.* **235**:1563-1570.

- Beck,S.E., Jung,B.H., Fiorino,A., Gomez,J., Rosario,E.D., Cabrera,B.L., Huang,S.C., Chow,J.Y., and Carethers,J.M.** (2006) Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **291**:G135-G145.
- Behrens,J., von Kries,J.P., Kuhl,M., Bruhn,L., Wedlich,D., Grosschedl,R., and Birchmeier,W.** (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**:638-642.
- Bellaiche,Y., The,I., and Perrimon,N.** (1998) Tout-velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* **394**:85-88.
- Berman,D.M., Karhadkar,S.S., Maitra,A., Montes De,O.R., Gerstenblith,M.R., Briggs,K., Parker,A.R., Shimada,Y., Eshleman,J.R., Watkins,D.N., and Beachy,P.A.** (2003) Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* **425**:846-851.
- Bhardwaj,G., Murdoch,B., Wu,D., Baker,D.P., Williams,K.P., Chadwick,K., Ling,L.E., Karanu,F.N., and Bhatia,M.** (2001) Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat.Immunol.* **2**:172-180.
- Bhatia,N., Thiyagarajan,S., Elcheva,I., Saleem,M., Dlugosz,A., Mukhtar,H., and Spiegelman,V.S.** (2006) Gli2 is targeted for ubiquitination and degradation by beta-TrCP ubiquitin ligase. *J.Biol.Chem.* **281**:19320-19326.
- Bijlsma,M.F., Spek,C.A., Zivkovic,D., van de,W.S., Rezaee,F., and Peppelenbosch,M.P.** (2006) Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS.Biol.* **4**:e232.
- Brosens,L.A., van,H.A., Hylind,L.M., Iacobuzio-Donahue,C., Romans,K.E., Axilbund,J., Cruz-Correa,M., Tersmette,A.C., Offerhaus,G.J., and Giardiello,F.M.** (2007) Risk of colorectal cancer in juvenile polyposis. *Gut* **56**:965-967.
- Brown,S.A., Warburton,D., Brown,L.Y., Yu,C.Y., Roeder,E.R., Stengel-Rutkowski,S., Hennekam,R.C., and Muenke,M.** (1998) Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of Drosophila odd-paired. *Nat.Genet.* **20**:180-183.
- Burke,R., Nellen,D., Bellotto,M., Hafen,E., Senti,K.A., Dickson,B.J., and Basler,K.** (1999) Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* **99**:803-815.
- Buttitta,L., Mo,R., Hui,C.C., and Fan,C.M.** (2003) Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development* **130**:6233-6243.
- Capurro,M.I., Xu,P., Shi,W., Li,F., Jia,A., and Filmus,J.** (2008) Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Dev.Cell* **14**:700-711.
- Chantret,I., Barbat,A., Dussaulx,E., Brattain,M.G., and Zweibaum,A.** (1988) Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* **48**:1936-1942.

- Chatel,G., Ganef,C., Boussif,N., Delacroix,L., Briquet,A., Nolens,G., and Winkler,R.** (2007) Hedgehog signaling pathway is inactive in colorectal cancer cell lines. *Int.J.Cancer* **121**:2622-2627.
- Chen,J.K., Taipale,J., Cooper,M.K., and Beachy,P.A.** (2002) Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev.* **16**:2743-2748.
- Chen,W., Ren,X.R., Nelson,C.D., Barak,L.S., Chen,J.K., Beachy,P.A., de,S.F., and Lefkowitz,R.J.** (2004) Activity-dependent internalization of smoothed mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science* **306**:2257-2260.
- Cheng,S.Y. and Bishop,J.M.** (2002) Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:5442-5447.
- Chuang,P.T. and McMahon,A.P.** (1999) Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* **397**:617-621.
- Clement,V., Sanchez,P., de,T.N., Radovanovic,I., and Altaba,A.** (2007) HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr.Biol.* **17**:165-172.
- Clevers,H.** (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**:469-480.
- Cooper,A.F., Yu,K.P., Brueckner,M., Brailey,L.L., Johnson,L., McGrath,J.M., and Bale,A.E.** (2005) Cardiac and CNS defects in a mouse with targeted disruption of suppressor of fused. *Development* **132**:4407-4417.
- Cooper,M.K., Porter,J.A., Young,K.E., and Beachy,P.A.** (1998) Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* **280**:1603-1607.
- Corbit,K.C., Aanstad,P., Singla,V., Norman,A.R., Stainier,D.Y., and Reiter,J.F.** (2005) Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* **437**:1018-1021.
- Corcoran,R.B. and Scott,M.P.** (2006) Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**:8408-8413.
- Dahmane,N., Lee,J., Robins,P., Heller,P., and Altaba,A.** (1997) Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* **389**:876-881.
- Dai,P., Akimaru,H., Tanaka,Y., Maekawa,T., Nakafuku,M., and Ishii,S.** (1999) Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J.Biol.Chem.* **274**:8143-8152.
- Dalerba,P., Cho,R.W., and Clarke,M.F.** (2007) Cancer stem cells: models and concepts. *Annu.Rev.Med.* **58**:267-284.
- Denef,N., Neubuser,D., Perez,L., and Cohen,S.M.** (2000) Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothed. *Cell* **102**:521-531.

- Deng,H., Makizumi,R., Ravikumar,T.S., Dong,H., Yang,W., and Yang,W.L.** (2007) Bone morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes migration and invasion of HCT116 cells. *Exp.Cell Res.* **313**:1033-1044.
- Deng,H., Ravikumar,T.S., and Yang,W.L.** (2009) Overexpression of bone morphogenetic protein 4 enhances the invasiveness of Smad4-deficient human colorectal cancer cells. *Cancer Lett.*
- Ditzel,H.J., Strik,M.C., Larsen,M.K., Willis,A.C., Waseem,A., Kejling,K., and Jensenius,J.C.** (2002) Cancer-associated cleavage of cytokeratin 8/18 heterotypic complexes exposes a neoepitope in human adenocarcinomas. *J.Biol.Chem.* **277**:21712-21722.
- Douard,R., Moutereau,S., Pernet,P., Chimingqi,M., Allory,Y., Manivet,P., Conti,M., Vaubourdolle,M., Cugnenc,P.H., and Loric,S.** (2006) Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer. *Surgery* **139**:665-670.
- Duman-Scheel,M., Weng,L., Xin,S., and Du,W.** (2002) Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* **417**:299-304.
- Echelard,Y., Epstein,D.J., St-Jacques,B., Shen,L., Mohler,J., McMahon,J.A., and McMahon,A.P.** (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**:1417-1430.
- Eppert,K., Scherer,S.W., Ozcelik,H., Pirone,R., Hoodless,P., Kim,H., Tsui,L.C., Bapat,B., Gallinger,S., Andrusis,I.L., Thomsen,G.H., Wrana,J.L., and Attisano,L.** (1996) MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* **86**:543-552.
- Fabre,E., Spano,J.P., Atlan,D., Braud,A.C., Mitry,E., Panis,Y., and Faivre,J.** (2000) [Cancer of the colon: an update]. *Bull.Cancer Suppl* **4**:5-20.
- Fearon,E.R. and Vogelstein,B.** (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**:759-767.
- Gallet,A., Staccini-Lavenant,L., and Therond,P.P.** (2008) Cellular trafficking of the glypican Dally-like is required for full-strength Hedgehog signaling and wingless transcytosis. *Dev.Cell* **14**:712-725.
- Garber,K.** (2008) Hedgehog drugs begin to show results. *J.Natl.Cancer Inst.* **100**:692-697.
- Goodrich,L.V., Milenkovic,L., Higgins,K.M., and Scott,M.P.** (1997) Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* **277**:1109-1113.
- Grady,W.M., Rajput,A., Myeroff,L., Liu,D.F., Kwon,K., Willis,J., and Markowitz,S.** (1998) Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res.* **58**:3101-3104.
- Grasset,E., Bernabeu,J., and Pinto,M.** (1985) Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: effect of secretagogues. *Am.J.Physiol* **248**:C410-C418.

- Gregorieff,A. and Clevers,H.** (2005) Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* **19**:877-890.
- Grimm,T., Teglund,S., Tackels,D., Sangiorgi,E., Gurrieri,F., Schwartz,C., and Toftgard,R.** (2001) Genomic organization and embryonic expression of Suppressor of Fused, a candidate gene for the split-hand/split-foot malformation type 3. *FEBS Lett.* **505**:13-17.
- Grinberg,I. and Millen,K.J.** (2005) The ZIC gene family in development and disease. *Clin.Genet.* **67**:290-296.
- Groden,J., Thliveris,A., Samowitz,W., Carlson,M., Gelbert,L., Albertsen,H., Joslyn,G., Stevens,J., Spirio,L., Robertson,M., and .** (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**:589-600.
- Guleng,B., Tateishi,K., Ohta,M., Asaoka,Y., Jazag,A., Lin,L.J., Tanaka,Y., Tada,M., Seto,M., Kanai,F., Kawabe,T., and Omata,M.** (2006) Smoothed gene mutations found in digestive cancer have no aberrant Hedgehog signaling activity. *J.Gastroenterol.* **41**:1238-1239.
- Hahn,H., Wicking,C., Zaphiropoulos,P.G., Gailani,M.R., Shanley,S., Chidambaram,A., Vorechovsky,I., Holmberg,E., Uden,A.B., Gillies,S., Negus,K., Smyth,I., Pressman,C., Leffell,D.J., Gerrard,B., Goldstein,A.M., Dean,M., Toftgard,R., Chenevix-Trench,G., Wainwright,B., and Bale,A.E.** (1996) Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* **85**:841-851.
- Hahn,H., Wojnowski,L., Specht,K., Kappler,R., Calzada-Wack,J., Potter,D., Zimmer,A., Muller,U., Samson,E., Quintanilla-Martinez,L., and Zimmer,A.** (2000) Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *J.Biol.Chem.* **275**:28341-28344.
- Hahn,H., Wojnowski,L., Zimmer,A.M., Hall,J., Miller,G., and Zimmer,A.** (1998) Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat.Med.* **4**:619-622.
- Hanahan,D. and Weinberg,R.A.** (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.
- Haramis,A.P., Begthel,H., van den,B.M., Van,E.J., Jonkheer,S., Offerhaus,G.J., and Clevers,H.** (2004) De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* **303**:1684-1686.
- Haramis,A.P., Hurlstone,A., van,d., V, Begthel,H., van den,B.M., Offerhaus,G.J., and Clevers,H.C.** (2006) Adenomatous polyposis coli-deficient zebrafish are susceptible to digestive tract neoplasia. *EMBO Rep.* **7**:444-449.
- Hardwick,J.C., van den Brink,G.R., Bleuming,S.A., Ballester,I., Van Den Brande,J.M., Keller,J.J., Offerhaus,G.J., van Deventer,S.J., and Peppelenbosch,M.P.** (2004) Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology* **126**:111-121.
- Hart,M., Concordet,J.P., Lassot,I., Albert,I., del los,S.R., Durand,H., Perret,C., Rubinfeld,B., Margottin,F., Benarous,R., and Polakis,P.** (1999) The F-box protein beta-

TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr.Biol.* **9**:207-210.

Hatton,B.A., Knoepfler,P.S., Kenney,A.M., Rowitch,D.H., de,A., I, Olson,J.M., and Eisenman,R.N. (2006) N-myc Is an Essential Downstream Effector of Shh Signaling during both Normal and Neoplastic Cerebellar Growth. *Cancer Res.* **66**:8655-8661.

Haycraft,C.J., Banizs,B., ydin-Son,Y., Zhang,Q., Michaud,E.J., and Yoder,B.K. (2005) Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS.Genet.* **1**:e53.

He,X.C., Zhang,J., Tong,W.G., Tawfik,O., Ross,J., Scoville,D.H., Tian,Q., Zeng,X., He,X., Wiedemann,L.M., Mishina,Y., and Li,L. (2004) BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat.Genet.* **36**:1117-1121.

Hodin,R.A., Chamberlain,S.M., and Meng,S. (1995) Pattern of rat intestinal brush-border enzyme gene expression changes with epithelial growth state. *Am.J.Physiol* **269**:C385-C391.

Hollnagel,A., Oehlmann,V., Heymer,J., Ruther,U., and Nordheim,A. (1999) Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J.Biol.Chem.* **274**:19838-19845.

Hooper,J.E. and Scott,M.P. (2005) Communicating with Hedgehogs. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **6**:306-317.

Howe,J.R., Bair,J.L., Sayed,M.G., Anderson,M.E., Mitros,F.A., Petersen,G.M., Velculescu,V.E., Traverso,G., and Vogelstein,B. (2001) Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat.Genet.* **28**:184-187.

Howe,J.R., Roth,S., Ringold,J.C., Summers,R.W., Jarvinen,H.J., Sistonon,P., Tomlinson,I.P., Houlston,R.S., Bevan,S., Mitros,F.A., Stone,E.M., and Aaltonen,L.A. (1998) Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* **280**:1086-1088.

Huang,S., He,J., Zhang,X., Bian,Y., Yang,L., Xie,G., Zhang,K., Tang,W., Stelter,A.A., Wang,Q., Zhang,H., and Xie,J. (2006) Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* **27**:1334-1340.

Huangfu,D., Liu,A., Rakeman,A.S., Murcia,N.S., Niswander,L., and Anderson,K.V. (2003) Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* **426**:83-87.

Hynes,M., Stone,D.M., Dowd,M., Pitts-Meek,S., Goddard,A., Gurney,A., and Rosenthal,A. (1997) Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1. *Neuron* **19**:15-26.

Ikram,M.S., Neill,G.W., Regl,G., Eichberger,T., Frischauf,A.M., Aberger,F., Quinn,A., and Philpott,M. (2004) GLI2 is expressed in normal human epidermis and BCC and induces GLI1 expression by binding to its promoter. *J.Invest Dermatol.* **122**:1503-1509.

- Incardona, J.P., Gaffield, W., Kapur, R.P., and Roelink, H.** (1998) The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* **125**:3553-3562.
- Ingham, P.W. and McMahon, A.P.** (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**:3059-3087.
- Ishizuya-Oka, A., Hasebe, T., Shimizu, K., Suzuki, K., and Ueda, S.** (2006) Shh/BMP-4 signaling pathway is essential for intestinal epithelial development during *Xenopus* larval-to-adult remodeling. *Dev. Dyn.* **235**:3240-3249.
- Jia, J., Tong, C., and Jiang, J.** (2003) Smoothed transduces Hedgehog signal by physically interacting with Costal2/Fused complex through its C-terminal tail. *Genes Dev.* **17**:2709-2720.
- Jiang, J. and Struhl, G.** (1998) Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* **391**:493-496.
- Johnson, R.L., Rothman, A.L., Xie, J., Goodrich, L.V., Bare, J.W., Bonifas, J.M., Quinn, A.G., Myers, R.M., Cox, D.R., Epstein, E.H., Jr., and Scott, M.P.** (1996) Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* **272**:1668-1671.
- Kalderon, D.** (2005) The mechanism of hedgehog signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:1509-1512.
- Karhadkar, S.S., Bova, G.S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs, J.T., Berman, D.M., and Beachy, P.A.** (2004) Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* **431**:707-712.
- Katoh, Y. and Katoh, M.** (2006) WNT antagonist, SFRP1, is Hedgehog signaling target. *Int. J. Mol. Med.* **17**:171-175.
- Kawai, S. and Sugiura, T.** (2001) Characterization of human bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7 gene promoters: activation of BMP promoters by Gli, a sonic hedgehog mediator. *Bone* **29**:54-61.
- Kayed, H., Kleeff, J., Keleg, S., Guo, J., Ketterer, K., Berberat, P.O., Giese, N., Esposito, I., Giese, T., Buchler, M.W., and Friess, H.** (2004) Indian hedgehog signaling pathway: expression and regulation in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **110**:668-676.
- Keeler, R.F. and Binns, W.** (1968) Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). V. Comparison of cyclopien effects of steroidal alkaloids from the plant and structurally related compounds from other sources. *Teratology* **1**:5-10.
- Kim, C.F., Jackson, E.L., Woolfenden, A.E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R.T., and Jacks, T.** (2005) Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* **121**:823-835.
- Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K.J., Preisinger, A.C., Hamilton, S.R., Hedge, P., Markham, A., and .** (1991) Identification of a

gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* **251**:1366-1370.

Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1990) The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol. Cell Biol.* **10**:634-642.

Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K., and Nakayama, K. (1999) An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *EMBO J.* **18**:2401-2410.

Kodach, L.L., Bleuming, S.A., Musler, A.R., Peppelenbosch, M.P., Hommes, D.W., van den Brink, G.R., van Noesel, C.J., Offerhaus, G.J., and Hardwick, J.C. (2008) The bone morphogenetic protein pathway is active in human colon adenomas and inactivated in colorectal cancer. *Cancer* **112**:300-306.

Koebnick, K. and Pieler, T. (2002) Gli-type zinc finger proteins as bipotential transducers of Hedgehog signaling. *Differentiation* **70**:69-76.

Kogerman, P., Grimm, T., Kogerman, L., Krause, D., Uden, A.B., Sandstedt, B., Toftgard, R., and Zaphiropoulos, P.G. (1999) Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat. Cell Biol.* **1**:312-319.

Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van, D.E., Huls, G., Peters, P.J., and Clevers, H. (1998) Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* **19**:379-383.

Kosinski, C., Li, V.S., Chan, A.S., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W.Y., Chan, T.L., Mifflin, R.C., Powell, D.W., Yuen, S.T., Leung, S.Y., and Chen, X. (2007) Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**:15418-15423.

Kovacs, J.J., Whalen, E.J., Liu, R., Xiao, K., Kim, J., Chen, M., Wang, J., Chen, W., and Lefkowitz, R.J. (2008) Beta-arrestin-mediated localization of smoothened to the primary cilium. *Science* **320**:1777-1781.

Koyabu, Y., Nakata, K., Mizugishi, K., Aruga, J., and Mikoshiba, K. (2001) Physical and functional interactions between Zic and Gli proteins. *J. Biol. Chem.* **276**:6889-6892.

Koyama, S.Y. and Podolsky, D.K. (1989) Differential expression of transforming growth factors alpha and beta in rat intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **83**:1768-1773.

Koziel, L., Kunath, M., Kelly, O.G., and Vortkamp, A. (2004) Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Dev. Cell* **6**:801-813.

Kubo, M., Nakamura, M., Tasaki, A., Yamanaka, N., Nakashima, H., Nomura, M., Kuroki, S., and Katano, M. (2004) Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res.* **64**:6071-6074.

Kuhnert, F., Davis, C.R., Wang, H.T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R., and Kuo, C.J. (2004) Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and

colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**:266-271.

Labbe,E., Lock,L., Letamendia,A., Gorska,A.E., Gryfe,R., Gallinger,S., Moses,H.L., and Attisano,L. (2007) Transcriptional cooperation between the transforming growth factor-beta and Wnt pathways in mammary and intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* **67**:75-84.

Lambert,S., Vivario,J., Boniver,J., and Gol-Winkler,R. (1990) Abnormal expression and structural modification of the insulin-like growth-factor-II gene in human colorectal tumors. *Int.J.Cancer* **46**:405-410.

Lapidot,T., Sirard,C., Vormoor,J., Murdoch,B., Hoang,T., Caceres-Cortes,J., Minden,M., Paterson,B., Caligiuri,M.A., and Dick,J.E. (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**:645-648.

Lauth,M., Bergstrom,A., Shimokawa,T., and Toftgard,R. (2007) Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**:8455-8460.

Lee,J., Platt,K.A., Censullo,P., and Altaba,A. (1997) Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* **124**:2537-2552.

Lee,J.J., Ekker,S.C., von Kessler,D.P., Porter,J.A., Sun,B.I., and Beachy,P.A. (1994) Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* **266**:1528-1537.

Lees,C., Howie,S., Sartor,R.B., and Satsangi,J. (2005) The hedgehog signalling pathway in the gastrointestinal tract: implications for development, homeostasis, and disease. *Gastroenterology* **129**:1696-1710.

Li,G.M. (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* **18**:85-98.

Li,X., Madison,B.B., Zacharias,W., Kolterud,A., States,D.J., and Gumucio,D.L. (2007) Deconvoluting the intestine: molecular evidence for a major role of the mesenchyme in the modulation of signaling crosstalk. *Physiol Genomics.*

Li,Y., Zhang,H., Choi,S.C., Litingtung,Y., and Chiang,C. (2004) Sonic hedgehog signaling regulates Gli3 processing, mesenchymal proliferation, and differentiation during mouse lung organogenesis. *Dev.Biol.* **270**:214-231.

Lin,S.J., Lerch,T.F., Cook,R.W., Jardetzky,T.S., and Woodruff,T.K. (2006) The structural basis of TGF-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *Reproduction.* **132**:179-190.

Lipinski,R.J., Dengler,E., Kiehn,M., Peterson,R.E., and Bushman,W. (2007) Identification and characterization of several dietary alkaloids as weak inhibitors of hedgehog signaling. *Toxicol.Sci.* **100**:456-463.

Liu,C., Li,Y., Semenov,M., Han,C., Baeg,G.H., Tan,Y., Zhang,Z., Lin,X., and He,X. (2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**:837-847.

- Liu,S., Dontu,G., Mantle,I.D., Patel,S., Ahn,N.S., Jackson,K.W., Suri,P., and Wicha,M.S.** (2006) Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res.* **66**:6063-6071.
- Liu,W., Dong,X., Mai,M., Seelan,R.S., Taniguchi,K., Krishnadath,K.K., Halling,K.C., Cunningham,J.M., Boardman,L.A., Qian,C., Christensen,E., Schmidt,S.S., Roche,P.C., Smith,D.I., and Thibodeau,S.N.** (2000) Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat.Genet.* **26**:146-147.
- Locklin,R.M., Riggs,B.L., Hicok,K.C., Horton,H.F., Byrne,M.C., and Khosla,S.** (2001) Assessment of gene regulation by bone morphogenetic protein 2 in human marrow stromal cells using gene array technology. *J.Bone Miner.Res.* **16**:2192-2204.
- Loeb,L.A.** (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* **51**:3075-3079.
- Lum,L., Zhang,C., Oh,S., Mann,R.K., von Kessler,D.P., Taipale,J., Weis-Garcia,F., Gong,R., Wang,B., and Beachy,P.A.** (2003) Hedgehog signal transduction via Smoothed association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, Costal-2. *Mol.Cell* **12**:1261-1274.
- Lynch,H.T. and Lynch,J.F.** (1998) Genetics of colonic cancer. *Digestion* **59**:481-492.
- Ma,X., Chen,K., Huang,S., Zhang,X., Adegboyega,P.A., Evers,B.M., Zhang,H., and Xie,J.** (2005) Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas. *Carcinogenesis* **26**:1698-1705.
- Ma,Y., Erkner,A., Gong,R., Yao,S., Taipale,J., Basler,K., and Beachy,P.A.** (2002) Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell* **111**:63-75.
- Madison,B.B., Braunstein,K., Kuizon,E., Portman,K., Qiao,X.T., and Gumucio,D.L.** (2005) Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* **132**:279-289.
- Maeno,M., Mead,P.E., Kelley,C., Xu,R.H., Kung,H.F., Suzuki,A., Ueno,N., and Zon,L.I.** (1996) The role of BMP-4 and GATA-2 in the induction and differentiation of hematopoietic mesoderm in *Xenopus laevis*. *Blood* **88**:1965-1972.
- Maguer-Satta,V., Bartholin,L., Jeanpierre,S., Ffrench,M., Martel,S., Magaud,J.P., and Rimokh,R.** (2003) Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP2, and BMP4, members of the TGFbeta family. *Exp.Cell Res.* **282**:110-120.
- May,S.R., Ashique,A.M., Karlen,M., Wang,B., Shen,Y., Zarbalis,K., Reiter,J., Ericson,J., and Peterson,A.S.** (2005) Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev.Biol.* **287**:378-389.
- Meng,X., Poon,R., Zhang,X., Cheah,A., Ding,Q., Hui,C.C., and Alman,B.** (2001) Suppressor of fused negatively regulates beta-catenin signaling. *J.Biol.Chem.* **276**:40113-40119.

- Methot,N. and Basler,K.** (2000) Suppressor of fused opposes hedgehog signal transduction by impeding nuclear accumulation of the activator form of Cubitus interruptus. *Development* **127**:4001-4010.
- Mizugishi,K., Aruga,J., Nakata,K., and Mikoshiba,K.** (2001) Molecular properties of Zic proteins as transcriptional regulators and their relationship to GLI proteins. *J.Biol.Chem.* **276**:2180-2188.
- Molenaar,M., van de,W.M., Oosterwegel,M., Peterson-Maduro,J., Godsave,S., Korinek,V., Roose,J., Destree,O., and Clevers,H.** (1996) XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**:391-399.
- Monzo,M., Moreno,I., Artells,R., Ibeas,R., Navarro,A., Moreno,J., Hernandez,R., Granell,M., and Pie,J.** (2006) Sonic hedgehog mRNA expression by real-time quantitative PCR in normal and tumor tissues from colorectal cancer patients. *Cancer Lett.* **233**:117-123.
- 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.
- Moser,A.R., Pitot,H.C., and Dove,W.F.** (1990) A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**:322-324.
- Nagase,H. and Nakamura,Y.** (1993) Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum.Mutat.* **2**:425-434.
- Nathke,I.S.** (2004) The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **20**:337-366.
- Nieuwenhuis,E., Motoyama,J., Barnfield,P.C., Yoshikawa,Y., Zhang,X., Mo,R., Crackower,M.A., and Hui,C.C.** (2006) Mice with a targeted mutation of patched2 are viable but develop alopecia and epidermal hyperplasia. *Mol.Cell Biol.* **26**:6609-6622.
- Nusslein-Volhard,C. and Wieschaus,E.** (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**:795-801.
- Nybakken,K., Vokes,S.A., Lin,T.Y., McMahon,A.P., and Perrimon,N.** (2005) A genome-wide RNA interference screen in *Drosophila melanogaster* cells for new components of the Hh signaling pathway. *Nat.Genet.* **37**:1323-1332.
- O'Brien,C.A., Pollett,A., Gallinger,S., and Dick,J.E.** (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**:106-110.
- Oniscu,A., James,R.M., Morris,R.G., Bader,S., Malcomson,R.D., and Harrison,D.J.** (2004) Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia. *J.Pathol.* **203**:909-917.
- Park,H.L., Bai,C., Platt,K.A., Matise,M.P., Beeghly,A., Hui,C.C., Nakashima,M., and Joyner,A.L.** (2000) Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* **127**:1593-1605.

- Pathi,S., Pagan-Westphal,S., Baker,D.P., Garber,E.A., Rayhorn,P., Bumcrot,D., Tabin,C.J., Blake,P.R., and Williams,K.P.** (2001) Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech.Dev.* **106**:107-117.
- Peacock,C.D., Wang,Q., Gesell,G.S., Corcoran-Schwartz,I.M., Jones,E., Kim,J., Devereux,W.L., Rhodes,J.T., Huff,C.A., Beachy,P.A., Watkins,D.N., and Matsui,W.** (2007) Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**:4048-4053.
- Pepinsky,R.B., Zeng,C., Wen,D., Rayhorn,P., Baker,D.P., Williams,K.P., Bixler,S.A., Ambrose,C.M., Garber,E.A., Miatkowski,K., Taylor,F.R., Wang,E.A., and Galdes,A.** (1998) Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J.Biol.Chem.* **273**:14037-14045.
- Porter,J.A., Young,K.E., and Beachy,P.A.** (1996) Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* **274**:255-259.
- Preat,T.** (1992) Characterization of Suppressor of fused, a complete suppressor of the fused segment polarity gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **132**:725-736.
- Qualtrough,D., Buda,A., Gaffield,W., Williams,A.C., and Paraskeva,C.** (2004) Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int.J.Cancer* **110**:831-837.
- Raffel,C., Jenkins,R.B., Frederick,L., Hebrink,D., Alderete,B., Fults,D.W., and James,C.D.** (1997) Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res.* **57**:842-845.
- Ramalho-Santos,M., Melton,D.A., and McMahon,A.P.** (2000) Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* **127**:2763-2772.
- Regl,G., Kasper,M., Schnidar,H., Eichberger,T., Neill,G.W., Philpott,M.P., Esterbauer,H., Hauser-Kronberger,C., Frischauf,A.M., and Aberger,F.** (2004) Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Res.* **64**:7724-7731.
- Reya,T., Morrison,S.J., Clarke,M.F., and Weissman,I.L.** (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**:105-111.
- Ricci-Vitiani,L., Lombardi,D.G., Pilozzi,E., Biffoni,M., Todaro,M., Peschle,C., and De,M.R.** (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**:111-115.
- Robbins,D.J. and Hebrok,M.** (2007) Hedgehogs: la dolce vita. Workshop on Hedgehog-Gli Signaling in Cancer and Stem Cells. *EMBO Rep.* **8**:451-455.
- Robbins,D.J., Nybakken,K.E., Kobayashi,R., Sisson,J.C., Bishop,J.M., and Therond,P.P.** (1997) Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein costal2. *Cell* **90**:225-234.

- Roberts,D.J., Johnson,R.L., Burke,A.C., Nelson,C.E., Morgan,B.A., and Tabin,C.** (1995) Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development* **121**:3163-3174.
- Roessler,E., Belloni,E., Gaudenz,K., Jay,P., Berta,P., Scherer,S.W., Tsui,L.C., and Muenke,M.** (1996) Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat.Genet.* **14**:357-360.
- Rubin,L.L. and de Sauvage,F.J.** (2006) Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat.Rev.Drug Discov.* **5**:1026-1033.
- Rubinfeld,B., Albert,I., Porfiri,E., Fiol,C., Munemitsu,S., and Polakis,P.** (1996) Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* **272**:1023-1026.
- Saaf,A.M., Halbleib,J.M., Chen,X., Yuen,S.T., Leung,S.Y., Nelson,W.J., and Brown,P.O.** (2007) Parallels between global transcriptional programs of polarizing Caco-2 intestinal epithelial cells in vitro and gene expression programs in normal colon and colon cancer. *Mol.Biol.Cell* **18**:4245-4260.
- Sanchez,P., Hernandez,A.M., Stecca,B., Kahler,A.J., DeGueme,A.M., Barrett,A., Beyna,M., Datta,M.W., Datta,S., and Altaba,A.** (2004) Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**:12561-12566.
- Sansom,O.J., Meniel,V.S., Muncan,V., Phesse,T.J., Wilkins,J.A., Reed,K.R., Vass,J.K., Athineos,D., Clevers,H., and Clarke,A.R.** (2007) Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* **446**:676-679.
- Sansom,O.J., Reed,K.R., Hayes,A.J., Ireland,H., Brinkmann,H., Newton,I.P., Batlle,E., Simon-Assmann,P., Clevers,H., Nathke,I.S., Clarke,A.R., and Winton,D.J.** (2004) Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev.* **18**:1385-1390.
- Sasaki,H., Hui,C., Nakafuku,M., and Kondoh,H.** (1997) A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* **124**:1313-1322.
- Sasaki,H., Nishizaki,Y., Hui,C., Nakafuku,M., and Kondoh,H.** (1999) Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* **126**:3915-3924.
- Sasaki,T., Suzuki,H., Yagi,K., Furuhashi,M., Yao,R., Susa,S., Noda,T., Arai,Y., Miyazono,K., and Kato,M.** (2003) Lymphoid enhancer factor 1 makes cells resistant to transforming growth factor beta-induced repression of c-myc. *Cancer Res.* **63**:801-806.
- Satir,P. and Christensen,S.T.** (2007) Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annu.Rev.Physiol* **69**:377-400.
- Shi,Y. and Massague,J.** (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**:685-700.

- Shibata,H., Toyama,K., Shioya,H., Ito,M., Hirota,M., Hasegawa,S., Matsumoto,H., Takano,H., Akiyama,T., Toyoshima,K., Kanamaru,R., Kanegae,Y., Saito,I., Nakamura,Y., Shiba,K., and Noda,T.** (1997) Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science* **278**:120-123.
- Sisson,J.C., Ho,K.S., Suyama,K., and Scott,M.P.** (1997) Costal2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* **90**:235-245.
- Smith,G., Carey,F.A., Beattie,J., Wilkie,M.J., Lightfoot,T.J., Coxhead,J., Garner,R.C., Steele,R.J., and Wolf,C.R.** (2002) Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:9433-9438.
- Solmi,R., De,S.P., Zucchini,C., Ugolini,G., Rosati,G., Del,G.M., Coppola,D., Yeatman,T.J., Lenzi,L., Caira,A., Zanotti,S., Taffurelli,M., Carinci,P., Valvassori,L., and Strippoli,P.** (2004) Search for epithelial-specific mRNAs in peripheral blood of patients with colon cancer by RT-PCR. *Int.J.Oncol.* **25**:1049-1056.
- Stone,D.M., Murone,M., Luoh,S., Ye,W., Armanini,M.P., Gurney,A., Phillips,H., Brush,J., Goddard,A., de Sauvage,F.J., and Rosenthal,A.** (1999) Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J.Cell Sci.* **112 (Pt 23)**:4437-4448.
- Sukegawa,A., Narita,T., Kameda,T., Saitoh,K., Nohno,T., Iba,H., Yasugi,S., and Fukuda,K.** (2000) The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. *Development* **127**:1971-1980.
- Taipale,J., Cooper,M.K., Maiti,T., and Beachy,P.A.** (2002) Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* **418**:892-897.
- Takaku,K., Miyoshi,H., Matsunaga,A., Oshima,M., Sasaki,N., and Taketo,M.M.** (1999) Gastric and duodenal polyps in Smad4 (Dpc4) knockout mice. *Cancer Res.* **59**:6113-6117.
- Takaku,K., Oshima,M., Miyoshi,H., Matsui,M., Seldin,M.F., and Taketo,M.M.** (1998) Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* **92**:645-656.
- Tang,J.Y., So,P.L., and Epstein,E.H., Jr.** (2007) Novel Hedgehog pathway targets against basal cell carcinoma. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **224**:257-264.
- Taylor,M.D., Liu,L., Raffel,C., Hui,C.C., Mainprize,T.G., Zhang,X., Agatep,R., Chiappa,S., Gao,L., Lowrance,A., Hao,A., Goldstein,A.M., Stavrou,T., Scherer,S.W., Dura,W.T., Wainwright,B., Squire,J.A., Rutka,J.T., and Hogg,D.** (2002) Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat.Genet.* **31**:306-310.
- Tenzen,T., Allen,B.L., Cole,F., Kang,J.S., Krauss,R.S., and McMahon,A.P.** (2006) The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev.Cell* **10**:647-656.
- Thayer,S.P., di Magliano,M.P., Heiser,P.W., Nielsen,C.M., Roberts,D.J., Lauwers,G.Y., Qi,Y.P., Gysin,S., Fernandez-del,C.C., Yajnik,V., Antoniu,B., McMahon,M., Warshaw,A.L., and Hebrok,M.** (2003) Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* **425**:851-856.

- Thiagalingam,S., Lengauer,C., Leach,F.S., Schutte,M., Hahn,S.A., Overhauser,J., Willson,J.K., Markowitz,S., Hamilton,S.R., Kern,S.E., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B.** (1996) Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat.Genet.* **13**:343-346.
- Toyota,M., Ahuja,N., Ohe-Toyota,M., Herman,J.G., Baylin,S.B., and Issa,J.P.** (1999) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:8681-8686.
- Uden,A.B., Zaphiropoulos,P.G., Bruce,K., Toftgard,R., and Stahle-Backdahl,M.** (1997) Human patched (PTCH) mRNA is overexpressed consistently in tumor cells of both familial and sporadic basal cell carcinoma. *Cancer Res.* **57**:2336-2340.
- van de Wetering,M., Sancho,E., Verweij,C., de,L.W., Oving,I., Hurlstone,A., van der,H.K., Battle,E., Coudreuse,D., Haramis,A.P., Tjon-Pon-Fong,M., Moerer,P., van den,B.M., Soete,G., Pals,S., Eilers,M., Medema,R., and Clevers,H.** (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **111**:241-250.
- van den Brink,G.R.** (2007) Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol Rev.* **87**:1343-1375.
- van den Brink,G.R., Bleuming,S.A., Hardwick,J.C., Schepman,B.L., Offerhaus,G.J., Keller,J.J., Nielsen,C., Gaffield,W., van Deventer,S.J., Roberts,D.J., and Peppelenbosch,M.P.** (2004) Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat.Genet.* **36**:277-282.
- van den Brink,G.R., Hardwick,J.C., Nielsen,C., Xu,C., ten Kate,F.J., Glickman,J., van Deventer,S.J., Roberts,D.J., and Peppelenbosch,M.P.** (2002) Sonic hedgehog expression correlates with fundic gland differentiation in the adult gastrointestinal tract. *Gut* **51**:628-633.
- van den Brink,G.R. and Peppelenbosch,M.P.** (2006) Expression of hedgehog pathway components in the adult colon. *Gastroenterology* **130**:619.
- van Dop,W.A., Uhmman,A., Wijgerde,M., Sleddens-Linkels,E., Heijmans,J., Offerhaus,G.J., van den Bergh Weerman MA, Boeckstaens,G.E., Hommes,D.W., Hardwick,J.C., Hahn,H., and van den Brink,G.R.** (2009) Depletion of the Colonic Epithelial Precursor Cell Compartment Upon Conditional Activation of the Hedgehog Pathway. *Gastroenterology*.
- Varjosalo,M., Li,S.P., and Taipale,J.** (2006) Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between *Drosophila* and mammals. *Dev.Cell* **10**:177-186.
- Varjosalo,M. and Taipale,J.** (2008) Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* **22**:2454-2472.
- Vogelstein,B., Fearon,E.R., Hamilton,S.R., Kern,S.E., Preisinger,A.C., Leppert,M., Nakamura,Y., White,R., Smits,A.M., and Bos,J.L.** (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N.Engl.J.Med.* **319**:525-532.

- Wang,B., Fallon,J.F., and Beachy,P.A.** (2000) Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* **100**:423-434.
- Wang,L.C., Nassir,F., Liu,Z.Y., Ling,L., Kuo,F., Crowell,T., Olson,D., Davidson,N.O., and Burkly,L.C.** (2002) Disruption of hedgehog signaling reveals a novel role in intestinal morphogenesis and intestinal-specific lipid metabolism in mice. *Gastroenterology* **122**:469-482.
- Watkins,D.N., Berman,D.M., Burkholder,S.G., Wang,B., Beachy,P.A., and Baylin,S.B.** (2003) Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* **422**:313-317.
- 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., Koh,H., Simms,L., Barker,M., Leggett,B., Levine,J., Kim,M., French,A.J., Thibodeau,S.N., Jass,J., Haile,R., and Laird,P.W.** (2006) CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat.Genet.* **38**:787-793.
- Weitz,J., Koch,M., Debus,J., Hohler,T., Galle,P.R., and Buchler,M.W.** (2005) Colorectal cancer. *Lancet* **365**:153-165.
- Wendler,F., Franch-Marro,X., and Vincent,J.P.** (2006) How does cholesterol affect the way Hedgehog works? *Development* **133**:3055-3061.
- Wice,B.M., Trugnan,G., Pinto,M., Rousset,M., Chevalier,G., Dussaulx,E., Lacroix,B., and Zweibaum,A.** (1985) The intracellular accumulation of UDP-N-acetylhexosamines is concomitant with the inability of human colon cancer cells to differentiate. *J.Biol.Chem.* **260**:139-146.
- Willert,K., Brown,J.D., Danenberg,E., Duncan,A.W., Weissman,I.L., Reya,T., Yates,J.R., III, and Nusse,R.** (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**:448-452.
- Winesett,M.P., Ramsey,G.W., and Barnard,J.A.** (1996) Type II TGF(beta) receptor expression in intestinal cell lines and in the intestinal tract. *Carcinogenesis* **17**:989-995.
- Winston,J.T., Strack,P., Beer-Romero,P., Chu,C.Y., Elledge,S.J., and Harper,J.W.** (1999) The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I κ B α and beta-catenin and stimulates I κ B α ubiquitination in vitro. *Genes Dev.* **13**:270-283.
- Worthley,D.L., Whitehall,V.L., Spring,K.J., and Leggett,B.A.** (2007) Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J.Gastroenterol.* **13**:3784-3791.
- Xie,J., Johnson,R.L., Zhang,X., Bare,J.W., Waldman,F.M., Cogen,P.H., Menon,A.G., Warren,R.S., Chen,L.C., Scott,M.P., and Epstein,E.H., Jr.** (1997) Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. *Cancer Res.* **57**:2369-2372.

Yang,Y.H., Dudoit,S., Luu,P., Lin,D.M., Peng,V., Ngai,J., and Speed,T.P. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* **30**:e15.

Yauch,R.L., Gould,S.E., Scales,S.J., Tang,T., Tian,H., Ahn,C.P., Marshall,D., Fu,L., Januario,T., Kallop,D., Nannini-Pepe,M., Kotkow,K., Marsters,J.C., Rubin,L.L., and de Sauvage,F.J. (2008) A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* **455**:406-410.

Zhang,C., Williams,E.H., Guo,Y., Lum,L., and Beachy,P.A. (2004) Extensive phosphorylation of Smoothened in Hedgehog pathway activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**:17900-17907.

Zhang,X., Harrington,N., Moraes,R.C., Wu,M.F., Hilsenbeck,S.G., and Lewis,M.T. (2008) Cyclopamine inhibition of human breast cancer cell growth independent of Smoothened (Smo). *Breast Cancer Res.Treat.*

Zhu,L., Zhou,G., Poole,S., and Belmont,J.W. (2008) Characterization of the interactions of human ZIC3 mutants with GLI3. *Hum.Mutat.* **29**:99-105.

Zhu,Y., James,R.M., Peter,A., Lomas,C., Cheung,F., Harrison,D.J., and Bader,S.A. (2004) Functional Smoothened is required for expression of GLI3 in colorectal carcinoma cells. *Cancer Lett.* **207**:205-214.

Publications personnelles

Delacroix L., Begon D., **Chatel G.**, Jackers P. et Winkler R. **2005**. Distal ERBB2 promoter fragment displays specific transcriptional and nuclear binding activities in ERBB2 overexpressing breast cancer cells. *DNA Cell Biol* ; 24 : 582-594.

Chatel G., Ganeff C., Boussif N., Delacroix L., Briquet A., Nolens G. et Winkler R. **2007**. Hedgehog signaling pathway is inactive in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* ; 121 : 2622-2627.

Ganeff C., **Chatel G.**, Munaut C., Frankenne F., Foidart J.M. et Winkler R. **2009**. The IGF system in in-vitro human decidualization. *Mol Hum Reprod* ; 15 : 27-38.

Annexes

Hedgehog signaling pathway is inactive in colorectal cancer cell lines

Guillaume Chatel, Corine Ganef, Naima Boussif, Laurence Delacroix, Alexandra Briquet, Gregory Nolens and Rosita Winkler*

Molecular Oncology Laboratory, Experimental Cancer Research Center, Center of Biomedical Integrative Genoproteomics, University of Liège, Liège, Belgium

The Hedgehog (Hh) signaling pathway plays an important role in human development. Abnormal activation of this pathway has been observed in several types of human cancers, such as the upper gastro-intestinal tract cancers. However, activation of the Hh pathway in colorectal cancers is controversial. We analyzed the expression of the main key members of the Hh pathway in 7 colon cancer cell lines in order to discover whether the pathway is constitutively active in these cells. We estimated the expression of *SHH*, *IHH*, *PTCH*, *SMO*, *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *SUFU* and *HHIP* genes by RT-PCR. Moreover, Hh ligand, Gli3 and Sufu protein levels were quantified by western blotting. None of the cell lines expressed the complete set of Hh pathway members. The ligands were absent from Colo320 and HCT116 cells, Smo from Colo205, HT29 and WiDr. *GLI1* gene was not expressed in SW480 cells nor were *GLI2/GLI3* in Colo205 or Caco-2 cells. Furthermore the repressive form of Gli3, characteristic of an inactive pathway, was detected in SW480 and Colo320 cells. Finally treatment of colon cancer cells with cyclopamine, a specific inhibitor of the Hh pathway, did not downregulate *PTCH* and *GLI1* genes expression in the colorectal cells, whereas it did so in PANC1 control cells. Taken together, these results indicate that the aberrant activation of the Hh signaling pathway is not common in colorectal cancer cell lines.

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: colon cancer; hedgehog; cyclopamine

The Hedgehog (Hh) signaling pathway is involved in the patterning of various tissues in many species.¹ The details of Hh pathway regulation are still being unravelled. Briefly, 3 vertebrate genes code for Hh ligands, Sonic- (*SHH*), Indian- (*IHH*), and Desert- (*DHH*) Hh. The ligands are processed and secreted and bind the Patched (Ptch) transmembrane receptor at the surface of responding cells. Ligand binding overcomes the repressive action of Ptch on the Smoothened (Smo) receptor and triggers the activation and nuclear translocation of Gli zinc finger transcription factors. Vertebrate cells contain 3 *GLI* genes, *GLI-1*, *-2* and *-3*. Gli2 and Gli3 proteins possess transcription activation and repression domains, while Gli1 has only an activation domain. In unstimulated cells Gli2 and Gli3 are cleaved to give rise to a repressive N-terminal form. Hh pathway activation inhibits Gli2 and Gli3 cleavage and stabilizes the full-length transcription factors that activate transcription.^{2,3} It seems likely that Gli2 and Gli3 are the initial transducers of the Hh signal, necessary for the induction of *GLI1* expression.^{4–7} Gli1 activates transcription of most of the Hh pathway target genes.^{8–10} The transmembrane protein Hhip (Hh interacting protein) binds Hh ligands and attenuates the signal.^{11,12} Recently, Sufu (suppressor of fused) was identified as the main repressor of the mammalian Hh signaling pathway.¹³ Sufu inhibits the Hh signal by binding Gli factors in the cytoplasm and the nucleus.¹⁴

The *GLI1*, *PTCH* and *HHIP* genes are pathway members and target genes, their expression being upregulated when the signal is triggered.^{11,15,16}

The Hh pathway is involved in gastro-intestinal tract development, as documented by the phenotype of mice where genes coding for Hh pathway members have been inactivated. Indeed, colon malformations have been observed in *Shh*^{-/-}, *Ihh*^{-/-}, *Gli2*^{-/-} and *Gli3*^{-/-} mice.¹⁷ Organization in crypts has been shown to be lost in the colonic epithelium of *Ihh*^{-/-} mice.^{18,19} Moreover, in a rat model, *Ihh* has been shown to restrict the activity of the WNT/

β-catenin pathway to cells located at the base of the crypts and thus maintain the differentiation of colonocytes at the tip of the crypts.¹⁹

The Hh pathway is constitutively activated in some types of human cancers.²⁰ Loss of function mutations of *PTCH* or *SUFU* genes, and gain of function mutations of *SMO* gene have been shown to be responsible for ligand independent activation of the pathway in basal cell carcinoma, medulloblastoma, or rhabdomyosarcoma. In most other tumor types the pathway has been shown to be activated by ligand overexpression.²¹

Several studies have aimed at understanding the role of the Hh pathway in colon cancer, but their results have been conflicting. Rare mutations of *PTCH* and *SMO* genes have been detected in this cancer type but they do not seem to affect the activity of the proteins.^{22,23} The expression of a limited number of Hh pathway members, as well as the response of colon cancer cells to treatment with the Smo inhibitor cyclopamine, did not allow to lead to a conclusion concerning the activation of the pathway in this tumor type.^{17,24}

Our first goal was thus to find out whether a thorough analysis of the expression of the members of the Hh pathway in colon cancer cells could help in coming to a conclusion on the ligand dependent activation of the pathway in colorectal cancer cell lines. So, we estimated the expression of *Shh*, *Ihh*, *Ptch*, *Smo*, *Gli1*, *Gli2* and *Gli3*, which transmit the signal. We also analysed the expression of the negative regulators *Sufu* and *Hhip*.

Seven colon cancer cell lines were included in our study. None of our cell lines expressed all the key members of the Hh pathway. We then verified whether cyclopamine modulated the expression of *PTCH* and *GLI1* genes. *Ptch* and *Gli1* transcripts levels were not significantly altered in cyclopamine treated colon cancer cells, in contrast with the cyclopamine responsive PANC cells. Our results thus suggest that Hh pathway activation is not a common event in colon cancer cell lines.

Material and methods

Cell culture

Colo205, Colo320, HT29 cell lines were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA). WiDr, Caco-2, SW480, HCT116, and 293T cells were provided by Dr V. Bours (University of Liège, Belgium). PANC-1 cells were a gift from Dr. Kiss (University of Brussels, Belgium). Colo205, Colo320 cells were grown in RPMI1640, HT29 and HCT116 in McCoy's 5A, WiDr in EMEM, SW480 in Leibovitz L-15, PANC1, and 293T in DMEM media. Culture media were supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 1 μg/ml penicillin/streptomycin.

Grant sponsors: Fonds National pour la Recherche Scientifique, Fédération contre le cancer, Centre Anticancéreux près l'Université de Liège, FRIA (FNRS), Televie, Fondation Leon Fredericq.

*Correspondence to: Laboratory of Molecular Oncology, GIGA Research Department, University of Liège, GIGA Tower—B34, 1 Avenue de l'Hôpital, 4000 Liège, Belgium. Fax: +32-43662502.
E-mail: rwinkler@ulg.ac.be

Received 3 August 2006; Accepted after revision 12 June 2007

DOI 10.1002/ijc.22998

Published online 7 August 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

TABLE I – SEQUENCES OF THE PRIMERS USED IN THIS STUDY. THE PRIMERS WITHOUT A REFERENCE WERE DESIGNED IN THE LABORATORY

5 Gene name	Forward primer	Reverse primer	Reference
Ihh	CGGCTGACAATCACACGGAGC	GAAGCTGCCCTCTTCTAGCAG	
Shh	GACGACGGCGCCAAGAAGGT	ATGAGAATGGTGCCCTGGGC	
Ptch	CATCAACTGGAACGAGGACA	AGGGGCTTGTA AACAGCAGCAG	
Smo	CTGGTGTGGTTTGGTTTGTG	TGGTCTCGTTGATCTTGCTG	
Gli1	CGGGTCTCAAACCTGCCAGCTT	GGCTGGGTCCTGAGCCCTC	25
Gli2	CTAGCATCAGCGAGAACGTG	AAAGCCTAACTGGCATCCTC	
Gli3	CAGATGTGACGGAGAAGCC	GATGATAGTATTCTGTGGG	
Sufu	CCAATCAACCCTCAGCGGCAGAATG	GTAGGTGAGAAAGAGGGCTGTC	26
Hhip	AAAACAGATCATCAGCCAGAA	TAAATGCCCATTTGGAATAGAAT	
Cph	TCTCCTTTGAGCTGTTTGCAGAC	AAACTTAACTCTGCAATCCAGC	

Caco-2 cells were grown in EMEM supplemented with 20% FBS, 2 mM glutamine, 1 µg/ml penicillin/streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 1.5 g/l sodium bicarbonate and 0.1 mM nonessential amino acids (Cambrex, Verviers, Belgium).

RNA extraction and semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using the Tripure reagent (Roche) according to the manufacturer's instructions. To avoid genomic DNA contamination, RNA (20 µg) was treated with 20 U RNase-free DNaseI (Roche) at 37°C for 30 min, phenol-chloroform extracted and ethanol precipitated.

Semi-quantitative RT-PCR was performed in 2 steps. First, 2 µg of total RNA were reverse transcribed (RT) with 10 U of reverse transcriptase (AMV-RT, Promega, Madison WI), 0.8 µM specific primer, 0.4 mM dNTPs (Roche), 2 U RNase inhibitor (Promega) for 1 hr at 48°C. Next, PCR amplification was performed on 1/25th of the RT reaction with 2.5 U of AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, Ca), 0.2 µM of each primer, and 0.4 mM of dNTPs in a thermocycler (Perkin Elmer). Sequences of the primers used in this study are presented in Table I. Each RT-PCR product (10 µl) was analyzed by electrophoresis through a 1% agarose gel. PCR amplification signals were quantified by densitometric scanning using Quantity One (Bio-Rad).

Western blot analysis and antibodies

Cells cultured in 58 cm² Petri dishes were washed twice, collected in 1 ml of PBS and centrifuged. The cellular pellet was suspended in 400 µl of Buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT and 0.5 mM PMSF) and incubated 15 min on ice. Cytoplasmic and nuclear proteins were extracted from cells lysed with NP40 (1% final concentration). After centrifugation, the supernatant containing mainly cytoplasmic proteins was collected. Nuclei from the pellet were lysed with Buffer C (20 mM HEPES pH7.9, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT and 1 mM PMSF). Total proteins were extracted from cells lysed with 0.5% SDS. Protein concentrations were measured using the BCA protein assay method (Pierce, Rockford, IL). Either thirty micrograms of cytoplasmic and nuclear proteins or 50 µg of total cellular proteins were analyzed by SDS-PAGE.

Secreted proteins were precipitated from conditioned media of 80% confluent cells grown in serum-free medium for 5 days. Proteins from 7 ml of conditioned media were acetone precipitated (final concentration 75%) and collected by centrifugation at 9000g for 15 min. The pellet was dissolved in 100 µl of SB buffer (SDS 0.33% (w/v), β-mercaptoethanol 0.83% (v/v), Tris 11.25 mM pH6.8, glycerol 1.66% (w/v) and bromophenol blue). Forty microliters were analysed by SDS-PAGE.

Proteins extracted from cells and conditioned media were separated on a 6% (Gli3) or 12% (Hh and Sufu) SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA). Membranes were blocked overnight in TBST buffer (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Tween20 0.1%) containing 5% low fat milk. They were then incubated for 2 hr with the following pri-

mary antibodies diluted in TBST buffer/5% low fat milk: 1/500 rabbit anti-Hh antibody (H-160, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca), 1/500 rabbit anti-Gli3 (H-280, Santa Cruz), 1/500 goat anti-Sufu (C-15, Santa Cruz) 1/10,000 mouse anti-actin (MP biomedical, Irvine, CA), 1/1,000 goat anti-Ku70 (Santa Cruz). Membranes were washed and incubated for 1 hr with the following secondary antibodies diluted in TBST buffer containing 5% milk: 1/2,000 goat anti-rabbit (Shh, Gli3), 1/2,000 goat anti-mouse and 1/1,000 (Sufu) or 1/4,000 (Ku70) rabbit anti-goat (DAKO, Carpinteria, CA). Signals were revealed with enhance chemiluminescence reagent (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

Transfection experiments

Gli3 cDNA was a kind gift from Dr B. Vogelstein. The Gli3 cDNA extracted with XbaI/SaII restriction enzymes was inserted in the XhoI/NheI sites of the pREP4 expression vector (Invitrogen, Paisley UK). Approximately 2×10^6 cells were seeded in 58 cm² Petri dishes 24 hr before transfection. PREP4-Gli3 expression vector (3 µg) was transfected with Fugene6 reagent (Roche) according to the manufacturer's recommendation. Nuclear proteins were extracted 24 hr later and analyzed as described above.

Cyclopamine and tomatidine treatment

Cyclopamine and tomatidine (Toronto Research Chemicals, North York, Ontario, CA) were dissolved in DMSO. About 1 to 2×10^6 cells were seeded in 21 cm² Petri dishes in medium supplemented with 10% FBS. Twenty four hours later the medium was replaced by media containing 10 µM of cyclopamine, tomatidine or DMSO in 0.5% serum. After 24 hr the culture media were changed and the cells were harvested a further 24 hr later. Total RNA was extracted as described above. RT-PCR was performed as described above except that RT priming was performed with random hexamers (3 µg).

Results

The Hh pathway is not activated ligand dependently in colon cancer cells

Firstly, we analyzed the levels of the cellular and the secreted Hh protein by western blotting. Hh proteins are synthesized as 45 kDa precursors that are cleaved to give rise to the secreted 20 kDa factor. High levels of the 20 kDa processed Hh protein were detected in the cytoplasm (Fig. 1a) and the conditioned media (Fig. 1b) of HT29, WiDr and Caco-2 cells. Low levels of the ligand were detected in the cytoplasm and the conditioned media of Colo205 and SW480 cells (Figs. 1a and 1b). No Hh proteins were detected in Colo320 and HCT116 cells (Figs. 1a and 1b). The antibody does not discriminate between the different Hh ligands. To know which factor is expressed in the colon cancer cells we identified the Hh transcripts by specific RT-PCR. We focused our interest on Ihh and Shh, which seem to be the only Hh ligands expressed in the colon. Shh mRNA was present in all the cell lines, while Ihh transcripts were only detected in HT-29, WiDr and Caco-2 cells (Fig. 1c). Interestingly, the Ihh mRNA was present in cells expressing high protein levels.

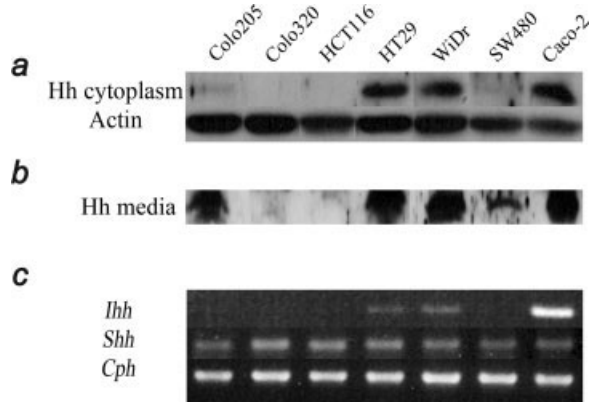


FIGURE 1 – Hh protein and mRNA levels in colorectal cancer cell lines. (a) Detection by western blotting of the 20 kDa mature Hh form in 30 μ g of cytoplasmic protein extracts. Actin was used as loading control. (b) Detection of the mature Hh proteins in conditioned media with an antibody recognizing the 3 Hh forms. (c) Detection of Ihh and Shh transcripts by RT-PCR in the colon cancer cells using primer pairs that discriminate between these Hh transcripts. Cyclophilin (Cph) mRNA was amplified as control.

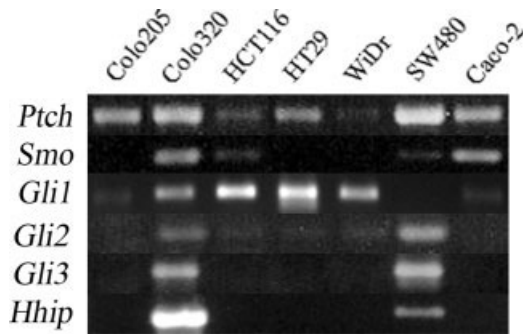


FIGURE 2 – Ptch, Smo, Gli1, Gli2, Gli3 and Hhip mRNA levels in the colorectal cancer cell lines. Two micrograms of total RNA were analyzed by RT-PCR.

According to these results the Hh pathway could be activated through an autocrine mechanism in HT29, WiDr, Caco-2, Colo205 and SW480 cells.

To find out whether the colon carcinoma cells are able to respond to the Hh factors they produce, we evaluated the expression levels of Ptch and Smo receptors, and the 3 Gli transcription factors. Ptch transcripts were detected in every cell line, while Smo mRNA was present in Colo320, HCT116, SW480 and Caco-2 cells. The pattern of the expression of the 3 Gli transcription factors varied according to the cell line. Colo320 was the only cell line expressing all 3 Gli transcription factors. A strong signal corresponding to Gli1 mRNA and a weak Gli2 signal was detected in HCT116, HT29 and WiDr cells. Both Gli2 and Gli3 were present in SW480 cells, which in contrast did not express Gli1. Finally Caco2 and Colo205 cells expressed only very low levels of Gli1 (Fig. 2).

The Hh pathway regulates differentially the activity of the 3 Gli transcription factors. Hh stimulates *GLII* gene transcription, while it inhibits the cleavage of Gli2 and Gli3 proteins. We analysed by western blotting the Gli3 protein present in our colorectal cancer cells. 293T cells transfected with a Gli3 expression vector served as positive control for this experiment. Nuclear proteins extracted from these cells were loaded on the same gel as the proteins extracted from the colon cancer cells, in order to distinguish the full length (Gli3FL) and the processed (Gli3R) Gli3. The Gli3 spe-

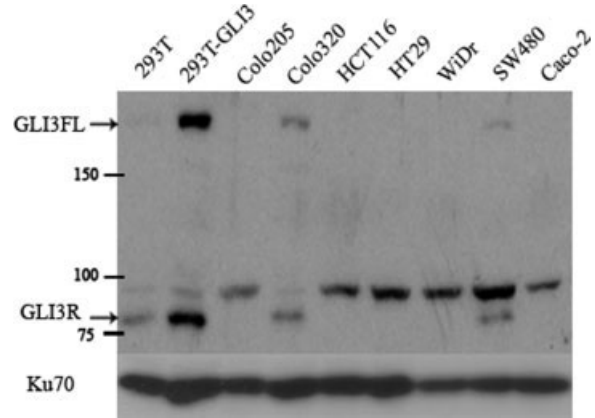


FIGURE 3 – Gli3 protein levels and cleavage status in colorectal cancer cells. Nuclear proteins (40 μ g) extracted from the colorectal cancer cells, and from parental 293T cells and 293T cells transfected with a Gli3 expression vector (293T-Gli3) were analyzed by western blotting with an antibody recognizing the N-terminal part of the protein. The antibody reveals both the 190 kDa full-length protein (Gli3FL) and the 83 kDa cleaved repressor protein (Gli3R). Arrows indicate positions of Gli3FL and Gli3R proteins. Ku70 was used as a loading control.

cific antibody revealed 3 bands of 190, 95 and 83 kDa in nuclear proteins from the parental 293T cells (Fig. 3). Only the intensity of the 190-kDa and the 83-kDa bands was greatly increased in Gli3 overexpressing 293T cells, indicating that these bands correspond respectively to Gli3FL and Gli3R. Both Gli3FL and Gli3R were detected in SW480 and Colo320 nuclear proteins, while Gli3 was not detected in the other cell lines, in agreement with the RT-PCR results.

Finally, we detected Hhip mRNA in Colo320 and SW480 cells, the only cells that also express the *GLI3* gene (Fig. 2).

These results thus suggest that no ligand dependent activation of the Hh pathway occurred in the colon cancer cells we study. Indeed, in the absence of ligands, the pathway cannot be activated in HCT116 and Colo320 cells. The absence of Smo does not allow the activation of the pathway in Colo205, HT29 and WiDr cells. The low level of Gli1 added to the absence of Gli2 and Gli3 in Caco2 cells and the absence of Gli1 from SW480 cells is a further indication that, in these cells, the pathway is probably also inactive. However, the Hh pathway could be activated downstream of the ligand, by mutations of Ptch, Smo or Sufu or by Smo activation through endogenous molecules. We tested the possibility of ligand independent activation of the Hh pathway in our colon cancer cell lines by Sufu mutation and by Smo activation.

The Hh pathway is not activated by ligand independent mechanisms in colon cancer cells

We first identified Sufu transcripts and protein in our colon cancer cells. Indeed, the absence of the protein or the production of truncated proteins due to *SUFU* gene mutations has been shown to be responsible for the pathway activation in some cancers.^{22,23,27,28} We detected Sufu transcripts in the 7 colon cancer cell lines we analysed (Fig. 4). Moreover, the 54 kDa Sufu protein was present in 6 out of 7 cell lines. In Colo205 a shorter 50 kDa protein was detected. Next, we measured the modulation of the expression of Hh target genes in cyclopamine treated cells. Cyclopamine, an alkaloid from *Veratrum californicum*, binds and inactivates Smo and inhibits the pathway.²⁹ As positive control, we used PANC1 cyclopamine responsive pancreas cancer cells.³⁰ These cells express Shh, Ptch, Smo, Gli1, Gli2, Hhip and Sufu transcripts (Fig. 5a). As a negative control the cells were treated either with tomatidine, an alkaloid structurally close to cyclo-

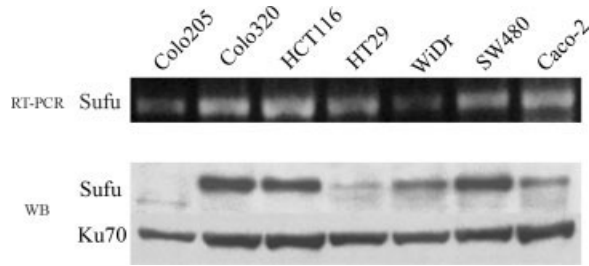


FIGURE 4 – Sufu mRNA and protein expression in colorectal cancer cell lines. Sufu transcripts were amplified by RT-PCR performed on 2 µg of total RNA. Sufu protein was detected in 50 µg of total protein extracts with an antibody recognizing the 54 kDa Sufu variant. Ku70 was used as a control.

pamine but inactive on the Hh pathway, or with the solvent (DMSO).

Cyclopamine downregulated *Ptch* transcript levels in PANC cells, in comparison with the expression in tomatidine treated cells (Fig. 5b). In contrast, no significant modifications of the *Ptch* mRNA level were observed in the 7 colorectal cancer cells after cyclopamine treatment. Cyclopamine induced a sharp decrease in the *Gli1* mRNA level in PANC cells (Fig. 5c). However, *Gli1* mRNA levels were not significantly modified in cyclopamine treated colon cancer cells in comparison with control cells. Surprisingly, tomatidine upregulated *Gli1* expression in Colo320 cells (Fig. 5c). Cyclopamine did not affect *Hhip* mRNA levels in any of the cells we tested, including the PANC cell line (data not shown).

Our results thus suggest that in the colon cancer cells we examined the Hh pathway is not activated by Sufu mutation or by aberrant activation of Smo.

Taken together, our results suggest that the constitutive activation of the Hh signalling pathway is not common in colon cancer cell lines.

Discussion

The published results on Hh pathway activation in colon cancer, based on the expression of some Hh target genes and on the response to cyclopamine treatment or the activity of a Gli responsive reporter vector, are conflicting. We wanted to discover whether a thorough analysis of the expression of the main key members of the Hh signaling pathway could help in understanding the activation status in colon cancer cell lines. Indeed, we think that it is important to define a reliable marker or combination of markers for Hh signal activity. This could then be applied in the identification of the human cancers that would benefit from a therapy targeting this pathway. To this end, we estimated the levels of *Shh*, *Ihh*, *Ptch*, *Smo*, *Gli1*, *Gli2*, *Gli3*, *Sufu* and *Hhip* transcripts and Hh, *Gli3* and Sufu proteins in 7 cell lines derived from different grade colon cancers. None of the cell lines expressed all the key members required for the pathway’s activation. Moreover, cyclopamine did not modulate the expression levels of *PTCH* and *GLI1* genes, further suggesting that the Hh pathway is not activated in the colon cancer cell lines we analyzed.

The cell lines we used have been tested in other studies for the expression of some Hh pathway members.^{23,30,31} Concordant results were obtained for the expression of some pathway members and differences were noticed for others. In our opinion these discrepancies might be the consequences of epigenetic modifications to gene expression. Indeed, *Ihh* expression has been shown to be induced in HT29 cells by sodium butyrate, a HDAC inhibitor.¹⁹ Moreover, Smo has been shown to be re-expressed upon treatment of colon cancer cells with a DNA methylation and a HDAC inhibitor.²³ Discrepancies were observed between our results and some published data for *PTCH* and *GLI1* genes expres-

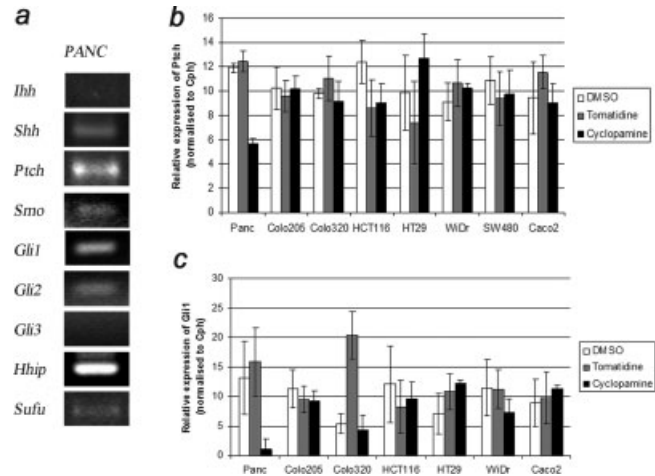


FIGURE 5 – Effect of cyclopamine on the expression of *PTCH* and *GLI1* genes in colorectal cancer cell lines. (a) Expression of Hedgehog pathway members in PANC cell line. (b and c) *Ptch* (b) and *Gli1* (c) transcripts levels in response to DMSO, tomatidine (10 µM) or cyclopamine (10 µM) treatments. Expression of *Ptch* and *Gli1* was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. PCR signals were quantified by densitometry. Values were normalized to those of the Cph signal. Values represent mean ± S.D. of 3 independent experiments.

sion in colon cancer cell lines. They are important since the expression of these genes is used as marker of Hh pathway activation. However, *PTCH* expression is not controlled only by the Hh signal. *PTCH* gene contains at least 3 alternative 5’ exons,³² each with its own promoter, but only 1 contains a Gli binding site and responds to Hh pathway activation.³³ Moreover, Berman *et al.*³⁰ detected the *Gli1* transcript in some colon cancer cells, although the transcription factor did not activate a Gli dependent reporter vector.

HHIP gene expression is increased in Hh stimulated cells. *HHIP* was expressed in 2 of our cell lines, Colo205 and SW480. However, the case of *Hhip* is complex, because besides being a target gene it is a powerful inhibitor of the pathway as shown in transgenic mice³⁴ and in cell lines.¹² *Hhip* downregulation has been shown to increase the Hh signal in some pancreatic cancer cell lines.³⁵ *HHIP* expression has been shown to be reduced in 8/10 primary human colon cancers, when compared with the normal tissue from the same patient.¹² The contribution of *Hhip* to the inhibition of the Hh pathway in colon cancer cells will have to be assessed experimentally.

The presence of the full-length *Gli2* and *Gli3* proteins, but not the transcript or total protein levels indicates the activation of the pathway. The absence of *Gli2* probably impairs the transmission of the signal in Caco2 and Colo205 cells. We cannot propose a role for *Gli2* in cells where the transcript was present since we could not examine the cleavage status of the protein. In contrast, we were able to show the presence of the repressive *Gli3R* in 2 cell lines. To our knowledge this is the first report of the presence of this repressor in colon cancer cells. Interestingly, mice engineered to express a C-terminally truncated *Gli3* protein have been shown to present gastro-intestinal abnormalities similar to those of *Shh*^{-/-} or *Ihh*^{-/-} animals.³⁶ The role of these transcription factors in colon cancer should be studied further.

Our expression results do not rule out the possibility of ligand independent activation of the Hh pathway in some cell lines. We examined the possibility of ligand independent aberrant activation of the Hh pathway due to the absence of *SUFU* or the expression of truncated *SUFU* protein as well as by constitutive Smo activation.

Sufu transcripts were present in every colon cancer cell line we tested. More importantly, the full-length protein was present in 6

of the 7 cell lines. The mechanism responsible for the shorter protein production in Colo205 cells will have to be determined. Sufu has been shown to inhibit the activity of all 3 Gli transcription factors. Sufu mutations lead to increased Gli activity and target genes expression in different cancer types.^{28,37} Although most mutations observed in cancer cells give rise to shorter proteins, we cannot rule out the presence mutations which would modify the activity of the protein. Further work is thus needed to ascertain the role of Sufu in colon cancer cell lines.

Smo can be activated independently of Hh by mutation and by endogenous metabolites.³⁸ Cyclopamine inhibits Smo activated by these mechanisms. We did not detect significant differences in the expression of the *PTCH* and *GLII* genes between cyclopamine and tomatidine treated colon cancer cells. In contrast, both Ptc and Gli1 transcript levels were downregulated in cyclopamine but not in tomatidine treated PANC cells used as positive control. Our results agree with those of Berman *et al.* who did not observe a modulation of *PTCH* expression in cyclopamine treated HCT116 cells, and the drug did not increase the apoptosis of these cells in comparison with tomatidine.³⁰ In contrast, cyclopamine increases apoptosis rate of colon cancer cells according to Qualtrough *et al.*³¹ However, these authors did not use tomatidine to control for possible non specific effects of cyclopamine.

Cell lines might not be good models for the assessment of Hh pathway activity.²¹ However, the published results on primary human colon cancers are also confusing. Some authors,^{39,40} but not others²² detected increased levels of Hh pathway members

during colon cancer progression. Moreover, the expression of Ihh and Gli1 were shown to be decreased during colon cancer progression in recent publications.^{19,41}

Hh pathway activity might be involved in the progression of colon cancer *in vivo* by mediating the cross-talk between the cancerous epithelial cells and the cells from the tumor environment. Also, we cannot exclude that the Hh pathway is activated in a cellular subpopulation, for instance in cancer stem cells. It would be interesting to re-examine this in the recently identified colon cancer stem cells.^{42,43}

Our results and the data from the literature rise the question of what is a reliable marker of Hh pathway status in cells where the pathway is not manipulated. Identification of post-transcriptional modifications, such as processing, sub-cellular localization or phosphorylation of some Hh pathway members might predict more accurately the Hh pathway activity than expression levels. Clearly more work is needed to understand the possible involvement of this pathway in colon cancer before it can be considered as a suitable therapeutic target.

Acknowledgements

We thank Dr. B. Vogelstein for providing Gli3 cDNA, and Drs. E. Dejardin and R. Patient for critical reading of the manuscript. This study was supported by grants from the Belgian "GC is a recipient of FRIA (FNRS), Televie and "Fondation Leon Fredericq" grants. RW is senior research associate of FNRS.

References

- Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001;15:3059–87.
- Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol* 2006;26:3365–77.
- Osterlund T, Kogerman P. Hedgehog signalling: how to get from Smo to Ci and Gli. *Trends Cell Biol* 2006;16:176–80.
- Park HL, Bai C, Platt KA, Matisse MP, Beeghly A, Hui CC, Nakashima M, Joyner AL. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 2000;127:1593–605.
- Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* 2002;129:4753–61.
- Roessler E, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillissen-Kaesbach G, Roeder ER, Ming JE, Altaba A, Muenke M. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13424–9.
- Ikram MS, Neill GW, Regl G, Eichberger T, Frischauf AM, Aberger F, Quinn A, Philpott M. GLI2 is expressed in normal human epidermis and BCC and induces GLI1 expression by binding to its promoter. *J Invest Dermatol* 2004;122:1503–9.
- Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh *in vitro*. *Development* 1997;124:1313–22.
- Hynes M, Stone DM, Dowd M, Pitts-Meek S, Goddard A, Gurney A, Rosenthal A. Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1. *Neuron* 1997;19:15–26.
- Altaba A. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* 1999;126:3205–16.
- Chuang PT, McMahon AP. Vertebrate Hedgehog signaling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 1999;397:617–21.
- Olsen CL, Hsu PP, Glienke J, Rubanyi GM, Brooks AR. Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors. *BMC Cancer* 2004;4:43.
- Svard J, Heby-Henricson K, Persson-Lek M, Rozell B, Lauth M, Bergstrom A, Ericson J, Toftgard R, Teglund S. Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell* 2006;10:187–97.
- Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog signaling. *J Cell Sci* 2007;120:3–6.
- Lee J, Platt KA, Censullo P, Altaba A. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 1997;124:2537–52.
- Marigo V, Tabin CJ. Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9346–51.
- Lees C, Howie S, Sartor RB, Satsangi J. The hedgehog signalling pathway in the gastrointestinal tract: implications for development, homeostasis, and disease. *Gastroenterology* 2005;129:1696–710.
- Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 2000;127:2763–72.
- van den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JC, Schepman BL, Offerhaus GJ, Keller JJ, Nielsen C, Gaffield W, van Deventer SJ, Roberts DJ, Peppelenbosch MP. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet* 2004;36:277–82.
- Pasca di MM, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer* 2003;3:903–11.
- Evangelista M, Tian H, de Sauvage FJ. The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:5924–8.
- Hu Z, Bonifas JM, Aragon G, Kopelovich L, Liang Y, Ohta S, Israel MA, Bickers DR, Aszterbaum M, Epstein EH, Jr. Evidence for lack of enhanced hedgehog target gene expression in common extracutaneous tumors. *Cancer Res* 2003;63:923–8.
- Zhu Y, James RM, Peter A, Lomas C, Cheung F, Harrison DJ, Bader SA. Functional Smoothed is required for expression of GLI3 in colorectal carcinoma cells. *Cancer Lett* 2004;207:205–14.
- Wang WS, Chen PM, Su Y. Colorectal carcinoma: from tumorigenesis to treatment. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:663–71.
- Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN, Bhatia M. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells *via* BMP regulation. *Nat Immunol* 2001;2:172–80.
- Stone DM, Murone M, Luoh S, Ye W, Armanini MP, Gurney A, Phillips H, Brush J, Goddard A, de Sauvage FJ, Rosenthal A. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli J Cell Sci 1999;112:4437–48.
- Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, et al. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 2002;31:306–10.
- Sheng T, Li C, Zhang X, Chi S, He N, Chen K, McCormick F, Gatalica Z, Xie J. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol Cancer* 2004;3:29.
- Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, Beachy PA. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 2000;406:1005–9.

30. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De OR, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003;425:846–51.
31. Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C. Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int J Cancer* 2004;110:831–7.
32. Kogerman P, Krause D, Rahnama F, Kogerman L, Uden AB, Zaphiropoulos PG, Toftgard R. Alternative first exons of PTCH1 are differentially regulated *in vivo* and may confer different functions to the PTCH1 protein. *Oncogene* 2002;21:6007–16.
33. Agren M, Kogerman P, Kleman MI, Wessling M, Toftgard R. Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene* 2004;330:101–14.
34. Madison BB, Braunstein K, Kuison E, Portman K, Qiao XT, Gumucio DL. Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* 2005;132:279–89.
35. Martin ST, Sato N, Dhara S, Chang R, Hustinx SR, Abe T, Maitra A, Goggins M. Aberrant methylation of the Human Hedgehog interacting protein (HHIP) gene in pancreatic neoplasms. *Cancer Biol Ther* 2005;4:728–33.
36. Bose J, Grotewold L, Ruther U. Pallister-Hall syndrome phenotype in mice mutant for Gli3. *Hum Mol Genet* 2002;11:1129–35.
37. Taylor MD, Zhang X, Liu L, Hui CC, Mainprize TG, Scherer SW, Wainwright B, Hogg D, Rutka JT. Failure of a medulloblastoma-derived mutant of SUFU to suppress WNT signaling. *Oncogene* 2004;23:4577–83.
38. Dwyer JR, Sever N, Carlson M, Nelson SF, Beachy PA, Parhami F. Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *J Biol Chem* 2007;282:8959–68.
39. Oniscu A, James RM, Morris RG, Bader S, Malcomson RD, Harrison DJ. Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia. *J Pathol* 2004;203:909–17.
40. Douard R, Moutereau S, Pernet P, Chimingqi M, Allory Y, Manivet P, Conti M, Vaubourdolle M, Cugnenc PH, Loric S. Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer. *Surgery* 2006;139:665–70.
41. Akiyoshi T, Nakamura M, Koga K, Nakashima H, Yao T, Tsuneyoshi M, Tanaka M, Katano M. Gli1, downregulated in colorectal cancers, inhibits proliferation of colon cancer cells involving Wnt signalling activation. *Gut* 2006;55:991–9.
42. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106–10.
43. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De MR. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111–5.

Annexe n°2

Résultat du microarray I153 *versus* I2: liste des gènes régulés 2 fois ou plus

Probe Set ID	Régulation	Gène	Titre
211518_s_at	7,2	<i>BMP4</i>	bone morphogenetic protein 4
212845_at	3,7	<i>SAMD4A</i>	sterile alpha motif domain containing 4A
205366_s_at	3,6	<i>HOXB6</i>	homeobox B6
218804_at	3,6	<i>TMEM16A</i>	transmembrane protein 16A
208792_s_at	3,5	<i>CLU</i>	clusterin
209505_at	3,5	<i>NR2F1</i>	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1
206382_s_at	3,5	<i>BDNF</i>	brain-derived neurotrophic factor
208791_at	3,3	<i>CLU</i>	clusterin
201042_at	3,3	<i>TGM2</i>	transglutaminase 2
203002_at	3,2	<i>AMOTL2</i>	angiomotin like 2
209506_s_at	3,0	<i>NR2F1</i>	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1
207826_s_at	3,0	<i>ID3</i>	inhibitor of DNA binding 3
203068_at	3,0	<i>KLHL21</i>	kelch-like 21
205601_s_at	3,0	<i>HOXB5</i>	homeobox B5
219371_s_at	2,9	<i>KLF2</i>	Kruppel-like factor 2
218308_at	2,9	<i>TACC3</i>	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3
202580_x_at	2,9	<i>FOXM1</i>	forkhead box M1
202800_at	2,8	<i>SLC1A3</i>	solute carrier family 1 , member 3
201939_at	2,8	<i>PLK2</i>	polo-like kinase 2
201289_at	2,7	<i>CYR61</i>	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
221521_s_at	2,7	<i>GINS2</i>	GINS complex subunit 2
203432_at	2,7	<i>TMPO</i>	thymopoietin
203851_at	2,7	<i>IGFBP6</i>	insulin-like growth factor binding protein 6
219650_at	2,6	<i>FLJ20105</i>	FLJ20105 protein
203162_s_at	2,6	<i>KATNB1</i>	katanin p80 (WD repeat containing) subunit B 1
202338_at	2,6	<i>TK1</i>	thymidine kinase 1
206632_s_at	2,5	<i>APOBEC3B</i>	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B
218619_s_at	2,5	<i>SUV39H1</i>	suppressor of variegation 3-9 homolog 1
202094_at	2,5	<i>BIRC5</i>	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
219051_x_at	2,5	<i>METRNL</i>	meteorin
215223_s_at	2,5	<i>SOD2</i>	superoxide dismutase 2
216804_s_at	2,5	<i>PDLIM5</i>	PDZ and LIM domain 5
204695_at	2,5	<i>CDC25A</i>	cell division cycle 25 homolog A
209714_s_at	2,4	<i>CDKN3</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 3
218903_s_at	2,4	<i>OBFC2B</i>	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 2B
218542_at	2,4	<i>CEP55</i>	centrosomal protein 55kDa
210983_s_at	2,4	<i>MCM7</i>	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7
212023_s_at	2,4	<i>MKI67</i>	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
202624_s_at	2,4	<i>CABIN1</i>	calcineurin binding protein 1
219336_s_at	2,4	<i>ASCC1</i>	activating signal cointegrator 1 complex subunit 1
209478_at	2,4	<i>PCDHGC3</i>	Protocadherin gamma subfamily C, 3
202107_s_at	2,3	<i>MCM2</i>	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2
221965_at	2,3	<i>MPHOSPH9</i>	M-phase phosphoprotein 9
201896_s_at	2,2	<i>PSRC1</i>	proline/serine-rich coiled-coil 1
221436_s_at	2,2	<i>CDCA3</i>	cell division cycle associated 3
208795_s_at	2,2	<i>MCM7</i>	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7
203242_s_at	2,2	<i>PDLIM5</i>	PDZ and LIM domain 5
202659_at	2,2	<i>PSMB10</i>	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10

201378_s_at	2,2	<i>UBAP2L</i>	ubiquitin associated protein 2-like
37577_at	2,2	<i>ARHGAP19</i>	Rho GTPase activating protein 19
203186_s_at	2,2	<i>S100A4</i>	S100 calcium binding protein A4
202183_s_at	2,2	<i>KIF22</i>	kinesin family member 22
220935_s_at	2,2	<i>CDK5RAP2</i>	CDK5 regulatory subunit associated protein 2
219494_at	2,2	<i>RAD54B</i>	RAD54 homolog B
218115_at	2,2	<i>ASF1B</i>	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B
218075_at	2,2	<i>AAAS</i>	achalasia, adrenocortical insufficiency
201755_at	2,2	<i>MCM5</i>	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5
217099_s_at	2,2	<i>GEMIN4</i>	gem (nuclear organelle) associated protein 4
204558_at	2,2	<i>RAD54L</i>	RAD54-like
210052_s_at	2,2	<i>TPX2</i>	TPX2
209891_at	2,1	<i>SPBC25</i>	spindle pole body component 25 homolog
218755_at	2,1	<i>KIF20A</i>	kinesin family member 20A
1053_at	2,1	<i>RFC2</i>	replication factor C (activator 1) 2
221962_s_at	2,1	<i>UBE2H</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2H
208978_at	2,1	<i>CRIP2</i>	cysteine-rich protein 2
201798_s_at	2,1	<i>FER1L3</i>	fer-1-like 3
215735_s_at	2,1	<i>TSC2</i>	tuberous sclerosis 2
34689_at	2,1	<i>TREX1</i>	three prime repair exonuclease 1
212412_at	2,1	<i>PDLIM5</i>	PDZ and LIM domain 5
201292_at	2,1	<i>TOP2A</i>	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
202240_at	2,1	<i>PLK1</i>	polo-like kinase 1
201611_s_at	2,1	<i>ICMT</i>	isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase
212738_at	2,1	<i>ARHGAP19</i>	Rho GTPase activating protein 19
208078_s_at	2,1	<i>SNF1LK</i>	SNF1-like kinase
210236_at	2,1	<i>PPFIA1</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1
219556_at	2,1	<i>C16orf59</i>	chromosome 16 open reading frame 59
203418_at	2,1	<i>CCNA2</i>	cyclin A2
209760_at	2,1	<i>KIAA0922</i>	KIAA0922
214414_x_at	2,1	<i>HBA2</i>	hemoglobin, alpha 2
222077_s_at	2,1	<i>RACGAP1</i>	Rac GTPase activating protein 1
222039_at	2,0	<i>LOC146909</i>	hypothetical protein LOC146909
204081_at	2,0	<i>NRGN</i>	neurogranin
221591_s_at	2,0	<i>FAM64A</i>	family with sequence similarity 64, member A
211603_s_at	2,0	<i>ETV4</i>	ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF)
216038_x_at	2,0	<i>DAXX</i>	death-associated protein 6
203962_s_at	2,0	<i>NEBL</i>	nebulette
201605_x_at	2,0	<i>CNN2</i>	calponin 2
32032_at	2,0	<i>DGCR14</i>	DiGeorge syndrome critical region gene 14
218564_at	2,0	<i>RFWD3</i>	ring finger and WD repeat domain 3
209680_s_at	2,0	<i>KIFC1</i>	kinesin family member C1
218039_at	2,0	<i>NUSAP1</i>	nucleolar and spindle associated protein 1
215728_s_at	2,0	<i>ACOT7</i>	acyl-CoA thioesterase 7
218550_s_at	2,0	<i>LRRC20</i>	leucine rich repeat containing 20
202095_s_at	2,0	<i>BIRC5</i>	baculoviral IAP repeat-containing 5
205436_s_at	2,0	<i>H2AFX</i>	H2A histone family, member X
203739_at	2,0	<i>ZNF217</i>	zinc finger protein 217
203696_s_at	2,0	<i>RFC2</i>	replication factor C (activator 1) 2
205294_at	2,0	<i>BAIAP2</i>	BAI1-associated protein 2
218009_s_at	2,0	<i>PRC1</i>	protein regulator of cytokinesis 1
221817_at	2,0	<i>DOLPP1</i>	dolichyl pyrophosphate phosphatase 1
204014_at	-12,8	<i>DUSP4</i>	dual specificity phosphatase 4
200920_s_at	-12,4	<i>BTG1</i>	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative
218677_at	-11,0	<i>S100A14</i>	S100 calcium binding protein A14

204362_at	-10,9	<i>SKAP2</i>	src kinase associated phosphoprotein 2
200914_x_at	-7,9	<i>KTNI</i>	kinectin 1
203939_at	-7,8	<i>NT5E</i>	5'-nucleotidase, ecto (CD73)
202668_at	-7,6	<i>EFNB2</i>	ephrin-B2
213421_x_at	-7,2	<i>PRSS3</i>	protease, serine, 3 (mesotrypsin)
212268_at	-7,1	<i>SERPINB1</i>	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1
207463_x_at	-6,7	<i>PRSS3</i>	protease, serine, 3
221753_at	-6,7	<i>SSH1</i>	slingshot homolog 1 (Drosophila)
217678_at	-6,1	<i>SLC7A11</i>	solute carrier family 7, member 11
212582_at	-5,6	<i>OSBPL8</i>	oxysterol binding protein-like 8
213734_at	-5,4	---	---
212762_s_at	-5,4	<i>TCF7L2</i>	transcription factor 7-like 2
208661_s_at	-5,4	<i>TTC3</i>	tetratricopeptide repeat domain 3
221731_x_at	-5,3	<i>CSPG2</i>	chondroitin sulfate proteoglycan 2
204620_s_at	-5,1	<i>CSPG2</i>	chondroitin sulfate proteoglycan 2
218237_s_at	-5,1	<i>SLC38A1</i>	solute carrier family 38, member 1
205402_x_at	-4,9	<i>PRSS2</i>	protease, serine, 2
208960_s_at	-4,9	<i>KLF6</i>	Kruppel-like factor 6
203637_s_at	-4,8	<i>MID1</i>	midline 1
213572_s_at	-4,5	<i>SERPINB1</i>	serpin peptidase inhibitor, clade B, member 1
202790_at	-4,4	<i>CLDN7</i>	claudin 7
213311_s_at	-4,2	<i>TCF25</i>	transcription factor 25
209884_s_at	-4,2	<i>SLC4A7</i>	solute carrier family 4, member 7
210276_s_at	-4,2	<i>TRIOBP</i>	TRIO and F-actin binding protein
221806_s_at	-4,1	<i>SETD5</i>	SET domain containing 5
202935_s_at	-4,0	<i>SOX9</i>	SRY (sex determining region Y)-box 9
201991_s_at	-4,0	<i>KIF5B</i>	kinesin family member 5B
209765_at	-3,9	<i>ADAM19</i>	ADAM metallopeptidase domain 19 (meltrin beta)
213435_at	-3,9	<i>SATB2</i>	SATB family member 2
212368_at	-3,8	<i>ZNF292</i>	zinc finger protein 292
204771_s_at	-3,8	<i>TTF1</i>	transcription termination factor, RNA polymerase I
210438_x_at	-3,8	<i>TROVE2</i>	TROVE domain family, member 2
201844_s_at	-3,7	<i>RYBP</i>	RING1 and YY1 binding protein
202177_at	-3,7	<i>GAS6</i>	growth arrest-specific 6
213258_at	-3,7	<i>TFPI</i>	tissue factor pathway inhibitor
219625_s_at	-3,7	<i>COL4A3BP</i>	collagen, type IV, alpha 3 binding protein
208961_s_at	-3,7	<i>KLF6</i>	Kruppel-like factor 6
210896_s_at	-3,6	<i>ASPH</i>	aspartate beta-hydroxylase
201862_s_at	-3,6	<i>LRRFIP1</i>	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1
204976_s_at	-3,6	<i>AMMECR1</i>	Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region, gene 1
203821_at	-3,6	<i>HBEGF</i>	heparin-binding EGF-like growth factor
221841_s_at	-3,5	<i>KLF4</i>	Kruppel-like factor 4
214941_s_at	-3,5	<i>PRPF40A</i>	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A
219412_at	-3,5	<i>RAB38</i>	RAB38, member RAS oncogene family
202795_x_at	-3,5	<i>TRIOBP</i>	TRIO and F-actin binding protein
208662_s_at	-3,5	<i>TTC3</i>	tetratricopeptide repeat domain 3
205195_at	-3,5	<i>APIS1</i>	adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit
219388_at	-3,5	<i>GRHL2</i>	grainyhead-like 2
204285_s_at	-3,5	<i>PMAIP1</i>	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
202599_s_at	-3,4	<i>NRIP1</i>	nuclear receptor interacting protein 1
218659_at	-3,4	<i>ASXL2</i>	additional sex combs like 2
213793_s_at	-3,4	<i>HOMER1</i>	homer homolog 1
203297_s_at	-3,4	<i>JARID2</i>	jumonji, AT rich interactive domain 2
202844_s_at	-3,4	<i>RALBP1</i>	ralA binding protein 1
212852_s_at	-3,4	<i>TROVE2</i>	TROVE domain family, member 2

209383_at	-3,4	<i>DDIT3</i>	DNA-damage-inducible transcript 3
217456_x_at	-3,3	<i>HLA-E</i>	major histocompatibility complex, class I, E
212096_s_at	-3,3	<i>MTUS1</i>	mitochondrial tumor suppressor 1
200731_s_at	-3,3	<i>PTP4A1</i>	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1
222122_s_at	-3,3	<i>THOC2</i>	THO complex 2
203355_s_at	-3,3	<i>PSD3</i>	pleckstrin and Sec7 domain containing 3
205356_at	-3,2	<i>USP13</i>	ubiquitin specific peptidase 13
200842_s_at	-3,2	<i>EPRS</i>	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase
203221_at	-3,2	<i>TLE1</i>	transducin-like enhancer of split 1
209921_at	-3,2	<i>SLC7A11</i>	solute carrier family 7, member 11
201661_s_at	-3,2	<i>ACSL3</i>	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3
204286_s_at	-3,2	<i>PMAIP1</i>	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
217892_s_at	-3,2	<i>LIMA1</i>	LIM domain and actin binding 1
215726_s_at	-3,2	<i>CYB5A</i>	cytochrome b5 type A
208974_x_at	-3,2	<i>KPNB1</i>	karyopherin beta 1
215111_s_at	-3,1	<i>TSC22D1</i>	TSC22 domain family, member 1
209771_x_at	-3,1	<i>CD24</i>	CD24 molecule
211503_s_at	-3,1	<i>RAB14</i>	RAB14, member RAS oncogene family
203497_at	-3,1	<i>PPARBP</i>	PPAR binding protein
222104_x_at	-3,1	<i>GTF2H3</i>	general transcription factor IIH, polypeptide 3
215780_s_at	-3,1	<i>SET</i>	SET translocation (myeloid leukemia-associated)
209135_at	-3,1	<i>ASPH</i>	aspartate beta-hydroxylase
201131_s_at	-3,1	<i>CDH1</i>	cadherin 1, type 1, E-cadherin
213341_at	-3,1	<i>FEM1C</i>	fem-1 homolog c
203825_at	-3,1	<i>BRD3</i>	bromodomain containing 3
212251_at	-3,0	<i>MTDH</i>	metadherin
202118_s_at	-3,0	<i>CPNE3</i>	copine III
222001_x_at	-3,0	<i>FAM91A2</i>	family with sequence similarity 91, member A2
204619_s_at	-3,0	<i>CSPG2</i>	chondroitin sulfate proteoglycan 2
213110_s_at	-3,0	<i>COL4A5</i>	collagen, type IV, alpha 5
203049_s_at	-3,0	<i>KIAA0372</i>	KIAA0372
200732_s_at	-3,0	<i>PTP4A1</i>	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1
202976_s_at	-3,0	<i>RHOBTB3</i>	Rho-related BTB domain containing 3
201861_s_at	-3,0	<i>LRRFIP1</i>	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1
202769_at	-3,0	<i>CCNG2</i>	cyclin G2
218145_at	-3,0	<i>TRIB3</i>	tribbles homolog 3
205196_s_at	-3,0	<i>AP1S1</i>	adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit
203298_s_at	-3,0	<i>JARID2</i>	jumonji, AT rich interactive domain 2
202786_at	-3,0	<i>STK39</i>	serine threonine kinase 39
205627_at	-2,9	<i>CDA</i>	cytidine deaminase
210273_at	-2,9	<i>PCDH7</i>	BH-protocadherin (brain-heart)
216210_x_at	-2,9	<i>TRIOBP</i>	TRIO and F-actin binding protein
201116_s_at	-2,9	<i>CPE</i>	carboxypeptidase E
205020_s_at	-2,9	<i>ARL4A</i>	ADP-ribosylation factor-like 4A
212341_at	-2,9	<i>YIPF6</i>	Yip1 domain family, member 6
202760_s_at	-2,9	<i>AKAP2</i>	A kinase (PRKA) anchor protein 2
201428_at	-2,9	<i>CLDN4</i>	claudin 4
209635_at	-2,9	<i>AP1S1</i>	adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit
203453_at	-2,9	<i>SCNN1A</i>	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha
208510_s_at	-2,8	<i>PPARG</i>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
204734_at	-2,8	<i>KRT15</i>	keratin 15
211969_at	-2,8	<i>HSP90AA1</i>	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1
201055_s_at	-2,8	<i>HNRPA0</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0
212820_at	-2,8	<i>DMXL2</i>	Dmx-like 2
218041_x_at	-2,8	<i>SLC38A2</i>	solute carrier family 38, member 2
220924_s_at	-2,8	<i>SLC38A2</i>	solute carrier family 38, member 2

207606_s_at	-2,8	<i>ARHGAP12</i>	Rho GTPase activating protein 12
212840_at	-2,8	<i>UBXD7</i>	UBX domain containing 7
216379_x_at	-2,8	<i>CD24</i>	CD24 molecule
200730_s_at	-2,8	<i>PTP4A1</i>	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1
212812_at	-2,8	<i>SERINC5</i>	Serine incorporator 5
214670_at	-2,7	<i>ZKSCAN1</i>	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1
207808_s_at	-2,7	<i>PROS1</i>	protein S (alpha)
219270_at	-2,7	<i>CHAC1</i>	ChaC, cation transport regulator homolog 1
210664_s_at	-2,7	<i>TFPI</i>	tissue factor pathway inhibitor
208656_s_at	-2,7	<i>CCNI</i>	cyclin I
204019_s_at	-2,7	<i>SH3YL1</i>	SH3 domain containing, Ysc84-like 1
214953_s_at	-2,7	<i>APP</i>	amyloid beta (A4) precursor protein
211675_s_at	-2,7	<i>MDFIC</i>	MyoD family inhibitor domain containing
203058_s_at	-2,7	<i>PAPSS2</i>	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2
204015_s_at	-2,7	<i>DUSP4</i>	dual specificity phosphatase 4
217939_s_at	-2,7	<i>AFTPH</i>	aftiphilin
201117_s_at	-2,7	<i>CPE</i>	carboxypeptidase E
210827_s_at	-2,7	<i>ELF3</i>	E74-like factor 3
211452_x_at	-2,7	<i>LRRFIP1</i>	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1
218451_at	-2,7	<i>CDCP1</i>	CUB domain containing protein 1
203423_at	-2,7	<i>RBP1</i>	retinol binding protein 1, cellular
221899_at	-2,7	<i>PFAAP5</i>	Phosphonoformate immuno-associated protein 5
221773_at	-2,6	<i>ELK3</i>	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)
219926_at	-2,6	<i>POPDC3</i>	popeye domain containing 3
200921_s_at	-2,6	<i>BTG1</i>	B-cell translocation gene 1
204971_at	-2,6	<i>CSTA</i>	cystatin A
205542_at	-2,6	<i>STEAP1</i>	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1
204041_at	-2,6	<i>MAOB</i>	monoamine oxidase B
204256_at	-2,6	<i>ELOVL6</i>	ELOVL family member 6
213792_s_at	-2,6	---	---
218273_s_at	-2,6	<i>PPM2C</i>	protein phosphatase 2C
219681_s_at	-2,6	<i>RAB11FIP1</i>	RAB11 family interacting protein 1
205967_at	-2,6	<i>HIST1H4C</i>	histone cluster 1, H4c
213107_at	-2,6	<i>TNIK</i>	TRAF2 and NCK interacting kinase
205768_s_at	-2,5	<i>SLC27A2</i>	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2
210357_s_at	-2,5	<i>SMOX</i>	spermine oxidase
209621_s_at	-2,5	<i>PDLIM3</i>	PDZ and LIM domain 3
204094_s_at	-2,5	<i>TSC22D2</i>	TSC22 domain family, member 2
203791_at	-2,5	<i>DMXL1</i>	Dmx-like 1
221829_s_at	-2,5	<i>TNPO1</i>	transportin 1
212062_at	-2,5	<i>ATP9A</i>	ATPase, Class II, type 9A
202730_s_at	-2,5	<i>PDCD4</i>	programmed cell death 4
213507_s_at	-2,5	<i>KPNB1</i>	karyopherin beta 1
222182_s_at	-2,5	<i>CNOT2</i>	CCR4-NOT transcription complex, subunit 2
221771_s_at	-2,5	<i>HSMPP8</i>	M-phase phosphoprotein, mpp8
201531_at	-2,5	<i>ZFP36</i>	zinc finger protein 36, C3H type, homolog
209034_at	-2,5	<i>PNRC1</i>	proline-rich nuclear receptor coactivator 1
209267_s_at	-2,5	<i>SLC39A8</i>	solute carrier family 39, member 8
203159_at	-2,5	<i>GLS</i>	glutaminase
202876_s_at	-2,5	<i>PBX2</i>	pre-B-cell leukemia transcription factor 2
218396_at	-2,5	<i>VPS13C</i>	vacuolar protein sorting 13 homolog C
205016_at	-2,5	<i>TGFA</i>	transforming growth factor, alpha
200632_s_at	-2,5	<i>NDRG1</i>	N-myc downstream regulated gene 1
221496_s_at	-2,5	<i>TOB2</i>	transducer of ERBB2, 2
217997_at	-2,5	<i>PHLDA1</i>	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
209226_s_at	-2,4	<i>TNPO1</i>	transportin 1

207966_s_at	-2,4	<i>GLG1</i>	golgi apparatus protein 1
204235_s_at	-2,4	<i>GULP1</i>	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1
212985_at	-2,4	---	Full-length cDNA clone CS0DC015YK09 of Neuroblastoma Cot 25-normalized of Homo sapiens
211992_at	-2,4	<i>WNK1</i>	WNK lysine deficient protein kinase 1
213924_at	-2,4	<i>MPPE1</i>	Metallophosphoesterase 1
204373_s_at	-2,4	<i>CEP350</i>	centrosomal protein 350kDa
202847_at	-2,4	<i>PCK2</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2
218923_at	-2,4	<i>CTBS</i>	chitobiase, di-N-acetyl-
210733_at	-2,4	<i>TRAM1</i>	Translocation associated membrane protein 1
214722_at	-2,4	<i>NOTCH2NL</i>	Notch homolog 2 (Drosophila) N-terminal like
1598_g_at	-2,4	<i>GAS6</i>	growth arrest-specific 6
206785_s_at	-2,4	<i>KLRC1</i>	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1
208540_x_at	-2,4	<i>LOC729659</i>	similar to Putative S100 calcium-binding protein A11 pseudogene
203952_at	-2,4	<i>ATF6</i>	activating transcription factor 6
213857_s_at	-2,4	<i>CD47</i>	CD47 molecule
212765_at	-2,4	<i>CAMSAP1L1</i>	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1-like 1
201242_s_at	-2,3	<i>ATP1B1</i>	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide
209846_s_at	-2,3	<i>BTN3A2</i>	butyrophilin, subfamily 3, member A2
221843_s_at	-2,3	<i>KIAA1609</i>	KIAA1609
201534_s_at	-2,3	<i>UBL3</i>	ubiquitin-like 3
219297_at	-2,3	<i>WDR44</i>	WD repeat domain 44
209451_at	-2,3	<i>TANK</i>	TRAF family member-associated NFKB activator
201549_x_at	-2,3	<i>JARID1B</i>	jumonji, AT rich interactive domain 1B
217744_s_at	-2,3	<i>PERP</i>	PERP, TP53 apoptosis effector
218700_s_at	-2,3	<i>RAB7L1</i>	RAB7, member RAS oncogene family-like 1
221760_at	-2,3	<i>MAN1A1</i>	Mannosidase, alpha, class 1A, member 1
204134_at	-2,3	<i>PDE2A</i>	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated
203704_s_at	-2,3	---	---
221510_s_at	-2,3	<i>GLS</i>	glutaminase
208786_s_at	-2,3	<i>MAP1LC3B</i>	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
201505_at	-2,3	<i>LAMB1</i>	laminin, beta 1
201353_s_at	-2,3	<i>BAZ2A</i>	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A
212331_at	-2,3	<i>RBL2</i>	retinoblastoma-like 2 (p130)
208161_s_at	-2,3	<i>ABCC3</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3
218704_at	-2,3	<i>RNF43</i>	ring finger protein 43
211651_s_at	-2,3	<i>LAMB1</i>	laminin, beta 1
216905_s_at	-2,3	<i>ST14</i>	suppression of tumorigenicity 14
210868_s_at	-2,3	<i>ELOVL6</i>	ELOVL family member 6
202102_s_at	-2,3	<i>BRD4</i>	bromodomain containing 4
210143_at	-2,3	<i>ANXA10</i>	annexin A10
201416_at	-2,3	<i>SOX4</i>	SRY (sex determining region Y)-box 4
205466_s_at	-2,3	<i>HS3ST1</i>	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1
221750_at	-2,3	<i>HMGCS1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1
218963_s_at	-2,3	<i>KRT23</i>	keratin 23
218967_s_at	-2,3	<i>PTER</i>	phosphotriesterase related
205364_at	-2,3	<i>ACOX2</i>	acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain
203798_s_at	-2,3	<i>VSNL1</i>	visinin-like 1
203234_at	-2,3	<i>UPP1</i>	uridine phosphorylase 1
212104_s_at	-2,3	<i>RBM9</i>	RNA binding motif protein 9
218930_s_at	-2,2	<i>TMEM106B</i>	transmembrane protein 106B
212759_s_at	-2,2	<i>TCF7L2</i>	transcription factor 7-like 2
202425_x_at	-2,2	<i>PPP3CA</i>	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform
215549_x_at	-2,2	<i>LOC643854</i>	similar to CTAGE family, member 5
205239_at	-2,2	<i>AREG</i>	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)
217947_at	-2,2	<i>CMTM6</i>	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6

218796_at	-2,2	<i>C20orf42</i>	chromosome 20 open reading frame 42
207843_x_at	-2,2	<i>CYB5A</i>	cytochrome b5 type A
202239_at	-2,2	<i>PARP4</i>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 4
201951_at	-2,2	<i>ALCAM</i>	activated leukocyte cell adhesion molecule
210830_s_at	-2,2	<i>PON2</i>	paraoxonase 2
219470_x_at	-2,2	<i>CCNJ</i>	cyclin J
206385_s_at	-2,2	<i>ANK3</i>	ankyrin 3, node of Ranvier
203586_s_at	-2,2	<i>ARL4D</i>	ADP-ribosylation factor-like 4D
213988_s_at	-2,2	<i>SATI</i>	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1
218178_s_at	-2,2	<i>CHMP1B</i>	chromatin modifying protein 1B
207266_x_at	-2,2	<i>RBMS1</i>	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1
209504_s_at	-2,2	<i>PLEKHB1</i>	pleckstrin homology domain containing, family B member 1
209272_at	-2,2	<i>NAB1</i>	NGFI-A binding protein 1
208942_s_at	-2,2	<i>TLOC1</i>	translocation protein 1
212536_at	-2,2	<i>ATP11B</i>	ATPase, Class VI, type 11B
201876_at	-2,2	<i>PON2</i>	paraoxonase 2
201222_s_at	-2,2	<i>RAD23B</i>	RAD23 homolog B
215505_s_at	-2,2	<i>STRN3</i>	striatin, calmodulin binding protein 3
209286_at	-2,2	<i>CDC42EP3</i>	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3
203320_at	-2,2	<i>SH2B3</i>	SH2B adaptor protein 3
213995_at	-2,2	<i>ATP5S</i>	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit s
212864_at	-2,2	<i>CDS2</i>	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidylyltransferase) 2
214182_at	-2,2	<i>ARF6</i>	ADP-ribosylation factor 6
204981_at	-2,2	<i>SLC22A18</i>	solute carrier family 22, member 18
211202_s_at	-2,2	<i>JARID1B</i>	jumonji, AT rich interactive domain 1B
202146_at	-2,2	<i>IFRD1</i>	interferon-related developmental regulator 1
203556_at	-2,2	<i>ZHX2</i>	zinc fingers and homeoboxes 2
207657_x_at	-2,2	<i>TNPO1</i>	transportin 1
203964_at	-2,2	<i>NMI</i>	N-myc (and STAT) interactor
213017_at	-2,1	<i>ABHD3</i>	abhydrolase domain containing 3
220785_at	-2,1	<i>UTS2</i>	urotensin 2
204342_at	-2,1	<i>SLC25A24</i>	solute carrier family 25, member 24
208736_at	-2,1	<i>ARPC3</i>	actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa
214715_x_at	-2,1	<i>ZNF160</i>	zinc finger protein 160
221778_at	-2,1	<i>KIAA1718</i>	KIAA1718 protein
212073_at	-2,1	<i>CSNK2A1</i>	casein kinase 2, alpha 1 polypeptide
218285_s_at	-2,1	<i>BDH2</i>	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2
203072_at	-2,1	<i>MYO1E</i>	myosin IE
208095_s_at	-2,1	<i>SRP72</i>	signal recognition particle 72kDa
218228_s_at	-2,1	<i>TNKS2</i>	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 2
209366_x_at	-2,1	<i>CYB5A</i>	cytochrome b5 type A
206875_s_at	-2,1	<i>SLK</i>	STE20-like kinase
209545_s_at	-2,1	<i>RIPK2</i>	receptor-interacting serine-threonine kinase 2
215127_s_at	-2,1	<i>RBMS1</i>	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1
218637_at	-2,1	<i>IMPACT</i>	Impact homolog
202085_at	-2,1	<i>TJP2</i>	tight junction protein 2
201671_x_at	-2,1	<i>USP14</i>	ubiquitin specific peptidase 14
218496_at	-2,1	<i>RNASEH1</i>	ribonuclease H1
202822_at	-2,1	<i>LPP</i>	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma
201143_s_at	-2,1	<i>EIF2S1</i>	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha
207616_s_at	-2,1	<i>TANK</i>	TRAF family member-associated NFkB activator
201043_s_at	-2,1	<i>ANP32A</i>	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A
202620_s_at	-2,1	<i>PLOD2</i>	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2

218191_s_at	-2,1	<i>LMBRD1</i>	LMBR1 domain containing 1
218435_at	-2,1	<i>DNAJC15</i>	DnaJ homolog, subfamily C, member 15
212952_at	-2,1	<i>CALR</i>	Calreticulin
205596_s_at	-2,1	<i>SMURF2</i>	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2
209679_s_at	-2,1	<i>LOC57228</i>	small trans-membrane and glycosylated protein
203180_at	-2,1	<i>ALDH1A3</i>	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3
208869_s_at	-2,1	<i>GABARAPL1</i>	GABA(A) receptor-associated protein like 1
213664_at	-2,1	<i>SLC1A1</i>	solute carrier family 1, member 1
209301_at	-2,1	<i>CA2</i>	carbonic anhydrase II
203719_at	-2,1	<i>ERCC1</i>	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
205190_at	-2,1	<i>PLS1</i>	plastin 1
213156_at	-2,1	---	Homo sapiens, clone IMAGE:4214654, mRNA
218124_at	-2,1	<i>RETSAT</i>	retinol saturase (all-trans-retinol 13,14-reductase)
214257_s_at	-2,1	<i>SEC22B</i>	SEC22 vesicle trafficking protein homolog B
219100_at	-2,1	<i>OBFC1</i>	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 1
209318_x_at	-2,0	<i>PLAGL1</i>	pleiomorphic adenoma gene-like 1
221763_at	-2,0	<i>JMJD1C</i>	jumonji domain containing 1C
203954_x_at	-2,0	<i>CLDN3</i>	claudin 3
201321_s_at	-2,0	<i>SMARCC2</i>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2
218924_s_at	-2,0	<i>CTBS</i>	chitinase, di-N-acetyl-
201694_s_at	-2,0	<i>EGR1</i>	early growth response 1
217127_at	-2,0	<i>CTH</i>	cystathionase
203385_at	-2,0	<i>DGKA</i>	diacylglycerol kinase, alpha
204291_at	-2,0	<i>ZNF518</i>	zinc finger protein 518
205767_at	-2,0	<i>EREG</i>	epiregulin
60474_at	-2,0	<i>C20orf42</i>	chromosome 20 open reading frame 42
203420_at	-2,0	<i>FAM8A1</i>	family with sequence similarity 8, member A1
221802_s_at	-2,0	<i>KIAA1598</i>	KIAA1598
207360_s_at	-2,0	<i>NTSR1</i>	neurotensin receptor 1
209061_at	-2,0	<i>NCOA3</i>	nuclear receptor coactivator 3
209146_at	-2,0	<i>SC4MOL</i>	sterol-C4-methyl oxidase-like
219736_at	-2,0	<i>TRIM36</i>	tripartite motif-containing 36
212605_s_at	-2,0	---	AF034176 Human mRNA
204297_at	-2,0	<i>PIK3C3</i>	phosphoinositide-3-kinase, class 3
202597_at	-2,0	<i>IRF6</i>	interferon regulatory factor 6
203060_s_at	-2,0	<i>PAPSS2</i>	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2
201061_s_at	-2,0	<i>STOM</i>	stomatin
210457_x_at	-2,0	<i>HMGA1</i>	high mobility group AT-hook 1
205489_at	-2,0	<i>CRYM</i>	crystallin, mu
213689_x_at	-2,0	<i>RPL5</i>	Ribosomal protein L5
212202_s_at	-2,0	<i>TMEM87A</i>	transmembrane protein 87A
217887_s_at	-2,0	<i>EPS15</i>	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15
218261_at	-2,0	<i>AP1M2</i>	adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit
220939_s_at	-2,0	<i>DPP8</i>	dipeptidyl-peptidase 8
201669_s_at	-2,0	<i>MARCKS</i>	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
218779_x_at	-2,0	<i>EPS8L1</i>	EPS8-like 1
213979_s_at	-2,0	<i>CTBP1</i>	C-terminal binding protein 1
213348_at	-2,0	<i>CDKN1C</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
211668_s_at	-2,0	<i>PLAU</i>	plasminogen activator, urokinase

RESUME:

La voie de signalisation Hedgehog (HH) est impliquée dans le développement du tractus gastro-intestinal chez de nombreuses espèces. Elle est importante chez l'adulte en participant au maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal. Récemment la suractivation de la voie HH a été mise en évidence dans de nombreux cancers dont ceux du tractus gastro-intestinal tels que les cancers de l'estomac et du pancréas. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la voie de signalisation HH dans les cancers du côlon. L'expression des membres principaux de la voie HH a d'abord été caractérisée dans sept lignées cellulaires de cancers du côlon (Colo205, Colo320, HCT116, HT29, WiDr, SW480, Caco-2). L'absence d'expression de certains membres clés de la voie indique que celle-ci n'est pas activée, de façon autocrine, dans les lignées cellulaires. Cette observation est également appuyée par des expériences réalisées en traitant les cellules à la cyclopamine, inhibiteur de la voie HH. Enfin GLI1, facteur de transcription mimant une activation de la voie HH, a été surexprimé stablement dans les cellules HCT116. Nous avons pu montrer que l'activation de la voie HH induisait l'expression du gène *BMP4*, gène cible de la voie HH lors de l'embryogenèse intestinale, ainsi que l'activité phosphatase alcaline, marqueur de différenciation du côlon.

Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation HH n'est pas activée de façon autocrine dans les cancers du côlon mais semble plutôt associée à la différenciation des cellules du côlon.

ABSTRACT:

The Hedgehog (HH) signaling pathway is involved in the development of the gastrointestinal tract development in several species. In adults, it is also implicated in the intestinal homeostasis. Recently, increased HH pathway activation has been found in several cancers including those of the gastrointestinal tract tumours such as the stomach and the pancreas. In this work, we have studied the HH signaling pathway in colon cancer. First, the expression of key members of the pathway has been characterized in seven colorectal cancer cell lines (Colo205, Colo320, HCT116, HT29, WiDr, SW480, Caco-2). The lack of expression of important members indicates that the pathway is not activated in these cell lines. This result has been confirmed by treating the cells with cyclopamine, an inhibitor of the HH pathway. Finally, GLI1, a transcription factor mimicking HH pathway activation, has been overexpressed in HCT116 cells. We have observed that activation of HH signaling pathway in these cells induces *BMP4* expression, a gene involved in intestinal embryogenesis, and phosphatase alkaline activity which is a differentiation marker of the colon.

Altogether, our results suggest that HH signaling pathway is not activated in colon cancers but seems to be associated rather with the differentiation of colonic cells.