

Université de Montréal

**Implications d'AXIN2 et de l'instabilité microsatellite dans le développement des
tumeurs du cortex-surrénalien**

par

Audrey Chapman

Département des Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître en Science (M.Sc)

En Sciences biomédicales

Août, 2010

©Audrey Chapman, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Implications d'AXIN2 et de l'instabilité microsatellite dans le développement des tumeurs
du cortex-surrénalien

Présentée par :
Audrey Chapman

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Sophie Valette, président-rapporteur
Isabelle Bourdeau, directrice de recherche
Sophie Bernard, membre du jury

RÉSUMÉ

Les lésions tumorales cortico-surréaliennes sont majoritairement des adénomes bénins et très rarement des carcinomes. Les altérations génétiques impliquées dans le développement des tumeurs cortico-surréaliennes sporadiques, plus particulièrement au stade malin, demeurent à ce jour très peu connues. Lors de travaux récents menant à l'identification d'altérations génétiques de β -CATÉNINE nous avons constaté que plusieurs tumeurs présentaient une accumulation nucléo/cytoplasmique de la protéine β -CATÉNINE sans toutefois contenir de mutations pour ce gène. Nous avons donc émis l'hypothèse que, comme pour d'autres types de cancers, d'autres composants de la voie de signalisation Wnt/ β -CATÉNINE, tel qu'*AXIN2*, pourrait être impliqués dans le développement des tumeurs du cortex surrénalien. De plus, plusieurs aberrations dans l'expression d'*AXIN2* et de β -CATÉNINE sont associées à des tumeurs présentant de l'instabilité microsatellite dans d'autres types de cancer, notamment le cancer gastrique et colorectal. Nous avons donc étudié une cohorte de 30 adénomes, 6 carcinomes, 5 AIMAH, 3 hyperplasies ACTH-dépendante et 5 PPNAD ainsi que les lignées cellulaires de carcinomes cortico-surréaliens humains H295R et SW13. Une étude préliminaire du statut MSI a également été réalisée sur 10 tumeurs contenant une mutation pour *AXIN2* et/ou β -CATÉNINE. Nous avons trouvé des mutations d'*AXIN2* dans 7% des adénomes (2/30) et 17% des carcinomes (1/6) cortico-surréaliens. L'analyse fonctionnelle des mutations par immunohistochimie, analyse *western blot* et analyse de RT-PCR en temps réel a révélé une diminution de l'expression d'*AXIN2* associée à cette mutation. L'analyse préliminaire MSI a démontré 1 échantillon AIMAH MSI-H, c'est-à-dire instable pour le locus *BAT-25* et *BAT-26* et 3 autres adénomes sécrétant de l'aldostérone instables seulement pour le locus *BAT-26*. Ainsi, ces travaux permirent d'identifier une nouvelle altération génétique associée au développement des tumeurs du cortex surrénalien en plus de rapporter pour la première fois la présence de MSI-H dans ce type de tumeurs.

Mots-clés : Tumeurs du cortex surrénalien, AXIN2, mutation, instabilité microsatellite, Wnt/ β -CATÉNINE.

ABSTRACT

Adrenocortical lesions are mostly benign tumors and rarely carcinomas. From now on, genetic alterations implicated in sporadic adrecocortical tumour development remains largely unknown. In our previous work leading to identification of genetic alterations in β -catenin, we observed that many tumors presented a nucleo/cytoplasmic accumulation of β -catenin protein without β -catenin mutations. Thus, we hypothesised that, as for many others cancers, others components of the Wnt/ β -catenin signalling pathway, as AXIN2, are implicated in development of adrenocortical tumors. Also, many aberrations in AXIN2 and β -catenin expression have been reported in association with microsatellite instability in other types of cancers like gastrointestinal and colorectal cancer. We have studied 30 adenomas, 6 carcinomas, 5 AIMAH, 3 ACTH-dependant hyperplasias and 5 PPNAD as well as the human carcinoma cancer cells lines H295R and SW13. Preliminary study for MSI was also realised on 10 tumors harbouring *AXIN2* and/or *B-CATENIN* mutations. We have found *AXIN2* mutations in 7% of adrenocortical adenomas (2/30) and 17% of adrenocortical carcinomas. Functional analysis of this mutation by immunohistochemical, western blot and real-time RT-PCR analysis revealed a down-regulation of AXIN2 expression associated with this mutation. Preliminary analysis of MSI results in 1 AIMAH sample MSI-H, which means instable for *BAT-25* and *BAT-26* locus, and 2 aldosterone adenomas were unstable for *BAT-26* locus. This work identified a new genetic alteration involved in adrenocortical tumour development and report for the first time MSI-H in this type of tumor.

Keywords : adrenocortical tumors, AXIN2, mutations, microsatelite instability, Wnt/ β -catenin

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
DÉDICACE.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xv
CHAPITRE I – INTRODUCTION.....	1
1. LE CORTEX SURRÉNALIEN.....	1
1.1 La glande surrénale.....	1
1.1.1 Développement de la glande surrénale.....	1
1.1.2 Anatomie et physiologie de la glande surrénale.....	1
1.1.3 Apport sanguin, nerveux et immunitaire aux glandes surrénales.....	5
2. LES TUMEURS CORTICO-SURRÉNALIENNES SPORADIQUES.....	6
2.1 Généralités.....	6
2.2 Outils diagnostiques et traitement.....	6
2.3 Clonalité des tumeurs cortico-surrénaliennes.....	8
2.4 Pathologie moléculaire des tumeurs sporadiques du cortex surrénalien.....	9
2.4.1 Génétique des syndromes tumoraux héréditaires.....	9
2.4.2 Génétique des tumeurs sporadiques cortico-surrénaliennes.....	12
2.4.2.1 Gène <i>TP53</i>	12

2.4.2.2 IGF2, gène <i>H19</i> et p57 ^{kip2} (<i>CDK1VIC</i>).....	13
2.4.2.3 Gène <i>MEN1</i>	14
2.4.2.4 Le récepteur d'ACTH.....	15
2.4.2.5 Autres altérations génétiques.....	15
3. LA VOIE DE WNT DANS LES TUMEURS DU CORTEX SURRÉNALIEN.....	17
3.1 La voie de Wnt.....	17
3.2 Wnt et le cancer.....	20
3.2.1 Mutations génétiques d' <i>APC</i>	21
3.2.2 Mutations génétiques de β - <i>CATÉNINE</i>	22
3.2.3 Mutations génétiques d' <i>AXIN1</i>	23
3.2.4 Autres altérations génétiques de Wnt.....	25
3.3 Wnt et les tumeurs sporadiques du cortex surrénalien.....	26
4. <i>AXIN2</i> : GÈNE SUPRESSEUR DE TUMEURS.....	33
4.1 Expression et régulation d' <i>AXIN2</i>	33
4.2 Rôle d' <i>AXIN2</i> dans la voie de Wnt	33
4.2.1 Interaction avec APC.....	34
4.2.2 Interactions avec β - <i>CATÉNINE</i>	35
4.2.3 Interactions avec GSK-3 β	35
4.2.4 Interactions avec DVL.....	36
4.2.5 Interactions avec PP2A.....	36
4.3 Implication d' <i>AXIN2</i> dans le cancer.....	37
4.3.1 Mutations héréditaires et polymorphisme d' <i>AXIN2</i>	37
4.3.2 Mutations sporadiques d' <i>AXIN2</i>	38
4.3.3 Autre mécanisme de régulation de l'expression d' <i>AXIN2</i>	43
5. INSTABILITÉ MICROSATELLITE.....	43

5.1 Généralités et classification internationale.....	43
5.2 Implication du MSI dans le cancer sporadique.....	49
5.3 MSI et la voie de signalisation Wnt.....	50
4.3.1 Instabilité microsatellite et AXIN2.....	52
5.4 Instabilité microsatellite dans les tumeurs surrénaliennes.....	52
6. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	53
6.1 Hypothèse de recherche.....	53
6.2 Objectifs.....	54
CHAPITRE II- ARTICLE NO.1.....	56
7. ARTICLE NO.1 : <i>Identification of genetic alterations of AXIN2 in adrenocortical tumors</i>	56
CHAPITRE III - MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	79
8. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE D'INSTABILITÉ MICROSATELLITE DANS LES TUMEURS CORTICO-SURRÉNALIENNES.....	79
8.1 Patients, échantillons de tumeurs cortico-surrénaliennes et lignée cellulaire de carcinomes cortico-surrénalien humaine.....	79
8.2 Analyse de l'instabilité microsatellite.....	79
8.3 Analyse mutationnelle de la voie de signalisation Wnt.....	80
CHAPITRE IV – RÉSULTATS.....	82
9. Résultats préliminaires des études d'instabilité microsatellite dans les tumeurs du cortex surrénalien.....	82

CHAPITRE V – DISCUSSION ET CONCLUSION..... 86

CHAPITRE VI – RÉFÉRENCES.....89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I

Résumé des syndromes héréditaires associés aux tumeurs cortico-surréaliennes.....11

Tableau II

Résumé des altérations génétiques impliquées dans les tumeurs sporadiques
du cortex surréalien.....17

Tableau III

Sommaire des altérations génétiques de β -*CATÉ*NINE dans les tumeurs du cortex
surréalien
et dans les lignées cellulaires humaines de carcinomes surréaliens.....30

Tableau IV

Résumé des plus importantes études d'analyse d'expression génique de type *microarray*
sur les tumeurs du cortex surréalien.....32

Tableau V

Les cinq marqueurs quasi-monomorphiques et mononucleotidiques utilisés dans
un PCR multiplex pour la détection du statut MSI.....46

Tableau VI

Taille des produits de PCR et des marqueurs fluorescents pour le locus correspondant dans
le système multiplex MSI.....46

Tableau VII

<i>AXIN2</i> , β - <i>CATENIN</i> mutation analysis and β - <i>CATENIN</i> staining in <i>adrenocortical tumors</i>	76
--	----

Tableau VIII

Tailles des produits de PCR et leurs marqueurs fluorescents respectifs pour les locus contenus dans l'essai MSI	81
--	----

Tableau IX

Instabilité microsatellite pour les locus <i>BAT-25</i> et <i>BAT-26</i> dans les tumeurs cortico-surréaliennes	85
--	----

Tableau X

Instabilité des locus <i>BAT-25</i> et <i>BAT-26</i> dans les tumeurs cortico-surréaliennes avec et sans altérations génétiques pour la voie de signalisation Wnt	85
--	----

LISTES DES FIGURES

Figure 1	
Stéroïdogénèse de la glande surrénale.....	4
Figure 2	
Physiologie de la glande surrénale.....	5
Figure 3	
Modèle schématique de la voie de signalisation canonique Wnt/ β -CATÉNINE.....	20
Figure 4	
Mutations de β -CATÉNINE, APC et AXINI dans le cancer humain.....	25
Figure 5	
Distribution de la protéine β -CATÉNINE dans les tumeurs sporadiques du cortex surrénalien.....	28
Figure 6	
Structure du gène d'AXIN2.....	37
Figure 7	
Profil aléllique typique de BAT-26, BAT-25, NR-24, NR-21 et NR-22.....	48
Figure 8	
Analyse MSI d'échantillons d'ADN normal avec le système multiplex.....	49

Figure 9	
<i>Representative DNA sequencing of AXIN2 mutations in adrenocortical tumors</i>	
<i>at the genomic and cDNA level.....</i>	74
Figure 10	
<i>Down regulation of AXIN2 in adrenocortical tumors mutated for AXIN2</i>	75
Figure 11	
<i>Immunohistochemistry staining of B-CATENIN and AXIN2 in mutated tumors.....</i>	77
Figure 12	
<i>Model of AXIN2 genetics alterations in adrenocortical tumors.....</i>	78
Figure 13	
<i>Instabilité microsatellite pour les marqueurs BAT-25 et BAT-26 dans les tumeurs</i>	
<i>cortico-surréaliennes.....</i>	84

LISTE DES ABREVIATIONS

ACTH : Corticotrophine – *adrenocorticotropic hormone*

ADN : Acide déoxyribonucléotidique

AIMAH : Hyperplasie macronodulaire indépendante de la corticotrophine- *corticotrophin (ACTH)-independent form of macronodular adrenal hyperplasia*

AMPC : Adénylate monophosphate cyclique

APC : Polypes adénomateuses - *adenomatous polyposis coli*

ARNm : Acide ribonucléotidique messenger

CK1 : Kinase caséine 1 – *Casein kinase 1*

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DVL : *Dishevelled*

GSK3- β : Kinase du glycogène synthase 3 β – *Glycogen synthase kinase 3 β*

GTPase : Hydrolase de la guanosine triphosphates – *Guanosine triphosphate hydrolase*

IGF2 : Facteur de croissance de l'insuline 2 – *Insulin growth factor 2*

IL-1 : Interleukine 1

IL-6 : Interleukine 6

MSI : Instabilité microsatellite - *Microsatellite instability*

MSI-H : Instabilité microsatellite élevé - *Microsatellite instability high*

MSI-L : Instabilité microsatellite faible - *Microsatellite instability low*

MSS : Stabilité microstellite – *Microsatellite stability*

p57^{kip2} : Kinase inhibitrice cycline-dependant

PCR : Réaction de la polymérase en chaine – *Polymerase Chain Reaction*

PP2A : Protéine phosphatase 2A – *Phosphatase protein 2A*

PPNAD : Hyperplasie micronodulaire pigmentée des glandes surrénales - *Primary pigmented nodular adrenocortical disease*

TNF : Facteur de nécrose tissulaire – *Tissular necrosis factor*

*À mes parents, Danièle et Michel, qui m'ont
ouvert toutes les portes...*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement Dr. Isabelle Bourdeau de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de développer mes aptitudes à la recherche. Ton appui et ta confiance me permirent de vivre une expérience mémorable, enrichissante et très formatrice.

Je veux également remercier tous mes collègues de travail autant pour leurs judicieux conseils que pour leur entrain au travail, ce qui a permis de faire de ce laboratoire un endroit des plus agréables à travailler. Je pense notamment à Antoine Lampron, Sylvie Oble, Tania Mazzuco, Julien Durand, Aurélia Sima et Daniel Manolescu.

CHAPITRE I – INTRODUCTION

1. LE CORTEX SURRÉNALIEN

1.1 La Glande surrénale

La glande surrénale a été découverte par Eustachius en 1563 et son importance physiologique a été mise en lumière plusieurs années plus tard par les travaux de Thomas Addison et Brown-Siguard, en 1855 et 1856, respectivement. Dans le milieu du 19^e siècle, avec l'émergence des techniques d'immunohistochimie, on a démontré que la glande surrénale était constituée de deux entités distinctes, soit la médulla et le cortex surrénalien.

1.1.1 Développement de la glande surrénale

La glande surrénale se compose de deux tissus embryologiques distincts, le cortex origine du mésoderme alors que la médulla origine plutôt des cellules de la crête neurale. À la 7^e semaine de gestation, les deux amas de cellules se rencontrent dans la région urogénitale et la médulla s'invagine graduellement dans le cortex. La zone fasciculée se forme après 20 semaines de gestation tandis que la zone glomérulée se forme à la naissance. Enfin, la zone réticulée du cortex surrénalien n'apparaît vraiment que chez l'adulte (Bornstein, Ehrhart-Bornstein et al. 1991; Bornstein, Gonzalez-Hernandez et al. 1994).

1.1.2 Anatomie et physiologie de la glande surrénale

La glande surrénale est située en position antérosupérieure par rapport au rein, du côté droit et gauche. Tel que mentionné ci-haut, elle se compose d'une capsule, d'un cortex et de la médulla (Figure 1). Le cortex, ou corticosurrénale, et la médulla, ou médullosurrénale, sont constamment en communication avec le système nerveux. En effet, la corticosurrénale est sous le contrôle du cortex, plus précisément de la corticotrophine (ACTH - *adrenocorticotropic hormone*) sécrétée par l'hypophyse, composante du système nerveux central. La médullosurrénale comme son nom l'indique est sous le contrôle du

système nerveux périphérique via la moelle épinière. Le rôle principal de la glande surrénale est la synthèse des hormones stéroïdiennes dont le précurseur commun est le cholestérol. La source majeure de cholestérol humaine est le foie qui relâche le cholestérol dans le sang sous forme de lipoprotéines lipases de faible poids moléculaire (LDL) afin d'être acheminé aux divers organes dont la glande surrénale. Le cholestérol est converti en hormones stéroïdiennes majoritairement par des réactions enzymatiques du cytochrome P450.

La médullosurrénale est la principale source d'hormones du groupe des catécholamines. Les cellules possèdent habituellement des noyaux volumineux, pâles, et un cytoplasme finement granuleux ; elles sont disposées en amas, cordons ou colonnes, entourées d'un riche réseau capillaire. Les catécholamines sont des hormones hydrosolubles possédant des récepteurs membranaires spécifiques leur permettant d'agir en tant qu'hormones et/ou neurotransmetteurs. L'adrénaline agit en tant que neurotransmetteur dans le système nerveux central et comme hormone dans la circulation sanguine. La noradrénaline est principalement un neurotransmetteur du système nerveux sympathique périphérique, même si on la retrouve également dans le sang. Les catécholamines sont particulièrement sollicitées lors d'un état de stress où leur sécrétion dans le sang est alors augmentée. Au cours d'une activité physique, par exemple, les catécholamines induisent des modifications physiologiques telles que l'augmentation de la fréquence cardiaque, de la tension artérielle et du taux de glucose dans le sang.

Le cortex adulte comprend trois zones anatomiques distinctes soit la zone glomérulée, fasciculée et réticulée. La zone glomérulée est responsable de la production des minéralocorticoïdes, soit l'aldostérone qui est principalement régulée par l'angiotensine II, l'ACTH et le potassium. De plus, la dopamine, le peptide natriurétique atriale (ANP) et d'autres neuropeptides peuvent aussi moduler sa fonction. La zone glomérulée est la seule du cortex surrénalien possédant l'enzyme clé de la synthèse de l'aldostérone soit le *CYP11B2* ou aldostérone synthase (Figure 1). La glomérulée représente 15 % de la

corticosurrénale et ses cordons s'organisent en réseaux arrondis, qu'on nomme glomérules (Figure 2). La zone fasciculée synthétise des glucocorticoïdes, soit le cortisol et la corticostérone, qui sont régulés par l'ACTH. En plus de l'ACTH, plusieurs cytokines (IL-1, IL-6 et TNF), neuropeptides et catécholamines influencent la biosynthèse des glucocorticoïdes. Cette zone représente 75% de la corticosurrénale et ses cordons s'organisent en réseaux parallèles, radiaires, d'une à deux couches de cellules, et séparés par des capillaires (Figure 2). Enfin, la zone réticulée, soit la zone la plus interne du cortex, est le site de la sécrétion du DHEA et de l'androstenedione. Cette zone produit également du cortisol et de la corticostérone. La zone réticulée du cortex représente 10 % de la superficie de la glande surrénale et ses cordons s'organisent en réseau anastomosé (en branches) (Figure 2). Même si la zone fasciculée est le site majeur de production du cortisol et la zone réticulée des androgènes ; les deux zones possèdent l'enzyme précurseur, soit la *17- α -hydrolase* permettant la synthèse des androgènes et du cortisol. Cette enzyme est cependant absente de la zone glomérulée (Figure 1).

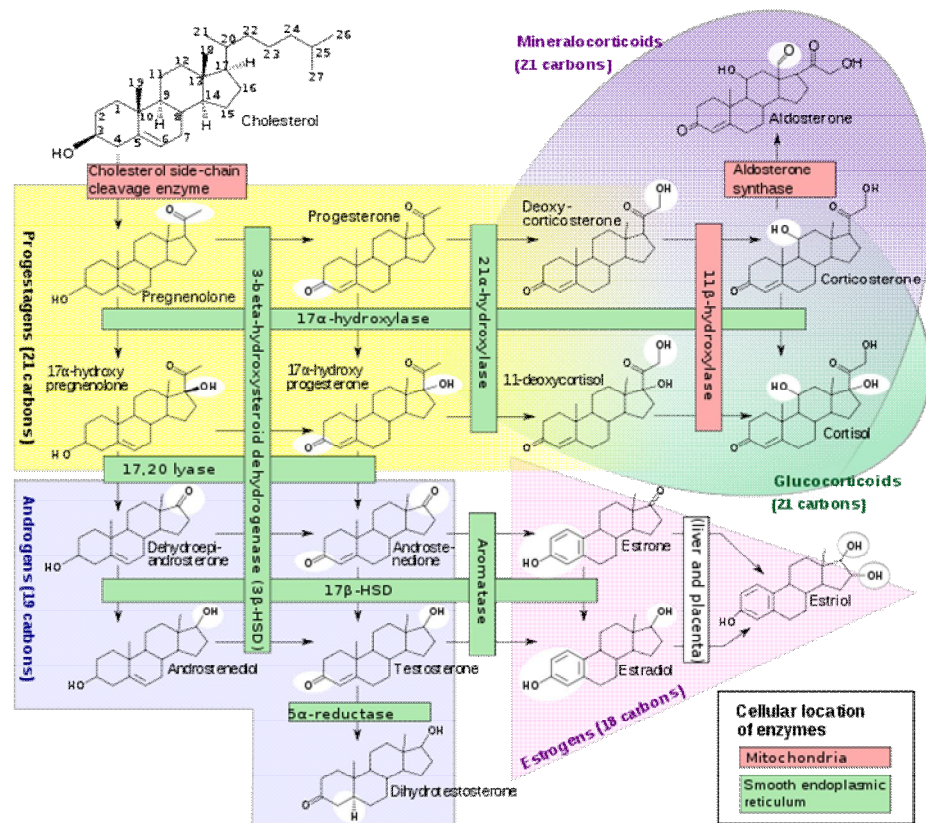


Figure 1 : Stéroïdogénèse de la glande surrénale. Le cortex surrénalien se divise en trois zones qui se distinguent notamment par la présence spécifique de certaines enzymes clés de la synthèse des hormones stéroïdiennes. La zone glomérulée est la seule à contenir l'enzyme *CYP11B2* ou aldostérone hydrolase qui permet de synthétiser l'aldostérone tandis que les zones fasciculées et réticulées contiennent plutôt l'enzyme *17-α-hydroxylase*, précurseur du cortisol et des androgènes. Walter F. Boron, Emile L. Boulpaep (2003). *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach*, page 1300, Elsevier/Saunders.

La stéroïdogénèse surrénalienne est régulée par deux boucles de rétro-inhibition endocrines négatives. L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien se concentre sur les glucocorticoïdes et les hormones sexuelles tandis que le système rénine-angiotensine-aldostérone régule plutôt les minéralocorticoïdes. Ainsi, une haute concentration de cortisol dans le sang inhibe l'activité de l'hypothalamus et de l'hypophyse tandis qu'un grand

volume sanguin intravasculaire supprime l'action de la rénine et de l'angiotensine. En utilisant le cholestérol comme précurseur moléculaire, la glande surrénale se spécialise dans la synthèse exclusive des hormones stéroïdiennes. Les glucocorticoïdes produits se lient à leurs récepteurs présents à la membrane de chaque cellule afin de gérer les balances énergétiques du corps. Durant les phases de repos et de stress, les hormones glucocorticoïdes sont sécrétées et régulent l'homéostasie métabolique, cardiovasculaire et immunitaire. À l'opposé, les minéralcorticoïdes régulent entre autres le volume sanguin tandis que les hormones androgènes servent de précurseurs à la synthèse des hormones sexuelles (œstrogène et testostérone).

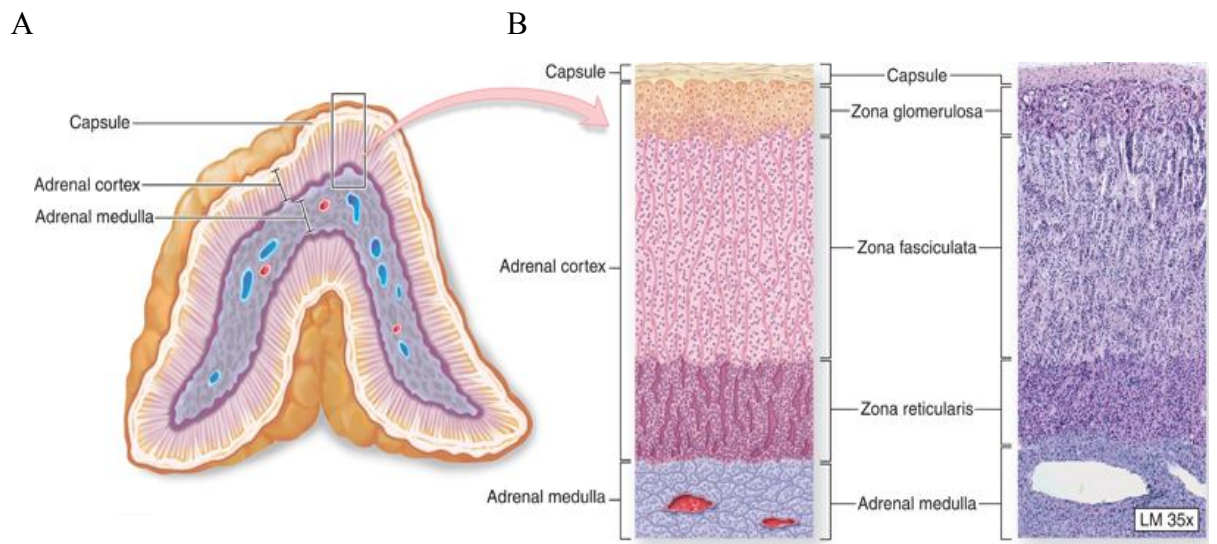


Figure 2 : Physiologie de la glande surrénale. A. Les trois composantes de la glande surrénale sont la capsule, le cortex et la médulla. B. Le cortex surrénalien se divise en trois zones : glomérulée, fasciculée et réticulée. McKinley M. and O'Loughlin V. (2006). *Human Anatomy*, McGraw-Hill Higher Education.

1.1.3 Apport sanguin à la glande surrénale

Avec un débit sanguin estimé à 5ml/min et considérant sa petite taille, la glande surrénale est parmi les organes les plus vascularisés. L'apport sanguin est maintenu par un réseau de 50 branches artérielles pour chaque glande qui prend directement naissance des

artères rénales, de l'aorte et des artères phréniques inférieures. Un apport sanguin de la médulla s'effectue par les artères médullaires (Vinson, Hinson et al. 1994) . Le sang pauvre en oxygène est collecté à la jonction cortex-médulla et drainé par la veine centrale surrénalienne jusqu'à la veine rénale ou directement dans la veine cave inférieure.

2. LES TUMEURS CORTICO-SURRÉNALIENNES SPORADIQUES

2.1 Généralités

Les lésions tumorales cortico-surrénales sont majoritairement des adénomes bénins et très rarement des carcinomes (Grumbach, Biller et al. 2003). Les adénomes surrénaux sont très fréquents dans la population générale et sont souvent découverts de manière accidentelle (Kloos, Gross et al. 1995; Brunt and Moley 2001). Avec l'amélioration continue des techniques d'imagerie, la fréquence des masses surrénales découvertes de manière fortuite, nommées incidentalomes, ne cesse d'augmenter (Bovio, Cataldi et al. 2006; Mazzuco, Bourdeau et al. 2009). Même si l'on rapporte que la majorité des incidentalomes sont bénins, une proportion de 1-5% de ceux-ci s'avèrent malins (Mazzuco, Bourdeau et al. 2009). Ainsi, en raison de l'évolution rapide de ces cas d'incidentalomes, l'incidence réelle des adénomes cortico-surrénaux demeure à ce jour inconnue (McNicol 2008). Par opposition, les carcinomes sont très rares avec une prévalence de 1-2 par million chez l'adulte, mais sont d'une grande agressivité (Dackiw, Lee et al. 2001). Le pronostic est peu optimiste avec 67 % à 94 % de mortalité (McNicol 2008) et une moyenne de 5 ans de survie au moment du diagnostic (Shen, Sturgeon et al. 2005; Allolio and Fassnacht 2006).

2.2 Outils diagnostiques et traitement

Avec une incidence élevée d'adénomes et une agressivité aussi marquée pour les carcinomes cortico-surrénaux, la nécessité de pouvoir distinguer les 2 types de tumeurs de manière précoce revêt une importance capitale. Le score modifié de Weiss constitue l'outil de classification pathologique le plus répandu permettant de distinguer une tumeur

bénigne de celle maligne (Aubert, Wacrenier et al. 2002). Cet outil diagnostique repose sur 9 critères histopathologiques dont trois sont structuraux (cytoplasme noir, nécrose et architecture diffuse), trois autres sont cytologiques (caractère atypique, compte mitotique et figures mitotiques) et les trois derniers sont en lien avec l'invasion (des sinusoides, des veines et de la capsule tumorale). Une tumeur avec ≤ 2 critères est classifiée d'adénome et celle renfermant ≥ 3 critères morphologiques est considérée un carcinome (Weiss, Medeiros et al. 1989). Cependant, le score de Weiss est loin d'être infallible puisque certains cas limites classifiés selon ces critères comme étant bénins se sont avérés avoir un caractère malin (Pohlink, Tannapfe et al. 2004; Klibanski, Stephen et al. 2006). Non seulement ce système de classification contient plusieurs critères subjectifs qui sont problématiques, mais les tumeurs ayant un score de Weiss de 3 se retrouvent dans un vide diagnostique puisqu'on peut difficilement conclure à un potentiel malin (Giordano 2006). Enfin, une autre faiblesse du système de classification de Weiss est qu'il renferme uniquement des critères morphologiques et descriptifs et aucun paramètre moléculaire.

Plusieurs études ont tenté d'évaluer la valeur pronostique ou diagnostique de marqueurs immunohistochimiques afin de discerner le potentiel malin des tumeurs du cortex surrénalien. La protéine la plus étudiée dans ce contexte est mib1/Ki-67, qui se retrouve fortement exprimée dans les carcinomes cortico-surréaliens comparativement aux adénomes cortico-surréaliens (Szajerka, Dziegiel et al. 2008). Associée à la prolifération cellulaire, l'expression de cette protéine de la matrice cellulaire a démontré une bonne valeur pronostique dans plusieurs études (McNicol, Struthers et al. 1997; Nakazumi, Sasano et al. 1998; Terzolo, Boccuzzi et al. 2001). De plus, ce marqueur corrèle autant au niveau protéique qu'au niveau de l'ARNm, ce qui renforce sa valeur en tant que marqueur (Giordano 2006). D'autres études proposent également le gène du facteur de croissance de l'insuline II (IGF2) dont la surexpression semble corrélée avec les carcinomes cortico-surréaliens. Une récente étude a démontré par étude microarray l'efficacité du marqueur mib1/Ki-67 et IGF2 combinés afin de distinguer les adénomes des carcinomes cortico-surréaliens (Soon, Gill et al. 2009). En plus de corrélérer avec le score de Weiss, cette étude

rapporte que l'analyse combinée de l'expression d'IGF2 et de mib1/Ki-67 aide à discriminer les tumeurs ayant un score de Weiss de 3, qui sont d'ordinaire difficilement classifiable en raison de phénotypes semblables pour une tumeur bénigne et maligne. Même si ces marqueurs semblent prometteurs, leur spécificité et leur sensibilité ne sont pas suffisantes pour remplacer la classification morphologique des tumeurs du cortex surrénalien.

Le traitement le plus répandu et le plus efficace à ce jour demeure l'ablation chirurgicale de la masse tumorale surrénalienne (Rescorla 2006). Environ 20 % des patients ayant atteint un stade de cancer trop avancé ne pourront être opérés et recevront alors une chimiothérapie couplée à un traitement au mitotane, un agent spécifique au cortex surrénalien, dont l'administration demeure controversée (Crucitti, Bellantone et al. 1996; Icard, Goudet et al. 2001). En effet, cet agent dont on ne connaît toujours pas précisément le mode d'action au niveau moléculaire semble donner des résultats variables (Terzolo, Angeli et al. 2007; Nakamura, Miki et al. 2009). Bref, on possède très peu d'outils diagnostiques et thérapeutiques permettant de combattre ce type de tumeurs.

2.3 Clonalité des tumeurs cortico-surréaliennes

La détermination de la clonalité des tumeurs surréaliennes est d'une grande importance puisqu'elle permet d'éclaircir le patron de tumorigenèse. La progression d'une tumeur vers un stade plus malin diffère ainsi selon son origine cellulaire. En effet, la polyclonalité suggère que les cellules tumorales sont affectées par des stimuli locaux et systémiques tandis que la monoclonalité propose que la progression tumorale résulte initialement d'une mutation génétique (Libe and Bertherat 2005). La composition clonale des tumeurs cortico-surréaliennes a été déterminée par le patron d'inactivation du chromosome X chez la femme hétérozygote possédant un polymorphisme lié au X. Selon les 3 articles parus sur le sujet à ce jour, les carcinomes cortico-surréaliens sont constitués d'une population monoclonale de cellules tandis que les adénomes présentent une forte tendance monoclonale avec quelques cas de polyclonalité rapportés (Beuschlein, Reincke et

al. 1994; Gicquel, Leblond-Francillard et al. 1994; Blanes and Diaz-Cano 2006). En effet, 2 articles sur 3 concluent que la majorité des adénomes sont monoclonaux; Beuschlein et son groupe rapportent 7 adénomes monoclonaux sur 8 (88 %) et Diaz-Cano, 49 sur 56 (88 %) tandis que le groupe de Gicquel dénote une proportion semblable d'adénomes surrenaliens pour les 2 types d'origine cellulaire, soit 6 cas polyclonaux contre 8 monoclonaux. Même si les événements initiatiques du développement des tumeurs cortico-surrenaliennes sporadiques demeurent à ce jour majoritairement inconnus, la monoclonalité des carcinomes et de la majorité des adénomes nous indique qu'ils prennent naissance à partir d'une mutation somatique procurant à la cellule touchée un avantage de croissance. Cet avantage est par la suite encouragé via l'expansion clonale afin de former un adénome (Clayton, Pfeifer et al. 2000). La présence d'adénomes possédant un patron d'expression de polyclonalité peut s'expliquer d'une part par des groupes de tumeurs ayant des mécanismes pathologiques intrinsèquement différents et d'autres parts par des tumeurs ayant atteint des stades différents d'un processus commun de tumorigenèse à plusieurs étapes (Libe and Bertherat 2005; Herbet, Feige et al. 2009).

2.4 Pathologie moléculaire des tumeurs sporadiques du cortex surrenalien

Les tumeurs du cortex surrenalien peuvent résulter de plusieurs syndromes héréditaires. La recherche des mécanismes moléculaires impliqués dans ces syndromes familiaux a permis les premières avancées sur les tumeurs sporadiques surrenaliennes. En effet, certains des gènes impliqués dans ces maladies jouent également un rôle dans le développement des tumeurs sporadiques du cortex surrenalien. Le tableau 1 résume ces syndromes tumoraux héréditaires ainsi que leurs gènes et/ou locus impliqués.

2.4.1 Génétique des syndromes tumoraux héréditaires

Les premières altérations génétiques impliquées dans le développement des tumeurs surrenaliennes ont été découvertes dans des syndromes héréditaires familiaux. Certains syndromes tels que celui de Li-Fraumeni et de Beckwith-Wiedemann sont associés avec la

formation de carcinomes cortico-surréaliens tandis que le Complexe de Carney et le Néoplasme endocrinien multiple I sont plutôt impliqués dans la maladie cortico-surréaliennne des nodules primaires pigmentés (PPNAD -*Primary pigmented nodular adrenocortical disease*) et d'adénomes cortico-surréaliens.

Les patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni, une maladie autosomale dominante à haute pénétrance, développent une susceptibilité envers plusieurs tumeurs : cancer du sein, tumeur du cerveau, sarcome, leucémie et carcinomes cortico-surréaliens (Li, Fraumeni et al. 1988; Garber, Goldstein et al. 1991). L'altération génétique responsable de ce syndrome est une mutation germinale du gène *TP53*, présente chez 70 % des patients atteints (Malkin, Li et al. 1990; Hisada, Garber et al. 1998). Le gène *TP53* code pour un facteur de transcription impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire à l'interphase G1/S, l'apoptose et la stabilité génomique (Vogelstein, Lane et al. 2000).

Le syndrome de Beckwith-Wiedemann s'apparente à celui de Li-Fraumeni dans le sens où cette maladie familiale autosomale dominante confère également aux patients atteints une susceptibilité à une panoplie de tumeurs dont fait partie le carcinome cortico-surréalien. Les patients affectés par ce syndrome sont atteints de gigantisme, omphalocèle ainsi que de macroglossie. Ils développent dans une proportion de 5% des tumeurs embryonnaires comme la tumeur de Wilm, l'hépatoblastome, le rhabdomyosarcome et le carcinome cortico-surréalien (Maher and Reik 2000; Hertel, Carlsen et al. 2003; Weksberg, Shuman et al. 2005). Environ 15 % des cas de syndromes de Beckwith-Wiedeman sont d'origine familiale et le reste d'origine sporadique (Shuman et al. 2005). Le locus responsable de ce syndrome, le chromosome 11p15, renferme le gène codant pour IGF2, le gène *H19* et la kinase inhibitrice cycline-dépendant ($p57^{kip2}$) (Henry, Jeanpierre et al. 1989). Cette région du génome est assujettie à l'empreinte parentale, un phénomène génétique où des gènes spécifiques sont uniquement exprimés par les allèles maternels ou paternels. Ainsi, IGF2 est spécifiquement exprimé par le père tandis que le gène *H19* et $p57^{kip2}$ sont normalement exprimés par la mère (Nystrom, Cheetham et al. 1992). Dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann, ces gènes sont soumis à des changements génétiques et

épigénétiques résultant en une hausse de l'expression d'*IGF-II* et une réduction de l'expression du gène *H19* et de *p57^{kip2}*. (Lam, Hatada et al. 1999; Herbet, Feige et al. 2009).

Plusieurs autres syndromes héréditaires sont associés aux tumeurs du cortex surrénalien tel que le complexe de Carney, Néoplasme endocrinien multiple I et le syndrome de McCune-Albright. Cependant, aucun lien clair entre les défauts génétiques à l'origine de ces maladies et les tumeurs sporadiques cortico-surréaliennes n'a encore été établi (Schulte, Heinze et al. 2000; Bertherat, Groussin et al. 2003).

Tableau I. Résumé des syndromes héréditaires associés aux tumeurs cortico-surréaliennes

Syndrome Familial	Gène (Locus chromosomal)	Manifestation tumorale	Prévalence des Tumeurs cortico-surréaliennes
Syndrome de Li-Fraumeni	<i>TP53</i> (17p13)	Sarcome des tissus souples, cancer du cerveau, cancer du sein, leucémie et cancer du cortex surrénalien	Carcinome surrénalien, 3% -4%
Syndrome de Beckwith-Wiedemann	<i>IGF2, H19, CDKN1C, KCNQ1</i> (11p15)	Gigantisme, omphalocèle, macroglossie, tumeur de Wilm, l'hépatoblastome, le rhabdomyosarcome et le cancer cortico-surrénalien	Carcinome surrénalien, 5%
Complexe de Carney	<i>PRKAR1A</i> (17q23-q24)2p16	Tumeur cardiaque, endocrine, cutanée et myxome neural, et lésions pigmentées de la peau et des muqueuses	PPNAD, 90%-100%
Néoplasme endocrinien multiple I	<i>MEN1</i> (menin) (11q13)	Tumeur de la parathyroïde, pancréas, pituitaire et tumeur surrénalienne	hyperplasie et adénome surrénaliens, 25%-40%; Carcinome surrénalien, <1%
Hyperplasie congénitale surrénalienne	<i>CYP21B</i> (6p21.3)- plus commun, <i>CYP11B, CYP17A, HSD3B2</i>	Hyperplasie surrénalienne, virilisation et perte importante de sel	Adénome 82%, hyperplasie 100%
<i>Familial adenomatous polyposis coli</i>	<i>APC</i> (5q12-22)	Polypes adénomateuses multiples, cancer du colon et du rectum. Manifestations extra-colon : cancer de l'ampoule de Vater, tumeur de la thyroïde, hépatoblastomes et tumeur cortico-surrénalienne	-

2.4.2 Génétique des tumeurs sporadiques du cortex surrénalien

Le modèle de tumorigenèse par étapes multiples s'appuie sur les mutations somatiques comme événement initiatique menant à une lésion pré-tumorale. L'accumulation par la suite de changements génétiques et épigénétiques dans la cellule initiatrice et/ou sa progéniture aboutirait à un stade plus malin. À ce jour, aucun modèle de tumorigenèse surrénalienne ne fait l'unanimité en raison d'un manque d'évidences moléculaires sur le sujet (Bertherat and Bertagna 2009; Herbet, Feige et al. 2009). Néanmoins, si le concept de transition d'adénomes à carcinomes par l'acquisition de nouvelles altérations s'applique aux tumeurs surrénaliennes, des altérations génétiques communes devraient être retrouvées autant dans les carcinomes que dans les adénomes. On dénote dans la littérature deux cas cliniques où l'on a pu constater la présence d'un stade bénin et malin dans la tumeur du patient, ce qui supporterait la séquence adénome-carcinome (Bernard, Sidhu et al. 2003; Gaujoux, Tissier et al. 2008). On ignore toujours l'événement initiatique d'un adénome cortico-surrénalien bénin, mais de grandes avancées ont cependant été réalisées afin d'identifier des altérations génétiques spécifiques aux adénomes et carcinomes sporadiques du cortex surrénalien. Le tableau 2 résume les altérations génétiques associées aux des tumeurs sporadiques cortico-surrénaliennes.

2.4.2.1 Gène *TP53*

Le gène *TP53* est un gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cas de cancer (Hollstein, Sidransky et al. 1991). On observe des mutations somatiques dans l'exon 5-8 du gène *TP53* dans 25% -35 % des carcinomes cortico-surrénaliens sporadiques et dans 0% -6 % des adénomes, ce qui laisse croire que cette altération serait un événement tardif dans le développement des tumeurs du cortex surrénalien (Ohgaki, Kleihues et al. 1993; Reincke, Karl et al. 1994). On rapporte également que ces mutations seraient habituellement observées dans des tumeurs plus grosses et à des stades plus avancés (Bertherat and Bertagna 2009). Le taux de survie des patients présentant une tumeur avec

une mutation somatique du gène *TP53* est beaucoup plus préoccupant, ce qui suggère que cette mutation serait impliquée dans des tumeurs plus agressives (Libe, Groussin et al. 2007). Le locus contenant le gène *TP53* est également assujéti à la perte d'hétérozygoté (LOH) de manière très importante dans les carcinomes cortico-surrénalien comparativement aux adénomes. En effet, on dénote une perte d'hétérozygoté dans le locus 17p13 dans une proportion de 85% pour les tumeurs malignes contre <30 % pour les tumeurs bénignes (Gicquel, Bertagna et al. 2001) (Yano, Linehan et al. 1989). La différence de fréquence entre le gène *TP53* lui-même et son locus pourrait s'expliquer par la présence d'un autre gène suppresseur de tumeur dans le locus 17p13. Deux gènes candidats ont été identifiés dans la région comme ayant possiblement une expression réduite dans les carcinomes cortico-surrénaliens (*ACADVL* et *ALOX15B*), mais des études plus approfondies doivent être réalisées (Soon, Libe et al. 2008).

2.4.2.2 IGFII, gène *H19* et $p57^{\text{kip}2}$ (*CDKN1C*)

Le système comprenant *IGFII* est impliqué dans le développement du cortex surrénalien. Ce système comprend 2 ligands peptides (IGF1 et IGF2), 2 récepteurs-IGF (IGF1R et IGF2R/récepteur mannose-6-phosphate) et 6 protéines liant IGF de haute affinité (protéines liant IGF 1 à 6) (Hoeflich, Reisinger et al. 2001). De nombreuses études rapportent une surexpression d'IGF2 et de faibles niveaux d'expression du gène *H19* et de $p57^{\text{kip}2}$ dans les carcinomes cortico-surrénaliens sporadiques qui sont causés par une perte d'hétérozygoté dans le locus 11p15 et des défauts dans le mécanisme d'empreinte parentale (Gicquel, Bertagna et al. 2001). Les études génétiques des tumeurs sporadiques du cortex surrénalien ont démontré qu'environ 90 % des carcinomes et 8,5 % des adénomes surexpriment IGF2, ce qui laisse croire que si IGF2 joue un rôle au niveau de la tumorignèse surrénalienne, ce serait à des stades très avancés du développement tumoral (Ilvesmaki, Kahri et al. 1993; Gicquel, Raffin-Sanson et al. 1997). De récentes études microarray permettant de comparer le profil d'expression génique entre les carcinomes et les adénomes cortico-surrénalien ont permis de confirmer qu'IGF2 est le gène le plus

hautement exprimé dans les carcinomes en comparaison avec les adénomes et la surrénale normale (Giordano, Thomas et al. 2003; de Fraipont, El Atifi et al. 2005). En raison de cette différence d'expression marquée, le marquage immunohistochimique d'IGF2 a été proposé comme outil diagnostique pouvant être ajouté à l'évaluation pathologique de la tumeur (Erickson, Jin et al. 2001; Giordano 2006). En effet, l'expression élevée d'IGF2 corrèle avec le degré de malignité des tumeurs et la surexpression d'IGF2 est associée avec un risque plus élevé de récurrence de carcinomes cortico-surréaliens (Boulle, Logie et al. 1998; Gicquel, Boulle et al. 2001). Malgré toutes les études faites sur le sujet, on connaît peu de chose sur le mécanisme moléculaire précis responsable de la modulation d'expression d'IGF2, du gène *H19* et $p57^{kip2}$ ainsi que le rôle de ceux-ci dans la tumorigenèse cortico-surréaliennne. Il a été suggéré que l'hétérozygoté du locus 11p15 serait causé par la perte de l'allèle maternel et la duplication de l'allèle parental aboutissant au changement d'expression décrit ci-haut pour IGF2, le gène *H19* et $p57^{kip2}$ (Gicquel, Baudin et al. 1997). Une étude rapporte également que la méthylation du promoteur du gène *H19* serait impliquée dans l'expression anormale de *H19* et IGF2 (Gao, Suppola et al. 2002). Enfin, pour $p57^{kip2}$ tout reste à faire puisqu'aucun mécanisme n'a été mis de l'avant afin d'expliquer sa baisse d'expression dans les carcinomes cortico-surréaliens et aucun lien à ce jour n'a pu être établi entre cette baisse et la tumorigenèse surréaliennne.

2.4.2.3 Gène *MEN1*

Le gène *MEN1*, situé sur le locus chromosomique 11q13, est un gène suppresseur de tumeur. Des mutations somatiques du gène *MEN1* sont rarement rapportées dans les tumeurs cortico-surréaliennes cependant, on dénote chez celles-ci une perte d'hétérozygoté dans le locus 11q13 contenant le gène *MEN1* dans 20 % des cas ; de plus, la majorité des tumeurs répondant positivement à cette perte d'hétérozygoté sont des carcinomes (Heppner, Reincke et al. 1999; Kjellman, Holst et al. 1999; Schulte, Mengel et al. 2000). En raison du manque de corrélation entre le profil d'expression du gène *MEN1* dans les carcinomes surréaliens comparativement aux adénomes et surréales normales, il

est peu probable que ce gène contribue au développement des tumeurs surrenaliennes (Soon, Libe et al. 2008). Cependant, l'importance de l'hétérozygoté associée au locus 11q13 impliquant des carcinomes cortico-surréaliens laisse sous-entendre la présence d'un autre gène suppresseur de tumeurs impliqué dans la tumorigénèse surrenalienne dans le même locus (Bertherat and Bertagna 2009).

2.4.2.4 Le récepteur d'ACTH

Le récepteur à mélanocortine 2 (MCR2), aussi appelé récepteur d'ACTH, est un acteur important de la voie de signalisation ACTH-AMPC-PKA. Cette voie est intimement liée au développement du cortex surrenalien ; en effet, on observe une corrélation entre les niveaux circulants d'ACTH et la taille du cortex surrenalien (Rosenberg, Groussin et al. 2002). Aucune mutation activatrice dans le gène du récepteur d'ACTH n'a été trouvée lors d'une étude comprenant 25 adénomes, 13 carcinomes et 8 hyperplasies cortico-surréaliennes (Latronico, Reincke et al. 1995; Fragoso, Domenice et al. 2003). Cependant, une perte d'hétérozygoté d'*MC2R* a été observée dans 1 adénome sur 16 et dans 2 des 4 carcinomes compris dans l'étude, ce qui suggère que la perte du récepteur d'ACTH pourrait jouer un rôle dans le développement des tumeurs cortico-surréaliennes (Reincke, Mora et al. 1997).

2.4.2.5 Autres altérations génétiques

D'autres gènes ont également été rapportés en lien avec le développement de tumeurs cortico-surréaliennes. Par exemple, une étude a détecté une perte d'hétérozygoté dans le locus 17q22-24 renfermant le gène *PRKARIA*, codant pour la sous-unité régulatrice R1- α de la PKA, dans 23 % des adénomes cortico-surréaliens et dans 53 % des carcinomes cortico-surréaliens. Le séquençage du gène a confirmé une mutation inactivatrice du gène dans 10 % des adénomes (Bertherat, Groussin et al. 2003). Également, deux études ont rapporté que le gène de la sous-unité alpha, *GNAS*, était rarement muté dans les adénomes cortico-surréalien sporadiques et dans des tumeurs de

patients atteints hyperplasie surrénalienne bilatérale macronodulaire ou AIMAH (*ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia*) (Fragoso, Domenice et al. 2003). Aucune mutation n'a été rapportée dans ce gène pour les carcinomes du cortex surrénalien. Enfin, un autre groupe de protéines semble être impliqué dans la tumorigenèse surrénalienne au niveau moléculaire, soit la famille des RAS. Cette famille est composée de 3 gènes (*H-,K-, et N-Ras*) qui codent pour des GTPases, des interrupteurs moléculaires impliqués dans diverses voies de signalisation intervenant dans la prolifération, différenciation, motilité et la mort cellulaire (Shields, Pruitt et al. 2000). En raison de son rôle important de modulateur cellulaire, il n'est pas surprenant que ces protéines soient les oncogènes les plus fréquemment mutés dans les cancers humains. Des mutations activatrices du gène *N-Ras* ont été identifiées dans 12,5 % des carcinomes et adénomes cortico-surréaliens étudiés et aucune mutation dans les 2 autres gènes de la famille (Yashiro, Hara et al. 1994). Néanmoins, d'autres études ne corroborent pas la fréquence des mutations détectées ; en rapportant aucune mutation dans la famille des Ras (Moul, Bishoff et al. 1993; Ocker, Sachse et al. 2000). Il a donc été suggéré que la famille des Ras promouvrait plutôt la tumorigenèse cortico-surrénalienne via leurs effecteurs comme le récepteur du facteur de croissance épithélial (*EGFR- Epithelial Growth factor receptor*) qui est surexprimé dans les adénomes et carcinomes du cortex surrénalien (Sasano, Suzuki et al. 1994). Enfin, récemment un groupe de recherche a découvert un nouveau facteur de la voie de signalisation de l'AMPc, la phosphodiesterase 11A (PDE11A) qui semblait être impliquée dans la tumorigenèse surrénaliennes (Horvath, Boikos et al. 2006). Une étude plus approfondie permet de conclure que les mutations dans le gène *PDE11A* sont fréquentes dans les tumeurs cortico-surréaliennes. En effet, parmi 117 échantillons regroupant des AIMAH, des adénomes et des carcinomes, 1 mutation non-sens menant à l'inactivation du gène ont été trouvée chez un adénome tandis que 22 tumeurs sur 117 possédaient des mutations ponctuelles avec une fréquence plus élevée chez les AIMAH avec 24 %, adénomes 19 % et carcinomes 16 % (Libe, Fratticci et al. 2008). Des analyses

immunohistochimiques révèlent une baisse d'expression de la phosphodiesterase 11A dans les échantillons possédant les mutations ponctuelles.

Tableau II. Altérations génétiques spécifiques des tumeurs cortico-surréaliennes

Gènes (locus chromosomal)	Altération Génétique	Perte d'hétérozygoté (LOH)
TP53 (11p13)	Mutations inactivatrices du gène suppresseur de tumeur <i>TP53</i> dans 25-35% des carcinomes et 0%-6% des adénomes cortico-surréaliens	85% des carcinomes et <30% des adénomes cortico-surréaliens
IGF2 (11p15)	90% des carcinomes surexpriment <i>IGF2</i> contre 8,5% des adénomes cortico-surréaliens	83% des carcinomes et 34% des adénomes cortico-surréaliens
MEN1 (11q13)	Mutations rares du gène suppresseur de tumeur <i>MEN1</i>	90% des carcinomes et 20% des adénomes cortico-surréaliens
MCR2 (18p11.2)	Aucune mutation trouvée	50% des carcinomes et 6% des adénomes cortico-surréaliens
PRKARIA (17q23-q24)	Mutations dans 10% des adénomes et aucune mutation dans les carcinomes cortico-surréaliens	53% des carcinomes et 23% des adénomes cortico-surréaliennes
GNAS (20q13.2)	Mutations rares dans les adénomes et tumeurs des patients avec AIMAH	-
N-Ras	Mutations activatrices de l'oncogène <i>N-Ras</i> dans <12,5% des adénomes et carcinomes cortico-surréaliens	-
PDE11A (2q31-35)	Mutations ponctuelles (R804H et R867G) - AIMAH 24%, Adénomes 19% et carcinomes 16% et mutation non-sens dans 1 échantillon sur 117.	Perte d'hétérozygoté 2q dans un échantillon avec mutation inactivatrice de PDE11A

3. LA VOIE DE WNT DANS LES TUMEURS DU CORTEX SURRÉALIEN

3.1 La voie de Wnt

La signalisation par la famille des Wnts détient un rôle central dans l'embryogenèse et le maintien de l'homéostasie des tissus chez l'adulte (Logan and Nusse 2004; Clevers 2006). Ces petites protéines sécrétées vont se lier à leurs récepteurs spécifiques Frizzled (Fzd) afin d'activer des voies intracellulaires distinctes, qui sont communément appelées voie de signalisation canonique ou non-canonique de Wnt. La voie canonique de Wnt/ β -

CATÉENINE qui est la plus conservée et la plus étudiée dans un contexte de tumorigenèse, permet de contrôler la stabilité cellulaire du co-facteur β -CATÉENINE et par le fait même, l'expression de ces gènes cibles (Zeng, Tang et al. 2005). Le contrôle astringent de ces gènes en conditions non pathologiques assure une fine régulation de la croissance cellulaire, de la motilité et de la survie cellulaire. L'activation chronique des gènes sous le contrôle de β -CATÉENINE résulte en une activation aberrante de la voie de signalisation Wnt qui entraîne une prolifération cellulaire et une survie cellulaire incontrôlée ce qui contribue à la formation de cancer dans plusieurs tissus comme le colon, la peau, le foie, le poumon, les ovaires ; pour ne nommer que les plus étudiés (Logan and Nusse 2004).

En absence d'activation par un Wnt, la protéine centrale de la voie, β -CATÉENINE, est activement dégradée via la formation d'un complexe de dégradation associé au protéasome (Kitagawa, Hatakeyama et al. 1999). Tout d'abord, β -CATÉENINE est capturé par *Adenomatous polyposis coli* (APC) et AXIN1 et/ou 2 formant ainsi un complexe protéique facilitant la phosphorylation de β -CATÉENINE par les kinases CK1 α et GSK3 β (Winston, Strack et al. 1999; Liu, Li et al. 2002). CK1 α et GSK3 β phosphorylent séquentiellement des résidus sérines et thréonines hautement conservés situés dans la partie N-terminale de β -CATÉENINE ; ciblant ainsi la protéine pour la dégradation (Amit, Hatzubai et al. 2002). β -TRCP, une sous-unité de l'ubiquitine ligase E3, peut alors facilement s'attacher au complexe comprenant β -CATÉENINE afin de l'ubiquitiner et de procéder à sa dégradation via le protéasome (Winston, Strack et al. 1999). La faible concentration de β -CATÉENINE libre dans la cellule assure alors une répression des gènes cibles au niveau transcriptionnel par le recrutement de co-répresseur comme Groucho/TLE qui forme un complexe avec les facteurs de transcription associés à β -CATÉENINE, soit la famille des TCF et LEF1 (Cavallo, Cox et al. 1998; Roose, Molenaar et al. 1998). Ce processus permet de contrôler finement le pool libre de β -CATÉENINE au sein de la cellule et conséquemment l'expression de ces gènes effecteurs (Figure 3a). À l'opposé, lors de la l'activation de la voie, les Wnts se lient spécifiquement avec le récepteur à 7 domaines

transmembranaires, Fzd et à son co-récepteur, LRP5/6 (He, Semenov et al. 2004). Suite à cette liaison à la surface cellulaire, le signal est transmis à l'intérieur de la cellule via DVL qui se lie au récepteur Fzd. La formation du complexe Fzd-Dvl permet la phosphorylation de LRP5/6 par CK1 γ ce qui facilite la relocalisation d'AXIN1/2 à la membrane cellulaire et par conséquent inhibe la formation du complexe de dégradation comprenant APC, GSK3- β , AXIN 1 et/ou 2 et β -CATÉNINE. Ainsi, en l'absence du complexe permettant sa phosphorylation et subséquemment sa dégradation, β -CATÉNINE s'accumule dans le cytoplasme pour ensuite entrer dans le noyau. Une fois au noyau, β -CATÉNINE forme un complexe avec TCF et transforme ce dernier en activateur potentiel de la transcription; en inhibant les co-répresseurs présents (Groucho/TLE) et en recrutant une panoplie de co-activateurs de la transcription tels que CBP, TBP, BRG1, BCL-9/PYG, Legless, Mediator et Hyrax (Figure 3b).

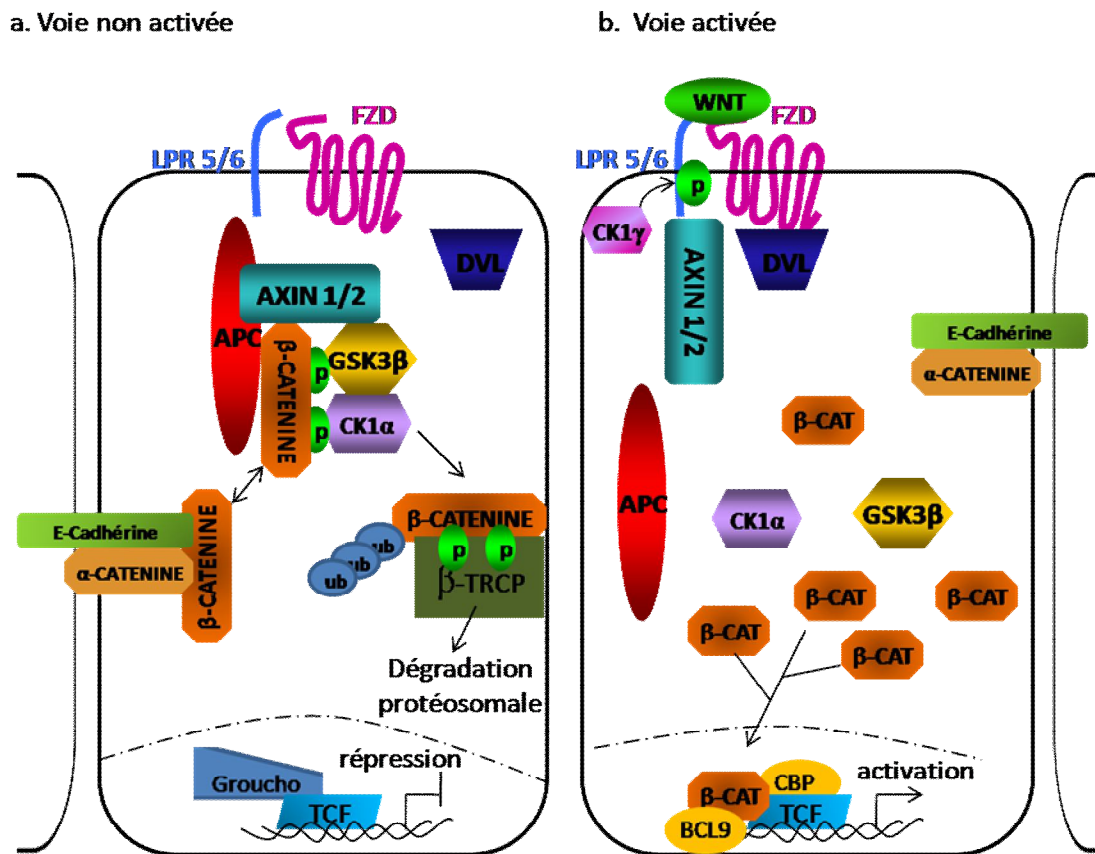


Figure 3. Modèle schématisé de la voie de signalisation canonique de Wnt/ β -CATÉNINE. a. En absence d'un ligand Wnt, on observe la formation d'un complexe de dégradation comprenant GSK3- β , AXIN 1 et/ou 2 et APC qui permet la phosphorylation de β -CATÉNINE et par la suite sa dégradation. b. En présence d'un ligand de Wnt, le complexe de dégradation est inhibé et on assiste à une stabilisation et une accumulation cytoplasmique de β -CATÉNINE, qui transloque ensuite au noyau afin d'activer la transcription de gènes cibles.

3.2 Wnt et le cancer

L'implication de la voie de Wnt dans plusieurs types de cancer ne cesse de s'accroître avec les années. Même si les altérations génétiques rapportées concernant la voie de Wnt sont distinctes pour plusieurs cancers ; certaines lignes directrices communes

commencent à s'en dégager et ont permis des avancées concernant l'implication de cette voie de signalisation dans le développement des tumeurs humaines. La plupart des avancées majeures établissant un lien entre la voie de Wnt et le cancer nous proviennent d'études faites sur le cancer colorectal, qui fut un précurseur en la matière. En effet, la plupart des implications de la voie de Wnt ont d'abord été découvertes dans le cancer colorectal pour ensuite être transposées et/ou vérifiées dans d'autres types de cancer. Dans la section qui suit, il sera question des altérations génétiques des composantes de la voie de Wnt contribuant à la tumorigenèse humaine dans divers types de cancer et puis ultimement dans les tumeurs du cortex surrénalien.

3.2.1 Mutations génétiques d'APC

La voie de signalisation de Wnt/ β -CATÉNINE a pour la première fois été associée à la formation de cancer lorsqu'elle a été trouvée constitutivement active dans le syndrome familial de polypes adénomateuses (*inherited familial adenomatous polyposis – FAP*) (Grodin, Thliveris et al. 1991; Kinzler, Nilbert et al. 1991) et dans des cas de cancer du colon sporadique (Korinek, Barker et al. 1997; Morin, Sparks et al. 1997). FAP est un syndrome héréditaire dans lequel les patients atteints ont hérité d'un allèle défectueux pour le gène APC et souffrent d'une inactivation spontanée du second allèle d'APC à une faible fréquence dans leurs cellules épithéliales intestinales (Kinzler, Nilbert et al. 1991; Nishisho, Nakamura et al. 1991). La conséquence de ce changement génétique est une activation chronique et aberrante de la voie de Wnt conduisant à la formation d'un adénome bénin (aussi appelée polypes). Dans un délai d'environ quarante ans, ces masses vont acquérir d'autres mutations permettant une progression de l'adénome au carcinome colorectal invasif (Galiatsatos and Foulkes 2006). La région la plus fréquemment mutée dans le cancer est le *hot spot* somatique compris entre les codons 1286 et 1513 du gène (Kikuchi 2000) (Figure 4). Ces mutants d'APC ont été dépouillés de leurs régions régulatrices en C-Terminale ainsi que des sites de liaison à la protéine chaperonne AXIN1 et/ou 2. Ainsi, la fonction d'APC au sein du complexe de dégradation est compromise ;

elle ne peut plus se lier à AXIN1 et/ou 2 et permettre une dégradation efficace de β -CATÉNINE ; cette dernière s'accumule alors dans le cytoplasme et transloque ensuite au noyau pour activer ces gènes cibles. Des études chez la souris FAP, c'est-à-dire porteuses de mutations similaires pour APC (APC^{min}), ont démontré que les souris développaient spontanément de multiples polypes intestinaux très tôt après la naissance, mais ne vivaient guère assez longtemps pour permettre l'observation vers la progression d'un cancer malin (Su, Kinzler et al. 1992; Moser, Mattes et al. 1993). Approximativement 90 % des cancers colorectaux démontrent une activation aberrante de la voie de Wnt, généralement causée par une altération génétique de la protéine APC (80 %). La voie aberrante de Wnt est considérée comme étant l'événement initiatique de la formation du cancer colorectal puisqu'elle est observée dans pratiquement tous les adénomes colorectaux et qu'elle transforme les cellules épithéliales intestinales afin qu'elles puissent accumuler d'autres défauts génétiques leur permettant de progresser vers une forme invasive et métastatique de ce cancer (van de Wetering, Sancho et al. 2002; Segditsas and Tomlinson 2006). Même si APC est muté dans la majorité des cancers colorectaux sporadiques, cet événement génétique est plutôt rare dans les autres types de cancer. Néanmoins, la découverte de mutations dans le gène d'APC dans des cancers sporadiques du poumon, des ovaires et du sein ainsi que des tumeurs extracolorectales associées au FAP confirme le pouvoir oncogène de ces mutations dans ces tissus. Leur rareté suggère néanmoins qu'ils ne sont pas la voie de prédilection menant à la formation d'un stade malin dans d'autres types de cancers (Wallis, Morton et al. 1999; Furuuchi, Tada et al. 2000; Wu, Zhai et al. 2001; Ohgaki, Kros et al. 2004).

3.2.2 Mutations génétiques de β -CATÉNINE

L'exon3 du gène *CTNNB1*, qui code pour la protéine β -CATÉNINE, est le *hot spot* pour les mutations dans les cancers humains. Cet exon contient les résidus serines et thréonines qui sont les sites de phosphorylation prisés par CKI α (Ser 45) et GSK-3 β (Ser 33, 37 et Thr 41) afin de cibler la protéine pour la dégradation (Figure 4). À ce jour, la

majorité des mutations de β -CATÉnine sont des mutations ponctuelles ciblant ces sites de phosphorylation afin de rendre la protéine β -CATÉnine insensible aux signaux de dégradations présents dans son environnement. Les mutations de β -CATÉnine semblent être la route de prédilection menant à une signalisation aberrante de la voie de Wnt étant donné qu'elles ont été identifiées dans une multitude de cancers tels que dans les cancers du foie (hépatoblastomes et cancer hépatocellulaires), ovariens endométrioïdes, de la peau pilomatricoma, de la prostate, dans le mélanome et les tumeurs de Wilm. Les premières mutations de β -CATÉnine ont été identifiées dans le cancer colorectal (Korinek, Barker et al. 1997; Morin, Sparks et al. 1997) et le mélanome (Rubinfeld, Robbins et al. 1997), mais plusieurs études subséquentes confirmèrent la faible fréquence de ces mutations dans ces deux types de tumeurs (Demunter, Libbrecht et al. 2002; Johnson, Volikos et al. 2005; Luchtenborg, Weijenberg et al. 2005; Thorstensen, Lind et al. 2005). Cependant, pour d'autres types de cancers, la prépondérance de ces mutations est beaucoup plus importante. Dans le cancer hépatocellulaire, plusieurs études ont démontré la présence de mutations activatrices pour β -CATÉnine dans 13 à 34 % et une présence nucléaire de β -CATÉnine dans 11 à 43 % des tumeurs sporadiques (De la Coste 1998 ; Hsu HC 2000 ; Huang H 1999, Taniguchi 2002 ; wong 2001 ; Terris 1999). Dans les cas de cancers ovariens endométrioïdes on dénote une fréquence des mutations de β -CATÉnine comprises entre 16 et 54 % selon les études (Palacios and Gamallo 1998; Gamallo, Palacios et al. 1999; Sagae, Kobayashi et al. 1999; Rong, Boterberg et al. 2001). Dans ces études, on constate également que les tumeurs arborant des mutations de β -CATÉnine sont plus fréquemment de faible grade et sont associées à un meilleur pronostic.

3.2.3 Mutations génétiques d'AXINI

La dérégulation de la voie de Wnt menant à une translocation nucléaire importante de β -CATÉnine est un phénomène fréquent dans le développement des cancers. Plusieurs groupes ont démontré par études immunohistochimiques de tissus cancéreux une accumulation nucléo/cytoplasmique de β -CATÉnine dans une grande proportion de leurs

échantillons ; indépendamment du statut muté ou non de β -CATÉNINE. Par exemple, une étude sur le cancer de pancréas rapporte que 65 % des tissus testés présentaient une accumulation nucléo/cytoplasmique de β -CATÉNINE suggérant une activation aberrante de la voie (Zeng, Germinaro et al. 2006) tandis qu'une étude sur le cancer du poumon rapporte une proportion de 41 % (Tseng, Lin et al. 2008). Étant donné que dans la majorité des cas, la fréquence des mutations de β -CATÉNINE ne pouvait expliquer ces observations, les groupes de recherche se concentrèrent sur les autres composants de la voie de Wnt afin de déterminer leur contribution à la présence anormale de β -CATÉNINE au noyau et/ou au cytoplasme. AXIN1, une protéine essentielle du complexe de dégradation, est considérée comme un gène suppresseur de tumeurs en se basant sur sa capacité à réguler négativement β -CATÉNINE. Des mutations dans le gène d'AXIN1 ont été rapportées avec la plus forte proportion dans le cancer hépatocellulaire avec une prévalence de 5-10 % (Satoh, Daigo et al. 2000). Les mutations d'AXIN1 sont pour la plupart des délétions, observées dans la moitié N-Terminale de la protéine affectant ainsi le site de liaison de β -CATÉNINE ou la formation du complexe avec APC, GSK3 β et β -CATÉNINE (Figure 4). En effet, dans l'étude du groupe de Taniguchi, on observe une accumulation nucléaire de β -CATÉNINE dans la moitié des échantillons porteurs de mutations pour AXIN1 ce qui renforce son rôle potentiel de gène suppresseur de tumeurs (Taniguchi, Roberts et al. 2002). Néanmoins, l'article rapporte également avoir observé la mutation d'AXIN1 en présence d'une mutation de β -CATÉNINE et ce, dans deux tissus ; ce qui signifie que d'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de ces mutations dans le développement du cancer.

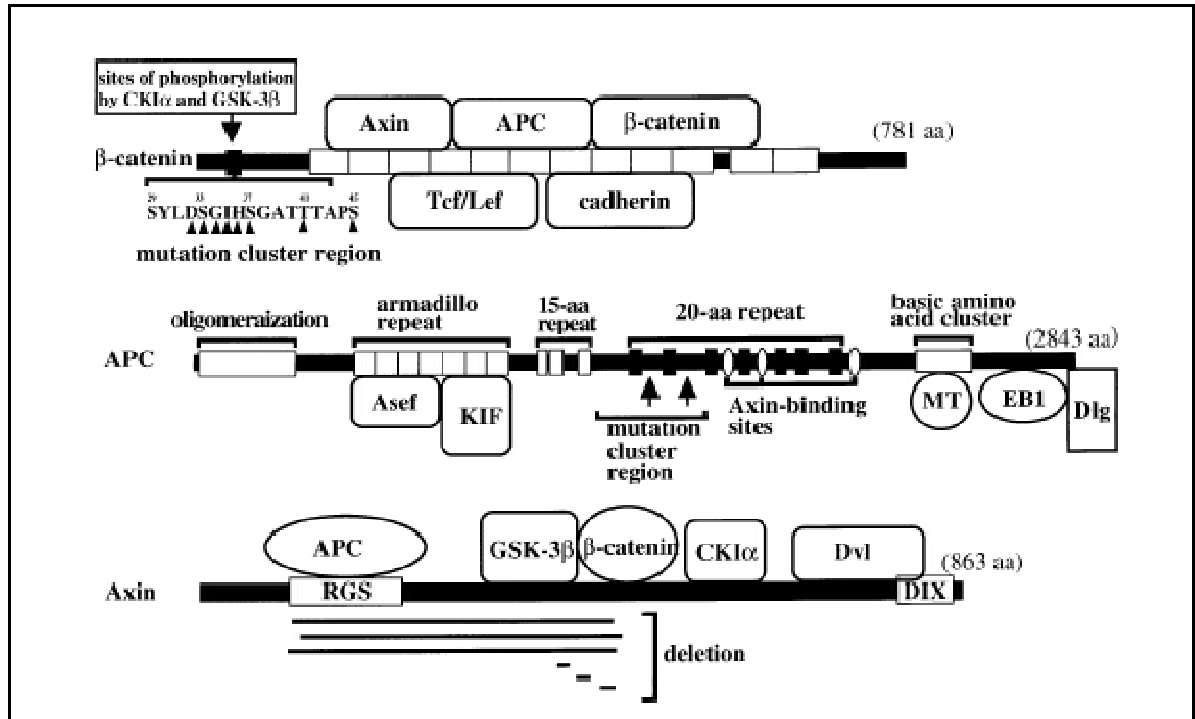


Figure 4. Mutations de β -CATÉNINE, APC et AXINI dans le cancer humain. Descriptions des domaines d'interactions et la position associée des mutations et/ou délétions de β -CATÉNINE, APC et AXINI. Tiré de Kikuchi and al. *Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway*. 2003, 94-3 :225-229.

3.2.4 Autres altérations génétiques de Wnt

Même si on reconnaît maintenant que β -CATÉNINE, APC et AXIN semblent être les composants de Wnt majoritairement responsables de la dérégulation de la voie de Wnt contribuant à la carcinogenèse, des altérations ou des constats d'expression aberrante chez d'autres composants de la voie ont également été rapportés. Ainsi, TCF4, un des facteurs de transcription de β -CATÉNINE se retrouvent muté dans la moitié des cancers colorectaux hautement instables dans leurs régions microsatellites (MSI-H). Toutefois, les conséquences de ces changements de cadre de lecture dans le dernier exon du facteur de transcription TCF4 demeurent controversés (Duval, Gayet et al. 1999; Fukushima, Yamamoto et al. 2001; Shimizu, Ikeda et al. 2002). Une autre mutation très rare qui conduit

à l'inactivation de la protéine sFRP1 reliée à Frizzled, compétitionne avec le ligand Wnt pour la liaison au récepteur Frizzled (Caldwell, Jones et al. 2004).

3.3 Wnt et les tumeurs sporadiques du cortex surrénalien

La voie de Wnt est impliquée dans le développement des tumeurs du cortex surrénalien. L'immunohistochimie est souvent utilisée afin d'étudier la localisation de la protéine β -CATÉNINE comme marqueur de l'activation de la voie de signalisation. En effet, en condition non pathologique, les niveaux de β -CATÉNINE sont très bas dans le cytoplasme et dans le noyau et on observe surtout la protéine au niveau membranaire. Par opposition, lorsque la voie de Wnt est activée, on observe une délocalisation du pool membranaire vers le cytoplasme et/ou le noyau (Figure 5). Notre groupe ainsi qu'un groupe français avons observé une accumulation cytoplasmique et/ou nucléaire dans les adénomes et carcinomes cortico-surréaliens, suggérant une activation aberrante de la voie de signalisation Wnt (Tissier, Cavard et al. 2005; Tadjine, Lampron et al. 2008). Le groupe de Tissier a également signalé une délocalisation plus diffuse de β -CATÉNINE dans les carcinomes cortico-surréaliens contrairement à une accumulation plus focale chez les adénomes (Tissier, Cavard et al. 2005). L'accumulation nucléo-cytoplasmique de β -CATÉNINE peut s'expliquer en partie par la présence de mutations somatiques dans l'exon3, de la protéine affectant principalement les sites de phosphorylation. En effet, parmi 53 tumeurs cortico-surréaliennes étudiées dans notre laboratoire (33 adénomes, 4 carcinomes, 13 AIMAH et 3 hyperplasies surréaliennes ACTH-dépendante), 5 adénomes sur 33 (15 %) étaient porteurs d'une altération génétique dans l'exon 3 de β -CATÉNINE. Malheureusement, aucune mutation du gène *CTNNB1* ne put être détectée chez les carcinomes en raison de leur faible nombre (Tadjine, Lampron et al. 2008). Le groupe de Tissier a établi une proportion semblable de mutations activatrices de β -CATÉNINE dans leur cohorte d'échantillons. Dans une série de 39 spécimens, des mutations somatiques de β -CATÉNINE ont été observées dans 7 des 26 adénomes cortico-surréaliens (27 %) et dans 4 des 13 carcinomes cortico-surréaliens étudiés (31 %). La lignée cellulaire de

carcinomes humains H295R détient également une mutation activatrice pour β -CATÉNINE (Tissier, Cavard et al. 2005; Tadjine, Lampron et al. 2008). Enfin, un autre groupe de recherche rapporte une fréquence de mutation semblable pour β -CATÉNINE dans une étude récente qui tente d'établir un lien entre les mutations du gène *BRAF* (voie de signalisation de Ras) et β -CATÉNINE. Ils ont observé diverses altérations génétiques de β -CATÉNINE dans une proportion équivalente de 20 % chez les adénomes (8/41) et les carcinomes (3/15) (Masi, Lavezzo et al. 2009) (Tableau III). Autant les adénomes fonctionnels que non-fonctionnels étaient porteurs de mutations pour β -CATÉNINE, notamment la mutation ponctuelle S45P.

Des études fonctionnelles d'activation de transcription avec un rapporteur TCF, pTOPFLASH (contenant trois sites de liaisons à β -CATÉNINE en amont du gène rapporteur) ont révélé qu'une activation de la transcription pouvait être inhibée par la transfection d'un dominant négatif TCF. Cette expérience a permis de démontrer que la mutation ponctuelle de β -CATÉNINE dans la lignée cellulaire H295R était responsable de l'activation constitutive de la transcription dépendant de TCF et par le fait même de consolider le rôle des altérations génétiques de la voie de Wnt dans le développement des tumeurs cortico-surréaliennes (Tissier, Cavard et al. 2005). Des traitements *in vitro* des cellules H295R avec une petite molécule inhibitrice du complexe TCF/ β -CATÉNINE PK115-584 ont démontré une inhibition dose-dépendante de la transcription dépendante de β -CATÉNINE et de la prolifération cellulaire, ce qui pourrait éventuellement contribuer au développement d'une nouvelle thérapie contre le cancer cortico-surrénalien. Le tableau III résumé l'ensemble des mutations observées dans les tumeurs cortico-surréaliennes pour la voie de Wnt, soit des mutations de β -CATÉNINE.

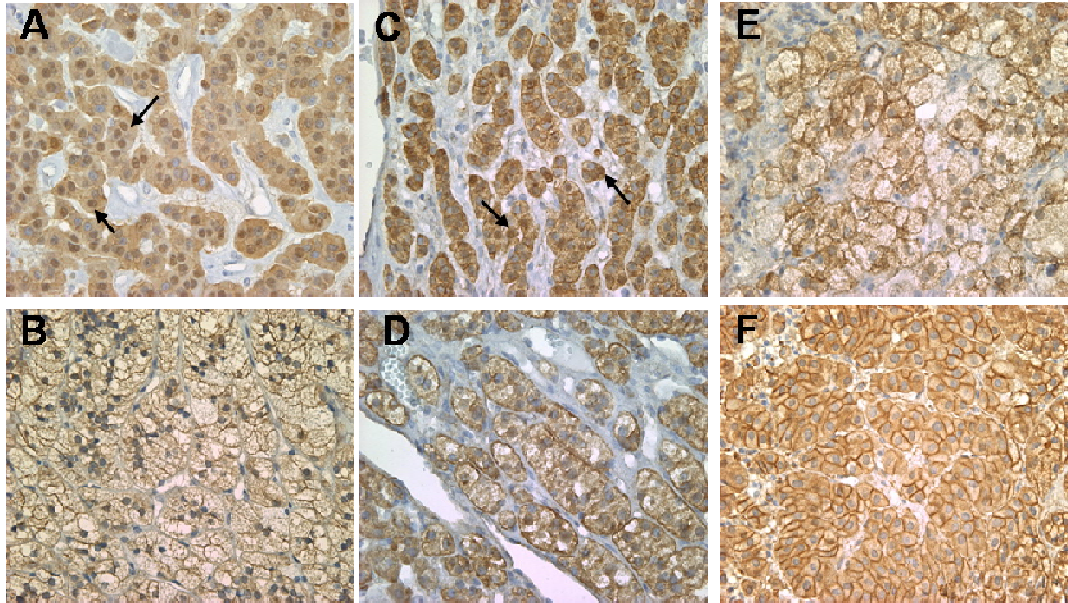


Figure 5. Distribution de la protéine β -CATÉNINGINE dans les tumeurs sporadiques du cortex surrénalien. A. Immunohistochimie de β -CATÉNINGINE dans un adénome cortico-surrénalien possédant une mutation ponctuelle pour β -CATÉNINGINE (S45P) illustrant une absence de marquage membranaire avec un marquage positif au noyau et diffus au cytoplasme (flèches). B. Tissu adjacent correspondant avec un marquage fortement positif au niveau membranaire. C. Adénome cortico-surrénalien d'un patient avec une délétion de 271 pb dans l'exon3 de β -CATÉNINGINE arborant un marquage cytoplasmique diffus et marquage nucléaire clairsemé. D. Tissu adjacent correspondant avec un marquage fortement positif au niveau membranaire. E. Un adénome cortico-surrénalien sans mutation pour β -CATÉNINGINE qui démontre un fort marquage membranaire homogène. F. Marquage immunohistochimique de β -CATÉNINGINE dans la surrénale normale démontrant une forte immunoréactivité membrane très homogène (Grossissement original 400X).

Ainsi, les mutations de l'exon 3 de β -CATÉNINGINE observées dans les tumeurs cortico-surréaliennes sont principalement des mutations ponctuelles ou de petites délétions qui sont observées dans 15 à 30 % des cas (Figure 5). Cette fréquence est sensiblement la

même dans les adénomes et carcinomes cortico-surréaliens alors que le marquage immunohistochimique anormal de β -CATÉNINE au noyau et au cytoplasme est plus élevée dans les cas de carcinomes cortico-surréaliens (84 %, 11 sur 13) comparativement aux adénomes (38 %, 10 sur 26). Cette disparité pourrait s'expliquer par des mutations dans d'autres composantes de la voie de signalisation de Wnt, qui pourrait participer à la progression des carcinomes vers un stade plus agressif (Soon, Braet et al. 2007). Également, étant donné que les altérations de la voie de Wnt se retrouvent autant dans les adénomes que dans les carcinomes du cortex surréalien ; on peut suggérer qu'il s'agit d'un stade précoce dans une séquence multi-stades de pathogenèse des tumeurs cortico-surréaliennes.

Tableau III. Sommaire des altérations génétiques de β -CATÉNINGE dans les tumeurs du cortex surrénalien et dans les lignées cellulaires de carcinomes surrénaliens

Altération Génétique	Type de tumeurs surrénaliennes associées ou lignées cellulaires de carcinomes cortico-surrénaliens	Fréquence	Accumulation nucléocytoplasmique de β -CATÉNINGE (focal/diffus)	Référence
S45P	AA (2/3)*	3/39	+ (focal)	Tissier et coll.2005
	Adénome dans un PPNAD	1/18	+	Tadjine et coll.2008
	Adénome	6/41	ND	Masi et coll.2009
	H295R	-	+	Tissier et coll.2005 et Tadjine et coll.2008
	HAC15	-	ND	Résultat non publié
S45Y	Adénome	1/39	+ (focal)	Tissier et coll. 2005
S37C	Adénome	1/33	+	Tadjine et coll. 2008
T41P	Carcinome	1/15	ND	Masi et coll.2009
T41A	Carcinome	1/39	+ (diffus)	Tissier et coll. 2005
	Adénome dans un PPNAD	1/18	+	Tadjine et coll. 2008
S45F	Adénome*, Carcinome	2/39	+	Tissier et coll. 2005
	Adénome*	1/33	+	Tadjine et coll.2008
	Adénome	1/41	ND	Masi et coll.2009
P44A	Adénome*	2/41	ND	Masi et coll.2009
DEL S45	Carcinome	1/39	+ (diffus)	Tissier et coll..2005
DEL 33pb (43,53)	Adénome	1/41	ND	Masi et coll.2009
	Carcinome	ND	ND	Résultats non publié
H36P	Carcinome	1/15	ND	Masi et coll.2009
N32H	Carcinome	1/15	ND	Masi et coll.2009
Del 376pb (26,813)	Adénome	1/39	+(focal)	Tissier et coll. 2005
Del 489pb (29,993)	Carcinome	1/39	+ (diffus)	Tissier et coll. 2005
DinsS33S	Adénome*	1/39	+(focal)	Tissier et coll. 2005
Del 55pb (26, 943)	Adénome	1/33	+	Tadjine and al. 2008
Del 271pb (26,995)	Adénome	1/33	+	Tadjine and al.2008
Del 6pb	Adénome	1/33	+	Tadjine and al.2008

*: Adénomes contenant également une mutation S45P pour β -CATÉNINGE, ND. Non disponible

L'importance de la voie de Wnt dans le développement des tumeurs du cortex surrénalien se consolida par la suite grâce à d'autres études liant les mutations sporadiques de β -CATÉNINGE à d'autres altérations génétiques bien caractérisées dans les tumeurs

cortico-surréaliennes. Tel que décrit précédemment, des mutations dans le gène *PRKARIA* menant à une dérégulation de la voie de signalisation AMPc sont fréquentes dans les PPNAD et ont aussi été rapportées dans des adénomes cortico-surréaliens. Une étude effectuée sur 9 PPNAD, dont 5 macronodulaires, 3 adénomes mutés pour *PRKARIA* et une tumeur hétérogène où un carcinome s'est développé dans l'adénome existant, démontra une accumulation de β -CATÉNINE par immunohistochimie dans tous les échantillons étudiés. Ainsi, cette étude met en lumière la possibilité d'une communication entre deux voies de signalisation activées dans les tumeurs du cortex surréalien, soit la voie de Wnt/ β -CATÉNINE et celle de l'AMPc (Gaujoux, Tissier et al. 2008).

Enfin, de nombreuses études d'analyses de profilage génique ont été effectuées comparant plusieurs groupes de tumeurs cortico-surréaliennes afin de découvrir de nouveaux gènes cibles ou des voies de signalisation communes impliquées dans le développement de ces tumeurs. Le tableau IV, résume les études marquantes ayant permis de dresser un portrait moléculaire des tumeurs cortico-surréaliennes. À ce jour, malgré quelques études comprenant un nombre important de tumeurs bénignes et malignes aucune voie de signalisation impliquée dans le développement du stade malin des tumeurs surréaliennes ne fait consensus. Néanmoins, de nombreux gènes se démarquent comme marqueur potentiel de malignité nécessitant des recherches plus approfondies. En résumé, les voies de signalisation qui semblent spécifiques au stade malin sont celles impliquées dans le cycle cellulaire, l'angiogenèse, Wnt/ β -CATÉNINE et la stéroïdogénèse (Giordano, Thomas et al. 2003; Bourdeau, Antonini et al. 2004; Laurell, Velazquez-Fernandez et al. 2009; Soon, Gill et al. 2009). Il est intéressant de noter que la seule observation constante parmi toutes ces études est la surexpression de *IGFII*, au niveau de l'ARNm et de la protéine dans les cancers cortico-surréaliennes (Tableau1).

Tableau IV : Résumé des plus importantes études d'analyses d'expression génique de type *microarray* sur les tumeurs du cortex surrénalien

Études	Types d'analyse	Échantillons étudiés	Gène/voie de signalisation
Giordano et coll. 2003	Affymetrix HG_U95Av2 Environ 10 500 gènes	11 ACC, 4ACA et 3 SN et 1 hyperplasie	IGFII (90,9% des ACC), osteopontine (SPP), Sérine/Thréonine kinase 15 (STK15), Angiopoeitin-2(Ang-2), ENC-1 et HMG2
Bourdeau et coll. 2004	cDNA microarray	8 AIMAH et 62 SN	Protéine 7B2 (SGNE1), RAB31, WNT-1, WISP2, KIF5B, CTNNAL1, HIF1A, IGF-II, KPE
Fraipont et coll. 2008	230 gènes candidats	57 tumeurs : 24 carcinomes et 33 adénomes	2 groupes de gènes exprimés dans les carcinomes : 8 gènes liés à IGFII et 14 gènes liés à la stéroïdogénèse dont 6 enzymes.
Soonet coll. 2009	Affymetrix HGU133plus2.0 genechips avec 54 675 gènes	16 adénomes, 12 carcinomes et 6 cortex surrénaliens normaux	<i>IGF2</i> , <i>MAD2L1</i> et <i>CCNB1</i> sont surexprimés dans les carcinomes comparativement aux adénomes alors que <i>ABLIM1</i> , <i>NAV3</i> , <i>SEPT4</i> et <i>RPRM</i> sont sous exprimés.
Laurell et coll. 2009	ArrayExpress (A-MEXP-114) 29 760 gènes	17 adénomes, 11 carcinomes et 4 cortex surrénaliens normaux	<i>IGF2</i> , <i>FGFR1</i> , <i>FGFR4</i> <i>USP4</i> , <i>UBE2C</i> et <i>UFD1L</i> sont exprimés différemment parmi les carcinomes et les adénomes. <i>OSBP</i> and <i>VEGFB</i> sont 2 gènes exprimés différemment dans les adénomes sécrétant de l'aldostérone
Fernandez-Ranvieret coll.2009	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip	74 adénomes et 11 carcinomes	37 gènes dont 22 sont surexprimés et 15 sous exprimés sont différemment exprimés entre le groupe de carcinomes et d'adénomes (Voir tableau de l'article)
Szabo et coll. 2010	Méta-analyse de <i>microarray</i> et d'études <i>microarray</i>	<u>Microarray disponible</u> :97 tumeurs bénignes, 67 tumeurs malignes et 18 normaux. <u>Études microarray</u> :269 tumeurs bénignes, 215 tumeurs malignes et 30 contrôles normaux	3 voies de signalisation identifiées entre tumeurs bénignes et malignes : cycle cellulaire, signalisation de l'acide rétinolique et présentation d'antigène et système du complément

SN : surrénale normale

4. *AXIN2* : GÈNE SUPRESSEUR DE TUMEURS

4.1 Expression et régulation d'*AXIN2*

En se basant sur l'homologie de 89 % entre *AXIN2* et ses homologues chez la souris et le rat, respectivement *Conductin* et *Axil*, *AXIN2* participe à la dégradation rapide de β -CATÉNINGINE via le protéasome en absence d'activation de la voie par les ligands wnts. *AXIN2* est souvent confondue avec son homologue *AXIN1* en raison de leurs grandes similitudes structurelles et de leurs fonctions considérées jusqu'à présent comme étant équivalentes. En effet, une étude a démontré chez la souris qu'*AXIN1* et *AXIN2* étaient fonctionnellement équivalents *in vivo* (Chia and Costantini 2005). Peu de chose sont connues sur la protéine *AXIN2*, qui a été découverte chez la souris grâce à ses interactions avec β -CATÉNINGINE (von Kries, Winbeck et al. 2000). Par conséquent, plusieurs observations faites chez *AXIN1* lui sont également attribuées, par analogie. Ainsi même si plusieurs études stipulent d'*AXIN1* et *AXIN2* possèdent une fonction équivalente, elles semblent également posséder chacune leurs particularités. Alors qu'*AXIN1* semble être exprimé de manière constitutive, l'expression d'*AXIN2* est plutôt en réponse à l'activation de la voie de Wnt (Jho, Zhang et al. 2002; Leung, Kolligs et al. 2002; Lustig, Jerchow et al. 2002). Les effecteurs de la voie de Wnt et E2F1 induisent l'expression d'*AXIN2*, ce qui en fait un gène cible de cette voie (Jho, Zhang et al. 2002; Leung, Kolligs et al. 2002; Lustig, Jerchow et al. 2002; Hughes and Brady 2005). L'induction de l'expression d'*AXIN2* permettrait de limiter l'intensité de la voie canonique de Wnt en effectuant une boucle de rétro-inhibition négative (Figure 3).

4.2 Rôle d'*AXIN2* dans la voie de Wnt

Le gène d'*AXIN2* qui code pour la protéine du même nom possède 45 % d'homologie au niveau nucléotidique avec *AXIN1*. Localisée au chromosome 17q23-24, la protéine *AXIN2* comprend 843 acides aminés dans lesquels on retrouve des domaines d'interaction pour β -CATÉNINGINE, APC, GSK3- β , DVL ainsi que le domaine RGB (Ikeda, Kishida et al. 1998; von Kries, Winbeck et al. 2000) (Figure 6).

4.2.1 Interaction avec APC

La région d'APC impliquée dans l'interaction avec AXIN2 est formée d'environ une vingtaine d'acides aminés contenant un motif SAMP répété trois fois (Ser-Ala-Met-Pro) (von Kries, Winbeck et al. 2000). La plupart des mutations aboutissant à des formes tronquées d'APC sont situées en amont du site de liaison d'AXIN2, éliminant ainsi le domaine d'interaction avec AXIN2, mais préservant quelques sites de liaisons à β -CATÉNINGINE ; ce qui indique l'importance du lien APC-AXIN2 dans la régulation de la voie de Wnt (Nakamura, Nishisho et al. 1991; Rubinfeld, Albert et al. 1997). Ainsi le potentiel tumoral d'APC muté corrèle davantage avec la perte de l'interaction d'AXIN2 plutôt que celle de β -CATÉNINGINE ; ce qui laisse croire que la liaison entre APC et AXIN2 via le domaine RGB est requise afin de cibler efficacement β -CATÉNINGINE pour la dégradation (Rubinfeld, Albert et al. 1997; Yamamoto, Kishida et al. 1998). Dans la lignée cellulaire de carcinome du colon, SW40, qui contient une forme tronquée d'APC la rendant non fonctionnelle, la protéine β -CATÉNINGINE est stabilisée. En présence d'une expression ectopique d'APC, β -CATÉNINGINE est dégradée efficacement (Rubinfeld, Albert et al. 1997; Yamamoto, Kishida et al. 1998; Polakis 2000). Même si on détecte la présence d'AXIN2 endogène dans ces cellules, elles ne réussissent pas à pallier à la dérégulation de la voie dans ces conditions. Néanmoins, la surexpression d'AXIN2 dans les cellules SW40 peut induire la dégradation de β -CATÉNINGINE (von Kries, Winbeck et al. 2000); ce qui laisse croire que la concentration d'AXIN2 est un élément crucial influençant sa fonction au sein de la voie de signalisation de Wnt. On constate dans cette même étude qu'un mutant d'AXIN2 sans le domaine d'interaction pour β -CATÉNINGINE ne peut cibler β -CATÉNINGINE pour la dégradation alors qu'un mutant d'AXIN2 sans le domaine de liaison à APC peut dégrader efficacement β -CATÉNINGINE. Ces observations indiquent que la liaison directe entre β -CATÉNINGINE et AXIN2 est essentielle pour la dégradation de β -CATÉNINGINE.

4.2.2 Interactions avec β -CATÉNINGINE

AXIN2 et β -CATÉNINGINE interagissent ensemble et il a été démontré que cette interaction pourrait être interrompue ou dramatiquement réduite par des mutations affectant les régions 3 et 4 des séquences répétées armadillo de β -CATÉNINGINE (von Kries, Winbeck et al. 2000; Salahshor and Woodgett 2005). Même si les mutations recensées dans la littérature affectant la fonction de β -CATÉNINGINE ne visent pas le domaine d'interaction avec AXIN2, cette dernière est un élément crucial de la formation du complexe de dégradation permettant la phosphorylation des résidus sérines et thréonines de β -CATÉNINGINE. β -CATÉNINGINE est un pauvre substrat pour GSK-3 β et il n'interagit pas directement avec la kinase. C'est via la formation du complexe de dégradation, qui requiert AXIN1 et/ou 2 ainsi qu'APC, que la phosphorylation de β -CATÉNINGINE par GSK-3 β est rendue possible (Hedgepeth, Deardorff et al. 1999; Hinoi, Yamamoto et al. 2000).

4.2.3 Interactions avec GSK-3 β

AXIN2 et GSK-3 β interagissent directement ensemble afin de permettre la phosphorylation de β -CATÉNINGINE. Il a été démontré dans une lignée cellulaire de sarcome fibreux murin que l'interaction entre AXIN2 et GSK-3 β était rompue dans les 3 minutes suivant l'activation de voie par Wnt3a ; ce qui laisse croire que la rupture de cette liaison constitue l'une des premières étapes menant à la stabilisation de β -CATÉNINGINE (Ding, Xia et al. 2005). Les mêmes résultats ont également été observés avec AXIN1, confirmant ainsi leur similarité fonctionnelle à ce niveau. Une autre étude faite avec la protéine AXIN1 démontre que l'interaction avec GSK-3 β facilite dramatiquement la phosphorylation d'APC et de β -CATÉNINGINE *in vitro* (Hart, de los Santos et al. 1998). Étant donné qu'AXIN1 et 2 possède le même domaine d'interactions pour GSK-3 β , on peut supposer qu'AXIN2 se comporterait similairement. D'autres études s'intéressant à l'interaction entre AXIN1 et GSK-3 β ont rapporté qu'AXIN1 est elle-même une cible de GSK-3 β et que cette modification augmenterait sa stabilité (Yamamoto, Kishida et al. 1999). La forme phosphorylée d'AXIN1 aurait une moins grande affinité pour β -CATÉNINGINE ce qui

réduirait son habilité à former un complexe de dégradation efficace (Willert, Logan et al. 1999; Yamamoto, Kishida et al. 1999; Jho, Zhang et al. 2002). Néanmoins, même si AXIN2 se lie à GSK-3 β dans le milieu intracellulaire et qu'elle possède des résidus pouvant être la cible de phosphorylation par cette kinase, aucune étude à ce jour n'a permis de le confirmer.

4.2.4 Interactions avec DVL

Le domaine d'interaction de DVL qui est présent dans la partie C-Terminale d'AXIN1 et d'AXIN2 permet d'inhiber l'activation d'AXIN (1 et/ou 2). Lors de l'activation de la voie par les wnts, AXIN serait relocalisée vers la membrane plasmique afin d'inhiber la formation du complexe de dégradation. Il a été démontré que DVL jouerait un rôle dans cette relocalisation avec AXIN1 (Cliffe, Hamada et al. 2003; Tolwinski, Wehrli et al. 2003). En effet, AXIN possède un motif DIX situé dans le domaine d'interaction pour DVL tout comme la protéine DVL elle-même qui est nécessaire à l'attachement des protéines aux vésicules intracellulaire et aux filaments d'actine (Capelluto, Kutateladze et al. 2002).

4.2.5 Interactions avec PP2A

PP2A est une protéine phosphatase sérine/thréonine qui interagit physiquement avec AXIN1 au niveau de sa sous-unité catalytique C et avec APC au niveau de sa sous-unité régulatrice B56 (Hsu, Zeng et al. 1999; Seeling, Miller et al. 1999). Le rôle de cette phosphatase est controversé et peu compris en raison des nombreuses voies de signalisation auxquelles elle participe ainsi que les nombreuses études contradictoires sur son rôle dans la voie de Wnt (Seeling, Miller et al. 1999; Willert, Logan et al. 1999; Li, Yost et al. 2001; Bajpai, Makhijani et al. 2004). Néanmoins, AXIN1 serait déphosphorylé par PP2A ; ce qui conférerait à PP2A un rôle positif au sein de la voie de signalisation (Willert, Logan et al. 1999; Ikeda, Kishida et al. 2000). Aucune étude n'a encore démontré une interaction directe

entre AXIN2 et PP2A, mais elle a été suggérée en raison de la similitude entre AXIN1 et AXIN2 (Figure 6).

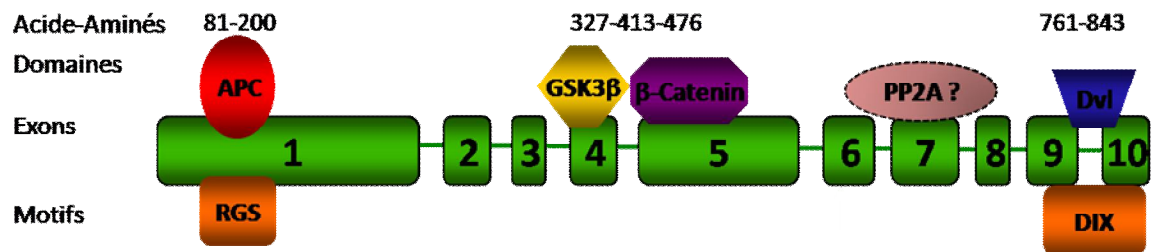


Figure 6. Structure du gène d'*AXIN2*. *AXIN2* est formé de 10 exons qui encodent une protéine de 843 acides aminés. Les domaines d'interactions connus d'*AXIN2* sont APC, GSK-3 β , β -CATÉNINGINE et DVL.

4.3 Implication d'*AXIN2* dans le cancer

AXIN2 est un régulateur majeur de la voie de Wnt par son habileté à promouvoir la dégradation de β -CATÉNINGINE (Kikuchi 1999). Les premières études impliquant la protéine *AXIN2* au cancer relataient des changements dans son expression dans des cas de tumeurs comparativement aux cas normaux.

4.3.1 Mutations héréditaires et polymorphisme d'*AXIN2*

Une implication d'*AXIN2* dans l'oligodontie a pour la première fois été démontrée dans une étude polonaise où une association entre des variantes polymorphiques d'*AXIN2* et l'oligodontie a été révélée (Mostowska, Biedziak et al. 2006). Par la suite, une étude brésilienne permit de confirmer ce lien dans 2 familles atteintes de la maladie dans lesquelles une association avec *AXIN2* a pu être établie (Callahan, Modesto et al. 2009). Néanmoins, une des découvertes les plus intéressantes concernant *AXIN2* ; fut son implication dans la prédisposition au cancer colorectal ainsi qu'à l'oligodontie. L'équipe du

Dr.Lammi, rapporta des mutations d'*AXIN2* dans une famille finlandaise atteinte d'une sévère oligodontie et de néoplasmes colorectaux à pénétration dominante (Lammi, Arte et al. 2004) Ils démontrèrent que l'oligodontie et la prédisposition au cancer colorectal étaient causés par une mutation non sens, Arg656Stop, d'*AXIN2* qui serait activatrice de la voie de signalisation de Wnt. Il s'agit de la première étude suggérant le rôle d'*AXIN2* dans la prédisposition au cancer colorectal. L'année suivante, une autre étude révéla des résultats similaires renforçant ainsi le potentiel prédictif de cette mutation d'*AXIN2* (R656X) (Renkonen, Nieminen et al. 2005). Enfin, une seule étude révèle un lien entre le polymorphisme d'*AXIN2* et le risque de cancer du sein. Cette étude rapporte une corrélation entre l'expression de 5 marqueurs génétiques d'*AXIN2* et l'augmentation du risque de cancer du sein (Wang and Luo 2008).

4.3.2 Mutations sporadique d'*AXIN2*

AXIN2 est un régulateur négatif de la voie de Wnt et agit comme gène suppresseur de tumeurs en limitant la dérégulation de la voie de Wnt qui est commune à plusieurs cancers (Hughes and Brady 2005). Le tableau IV résumé l'ensemble des altérations génétiques d'*AXIN2* rapportées. La première évidence soutenue de l'implication d'*AXIN2* dans le développement du cancer fut démontrée dans le cancer colorectal avec instabilité microsatellite. Le groupe de Liu rapporte qu'*AXIN2* est muté dans 11 des 45 cas de cancers colorectaux testés (24 %) (Liu, Dong et al. 2000). Les 11 mutations sont des mutations modifiant le cadre de lecture, soit 6 insertions de 1pb et 5 délétions de 1pb situées dans la région répétée de 4 mononucléotides de l'exon 7 d'*AXIN2*. Ils ont analysé l'implication pathophysiologique de ces mutations par immunohistochimie de β -CATÉNINE et ont observé une accumulation de β -CATÉNINE dans le noyau des cellules de 10 échantillons mutés sur 11 (90 %), et aucune accumulation dans le tissu normal correspondant. De plus, l'introduction d'un mutant d'*AXIN2* dans des cellules normales de fibroblastes a confirmé l'accumulation nucléaire de β -CATÉNINE. Afin de tester l'impact fonctionnel de cette mutation, un essai de vecteur rapporteur TCF, soit un vecteur contenant des sites de liaisons

à TCF chimériques ou mutés placés en amont d'un gène rapporteur luciférase (pTOPFLASH et pFOPFLASH respectivement) a été co-transfecté dans les cellules 293 avec le vecteur sauvage d'*AXIN2* ou le mutant d'*AXIN2*. Cette expérience a démontré que les mutations d'*AXIN2* activaient la transcription dépendante de TCF ; ce qui permet de suggérer un lien entre la mutation décrite et le développement de cancers (Liu, Dong et al. 2000). Les auteurs ont également soulevé l'importance du domaine DIX dans la fonction d'*AXIN2* puisque les mutations somatiques décrites aboutissent toutes à l'élimination de ce domaine qui est également présent chez DVL et AXIN1 (Peifer and Polakis 2000). Une autre étude sur le cancer colorectal a confirmé le rôle d'*AXIN2* dans ce type de cancer avec un pourcentage de tumeurs mutées pour *AXIN2* de 11 % (5/47) et de 8 % (2/26) dans les lignées cellulaires (Suraweera, Robinson et al. 2006). Quatre des 5 cas de mutations de cancer colorectal sont une insertion d'une 1pb dans la région répétée de mononuléotides aboutissant à l'insertion d'un codon stop. L'autre altération génétique détectée est une délétion hétérozygote de 12pb des codons 671-674 (RTTP) de l'exon 7 d'*AXIN2* ; également trouvée dans une lignée cellulaire (Suraweera, Robinson et al. 2006). Aucune étude fonctionnelle ou analyse immunohistochimique n'a cependant été entreprise.

L'implication d'*AXIN2* fut également explorée dans d'autres types de cancer. Une étude sur le cancer ovarien endométrioïde comprenant 45 échantillons et 2 lignées cellulaires a investigué la région codante d'*AXIN2* dans leurs échantillons non mutés pour β -CATÉNINE. Ils ont trouvé une mutation d'*AXIN2* déplaçant le cadre de lecture dans l'un de leurs échantillons (2 %), la délétion d'un G au codon 665 (Wu, Zhai et al. 2001). Malheureusement, l'analyse immunohistochimique de cette mutation n'a révélé qu'une expression faible de β -CATÉNINE au niveau membranaire et cytoplasmique et aucun marquage nucléaire (Wu, Zhai et al. 2001). Une proportion similaire de mutations d'*AXIN2* a également été observée dans une cohorte de 73 carcinomes hépatocellulaires et 27 hépatoblastomes. En effet, 2 mutations d'*AXIN2* ont été trouvées dans les carcinomes hépatocellulaires, mais aucune dans le cas des hépatoblastomes. Fait intéressant, dans l'un des cas rapportés, une mutation de β -CATÉNINE était aussi présente (Taniguchi, Roberts et

al. 2002). Ils ont aussi trouvé une mutation non sens au nucléotide 2064 et une délétion de 12 pb débutant au nucléotide 2102. L'importance fonctionnelle des mutations d'*AXIN2* a été investiguée par l'entremise d'analyses immunohistochimiques de β -CATÉNINE qui s'est avéré positive pour le marquage nucléaire de β -CATÉNINE dans les échantillons mutés pour *AXIN2* (Taniguchi, Roberts et al. 2002).

Une autre analyse de l'état mutationnel d'*AXIN2* dans le cancer du foie, plus particulièrement, l'hépatoblastome, a permis de consolider l'implication d'*AXIN2* dans le processus de tumorigenèse puisque des mutations somatiques ont été découvertes dans 5 % des cas (2/37). Il s'agissait d'une mutation ponctuelle dans l'exon 9, au codon 762, ayant pour conséquence la substitution d'une sérine pour une asparagine et d'une délétion de 52pb (codon 745-762) dans l'exon 8-9. L'analyse de la lignée cellulaire d'hépatoblastomes a démontré également la présence d'une délétion de 1624pb débutant au codon 217 de l'exon1 et s'étendant jusqu'au codon 843 de l'exon 10 (Koch, Weber et al. 2004). L'équipe de Koch a aussi analysé l'expression d'*AXIN2* dans 25 tumeurs et 5 lignées cellulaires d'hépatoblastomes. Toutes les tumeurs étudiées ont démontré une augmentation de l'expression d'*AXIN2* comparativement à leur tissu adjacent normal. De plus, cette hausse marquée de l'expression d'*AXIN2* corrèle avec une accumulation nucléaire de β -CATÉNINE dans 85 % des cas d'hépatoblastomes analysés. Certaines de ces tumeurs possédaient des mutations activatrices de β -CATÉNINE et une forte corrélation entre la présence de ces mutations et l'expression d'*AXIN2* a pu être démontrée (Koch, Weber et al. 2004). Enfin, cette étude a permis de conclure que la surexpression du régulateur négatif de la voie de Wnt, *AXIN2*, était commune dans l'hépatoblastomes et de confirmer le statut d'*AXIN2* en tant que gène cible de la voie de Wnt, comme il avait déjà été précédemment mentionné.

Une analyse fastidieuse d'*AXIN2* dans la pathologie du médulloblastome a apporté plusieurs nouveaux éléments sur la modulation de la voie de Wnt par *AXIN2* e. Tout d'abord, l'analyse mutationnelle a révélé la présence de 2 mutations sporadiques d'*AXIN2* dans le même échantillon, une insertion de 2pb (AT) au codon 403 de l'exon 5

menant à une terminaison prématurée de la translation au codon 506 (Val506Stop) et une mutation ponctuelle dans l'exon 7, codon 696 (CAG→CGG) aboutissant à la substitution d'un acide aminé de glutamine en arginine (Koch, Hrychuk et al. 2007). L'accumulation nucléaire de β -CATÉNINE dans cet échantillon muté a confirmé le rôle de gène suppresseur de tumeurs conféré à *AXIN2*. Un polymorphisme rare a également été mentionné, soit l'échange de l'acide aminé sérine pour une phénylalanine, codon 738 dans l'exon 8 en plus des 3 polymorphismes silencieux au codon 455 (CCG→CCA), 462 (CCT→CCC) et codon 688 (CTG→TTG) (Koch, Hrychuk et al. 2007). Enfin, une mutation germinale dans l'exon 5 correspondant à une substitution d'une Glutamine pour une Lysine, au codon 408 complète leur séquençage complet du gène d'*AXIN2* (Koch, Hrychuk et al. 2007). Par la suite, dans l'ensemble des cas de médulloblastomes, une baisse significative d'*AXIN2* a été observée comparativement à des tissus contrôles cérébelleux. Afin de comprendre l'impact fonctionnel de la mutation somatique décrite ci-haut dans le médulloblastome, un essai de transcription avec un vecteur reproduisant l'effet de la mutation (délétion du domaine DIX) a été introduit dans une lignée cellulaire non mutée pour les composants de la voie de Wnt. Le vecteur TOPFLASH a démontré que la mutation trouvée pouvait activer la transcription dépendante de TCF comme dans le cas du cancer colorectal, ce qui confirme que les mutations d'*AXIN2* sans domaine DIX activent de manière aberrante la voie de Wnt (Koch, Hrychuk et al. 2007).

Finalement, des mutations somatiques d'*AXIN2* ont été décrites dans le cancer gastrique dans une proportion de 28,1%. Ces mutations étaient plus fréquentes dans les cas de cancer gastriques MSI-H suggérant une implication de la voie de Wnt dans ce sous-type de tumeurs (Kim, Kim et al. 2009). Une autre étude sur le mélanome comprenant l'analyse mutationnelle de plusieurs composants de la voie de Wnt rapporta la présence d'une mutation germinale d'*AXIN2* dans une de leur lignée cellulaire (11%, 1/9). Cette lignée cellulaire répondait positivement à l'analyse immunohistochimique de β -CATÉNINE avec une accumulation nucléo-cytoplasmique et présentait un niveau d'expression protéique élevée d'*AXIN2*. Cette lignée cellulaire mutée pour *AXIN2* est également mutée pour β -

CATÉNINE ce qui suggère aux auteurs de l'étude que la mutation d'*AXIN2* pourrait prédisposer au mélanome (Castiglia, Bernardini et al. 2008).

Tableau IV. Résumé des altérations génétiques d'*AXIN2* dans les tumeurs et les lignées cellulaires humaines

Études	Type de Cancer	Exon	Origine	Mutations	Féquence Mutations	Autres mutations de la Voie de Wnt	Accumulation nucléo/cytoplasmique de β -CATÉLINE
Liu et al. 2000	Colorectal	7	somatique	2083 DelG L688X (3/45) 2084 InsG G706X (6/45) 2015 InsA G706SX (1/45) 2112 DelC L688X (1/45) 2100 DelC L688X (1/45)	24,4%	<i>AXIN2</i> -2015,InsA,G706X <i>AXIN2</i> -2084,InsG,G706X	+ + + +
Suraweera et.al 2006	Colorectal	7	somatique	1993 DelG L688X (4/47) + Lignées cellulaire (1/26) 2010 DelTTRP, 12pb (1/47) + lignée cellulaire (1/26)	11%	APC-E1209X (1x) APC-C1410X	 NA
Wu et al. 2001	Endomètre Ovarien	7	somatique	2083 DelG665X	2%		NA
Taniguchi et al. 2002	Hépatocarcinome	7	somatique	2064 C→T R659W 2102 DelTTRP 12pb	2,4%	β -CATÉLINE-S45P	+ +
Koch et al. 2004	Hépatoblastome	9 8-9 1-10	somatique	G→A S762N Del 52pb 745-762 HUH6,Del1624pb 217-823(1/5)	3%	NA	NA
Koch et al. 2007	Médulloblastome	5 7 5	somatique somatique germinale	InsAT V506X A→G Q696R G→A Q408L	3%	NA	+ NA NA
Pan et al. 2008	Gastrique	7	somatique	2083 DelG L688X	1%	<i>AXIN1</i> -1076 Del1pb	+
Castiglia et al. 2008	Mélanome	7	germinale	PR-Mel, DelTTRP, 12pb	11%	β -CATÉLINE-S45P	+
Lammi et al. 2004	Hypodontie Familiale (cancer colorectal)	7	germinale	1966 C→T A656X 1994 InsG G706X	NA	NA	NA

4.3.3 Autres mécanismes de régulation de l'expression d'AXIN2

Outre les mutations provoquant un changement fonctionnel de la protéine, d'autres modes de régulation de l'expression génique sont pointés du doigt pour leur rôle de plus en plus consolidé dans le développement du cancer. Dans les dernières années, quelques études se sont intéressées à la méthylation du promoteur d'*AXIN2* afin de réguler son expression. Dans une étude sur le cancer colorectal, une baisse marquée de l'expression d'*AXIN2* a été associée au groupe de tumeurs classé MSI-H. Afin de déterminer la cause de cette baisse d'expression, des expériences d'hyperméthylation du promoteur ont permis de mettre en lumière l'importance de ce mode de régulation dans le cancer colorectal (Koinuma, Yamashita et al. 2006). Cette étude nous démontre l'importance d'un mode alternatif de régulation aux mutations génétiques soit le *silencing* épigénétique qui pourrait jouer un rôle important dans la tumorigenèse via l'activation de la voie de Wnt (Koinuma, Yamashita et al. 2006).

Une autre étude, par le groupe de Hughes, a présenté un autre mode de régulation du gène *AXIN2* soit via l'expression différentielle de ces trois régions 5' non traduites alternatives (UTR). Les régions 5'UTR modulent l'efficacité de la traduction et par conséquent possèdent une influence certaine sur le niveau d'expression des protéines subjacentes. Cette étude a démontré une corrélation entre le statut d'expression d'*AXIN2* et le statut des 3 régions 5'UTR d'*AXIN2* s'y rattachant (Hughes and Brady 2005). De plus, l'expression des 5'UTR diffère entre les échantillons tumoraux et normaux de cancer colorectal et du poumon.

5. INSTABILITÉ MICROSATELLITE

5.1 Généralités et classification internationale

L'instabilité microsatellite (MSI-*Microsatellite instability*) est un type d'instabilité génomique caractérisé par des altérations dans la longueur des séquences microsatellites répétées dans l'ADN tumoral, mais qui sont absentes de l'ADN génomique correspondant. La découverte du MSI remonte en 1993, lorsque ce défaut génétique a été associé pour la première fois au cancer colorectal, plus précisément au syndrome de Lynch (syndrome du

cancer colorectal héréditaire sans polypes (HNPCC- *Heredity Nonpolyposis Colorectal Cancer*) (Ionov, Peinado et al. 1993; Peltomaki, Lothe et al. 1993; Thibodeau, Bren et al. 1993). Les évidences confirmant que le MSI est un phénotype mutationnel furent éclaircies à la fin de cette même année grâce à deux autres papiers publiés dans la revue *Cell* qui identifiaient la base biochimique du phénomène par association avec des échantillons possédant des défauts dans le système de réparation de l'ADN et en détectant la première mutation germinale du gène de réparation de l'ADN *hMLH2* chez des patients atteints du syndrome de Lynch (Parsons, Li et al. 1993; Fisher 1999). Le MSI est donc causé par une déficience du système de réparation de l'ADN (MMR- DNA mismatch repair) résultant en échecs de réparation des erreurs introduites lors de la réplication de l'ADN (Bronner, Baker et al. 1994; Fishel, Ewel et al. 1994). L'inactivation de n'importe lesquels des nombreux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, incluant *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* et *hPMS2* peut aboutir en MSI (Eshleman and Markowitz 1996). Les séquences répétées de l'ADN comme les microsatellites sont plus sensibles aux erreurs de réplifications de l'ADN, ce qui en fait un bon marqueur de l'intégrité du système de réparation de l'ADN.

Dans les années qui suivirent la découverte du MSI, de nombreux groupes de recherches s'intéressèrent à ce phénomène génétique. En raison de la littérature grandissante sur le sujet, la nécessité d'établir des critères internationaux pour la détection des MSI s'imposa en 1997. L'institut national du cancer forma un groupe de travail qui recommanda une liste de cinq marqueurs microsatellites pour la détection des MSI consistant en deux marqueurs mononucléotides (*BAT-25* et *BAT-26*) et trois marqueurs dinucléotides (*D2S123*, *D5S346* et *D17S250*) (Thibodeau, French et al. 1998). Cette liste qui est communément appelée la liste de Bethesda, classifie les tumeurs en trois grandes catégories. Les tumeurs présentant une instabilité dans deux marqueurs ou plus sont définies comme *MSI-H (MSI-High)* tandis que celles possédant un seul marqueur positif sont classées *MSI-L MSI-L (MSI-low)*. Les tumeurs ne présentant aucune instabilité microsatellite sont considérés comme stables. La liste de Bethesda a permis d'uniformiser

les critères de détection des MSI et de permettre la standardisation de l'analyse des MSI. Néanmoins, avec les années, ces cinq marqueurs ont été mis à l'épreuve et certaines limitations décrites dans un rapport de l'Institut national du cancer publié en 2002 ont été soulignées (Boland, Thibodeau et al. 1998). La limitation principale constitue l'utilisation de marqueurs dinucléotidiques puisqu'ils sont moins sensibles et moins spécifiques pour détecter les tumeurs ayant des défauts dans le système de réparation que les séquences répétées mononucléotidiques et peuvent ainsi résulter en une classification erronée des MSI-L en MSI-H. De plus, même si les auteurs du groupe de travail reconnaissent une distinction entre MSI-L et tumeurs stables, celle-ci demeure très controversée (Halford, Sasieni et al. 2002; Laiho, Launonen et al. 2002; Lindor, Burgart et al. 2002). Halford et ses collaborateurs rapportèrent que 68 % des tumeurs sporadiques non-MSI-H possédaient de l'instabilité dans au moins un marqueur lorsque 44 marqueurs ont été testés (Halford, Sasieni et al. 2002). Des résultats similaires ont été obtenus par le groupe de Laiho où 79 % des tumeurs stables pour le marqueur *BAT-26* étaient MSI-L en utilisant 377 marqueurs dinucléotides (Laiho, Launonen et al. 2002). Si la relation entre des tumeurs MSI-H et les caractéristiques cliniques et pathologiques n'est plus à faire, aucune évidence ne semble supporter une telle relation avec les MSI-L (Bacher, Flanagan et al. 2004).

Avec les années plusieurs auteurs démontrèrent que la spécificité des marqueurs mononucléotides *BAT-25* et *BAT-26* était suffisante pour permettre à eux seuls d'établir le statut MSI sans référence à l'ADN normal dans les cas de cancers colorectaux (Hoang, Cottu et al. 1997; Zhou, Fang et al. 1998; Suraweera, Duval et al. 2002). Néanmoins, en raison d'allèles de taille différente pour *BAT-25* et *BAT-26* identifiées chez 18,4 % et 12,6 % des Africains américains ; ces 2 marqueurs seuls ne sont pas suffisants dans certains cas (Zhou, Fang et al. 1998; Samowitz, Slattery et al. 1999; Sood, Holmes et al. 2001). En 2002, le groupe de Suraweera proposa donc une liste de cinq marqueurs mononucléotides quasi-monomorphiques incluant *BAT-25* et *BAT-26* démontrant 100 % de spécificité afin de détecter le statut MSI sans l'utilisation d'ADN génomique normal comparatif sur des

échantillons de cancer gastro-intestinaux et colorectaux (Tableau V et figure 7) (Suraweera, Duval et al. 2002). Dans la même ligne de pensée, en 2004, Bacher et al. ont évalué un éventail de 266 locus microsatellites de mono-, di-, tetra- et penta-nucléotide pour leur potentiel de détection des MSI-H (Tableau VI) (Bacher, Flanagan et al. 2004). Leur groupe a conclu que les marqueurs mono-nucléotides sont beaucoup plus sensibles et spécifiques que tous les autres marqueurs et a développé ainsi un essai multiplex fluorescent semblable à celui de Suraweera à l'exception d'un seul marqueur (*BAT-25*, *BAT-26*, *NR-24*, *NR-21* et *MONO-21*). Ces marqueurs en plus d'être plus sensibles et plus spécifiques que les dinucléotides de Bethesda sont quasi-monomorphiques, ce qui simplifie l'interprétation des séquences du profil allélique lorsqu'un seul allèle est présent dans l'ADN normal et offre également la possibilité de faire un essai MSI sans comparaison avec l'ADN normal correspondant (Suraweera, Duval et al. 2002; Bacher, Flanagan et al. 2004; Laghi, Bianchi et al. 2008). Afin d'introduire un contrôle interne, le groupe de Bacher ajouta deux séquences répétées pentanucléotides polymorphiques, *PentaC* et *PentaD*, afin de détecter des contaminations ou des mélanges potentiels d'échantillons qui ne seraient pas apparents en utilisant uniquement les marqueurs mononucléotides (Figure 8) (Bacher, Flanagan et al. 2004). En utilisant 2 marqueurs polymorphiques on augmente la spécificité ainsi seulement 0,2 -0,6 % des individus pourraient posséder le même profil allélique, selon les différents groupes ethniques.

Tableau V : Les cinq marqueurs quasi-monophoriques et mononucléotidiques utilisés dans un PCR multiplex pour la détection du statut MSI

Name	Gene	Genbank number	Length and location of the repeat	Fluorescent marker	Primer sequence 5' to 3'	Average PCR product size (bp)
BAT-26	hMSH2	U41210	26 (A) Intron 5	FAM	tgactacttttgactcagcc aaccattcaacattttaacc ^a	120
BAT-25	c-kit	L04143	25 (T) Intron 16	NED	tcgctccaagaatgtaagt ^a tctgcatttaactatggctc	124
NR-21	SLC7A8	XM_033393	21 (T) 5' UTR	HEX	taaatgtatgtctcccctgg attcctactccgcattcaca ^a	103
NR-22	Transmembrane precursor protein B5	L38961	22 (T) 3' UTR	FAM	gaggcttgccaaggacataa aattcggatgcatccagtt ^a	142
NR-24	Zinc finger 2 (ZNF-2)	X60152	24 (T) 3' UTR	HEX	ccattgctgaatttacctc attgtgccattgcattccaa ^a	132

^aFluorescent primer.

Tiré de Suraweera and al. *Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR*. 2002, 123:1804-1811.

Tableau VI : Tailles des produits de PCR et les fluorescents pour le locus correspondant dans le Système multiplex MSI

Locus name	Genebank number	Gene	Repeat motif	Size range (bp)	Fluorescent label
NR-21	XM_033393	SLC7A8	(A) ₂₁	94-101	JOE
BAT-26	U41210	MSH2	(A) ₂₆	103-115	FL
BAT-25	L04143	c-kit	(A) ₂₅	113-124	JOE
NR-24	X60152	ZNF-2	(A) ₂₄	130-133	TMR
MONO-27	AC007684	MAP4K3	(A) ₂₇	142-154	JOE
Penta C	AL138752	-	(AAAAG) ₃₋₁₅	143-194	TMR
Penta D	AC000014	-	(AAAAG) ₂₋₁₇	135-201	FL

Tiré de Bacher and al. *Detection of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors*. 2004, 20 :237-250.

Dans les années qui suivirent la sortie des publications sur la nouvelle méthode utilisant des marqueurs mononucléotides au détriment de marqueurs dinucléotidiques, plusieurs études comparatives permirent de tester et de consolider la fiabilité de ces nouveaux marqueurs. L'étude de Murphy et al. du cancer colorectal évalua le profil MSI de 34 tumeurs en comparant les 2 méthodes (Système multiplex MSI et Bethesda). La concordance entre les 2 méthodes était de 85 %, soit 29/34. L'étude conclut à une concordance complète entre les 2 essais pour les cas catégorisés MSI-H (11/11) et les tumeurs dites stables (18/18). Pour les 5 tumeurs restantes, la liste de Bethesda les classa

comme MSI-L alors que le système d'analyse MSI les classa comme stables. Pour les MSI-H classés selon la méthode Bethesda, tous démontrèrent de l'instabilité pour les deux locus mononucléotides (*BAT-25* et *BAT-26*); étant donné que le critère pour un MSI-H exige ≥ 2 locus instables sur 5, ces échantillons auraient été classés MSI-H, même sans l'analyse des dinucléotides, ce qui démontre la puissance des *BAT-25* et *BAT-26* dans le diagnostic du MSI dans le cancer colorectal. Également, cette étude révéla la spécificité des cinq marqueurs mononucléotidiques pour la détection du MSI, puisque les 11 cas classés MSI-H démontrèrent tous de l'instabilité pour les cinq locus (Murphy, Zhang et al. 2006).

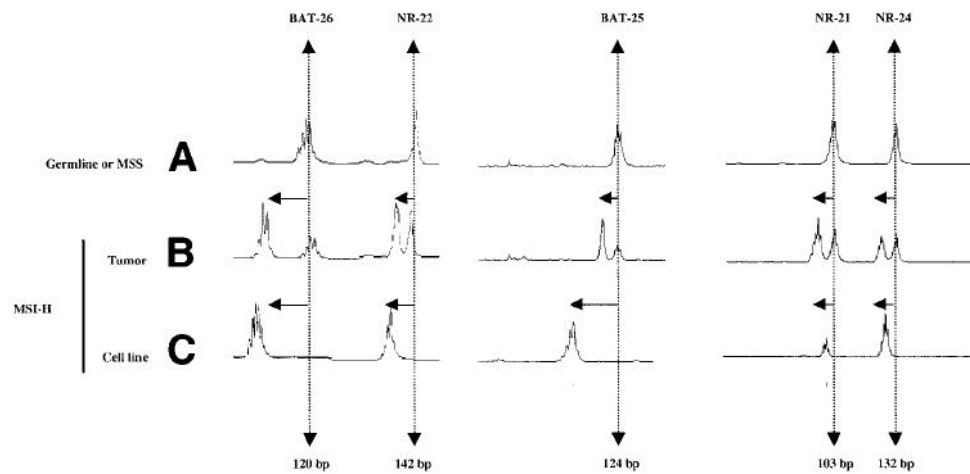


Figure 7 : Profile allélique typique de *BAT-26*, *BAT-25*, *NR-24*, *NR-21* et *NR-22*. A. Tumeurs normales ou MSI stable; B. Tumeur primaire MSI-H avec un allèle court et l'autre de longueur normale; et C. Une lignée cellulaire MSI-H avec une délétion homozygote. Tiré de Suraweera and al. *Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR*. 2002, 123:1804-1811.

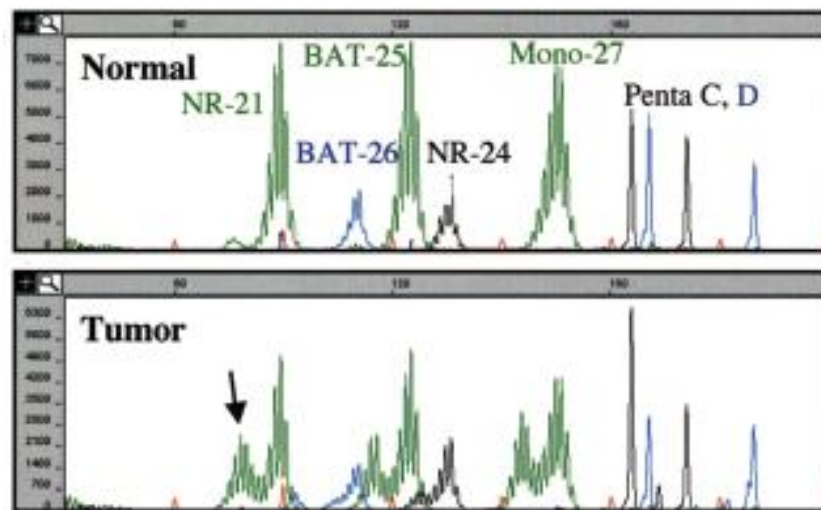


Figure 8. Analyse MSI d'échantillons d'ADN normal avec le système multiplex. Le Système multiplex MSI contient cinq locus répétés quasi-monophoriques mononucléotides (*BAT-25*, *BAT-26*, *MONO-27*, *NR-21* et *NR-24*) qui sont très spécifiques pour la détection des tumeurs MSI-H. De plus, deux marqueurs polymorphiques pentanucléotides sont inclus comme contrôle interne. Ce système pentaplex a également été recommandé dans le rapport le plus récent de la réunion de l'Institut du cancer sur le MSI et les tumeurs de Lynch. Tiré de Murphy and al. *Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers*. 2006, 8(3):305-311.

5.2 Implication du MSI dans le cancer sporadique

La découverte de l'instabilité microsatellite dans le cancer et sa relation avec le syndrome de Lynch, qui est un cancer colorectal héréditaire sans polypes, fut établit pour la première fois en en 1993 (Ionov, Peinado et al. 1993; Peltomaki, Lothe et al. 1993; Thibodeau, Bren et al. 1993). Depuis, dans le cancer colorectal, cette instabilité microsatellite (MSI-H) est prépondérante dans la majorité des syndromes de Lynch ainsi que dans une petite population de cancers sporadiques (Perucho 2003; Soreide, Janssen et al. 2006). Cette découverte permet d'explorer une voie tumorale distincte puisque

l'inactivation génétique et épigénétique de gènes associés au système de réparation de l'ADN(MMR) mène à des mutations dans des gènes associés aux cancers et ultimement au développement de cancers. Le statut MSI-H d'une tumeur sous-entend une voie distincte de tumorigenèse puisque ces cancers présentent des caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires différentes. L'instabilité microsatellite possède une valeur prédictive du dénouement clinique et pourrait également prédire la réponse tumorale aux thérapies avec adjuvant (Messerini, Ciantelli et al. 1999; Edmonston, Cuesta et al. 2000; Gryfe, Kim et al. 2000; Samowitz, Curtin et al. 2001; Ribic, Sargent et al. 2003). L'instabilité microsatellite est présente dans les tumeurs d'origine sporadique du cancer colorectal, gastrique et de l'endomètre dans une proportion de 10 à 15 % et à une fréquence plus faible dans d'autres types de cancer (Woerner, Kloor et al. 2005; Demokan, Suoglu et al. 2006). En plus de démontrer des caractéristiques pathologiques différentes, les tumeurs MSI-H semblent posséder des taux plus faibles de mutation du gène *TP53* et un taux plus bas de différenciation cellulaire (Yamamoto, Perez-Piteira et al. 1999; Jass 2004).

L'hyperméthylation des régions promotrices riches en Cp-G est maintenant reconnue comme une caractéristique commune des tumeurs humaines. Il existe une relation étroite entre l'hyperméthylation des promoteurs et le statut MSI-H. En effet, les tumeurs sporadiques avec MSI-H dans le cancer colorectal sont associées à l'hyperméthylation de la région promotrice du gène *hMLH1* (Thibodeau, French et al. 1998). De plus, la méthylation du promoteur hMLH1 est la cause prédominante de l'instabilité microsatellite élevée dans les tumeurs sporadiques (Tuupanen, Niittymaki et al. 2008). En plus de l'hyperméthylation, dans le modèle du cancer colorectal, les tumeurs MSI-H possèdent un taux significativement plus élevé de mutations du gène *BRAF* (Rajagopalan and Lengauer 2004; Deng 2006). Le gène *BRAF* code pour une sérine/thréonine kinase dans la voie de signalisation de la protéine kinase RAS /RAF (Dhomen and Marais 2007). De surcroît, une mutation hautement oncogénique, V600E, dans le gène *BRAF* est fréquemment rapportée dans les tumeurs sporadiques du cancer colorectal, mais pas dans celles reliées au syndrome de Lynch (Deng 2006).

5.3 MSI et la voie de signalisation Wnt

L'une des premières évidences d'une proximité entre la voie de Wnt et l'instabilité microsatellite est la découverte de mutations dans le gène *TCF4*, aboutissant à des changements dans le cadre de lecture (Duval, Gayet et al. 1999). Dans les dernières années, plusieurs groupes de recherche se sont intéressés au lien possible entre les altérations génétiques de la voie de signalisation Wnt et le statut MSI-H des tumeurs, particulièrement dans le cas du cancer colorectal où l'incidence de l'instabilité microsatellite a été largement étudiée. Le groupe de Shimizu, rapporte une fréquence élevée d'altérations génétiques dans la voie de signalisation de Wnt dans une série de 33 échantillons de tumeurs MSI-H (Shimizu, Ikeda et al. 2002). Les gènes étudiés dans lesquels ont été rapportés des mutations sont *β-CATÉLINE* (3/33), *AXINI* (8/33), *APC* (2/33) et *TCF4* (14/33). Des mutations dans plusieurs des composants de la voie de Wnt pour un même échantillon ont aussi été observées (Shimizu, Ikeda et al. 2002). La protéine sécrétée *Frizzled* qui agit comme inhibiteur de la voie de Wnt à la surface membranaire est plus faiblement exprimée par hyperméthylation du promoteur dans le cancer colorectal avec instabilité microsatellite (Tanaka, Watanabe et al. 2008). Récemment, deux analyses microarray comparant des tumeurs MSI-H et MSS dans le cancer colorectal et de l'endomètre ovarien conclurent à une signature moléculaire significativement différente entre les deux groupes. En effet, plusieurs gènes associés à la voie de signalisation de Wnt démontraient des différences d'expression entre les tumeurs MSI-H et MSS suggérant que la voie de Wnt serait plus active dans les tumeurs MSI-H (Risinger, Maxwell et al. 2005; Koinuma, Yamashita et al. 2006)

À l'opposé, d'autres études tentant d'établir un lien entre l'instabilité génétique (CIN ou MSI) et l'expression aberrante de *β-CATÉLINE* dans les tumeurs du cancer colorectal ont observé un lien entre ces altérations et l'instabilité chromosomique, mais aucune relation avec le statut MSI des tumeurs (Martensson, Oberg et al. 2007; Ortega, Moran et al. 2008). Quelques études sur le sujet ont également été publiées pour d'autres

types de cancer comme celui de l'ovaire endométrioïde où une expression aberrante de certains gènes liés à la voie de Wnt, SFRP1, SFRP4 et *fibroblast growth factor 18* a été rapportée dans un groupe de tumeurs MSI-H par rapport au groupe contrôle. De plus en plus de chercheurs s'intéressent à la relation entre la voie de signalisation Wnt et l'instabilité génomique, toutefois d'autres études sont requises afin de consolider cette association.

5.3.1 Instabilité microsatellite et AXIN2

Peu d'études se sont penchées sur l'interaction entre le gène *AXIN2* et l'instabilité microsatellite, néanmoins les conclusions de celles-ci sont prometteuses. Une étude sur le cancer gastrointestinal a rapporté la fréquence des mutations d'*AXIN2* et de *TCF7L2* dans une série de tumeurs MSI-H (32), MSI-L(13) et MSS (47) (Kim, Kim et al. 2009). Ils ont découvert 9 échantillons mutés pour *AXIN2* dans le groupe MSI-H (28,1%) et aucun échantillon muté dans les groupes MSI-L et MSS (Kim, Kim et al. 2009). Cette étude a mis en lumière l'importance des mutations d'*AXIN2* dans ce type de tumeur avec une instabilité microsatellite. Une autre grande étude de microarray comparant des tumeurs MSI-H et MSS du cancer colorectal a permis de conclure à une signature moléculaire distincte pour les tumeurs MSI-H. De manière surprenante, l'expression d'*AXIN2* et de β -CATÉNINE était significativement différente entre le groupe MSI-H et MSS avec une baisse d'expression d'*AXIN2* dans le groupe de tumeurs MSI-H (Koinuma, Yamashita et al. 2006). Des analyses ultérieures de méthylation dans la région promotrice du gène ont permis de mettre en évidence le mécanisme de *Silencing* du gène *AXIN2* dans le cancer colorectal avec instabilité microsatellite. L'analyse mutationnelle du gène d'*AXIN2* pour l'exon7 a révélé que seulement un échantillon possédait une mutation entraînant un changement dans le cadre de lecture. Ainsi, en plus de démontrer un lien entre le statut MSI-H et l'expression d'*AXIN2*, cette étude met également en lumière les multiples mécanismes d'altérations de l'expression de ce gène qui sont impliqués dans le processus

de tumorigenèse, soit les altérations génétiques et la méthylation du promoteur (Koinuma, Yamashita et al. 2006).

5.4 Instabilité microsatellite dans les tumeurs surrenaliennes

Il existe à ce jour deux études ayant abordées la question de l'instabilité microsatellite dans les tumeurs de la glande surrenale. Le groupe de Namour en 2006, analysa 21 tumeurs surrenaliennes bénignes (12 adénomes sécrétant de l'aldostérone, 7 tumeurs non sécrétants et 2 adénomes de Cushing) avec la série de marqueurs de Bethesda soit *BAT-25*, *BAT-26*, *D2S123*, *D5S346* et *D17S250*. Aucune tumeur avec instabilité microsatellite n'a cependant été détectée (Namour, Ayav et al. 2006). Une autre étude regroupant plusieurs types de tumeurs endocrines a analysé dans sa série 2 carcinomes et 2 adénomes surrenaliens qui se sont avérés également négatifs pour l'instabilité microsatellite (Kupka, Haack et al. 2008). Plusieurs marqueurs identifiés dans divers types de cancer avaient été utilisés : *BAT25*, *BAT26*, *D2S123*, *D5S346*, *D17S250*, *D2S443*, *D21S1436*, *DIS104*, *D3S1284*, *D11S1338*, mais étant donné le faible nombre d'échantillons analysés, il est difficile d'émettre une conclusion sur l'incidence des MSI-H dans les tumeurs cortico-surrenaliennes. Peu d'information est actuellement disponible sur l'incidence de l'instabilité microsatellite dans les tumeurs de la glande surrenale et ce champ de recherche demeure à ce jour pratiquement vierge.

6. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

6.1 Hypothèses de recherche

Lors de récentes études, nous avons mis en évidence, pour la première fois, l'implication de la voie de Wnt dans le cancer cortico-surénalien; avec 15 % des tumeurs sporadiques porteuses d'une mutation pour β -CATÉNINE (Tadjine, Lampron et al. 2008). La plupart des échantillons arborant une mutation de β -CATÉNINE démontrent également

une accumulation nucléo-cytoplasmique importante de cette protéine témoignant ainsi du potentiel activateur de ces mutations. Des mutations activatrices d'*AXIN2*, un gène suppresseur de tumeurs au sein de la voie de Wnt ont été rapportées dans plusieurs types de cancer comme le cancer colorectal, de l'ovaire endométrioïde, gastrointestinal, carcinome hépatocellulaire et l'hépatoblastome (Liu, Dong et al. 2000; Wu, Zhai et al. 2001; Taniguchi, Roberts et al. 2002; Suraweera, Robinson et al. 2006; Kim, Kim et al. 2009). Or, nous avons observé que plusieurs échantillons qui ne possédaient pas de mutation pour *β-CATÉNINE* détenaient néanmoins une accumulation nucléo-cytoplasmique de la protéine ; suggérant une dérégulation de la voie de signalisation de Wnt. En raison du rôle essentiel de cette voie de signalisation dans le développement des tumeurs, nous émettons l'hypothèse que d'autres composants de la voie de Wnt, tel que le gène suppresseur de tumeur *AXIN2* soit impliqués dans le développement des tumeurs du cortex surrénalien.

Dans les dernières années, de nombreuses études ont émis l'hypothèse d'un lien entre les altérations génétiques de la voie de Wnt et l'instabilité microsatellite, notamment dans le cas du cancer colorectal où ce type d'instabilité génétique contribue au développement de certaines tumeurs (Martensson, Oberg et al. 2007; Ortega, Moran et al. 2008). Or, des études sur l'analyse de l'instabilité microsatellite dans les tumeurs de la glande surrénale sont quasi inexistantes. En effet, seulement deux auteurs rapportent l'analyse de tumeurs surrénaliennes parmi leur cohorte de tumeurs analysée pour le MSI, qui comprenait respectivement 21 adénomes surrénaliens et 4 tumeurs surrénaliennes (2 carcinomes et 2 adénomes), sans résultat concluant (Namour, Ayav et al. 2006; Kupka, Haack et al. 2008). Étant donné un lien soutenu entre *AXIN2* et l'instabilité microsatellite dans des cas de cancer gastro-intestinal et colorectal, nous avons également émis l'hypothèse qu'une telle relation pourra être observée dans les tumeurs du cortex surrénalien (Koinuma, Yamashita et al. 2006; Kim, Kim et al. 2009).

6.2 Objectifs

Mon projet de recherche tente de déterminer dans un premier temps le rôle potentiel d'AXIN2, une protéine centrale de la voie de Wnt, dans le développement des tumeurs surrenaliennes. Plusieurs niveaux de régulation d'AXIN2 seront explorés afin de déterminer son implication dans le processus de tumorigenèse surrenalienne. Dans un second temps, une analyse de l'instabilité microsatellite des échantillons identifiés précédemment comme mutés pour la voie de Wnt sera réalisée afin de vérifier l'association entre les altérations de la voie de Wnt et le statut MSI dans les tumeurs cortico-surrenaliennes.

CHAPITRE II – ARTICLE NO.1

7. ARTICLE NO.1

*Manuscript to be submitted to Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,
November, 2010*

IDENTIFICATION OF GENETIC ALTERATIONS OF *AXIN2* GENE IN ADRENOCORTICAL TUMORS

Audrey Chapman, Julien Durand, Lydia Ouadi, Isabelle Bourdeau[¶]

Divisions of Endocrinology, Department of Medicine, Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, Quebec, Canada,

Keywords: Adrenocortical tumors, *AXIN2*, Wnt/ β -catenin signaling

Working title: *AXIN2* alterations in adrenocortical tumors

Original article, Word count: 2428 **Table:1** **Figures: 2**

The authors have nothing to disclose.

[¶] To whom correspondence should be addressed:

Isabelle Bourdeau, MD
Division of Endocrinology, Department of Medicine
Research Centre, CHUM Hôtel-Dieu
3850, Saint-Urbain Street, Montréal, Québec, Canada H2W 1T7
Tel.: (514) 890-8000 ext 14086
Fax: (514) 412-7204

ABSTRACT

Background. Mutations of the β -*CATENIN* gene (*CTNNB1*) which lead to constitutive activation of Wnt signaling have been recently described in adrenocortical adenomas (AA) and carcinomas (ACC). However, somatic *CTNNB1* mutations may explain only about 50% of *CTNNB1* accumulation that was described previously in adrenocortical tumors.

Objective. We hypothesised that others components of Wnt pathway may be altered in adrenocortical tumorigenesis.

Methods. We studied 49 human adrenocortical samples; 30 AA, 6 ACC, 5 PPNAD, 5 AIMAH and 3 ACTH-dependent hyperplasias in addition to the human ACC cell lines SW13 and H295R. Samples were screened for somatic genetic alterations in exon 3 of *CTNNB1* and exons 5, 7 and 9 of *AXIN2*. Immunohistochemical analysis of *CTNNB1* was performed and *AXIN2* expression was evaluated using real time-PCR and Western Blot analysis.

Results. We observed an in-frame 12-bp deletion beginning at nucleotide 2102 in exon 7 of *AXIN2* gene (c.2102_2113del12) in 2 out of 30 AA (7%), 1 out of 6 ACC (17%) and the ACC cell line H295R. The ACC tumor and cell line harbored in addition the S45P *CTNNB1* mutation. Immunohistochemical studies revealed that the tumors harboring *AXIN2* genetic defects showed nuclear/cytoplasmic accumulation of *CTNNB1* indicating an activation of Wnt signaling. mRNA and protein expression of *AXIN2* were decreased in tumors harboring *AXIN2* genetic defects and/or *CTNNB1* mutations.

Conclusion. This study suggests for the first time that *AXIN2* genetic defects may be found in adrenocortical tumors. However, the functional consequence of this genetic alteration remains to be determined.

INTRODUCTION

Although adrenocortical lesions may be associated with hereditary syndromes (Bourdeau 2004; Bertherat and Bertagna 2009), only few genetic alterations have been described in sporadic adrenocortical tumors. β -CATENIN (*CTNNB1*) gene mutations are found in 15% to 30,8% of sporadic adrenocortical adenomas (AA) and carcinomas (ACC) (Tissier, Cavard et al. 2005; Tadjine, Lampron et al. 2008; Masi, Lavezzo et al. 2009). Mutations in exon 3 of *CTNNB1* lead to abnormal nuclear and/or cytoplasmic accumulations of β -CATENIN protein and constitutive transcriptional activation of Wnt signaling (Tissier, Cavard et al. 2005; Tadjine, Lampron et al. 2008; Tadjine, Lampron et al. 2008). Somatic *CTNNB1* mutations may explain about 50% of Wnt activation that were observed in adrenocortical tumors (Tissier, Cavard et al. 2005; Tadjine, Lampron et al. 2008), suggesting that other components of the Wnt signaling pathway may be involved in adrenocortical tumorigenesis.

Mutations have been described in other components of the Wnt signaling pathway in various cancers such as in *APC*, *AXIN1* and *AXIN2* genes (Giles, van Es et al. 2003; Behrens and Lustig 2004; Polakis 2007). *AXIN2*, also named *Axil/conductin*, is a negative regulator of Wnt signaling by inducing the degradation of β -catenin (Behrens and Lustig 2004; Hughes and Brady 2005). *AXIN2* works as a scaffold protein and promotes the assembly of the multi-protein complex which included the APC, the serine/threonine kinase GSK3 β , *AXIN1* and *CTNNB1*. Once associated with the complex, *CTNNB1* is phosphorylated by the GSK3 β , which leads to its ubiquitination and degradation by the

proteasome complex. In addition, *AXIN2* is itself activated by Wnt/TCF signaling resulting in a negative feedback loop, which regulates the duration and intensity of Wnt/TCF activation (Jho, Zhang et al. 2002). Inactivating mutation of *AXIN2* have been identified in colorectal carcinomas, hepatocellular carcinomas, hepatoblastomas, melanomas, gastric cancer and ovarian endometrioid adenocarcinomas (Liu, Dong et al. 2000; Wu, Zhai et al. 2001; Taniguchi, Roberts et al. 2002; Suraweera, Robinson et al. 2006; Kim, Kim et al. 2009). Because adrenocortical tumors tend to show accumulation of CTNNB1 more often than *CTNNB1* mutations, we hypothesised that other components of Wnt pathway, as the negative regulator *AXIN2*, can be implicated in adrenocortical tumorigenesis. We report here for the first time, genetic alterations of *AXIN2* gene in adrenocortical adenomas and carcinoma.

MATERIALS AND METHODS

Patients, adrenocortical samples and cell lines

Tissue specimens were obtained from 49 patients with different types of adrenocortical lesions: 30 AA, 6 ACC, 5 ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasias (AIMAH), 5 primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) and 3 ACTH-dependent hyperplasias. All adrenal tissue samples were obtained from patients under research protocols approved by the Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Canada and, every patient signed informed consent. Adrenal tissues were obtained at surgery, frozen immediately in liquid nitrogen and stored for later use. Tissue sections were fixed in formalin and embedded in paraffin for histopathological analysis. Histopathological assessment of the adrenocortical samples followed current guidelines for the diagnosis of adrenocortical adenomas and carcinomas; all adenomas had a Weiss score < 2 (Schteingart, Doherty et al. 2005). The human adrenocortical cell line NCI-H295R and SW13 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA) were cultured as described earlier (Tadjine, Lampron et al. 2008).

DNA extraction, RNA extraction and cDNA preparation

Genomic DNA was isolated from frozen tissue by standard proteinase K/SDS digestion, followed by phenol/chloroform extraction. mRNA was obtained from frozen tissues using TriZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. cDNA was generated

using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) and random hexamers (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Mutational analysis of AXIN2 and CTNNB1 genes

Mutational studies were performed on 49 adrenocortical tissues including: 30 AA (1 non-secreting, 14 cortisol-secreting and 15 aldosterone-secreting), 6 ACC, 5 PPNAD, 5 AIMAH and 3 ACTH-dependent hyperplasias. The human adrenocortical cancer cell lines H295R and SW13 were also analysed. Exons 5, 7 and 9 coding regions of *AXIN2* gene were studied. According to the literature, all the *AXIN2* mutations described previously were localized in these 3 exons. *AXIN2* primers were as described previously except that primers (exons) 5-1 and 5-2 were combined as 5-3 and 5-4 (Liu, Dong et al. 2000). The DNA was performed employing TAQ DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) in a final volume of 25 ul with 200 ng of DNA in a buffer containing 0.3 μ M of each primer, 0,2 mM dNTP, 2mM MgCl₂ and 0,5 U/ μ l TAQ DNA polymerase. PCR program contained 5 min step followed by 35 amplifications for all primers (95°C/45s, annealing between 56-58°C/30s and 72°C/45s) and terminated by extension step of 72°C for 7 min. The amplicons were purified with the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA) and directly sequenced on an automated sequencer in both directions (SUCOF, Université Laval, QC, CA). All mutations were confirmed in at least 2 tissue extractions and at cDNA level using the following primer set: forward 5-TTATGCTTTGCACTACGTCCCTCCA-3 and reverse 5-CGCAACATGGTCAACCCTCAGAC-3 cDNA bands were extracted, purified and sequenced as above. *CTNNB1* mutational analysis of exon 3 was performed as described previously (Tadjine, Lampron et al. 2008).

Immunohistochemical analysis of CTNNB1

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue were available from 2 AA harboring *AXIN2* deletion for immunohistochemical analysis of CTNNB1. Tissue sections were deparaffinized with toluene, rehydrated through graded ethanol, treated with 3% H₂O₂ to eliminate endogenous peroxidase activity, and incubated for 17 min at 95°C in citrate buffer (pH 6.0) for antigen retrieval. Nonspecific antigens were blocked with a protein-blocking, serum-free reagent (Dako Diagnostics Canada, Inc., Mississauga, ON, Canada). The slides were then incubated for 60 min in a humidified chamber with specific mouse monoclonal anti-AXIN2 antibody (1:200; Conductin (C-6) sc-25302, Santa Cruz Biotechnology Inc., Delaware, CA) and monoclonal anti-β-CATENIN antibody (1:25, BD Transduction Laboratories, BD Biosciences, Mississauga, Canada). Twenty-minute incubations with secondary biotinylated antibody and streptavidin-horseradish peroxidase (Dako Diagnostics Canada, Inc.) followed sequentially. Reaction products were developed with diaminobenzidine containing 0.3% H₂O₂ as substrate for peroxidase. Hematoxylin counterstaining was included for ease of analysis. The negative controls included substitution of the primary antibody by PBS and an isotype control, IgG1 (Cymbus Biotechnology, Hampshire, UK). Ten consecutive fields (400×) of 2 slides of each tumour studied were examined independently under standard light microscopy by two readers, including a pathologist. Staining was quantified as a percentage of cells stained from 0 to 100% which represents a mean of the percentage found in 10 consecutive fields of 2 slides of each tissue.

Real-time RT-PCR quantification

We studied 22 adrenocortical tumors (20 AA, 2 ACC) and 8 normal adrenal glands by Real-time RT-PCR. From these tumours, 3 harbored *AXIN2* mutations, 5 *CTNNB1* mutations and 14 had wild-type *AXIN2* and *CTNNB1* genes. We used the Quantitect SYBR green RT-PCR kit (QIAGEN, Valencia, CA) and a Rotor Gene 3000 cycler (Corbett Research, Sydney, Australia) to perform the reactions following the manufacturer's protocols. We used QuantumRNA 18S internal standards (Ambion, Austin, TX) as internal controls. Results were normalized to a commercially available pool of normal adrenal glands (CLONTECH, Mountain View, CA). Primer sequences for *AXIN2* were 5'AGGCTTTGTGACCAAGCAGAC-3' for sens and 5'-GTGCCTTTCCCATTGCGTT-3' for anti-sens. The protocol for the Real-time PCR reaction was as follows: 15 min denaturation at 95 °C followed by 40 cycles of 15 sec at 95 °C, 30 sec at 59 °C, 45 sec at 72 °C, finished by a 7 min elongation at 72 °C. PCR reactions were performed at least twice. Specificity of the reaction was assessed for each run by running a melting curve analysis of the PCR products. Efficiency of the reaction was routinely measured with dilution curve of the reverse transcription reactions. Efficiency of the primer sequence of 99% was obtained for *AXIN2* primer pair and the expression ratios were determined with these efficiencies using the Pfaffl method (Pfaffl 2001). Real-time RT-PCR analysis was performed in triplicate on Rotor Gene 3000 Cycler (Corbett Research, Sydney, Australia). After quantification of the expression ratio and normalization of the values to 18S internal

standard expression, the relative mRNA expression of *AXIN2* in adrenocortical samples was compared to adrenocortical tumors without known Wnt mutations and tumors harboring *CTNNB1* mutations. Student T-Test with P-value $\leq 0,05$ was used to determine the significance of differences.

Preparation of protein lysate and Western Blot analysis

Western blot analysis of *AXIN2* was performed on one tumour harbouring the *AXIN2* c.2102_2113del12 genetic deletion and compared to 2 AA harboring *CTNNB1* mutations, an AA with wild-type *CTNNB1* and *AXIN2* genes, and one normal adrenal gland. Frozen adrenocortical tumors were homogenized in 1 ml of ice-cold 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8,0, containing 3mM EDTA and a mixture of protease inhibitors. The homogenates were centrifuged for 5 min at 10 000g to remove debris. A Bradford bioassay was performed to determine the protein concentration with BSA as standard. Ready gels (10%; in 40ul wells) were loaded with 25ug of prepared protein lysates using Biorad assembly (Bio-Rad, Mississauga, ON). Protein was transferred one hour and a half in ice to immobilon-PVDF membranes (Millipore, Bedford, MA) with the Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, Mississauga, ON) in transfer buffer (25mM Tris, 200mM glycine, 20% MeOH). Blots were then blocked for one hour in 5% non fat dry instant milk in Tris-buffered-saline. Next, blots were incubated with primary antibody overnight at 4°C at room temperature. Following incubation, blots were washed for 5 min, 3 times, in Tris-saline. One hour incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody in 5 % nonfat dry instant

milk. Another series of washes (3 x 5min) before blots were subjected to ECL detection (GE healthcare, Baie d'Urfe Qc), as recommended by the manufacturer. Western blot analysis was performed in duplicate.

RESULTS

AXIN2 genetic alterations occur in human adrenocortical tumors and the carcinoma cell line H295R

We found genetic alterations of *AXIN2* gene in 2/30 (7%) AA and 1/6 (17%) ACC. The genetic defect is an in-frame 12-bp deletion in exon 7 of *AXIN2* beginning at nucleotide 2102 (c.2102_2113del12). The deletion results in heterozygous loss of codons 671–674 (amino acids, RTTP) which contains 2 potential sites of phosphorylation (Figure 9A). We did not find *AXIN2* genetic alteration in PPNAD, AIMAH and ACTH-dependent hyperplasias tissues. However, we found the same deletion (c.2102_2113del12) in the DNA from the human ACC cell line NCI-H295R but not in SW13 cell line. Interestingly, the ACC and the H295R cells with *AXIN2* deletion (c.2102_2113del12) harbored in addition the activating *CTNNB1* mutation S45P (Table VIII) which affect a site of phosphorylation of β -catenin by GSK3 β . Genetic changes were confirmed by repeat DNA extraction, and sequenced in both the sense and anti-sense orientation and at the RNA level by RT-PCR and cDNA sequencing (Figure 9A). Two single nucleotide polymorphisms

were identified in exon7 of *AXIN2* at codon 688 (CTG→TTG) in 2 AA and 1 AIMAH and at codon 684 (GCG→GCA) in an AIMAH tissue. We did not find any genetic alterations in the exons 5 and 9 of *AXIN2*.

CTNNB1 protein is aberrantly expressed in adrenocortical tumors harboring genetic alterations of AXIN2

We observed nuclear (0,7% and 7,8% of cells) and cytoplasmic (87 and 91% of cells) CTNNB1 immunostaining in the 2 AA harboring *AXIN2* genetic alterations available for immunohistochemical studies indicating an activation of Wnt signaling (Figure 9B) as previously described in tumors harbouring *CTNNB1* mutations (Tissier, Cavard et al. 2005; Tadjine, Lampron et al. 2008).

AXIN2 expression is downregulated in adrenocortical tumors harbouring AXIN2 genetic alterations

Real-time RT-PCR studies showed *AXIN2* mRNA downregulation in adrenocortical tumors harbouring *AXIN2* c.2102_2113del12 genetic alteration (n:3) by 45 ± 15 % compared to normal adrenal glands (n:8) (P value <0.05) and by 36 ± 16 % compared to wild-type *AXIN2* AA and ACC (n:14) (P-value <0.05) (Figure 2A). In addition, *AXIN2* mRNA levels were decreased in adrenocortical tumors harboring *CTNNB1* activating mutations (n:5) by 38 ± 12 % compared to normal adrenal glands (P-value <0,001) and by 30 ± 13 % compared to wild-type *AXIN2* tumors (P-value < 0,05) (Figure 10A). By western blot, *AXIN2* protein

expression was decreased in an adrenocortical tumor harbouring the *AXIN2* genetic alteration (E128) and in two samples harbouring *CTNNB1* missense mutations compared to wild-type adrenocortical tumors and normal adrenal gland (Figure 10B).

DISCUSSION

Previous studies demonstrated that *CTNNB1* somatic mutations are frequent in AA and ACC but could not explain all cases of aberrant cytoplasmic and/or nuclear accumulation of β -catenin found in adrenocortical tumors (Tissier, Cavard et al. 2005; Tadjine, Lampron et al. 2008) suggesting that other components of the Wnt signaling pathway may also be involved in adrenocortical tumorigenesis.

We identified a 12 bp in-frame deletion in exon 7 of *AXIN2* (c.2102_2113del12) in 2 human AA, 1 ACC, and the H295R cells that has never been reported in adrenocortical tumors but was found previously in a hepatocellular carcinoma (Taniguchi, Roberts et al. 2002), a melanoma (Castiglia, Bernardini et al. 2008) and a colorectal cell line (Suraweera, Robinson et al. 2006). Although we did not have access to lymphocyte DNA in our study, these latest reports described the mutation as somatic. The functional consequence of c.2102_2113del12 has not been studied however it is localized in the polynucleotide tracts of exon 7 which is known as a common site for *AXIN2* mutations (Thorstensen, Lind et al. 2005). Exon 7 of *AXIN2* gene is the hypothetic binding site for the phosphatase PP2A which act as a positive regulator of Wnt pathway by dephosphorylation of AXIN1 and to some extent AXIN2. *AXIN2* (c.2102_2113del12) deletion leads to the removal of two threonine amino acid residue that could be the target of PP2A (Ikeda, Kishida et al. 1998; Willert, Logan et al. 1999; Audi, Olson et al. 2000).

We observed increased CTNNB1 cytoplasmic and nuclear accumulation in tumoral cells of AA harboring the 12pb deletion of *AXIN2* supporting an activation of Wnt signaling pathway in these tumors. Our findings are consistent with others studies where somatic *AXIN2* mutations were associated with nuclear translocation of β -catenin (Liu, Dong et al. 2000; Wu, Zhai et al. 2001; Taniguchi, Roberts et al. 2002; Koch, Weber et al. 2004; Koch, Hrychyk et al. 2007; Kim, Kim et al. 2009).

AXIN2 genetic alterations were found in 1 cortisol-secreting AA, 1 aldosterone-secreting AA and 1 cortisol-androgen-secreting ACC and the ACC H295R cell line. Interestingly, the ACC and the H295R cells harboured in addition the S45P *CTNNB1* mutation. The presence of genetic alterations of 2 components of Wnt signaling was somehow surprising. However, in colorectal cancer *AXIN2* mutations were found in a subgroup of tumors also containing either *APC* or *CTNNB1* contributing to further upregulation of Wnt activity compared to tumors containing only *APC* or *CTNNB1* genetic defects (Polakis 2007).

AXIN2 is a direct target gene and a known antagonist of the Wnt signaling pathway created by a negative feedback loop thus it is a major negative regulator of Wnt signal transduction (Lustig, Jerchow et al. 2002; Koch, Hrychyk et al. 2007). *AXIN2* is overexpressed in various types of cancers like hepatoblastomas, lung and colon cancers and reduced in others like medulloblastomas, breast, bladder, pancreas, prostate and colorectal carcinomas (Lustig, Jerchow et al. 2002; Koinuma, Yamashita et al. 2006; Koch, Hrychyk et al. 2007). In our study, *AXIN2* expression was decreased in tumor harboring the *AXIN2* c.2102_2113del12 as in tumors harboring activating *CTNNB1* mutations.

Previous studies demonstrated that a forced expression of Axin2 induced a marked suppression in the luciferase activity in colorectal carcinoma cell lines (Koinuma, Yamashita et al. 2006). Downregulation of *AXIN2* gene has also be associated to tumorigenesis and deregulation of Wnt signaling pathway in meduloblastomas (Koch, Weber et al. 2004). Decreased AXIN2 expression may be explained by its known negative feedback loop system which may lead to its inhibition following an activation of the Wnt/b-catenin signaling pathway in the presence of activating *AXIN2* and *CTNNB1* mutations.

In conclusion, this is the first study to report the presence of *AXIN2* genetic alterations in AA and ACC in addition to the H295R cell line with abnormal accumulation of CTNNB1 protein. The functional impact of these genetic changes remain to be determined as the significance of decreased expression of AXIN2 expression

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. André Lacroix, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montreal, Quebec, Canada, for providing adrenocortical samples. We thank Dr. Anne-Marie Mess-Masson and members of her laboratory for their assistance in the immunohistochemical studies as well as the MacDonald Stewart Foundation for photographic support. We thank Mimi Tadjine who performed mutational analysis of the adrenocortical tumors at the beginning of the project and Dr. Sophie Vallette for her helping discussion. The editing of our manuscript by Mr. x, Research Support Office, Research Centre, CHUM, is acknowledged. This study was supported by Grant FRSQ-6519/5360 from Fonds de la recherche en santé du Québec (PI: Dr. I. Bourdeau) and The Cancer Research Society (PI: Dr. I. Bourdeau).

FIGURE LEGENDS

Figure 9. (A) Nucleotide sequencing of exon 7 of *AXIN2* showing an heterozygous in-frame deletion of 12 pb (TTPR,472-476) starting at position 2102 in DNA and cDNA of a cortisol-secreting adenoma (E128) compared to wild-type sequence. (B) Immunohistochemical staining of *CTNNB1* showing nuclear and cytoplasmic immunoreactivity in the tumoral tissue with *AXIN2* c.2102_2113del12 suggesting an activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway (original magnifications: X400). (C) However, there was mainly membranous staining in the normal adrenal gland. nuclear cells (N→) and cytoplasmic immunoreactivity (C→)

Figure 10. (A) Real-time PCR revealed decreased expression of *AXIN2* in tumors harbouring *AXIN2* c.2102_2113del12 compared to adrenocortical tumors not known to harbour mutations of components of Wnt pathway and normal adrenal glands. Similarly *AXIN2* mRNA downregulation was found in tumors harbouring *CTNNB1* mutations. (B) Westernblot analysis showing decreased expression of *AXIN2* in tumors with *AXIN2* genetic alteration and *CTNNB1* mutations compared to tumors with wild-type *AXIN2* and *CTNNB1* genes and normal adrenal glands.

Figures and tables

Figure 9

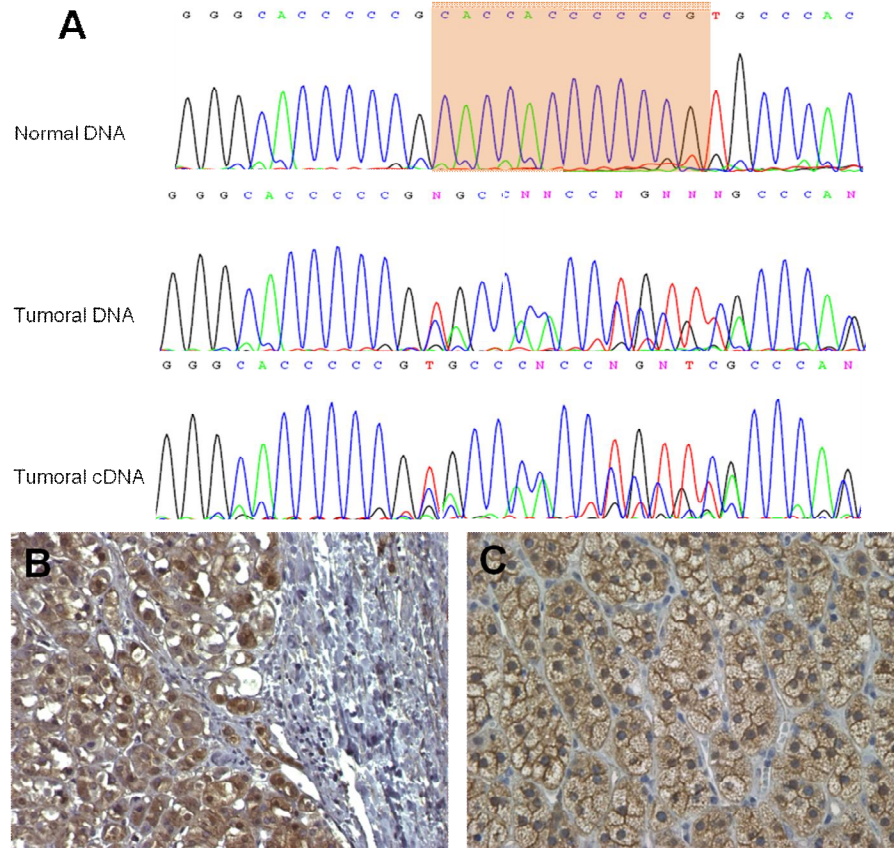
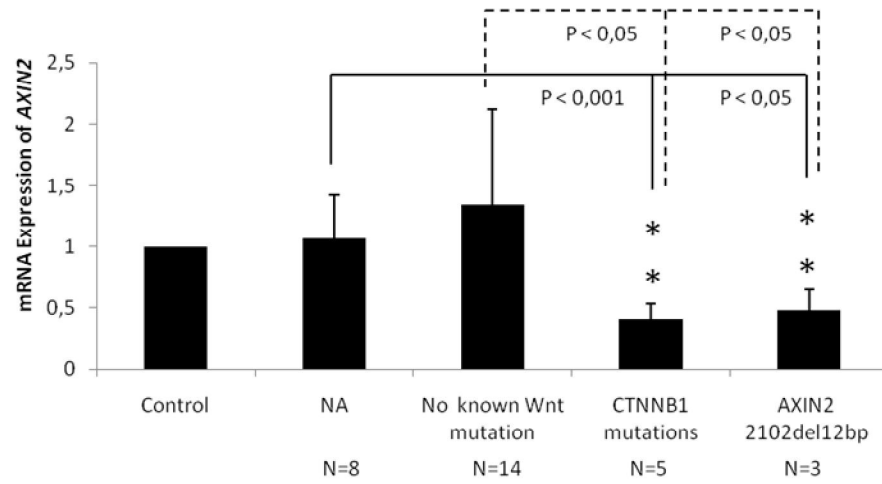


Figure 10

A



B

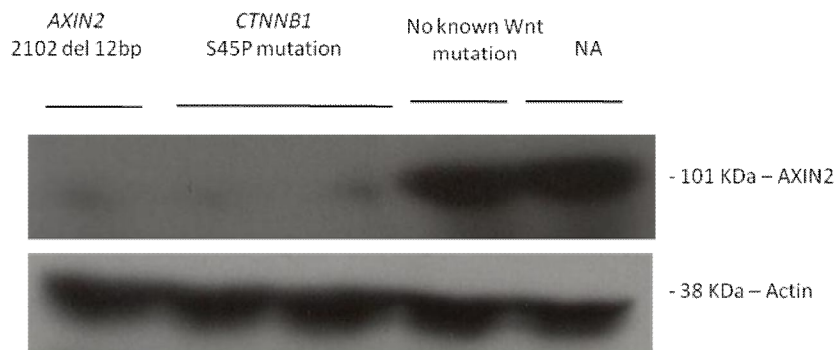


Table VII. *AXIN2*, *CTNNB1* mutation analysis and β -CATENIN staining in adrenocortical tumors

	Age	Sex	Diagnosis	<i>AXIN2</i> genetic alterations	<i>CTNNB1</i> mutations	<i>B-CATENIN</i> immunostaining
E123	38	F	Aldosterone- secreting adenoma	2102 del 12bp	No	N: 7,8%, C: 91%
E128	40	M	Cortisol-secreting adenoma	2102 del 12bp	No	N: 0,7%, C:87%
E193	49	F	Cortisol/ androgenes- secreting carcinoma	2102 del 12bp	S45P	NA
H295R			Human adrenocortical carcinoma cell line	2102 del 12bp	S45P	NA

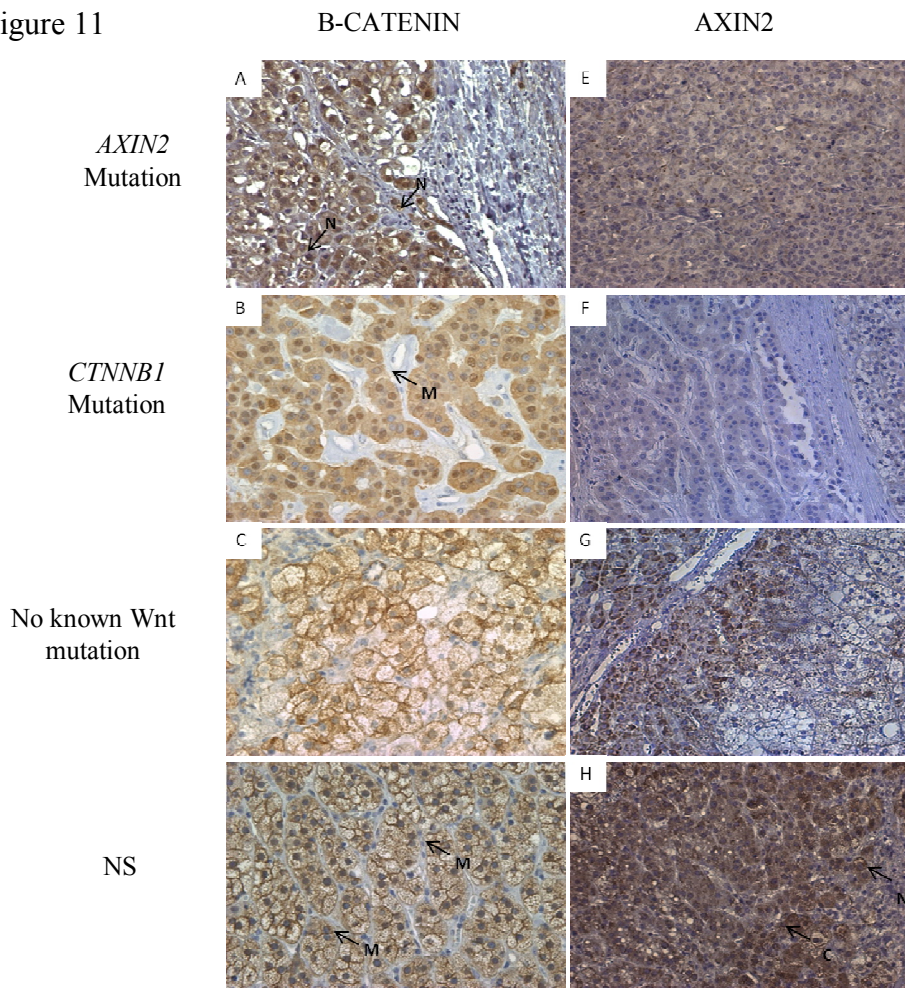
F :Female ; M :Male ; N :Nuclear ; C : Cytoplasmic ; NA : Not available

Supplemental data

Figure 11. Immunohistochemical staining of β -CATENIN and AXIN2 in *AXIN2* mutated tumors. A, B, C et D are β -CATENIN staining and E, F G and H are AXIN2 staining. A and E. Adrenocortical adenomas with *AXIN2* 12pb deletion in exon 7 showing nuclear and or cytoplasmic accumulation of β -CATENIN (A) and reduction of AXIN2 expression (E). B and F. Adrenocortical tumour with β -CATENIN mutation showing abnormal accumulation of β -CATENIN protein in the nucleus and the cytoplasm (B) and reduction of AXIN2 expression (F).C and G. Adrenocortical tumour without AXIN2 mutation showing normal membrane staining of β -CATENIN protein (C) and normal cytoplasmic AXIN2 protein staining (G). D and H. Normal adrenal gland with membrane staining of β -CATENIN(D) and cytoplasmic AXIN2 normal expression (H).

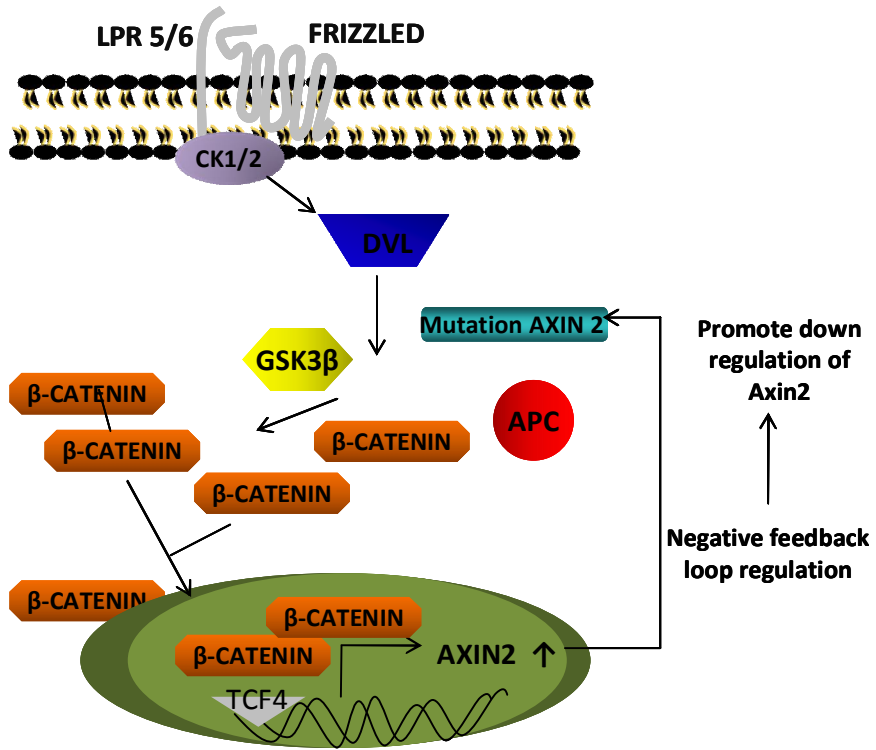
Figure 12. Model of Axin2 genetic alterations in adrenocortical tumors. Mutated Axin2 samples lost its ability as a scaffold protein and no longer promote the formation of the destruction complex. Accumulation of β -catenin at the cytoplasmic level and its translocation into the nucleus activates aberrant transcription of Wnt pathway target genes, as Axin2. Upregulation of Axin2 activates its negative feedback loop regulation in Wnt pathway which promotes its down regulation.

Figure 11



NS : normal adrenal gland

Figure 12



CHAPITRE III – MATÉRIEL ET MÉTHODES

8. Étude préliminaire de l'instabilité microsatellite dans les tumeurs surrenaliennes

8.1 Patients, échantillons de tumeurs cortico-surrenaliennes et lignée cellulaire de carcinomes surrenaliens humaines

Des spécimens de tissus ont été obtenus de 38 patients diagnostiqués avec divers types de lésions cortico-surrenaliennes : 27 adénomes, 4 carcinomes, 3 AIMAH et 4 PPNAD ainsi que 10 surrenales normales. Tous les échantillons de tissus ont été obtenus de patients sous un protocole de recherche approuvé par le Centre hospitalier de l'Université de Montréal Montréal, Canada et chaque patient a signé un consentement éclairé. La lignée cellulaire humaine de carcinomes cortico-surrenalien HAC15 a également été étudiée (Parmar, Key et al. 2008). La lignée cellulaire HAC15 a été cultivée tel que décrit précédemment (Parmar, Key et al. 2008). Les tissus surrenaliens ont été obtenus lors de chirurgies, congelés immédiatement dans du nitrogène liquide et entreposés pour un usage ultérieur. Des sections de tissus ont ensuite été fixées dans de la fomaline et emballées dans de la paraffine pour des analyses immunopathologiques. L'évaluation immunopathologique des tumeurs cortico-surrenaliennes respecte les critères actuels de diagnostic des adénomes et carcinomes cortico-surrenaliens. Ainsi tous les adénomes possèdent un score de Weiss \leq 2 (Schteingart, Doherty et al. 2005).

8.2 Analyse de l'instabilité microsatellite

L'ADN génomique fut isolé de tissus congelés par méthode standard de digestion par protéinase K/SDS, suivi d'une extraction phénol/chloroforme. Les deux marqueurs les plus prédictifs de MSI, compris dans le groupe de marqueurs de l'Institut national de cancer et dans l'essai multiplex de Bacher et Suraweera, soit les locus *BAT-25* et *BAT-26*, furent amplifiés (Boland, Thibodeau et al. 1998; Suraweera, Duval et al. 2002; Bacher, Flanagan

et al. 2004). Étant donné l'absence de tissu normal comparatif, les pentanucléotides *PentaC* et *PentaD* furent utilisés comme contrôle. Les amorces utilisées ont été décrites précédemment pour *BAT-25* et *BAT-26* (Suraweera, Duval et al. 2002) ainsi que *PentaC* et *PentaD* (Bacher, Flanagan et al. 2004). Chaque amorce anti-sens fut marquée par un des fluorophores FAX, VIC ou NED en position 5' (Figure VIII). Chaque séquence nucléotidique a été amplifiée avec la polymérase d'ADN TAQ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dans un volume final de 25ul avec 100ng d'ADN dans un tampon contenant 0,2µM de chaque amorce, 0,2mM dNTP, 1,5mM de MgCl₂ et 0,75U/ul d'ADN polymérase TAQ. Le programme de PCR pour *BAT-25* et *BAT-26* comprend une dénaturation à 94°C durant 3 min suivie d'une amplification de 35 cycles : 94°C pour 45sec, hybridation des amorces à 55°C pour 50sec et une extension à 72°C durant 50sec. Une étape finale d'extension a été réalisée à 72°C pour 3 min. Le programme pour les *PentaD* et *PentaC* comprend une dénaturation à 94°C durant 5 min suivie d'une amplification de 35 cycles : 94°C pour 30sec, hybridation des amorces à 57°C pour 30sec et une extension à 72°C durant 30sec. Une étape finale d'extension a été réalisée à 72°C pour 5 min. Les amplicons obtenus ont été vérifiés par électrophorèse sur gel avant d'être analysés par le séquenceur d'ADN par électrophorèse capillaire ABIM PRISM 3100 (Applied Biosystems PRISM 3100, Foster City.L.A., USA). Les échantillons ont été envoyés dans de la formamide déionisé tel que suggéré par Applied Biosystems accompagné du standard 500LIZ (Applied Biosystems, Foster City.L.A., USA). La taille des allèles a ensuite été estimée en utilisant le logiciel GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems, Foster City.L.A., USA).

8.3 Analyse mutationnelle de la voie de Wnt

L'exon 5, 7 et 9 du gène *AXIN2* et l'exon 3 du gène *β-CATÉnine* ont été analysés comme décrit précédemment dans le chapitre VI à la section matériels et méthodes de l'article *Identification of genetics alterations of AXIN2 in adrenocortical tumors*.

Tableau VIII : Tailles des produits de PCR et leurs marqueurs fluorescents respectifs pour les locus contenus dans l'essai MSI.

Nom du marqueur	No. Genbank	Gène	Motif répété	Taille produits de PCR (bp) ₁	Taille moyenne des allèles (bp) ₂	Marqueur fluorescent
BAT-26	U41210	hMSH2	(A) ₂₅	117-120	120	FAM
BAT-25	L04143	c-kit	(A) ₂₆	116-119	124	FAM
PentaC	AL138752	-	(AAAAG) ₃₋₁₅	175, 178	-	VIC
PentaD	ALC000014	-	(AAAAG) ₂₋₁₇	164, 200	-	NED

1 : Taille des allèles déterminée par l'ABI PRISM 3100 , analysée et calculée par le logiciel GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems, Foster City.L.A., USA).

2: Taille moyenne des allèles observés par Suraweera, Duval et coll..2002 pour *BAT-25* et *BAT-26*

Tiré de Bacher and al.. *Detection of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors.*2004, 20 :237-250 et de Suraweera and al.. *Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR.* 2002, 123:1804-1811.

CHAPITRE IV – RÉSULTATS

9. Résultats préliminaires des études d'instabilité microsatellite dans les tumeurs cortico-surréaliennes

Le profile allélique pour les marqueurs *BAT-26* et *BAT-25* a été réalisé dans une cohorte de 10 surrénales normales et 38 tumeurs cortico-surréaliennes dont 27 adénomes, 4 carcinomes, 4 PPNAD et 3 AIMAH) (Tableau IX). De ce groupe, 8 adénomes, 1 carcinome et 1 PPNAD étaient porteurs de mutations pour la voie de Wnt, soit pour *AXIN2* et/ou *β -CATÉLINE*. En l'absence d'ADN normal correspondant pour chaque échantillon, un contrôle positif permettant d'identifier l'échantillon a été effectué avec les marqueurs hautement polymorphiques *PentaC* et *PentaD*, selon le système pentaplexe sans ADN normal correspondant (Bacher, Flanagan et al. 2004). Un résultat positif pour l'instabilité microsatellite pour le marqueur *BAT-25* ou *BAT-26* a été constaté lorsqu'un variant allélique de taille plus petite était observé en concordance avec un contrôle positif conforme. Un échantillon est considéré hautement instable pour les régions répétées microsatellites lorsque ce dernier possède 2 locus mononucléotidiques instables ou plus (MSI-H). De l'instabilité détectée dans un seul des cinq locus mononucléotidiques analysés est considérée comme faiblement instable (MSI-L) (Bacher, Flanagan et al. 2004; Murphy, Zhang et al. 2006). Dans notre analyse préliminaire, étant donné que seulement 2 locus mononucléotidiques ont été analysés, soit *BAT-25* et *BAT-26*, sur les cinq du système de détection des microsatellites par méthode pentaplex ; il est possible d'identifier des échantillons MSI-H seulement si ceux-ci sont positifs pour les deux marqueurs. Il est cependant impossible d'identifier un échantillon MSI-L sans analyser les 3 autres marqueurs *NR-21*, *NR-24* et *MONO-27* du système pentaplexe.

Pour chaque locus mononucléotidique ainsi que les contrôles pentanucléotidiques, le logiciel GeneMapper 3.7 a été utilisé afin de calculer la taille du produit de PCR en

comparaison avec la taille des standards internes. Parmi les 38 tumeurs analysées, 3 se sont avérées instables pour le marqueur *BAT-26* tandis qu'une seule tumeur cortico-surrénalienne était également instable pour le marqueur *BAT-25* (Tableau IX et figure 13). La fréquence des MSI, c'est-à-dire un marqueur positif entre *BAT-25* et/ou *BAT-26*, dans le groupe des tumeurs porteuses d'altérations génétiques pour la voie de Wnt est de 10 % (1/10) ; ce qui n'est pas significativement différent du groupe des tumeurs non mutées pour la voie de Wnt, qui est de aussi de 10 % (3/28) (Tableau X). Enfin, un seul échantillon, soit un AIMAH, s'avère MSI-H avec au moins 2 locus mononucléotidiques instables, soit les deux marqueurs analysés dans cette étude préliminaire (Figure 13).

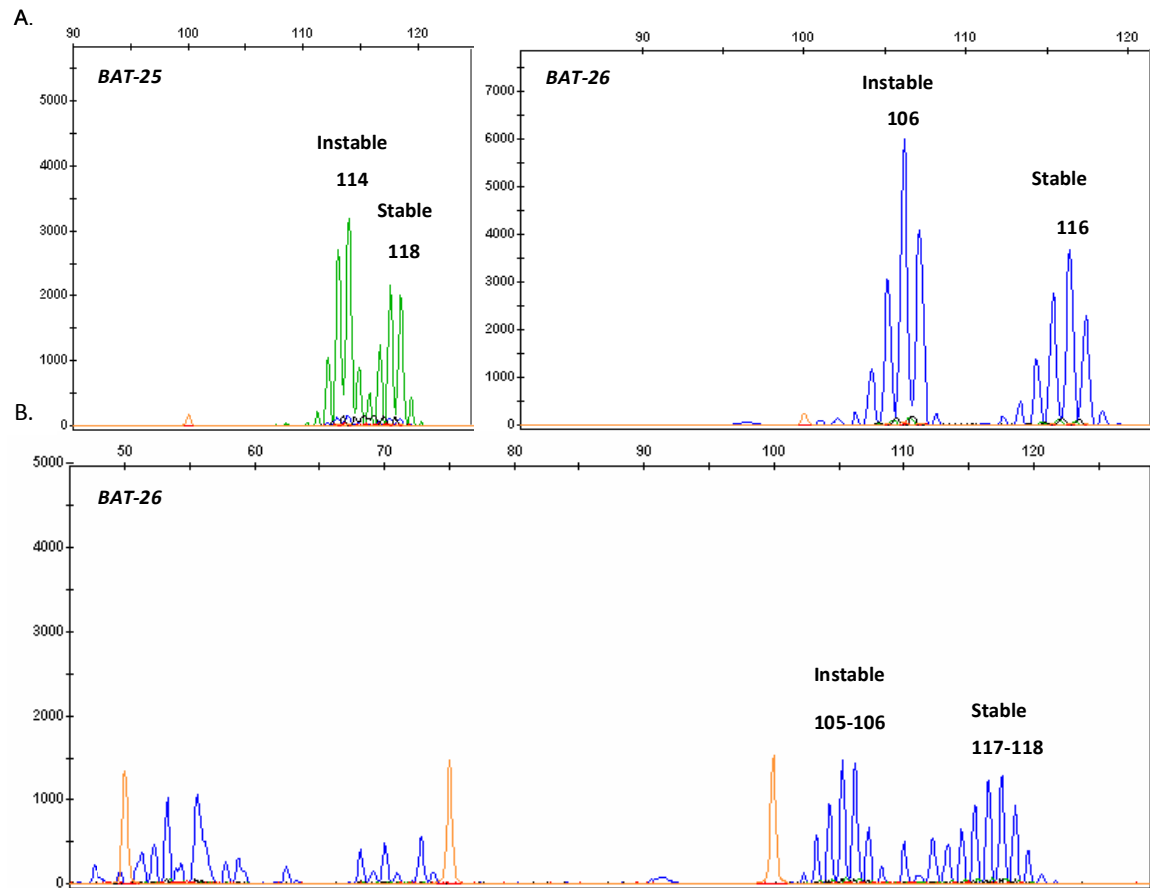


Figure 13: Instabilité microsatellite pour les marqueurs *BAT-25* et *BAT-26* dans les tumeurs cortico-surréaliennes. A. Tumeur AIMAH MSI-H, pour les marqueurs *BAT-25* et *BAT-26*. B. Instabilité microsatellite pour le marqueur *BAT-26* dans un adénome cortico-surrénalien sécrétant de l'adostérone

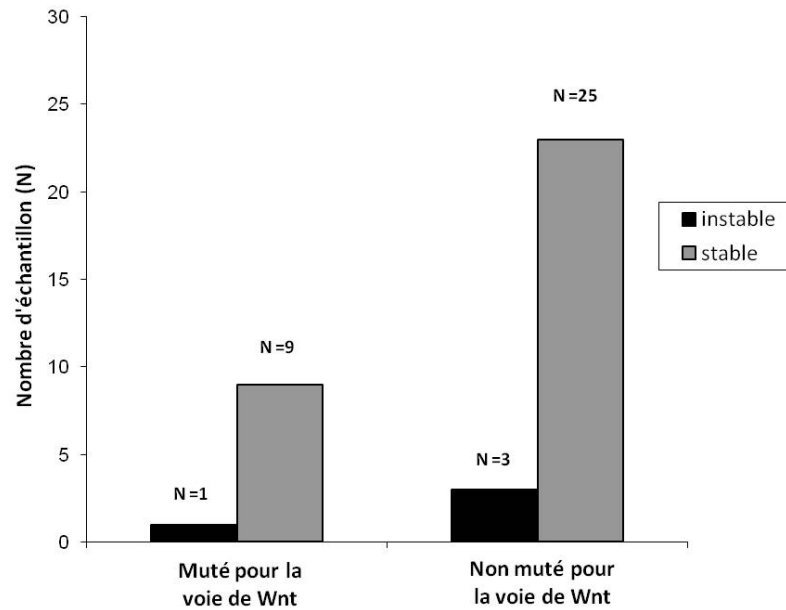
Tableau IX. Instabilité microsatellite pour les locus *BAT-25* et *BAT-26* dans les tumeurs cortico-surréaliennes

Échantillon	Marqueur MSI			
	<i>BAT-25</i>		<i>BAT-26</i>	
	MSI	MSS	MSI	MSS
Adénome	-	27	3	24
Carcinome	-	4	-	4
PPNAD	-	4	-	4
AIMAH	1	2	1	2
SN	-	10	-	10
Sous-total	1	47	4	44
Total	48			

MSI : Instable pour *BAT-25* et/ou *BAT-26*

MSS : Stable pour *BAT-25* et/ou *BAT-26*

Tableau X. Instabilité microsatellite des locus *BAT-25* et *BAT-26* dans les tumeurs cortico-surréaliennes avec et sans altérations génétiques pour la voie de signalisation Wnt.



Instable: Instable pour *BAT-25* et/ou *BAT-26*; Stable : Stable pour *BAT-25* et/ou *BAT-26*

CHAPITRE V – DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous avons précédemment rapporté que des mutations somatiques de β -CATÉNINE étaient fréquentes dans les tumeurs cortico-surréaliennes, mais que ces altérations génétiques ne pouvaient expliquer plusieurs cas où une activation de la voie de signalisation Wnt était observée par une accumulation nucléo/cytoplasmique de la protéine β -CATÉNINE (Bourdeau I, L. A., Tadjine M. (October 25-29, 2005) *Mutations and interstitial deletions involving Exon 3 of the beta-catenin gene are detected in sporadic adrenocortical tumors.*, In *The 55th ASHG Annual Meeting.*, Salt Lake City, Utah, USA.)(Tadjine, Lampron et al. 2008). Le groupe de Tissier a également observé que la localisation anormale de β -CATÉNINE était plus fréquente dans les carcinomes que dans les adénomes chez 75 % des échantillons étudiés (Tissier, Cavard et al. 2005). Ces observations ont suggéré fortement que d'autres composants de la voie de Wnt pourraient aussi contribuer à la tumorigenèse surrénalienne et plus spécifiquement au développement des carcinomes cortico-surréaliens.

Des mutations dans le gène *AXIN2* ont été trouvées dans plusieurs types de cancer. Dans le cancer colorectal avec défauts dans le système de réparation de l'ADN, des mutations d'*AXIN2* altérant le cadre de lecture et des délétions dans l'exon 7 du gène ont été rapportées dans une proportion respective de 24 % et 11 % (Liu, Dong et al. 2000; Suraweera, Robinson et al. 2006). Des mutations somatiques du gène *AXIN2* ont aussi été observées dans des adénocarcinomes de l'endomètre ovarien où le même changement dans le cadre de lecture de l'exon 7 fut trouvé dans une tumeur (2 %) (Wu, Zhai et al. 2001). Enfin, des altérations génétiques d'*AXIN2* sont aussi présentes dans l'hépatoblastome, le cancer gastrique, le médulloblastomes (28,1%) et le cancer hépatocellulaire où des mutations dans l'exon 9 ont été observées (Liu, Dong et al. 2000; Wu, Zhai et al. 2001; Taniguchi, Roberts et al. 2002; Koch, Weber et al. 2004; Suraweera, Robinson et al. 2006; Koch, Hrychuk et al. 2007; Kim, Kim et al. 2009).

Dans la présente étude, nous avons examiné 49 échantillons de tumeurs cortico-surréaliennes soit 30 adénomes, 6 carcinomes, 5 AIMAH, 3 hyperplasies ACTH-dépendantes et 5 PPNAD pour des mutations d'*AXIN2*. Nous avons trouvé une délétion de 12pb dans l'exon 7 d'*AXIN2* dans 7 % des adénomes (2/30) et dans 17 % des carcinomes étudiés (1/6) (Table VII et figure 9A). Une délétion de 12pb dans l'exon7 a aussi été observée dans la lignée cellulaire de carcinomes humains H295R, contenant déjà une mutation ponctuelle pour β -CATÉNINE. De manière très intéressante, le seul carcinome identifié dans notre cohorte de tissus étudiés comme porteur de mutation d'*AXIN2* contient aussi, tout comme la lignée cellulaire H295R, une mutation activatrice pour β -CATÉNINE tandis que les deux autres tumeurs avec uniquement des mutations d'*AXIN2* sont des adénomes. La même délétion de 12pb dans l'exon7 du gène *AXIN2* a déjà été rapportée dans le cancer colorectal et dans le cancer hépatocellulaire (Taniguchi, Roberts et al. 2002; Suraweera, Robinson et al. 2006). À notre connaissance, nous sommes les premiers à décrire des altérations génétiques d'*AXIN2* dans les adénomes et carcinomes cortico-surréaliens.

Dans un second temps, nous avons analysé l'impact fonctionnel de cette mutation dans les tumeurs cortico-surréaliennes par marquage immunohistochimique de la protéine β -CATÉNINE. Nous avons observé une accumulation de la protéine β -CATÉNINE dans le noyau des cellules tumorales dans les deux échantillons contenant uniquement la mutation pour *AXIN2*, mais pas dans le tissu normal correspondant ni dans les échantillons ne contenant aucune mutation pour *AXIN2* ou β -CATÉNINE (Figure 11). Ces résultats suggère que tout comme les mutations ponctuelles déjà rapportées de β -CATÉNINE, les mutations d'*AXIN2* aboutissent à une accumulation nucléaire et/ou cytoplasmique anormale de la protéine β -CATÉNINE et ainsi semblent contribuer à la dérégulation de la voie de signalisation Wnt. Nos résultats sont consistant avec d'autres études où des mutations somatiques d'*AXIN2* sont associées avec une translocation nucléaire de β -CATÉNINE et un

rôle potentiel dans le développement tumorale (Liu, Dong et al. 2000; Wu, Zhai et al. 2001; Taniguchi, Roberts et al. 2002; Koch, Weber et al. 2004; Suraweera, Robinson et al. 2006; Koch, Hrychyk et al. 2007; Kim, Kim et al. 2009). L'exon7 du gène *AXIN2* est le site hypothétique de liaison pour la phosphatase PP2A qui agit comme régulateur positif de la voie de Wnt en déphosphorylant AXIN1 et par extension AXIN2 (Ikeda, Kishida et al. 1998; Willert, Logan et al. 1999). La délétion de 12pb observée dans les 2 adénomes et 1 carcinome cortico-surréaliens correspond au retrait de deux acides aminés thréonine qui pourraient être les cibles de déphosphorylation de PP2A. Néanmoins, à ce jour nous n'avons qu'une faible compréhension des interactions d'*AXIN2* avec les autres composants de la voie de signalisation de Wnt et même avec d'autres voies de signalisation, ce qui suggère que d'autres travaux de recherche sont nécessaires afin de valider cette hypothèse.

Les mutations d'*AXIN2* ont été observées dans deux adénomes cortico-surréaliens sécrétants, ce qui corrèle avec notre étude précédente où nous avons observé que 80 % des adénomes possédant des mutations activatrices pour β -*CATÉnine* étaient fonctionnels en sécrétant soit du cortisol ou de l'aldostérone (Tadjine, Lampron et al. 2008). De manière intéressante, la lignée cellulaire de carcinomes humains H295R et le seul carcinome contenant la délétion de 12bp d'*AXIN2* étaient également porteurs d'une mutation ponctuelle pour β -*CATÉnine* (*CTNNB1* S45P). L'accumulation de mutations dans la voie de signalisation Wnt menant à la dérégulation de celle-ci pourrait expliquer en partie la prévalence d'accumulation anormale de β -*CATÉnine* dans le noyau et/ou le cytoplasme dans les carcinomes cortico-surréaliens. Étant donné que les altérations génétiques d'*AXIN2* sont nouvellement identifiées dans les tumeurs cortico-surréaliennes incluant les adénomes et carcinomes, cette étude permet également d'ajouter un élément en faveur de l'hypothèse supportant un processus de tumorigenèse à multi étapes qui ne fait pas encore consensus dans les tumeurs cortico-surréaliennes (Libe and Bertherat 2005; Herbet, Feige et al. 2009). Enfin, étant donné le nombre restreint d'échantillons trouvés mutés lors de cette étude, il est difficile de conclure sur l'impact d'une double mutation des composants

de Wnt (*AXIN2* et β -*CATÉENINE*) tel que décrit dans un carcinome cortico-surrénalien et dans la lignée cellulaire humaine de carcinome cortico-surrénalien H295R. Même si cela pourrait suggérer une implication vers la progression au stade malin des tumeurs du cortex surrénalien, une étude mutationnelle sur un plus grand nombre de carcinomes serait nécessaire afin de confirmer cette observation.

AXIN2 est un régulateur négatif majeur de la voie de signalisation de Wnt notamment par son habileté à promouvoir la dégradation de β -*CATÉENINE*. En fait, *AXIN2* est également un gène cible direct de la voie de Wnt et un antagoniste bien connu de cette voie par la formation d'une boucle de rétro-inhibition négative (Figure 3). L'expression d'*AXIN2* semble varier selon le type de cancer puisqu'une surexpression d'*AXIN2* est observée dans certains cancers comme l'hépatoblastomes, le cancer du poumon et du côlon; et semble plutôt réduite dans d'autres types de cancers comme celui du médulloblastomes, du sein, du pancréas, de la prostate et colorectal (Lustig, Jerchow et al. 2002; Koinuma, Yamashita et al. 2006; Koch, Hrychuk et al. 2007). Dans notre étude, l'expression d'*AXIN2* dans les tumeurs mutées pour *AXIN2* était réduite comparativement aux tumeurs sans mutation pour *AXIN2* et aux glandes surrénales normales (Figure 10 et 11). La réduction dans l'expression d'*AXIN2* a tout d'abord été observée par analyse de marquage immunohistochimique et ensuite confirmée par *Western Blot* (Figure 10 et 11). L'analyse quantitative par *Real-time RT-PCR* a également démontré une réduction de $36 \pm 16\%$ l'expression d'*AXIN2* au niveau de l'ARNm comparativement aux tumeurs non mutées (Figure 10A). De manière surprenante, l'analyse de l'expression d'*AXIN2* dans les échantillons mutés pour ce gène est comparable à celle des échantillons possédant des mutations ponctuelles pour β -*CATÉENINE* ($30 \pm 16\%$) (Figure 10A). En effet, l'expression d'*AXIN2* est significativement réduite dans les tumeurs cortico-surrénaliennes possédant une mutation ponctuelle pour β -*CATÉENINE* ou une délétion de 12pb pour *AXIN2*. Cette observation met en lumière le rôle prépondérant d'*AXIN2* au sein de la voie de Wnt dans les tumeurs cortico-surrénaliennes. Dans des études précédentes, il a été démontré que

l'expression induite d'*AXIN2* conduisait à une suppression marquée de l'expression d'*AXIN2* dénotée par l'activité luciférase dans des lignées cellulaires de carcinomes colorectaux (Koinuma, Yamashita et al. 2006). La réduction dans l'expression d'*AXIN2* a également été associée à la tumorigenèse et à la dérégulation de la voie de Wnt dans le méduloblastome (Koch, Weber et al. 2004).

La relation observée entre les mutations d'*AXIN2* menant à une dérégulation de la voie de Wnt et la réduction d'expression d'*AXIN2* peut s'expliquer par le système de boucle de rétro-inhibition négative qui répond à une augmentation de l'activation de la voie par son inhibition. Dans le cas qui nous intéresse, les mutations activatrices d'*AXIN2* et de β -*CATÉLINE* mènent à une augmentation de la transcription des gènes cibles de la voie de Wnt tel qu'*AXIN2* ; qui par sa boucle de rétro-inhibition tente de réguler l'activation aberrante de Wnt en inhibant l'expression d'*AXIN2* (Figure 12). Il est évident que davantage de recherches telles que des essais cellulaires avec un vecteur contenant la mutation d'*AXIN2* seule sont nécessaires afin de confirmer cette relation encore hypothétique. Finalement, une expression réduite d'*AXIN2* a également été observée dans une faible proportion de tumeurs ne possédant pas de mutations pour *AXIN2* ou β -*CATÉLINE*, ce qui suggère que d'autres mécanismes de régulation d'*AXIN2* comme le *silencing* épigénétique ou l'expression différentielle des régions UTR pourraient être impliqués dans ce processus (Hughes and Brady 2005; Koinuma, Yamashita et al. 2006).

Dans quelques études, les altérations génétiques d'*AXIN2* sont associées à un groupe de tumeurs contenant du MSI-H, notamment dans le cancer colorectal et gastrique. (Kim, Kim et al. 2009). Dans le but de tenter d'établir une relation entre les altérations génétiques de la voie de signalisation Wnt/ β -*CATÉLINE* et l'instabilité microsatellite, un groupe de 11 tumeurs cortico-surréaliennes contenant des mutations activatrices pour le gène *AXIN2* et/ou β -*CATÉLINE* ont été étudiées. Des changements dans la capacité de réparer l'ADN endommagé, se traduisant par des défauts dans le système de réparation de

l'ADN, ont été associés avec le développement de certains types de tumeurs (Imai and Yamamoto 2008). Ces défauts dans le système de réparation de l'ADN peuvent accélérer l'accumulation de mutations dans des gènes clés et favoriser la progression d'une tumeur bénigne vers un stade plus malin. Des études récentes indiquent qu'une variété de tumeurs sporadiques présente fréquemment de l'instabilité microsatellite associée à des défauts du système de réparation de l'ADN. À ce jour, seulement deux études sur les tumeurs cortico-surréaliennes se sont penchées sur l'incidence de l'instabilité microsatellite dans ce type de cancer (Namour, Ayav et al. 2006; Kupka, Haack et al. 2008). À notre connaissance, nous sommes le premier groupe à rapporter l'incidence de l'instabilité microsatellite dans une cohorte aussi importante de tumeurs sporadiques cortico-surréaliennes, soit 48 échantillons regroupant plusieurs types de lésions et 10 surrénales normales. Dans notre étude préliminaire, nous avons tout d'abord inclus les deux marqueurs mononucléotidiques les plus prédictifs d'instabilité microsatellite (*BAT-25* et *BAT-26*) identifiés dans d'autres types de cancer où l'importance des défauts dans le système de réparation a déjà été démontrée. En effet, dans la majorité des études, l'analyse des motifs répétés mononucléotides *BAT-25* et *BAT-26* est suffisante pour établir le statut MSI-H sans référence à l'ADN germlinal normal, puisque ces marqueurs sont quasi mono-morphiques dans la plupart des populations caucasiennes (Hoang, Cottu et al. 1997; Zhou, Fang et al. 1998; Suraweera, Duval et al. 2002).

Dans notre étude préliminaire, le marqueur *BAT-26* se retrouve instable dans 11 % des cas, soit 4 tumeurs sporadiques du cortex surrénalien sur 38. Trois des échantillons instables pour le marqueur d'instabilité *BAT-26* sont respectivement des adénomes sécrétant de l'aldostérone et 1 AIMAH (Tableau IX, Figure 13). De manière surprenante, l'échantillon AIMAH s'est révélé également instable pour le marqueur *BAT-25*, ce qui confirme son statut de MSI-H (Tableau IX et figure 13). Les lésions de type AIMAH sont rares et souvent associées à une forme classique ou atypique du syndrome de Cushing (Bourdeau 2004). Bien qu'aucune mutation des composantes de la voie de Wnt n'a été

identifiée dans l'AIMAH jusqu'à présent, nous avons précédemment rapporté la présence d'un profil aberrant d'expression des gènes de Wnt/ β -CATÉLINE dans cette pathologie (Bourdeau 2004). Le rôle du statut MSI-H retrouvé dans un cas de AIMAH demeure à être déterminé. Également, de manière surprenante, les trois échantillons se retrouvant instables uniquement pour le marqueur *BAT-26* sont tous des adénomes sécrétant de l'aldostérone. Il devient ainsi très intéressant pour ces échantillons de compléter l'étude préliminaire avec les trois autres marqueurs de l'essai pentaplexe *NR-21*, *NR-24* et *MONO-27*.

Seulement 1 échantillon muté pour la voie de Wnt se retrouve instable sur les 10 tumeurs analysées avec des altérations génétiques dans la voie de signalisation Wnt (Tableau X). Il est donc impossible à ce jour d'établir un lien quelconque entre le statut MSI et une dérégulation de la voie de signalisation Wnt comme ceci avait déjà été rapporté dans d'autres types de tumeurs. Étant donné que la relation entre le statut microsatellite et la voie de signalisation Wnt semble diverger, il est à considérer que dans le cas des tumeurs sporadiques cortico-surréaliennes, le statut MSI pourrait être davantage associé à un pronostic favorable comme il semble être le cas pour certains types de cancers, notamment les cancers sporadiques colorectaux (Gafa, Maestri et al. 2000; Soussi 2000; Martensson, Oberg et al. 2007). Ainsi, une étude plus approfondie mettant en relation le statut d'instabilité microsatellite et les données de survie clinique pourrait s'avérer très intéressante.

Malgré la faible incidence d'instabilité microsatellite dans cette première étude pour les tumeurs sporadiques du cortex surrénalien, les résultats préliminaires ont néanmoins révélé des pistes de recherche intéressante. Il serait ainsi intéressant de compléter l'analyse des trois autres marqueurs de l'essai pentaplex, soit *NR-21*, *NR-24* et *MONO-27*. En effet, des tailles alternatives d'allèles pour *BAT-25* et *BAT-26* ont été observées respectivement dans 18,4 % et 12,6 % de la population américaine (Perucho 1999; Pyatt, Chadwick et al. 1999; Samowitz, Slattery et al. 1999). Des polymorphismes pour ces deux marqueurs ont

également été observés avec un faible pourcentage dans la population caucasienne (Zhou, Fang et al. 1998; Samowitz, Slattery et al. 1999; Sood, Holmes et al. 2001). Ainsi, *BAT-25* et *BAT-26* ne sont pas suffisants pour déterminer le statut MSI-H dans toutes les populations. Comme peu de littérature est disponible sur la prévalence des MSI dans les tumeurs surrenaliennes, ni sur les marqueurs les plus révélateurs de cette instabilité, il est pertinent d'étudier d'autres locus. Il est également important de souligner que le système d'analyse des MSI comprenant les cinq marqueurs mononucléotidiques dont les locus *BAT-25* et *BAT-26* ont été établis principalement dans le cancer colorectal et gastro-intestinal (Boland, Thibodeau et al. 1998; Murphy, Zhang et al. 2006). De plus, différents marqueurs d'instabilité microsatellite ont été plus spécifiquement associés à d'autres types de tumeurs. Ainsi, 3 locus différents de ceux mentionnés dans l'essai pour le cancer colorectal sont utilisés dans le cancer du sein (D2S443, D21S1436 et D1S104) (Siah, Quinn et al. 2000). Dans cette optique, mis à part les marqueurs proposés par l'essai multiplex, d'autres locus répétés associés à l'instabilité microsatellites seraient peut-être davantage représentatifs pour les tumeurs cortico-surrenaliennes et devraient être considérés.

En conclusion, nous avons observé pour la première fois, dans une proportion de 8% (3/36) des mutations d'*AXIN2* dans notre cohorte d'adénomes et de carcinomes sporadiques cortico-surrenaliennes (2/30 chez les adénomes et 1/6 chez les carcinomes) ; aboutissant à une expression aberrante de la protéine β -CATÉNINE dans le noyau et/ou le cytoplasme des cellules tumorales. Une faible expression d'*AXIN2* aussi bien au niveau protéique que de l'ARNm, fut associée à cette mutation. Un carcinome ainsi que la lignée cellulaire de carcinome surrenalien humaine H295R mutés pour *AXIN2* contenaient également une mutation ponctuelle pour *β -CATÉNINE* contrairement aux deux autres adénomes sécrétant retrouvés seulement mutés pour *AXIN2*. Aucune association entre les altérations de la voie de Wnt et le statut préliminaire MSI des tumeurs cortico-surrenalines n'a pu être établie. Néanmoins, cette étude préliminaire a permis d'observer un AIMAH avec MSI-H ainsi que trois adénomes sécrétant de l'aldostérone instables pour

le locus *BAT-26*. Ces travaux ont permis une meilleure compréhension des mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans la tumorigenèse du cortex surrénalien et pourraient conduire aux développements de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques dans la prise en charge des patients atteints de tumeurs cortico-surréaliennes. En effet, on peut penser qu'un dépistage des gènes de la voie de Wnt pourrait s'avérer révélateur de l'issue clinique du patient dans le futur. Également, dans un but thérapeutique, des inhibiteurs de la voie de Wnt pourraient être développés comme agent de traitement combiné à d'autres agents tel que le mitotane qui est actuellement utilisé dans le traitement des patients atteints de carcinome cortico-surréaliens.

CHAPITRE VI - RÉFÉRENCES

- Allolio, B. and M. Fassnacht (2006). "Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update." J Clin Endocrinol Metab **91**(6): 2027-37.
- Amit, S., A. Hatzubai, et al. (2002). "Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway." Genes Dev **16**(9): 1066-76.
- Aubert, S., A. Wacrenier, et al. (2002). "Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors." Am J Surg Pathol **26**(12): 1612-9.
- Audi, S. H., L. E. Olson, et al. (2000). "Toluidine blue O and methylene blue as endothelial redox probes in the intact lung." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(1): H137-50.
- Bacher, J. W., L. A. Flanagan, et al. (2004). "Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors." Dis Markers **20**(4-5): 237-50.
- Bajpai, R., K. Makhijani, et al. (2004). "Drosophila Twins regulates Armadillo levels in response to Wg/Wnt signal." Development **131**(5): 1007-16.
- Behrens, J. and B. Lustig (2004). "The Wnt connection to tumorigenesis." Int J Dev Biol **48**(5-6): 477-87.
- Bernard, M. H., S. Sidhu, et al. (2003). "A case report in favor of a multistep adrenocortical tumorigenesis." J Clin Endocrinol Metab **88**(3): 998-1001.
- Bertherat, J. and X. Bertagna (2009). "Pathogenesis of adrenocortical cancer." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **23**(2): 261-71.
- Bertherat, J., L. Groussin, et al. (2003). "Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity." Cancer Res **63**(17): 5308-19.
- Beuschlein, F., M. Reincke, et al. (1994). "Clonal composition of human adrenocortical neoplasms." Cancer Res **54**(18): 4927-32.
- Blanes, A. and S. J. Diaz-Cano (2006). "DNA and kinetic heterogeneity during the clonal evolution of adrenocortical proliferative lesions." Hum Pathol **37**(10): 1295-303.
- Boland, C. R., S. N. Thibodeau, et al. (1998). "A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition:

- development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer." Cancer Res **58**(22): 5248-57.
- Bornstein, S. R., M. Ehrhart-Bornstein, et al. (1991). "Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland." Cell Tissue Res **265**(1): 1-9.
- Bornstein, S. R., J. A. Gonzalez-Hernandez, et al. (1994). "Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions." J Clin Endocrinol Metab **78**(1): 225-32.
- Boulle, N., A. Logie, et al. (1998). "Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors." J Clin Endocrinol Metab **83**(5): 1713-20.
- Bourdeau, I. (2004). "Clinical and molecular genetic studies of bilateral adrenal hyperplasias." Endocr Res **30**(4): 575-83.
- Bourdeau, I., S. R. Antonini, et al. (2004). "Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators." Oncogene **23**(8): 1575-85.
- Bovio, S., A. Cataldi, et al. (2006). "Prevalence of adrenal incidentaloma in a contemporary computerized tomography series." J Endocrinol Invest **29**(4): 298-302.
- Bronner, C. E., S. M. Baker, et al. (1994). "Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer." Nature **368**(6468): 258-61.
- Brunt, L. M. and J. F. Moley (2001). "Adrenal incidentaloma." World J Surg **25**(7): 905-13.
- Caldwell, G. M., C. Jones, et al. (2004). "The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis." Cancer Res **64**(3): 883-8.
- Callahan, N., A. Modesto, et al. (2009). "Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms and tooth agenesis." Arch Oral Biol **54**(1): 45-9.
- Capelluto, D. G., T. G. Kutateladze, et al. (2002). "The DIX domain targets dishevelled to actin stress fibres and vesicular membranes." Nature **419**(6908): 726-9.
- Castiglia, D., S. Bernardini, et al. (2008). "Concomitant activation of Wnt pathway and loss of mismatch repair function in human melanoma." Genes Chromosomes Cancer **47**(7): 614-24.
- Cavallo, R. A., R. T. Cox, et al. (1998). "Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity." Nature **395**(6702): 604-8.

- Chia, I. V. and F. Costantini (2005). "Mouse axin and axin2/conductin proteins are functionally equivalent in vivo." Mol Cell Biol **25**(11): 4371-6.
- Clayton, R. N., M. Pfeifer, et al. (2000). "Different patterns of allelic loss (loss of heterozygosity) in recurrent human pituitary tumors provide evidence for multiclonal origins." Clin Cancer Res **6**(10): 3973-82.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." Cell **127**(3): 469-80.
- Cliffe, A., F. Hamada, et al. (2003). "A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling." Curr Biol **13**(11): 960-6.
- Crucitti, F., R. Bellantone, et al. (1996). "The Italian Registry for Adrenal Cortical Carcinoma: analysis of a multiinstitutional series of 129 patients. The ACC Italian Registry Study Group." Surgery **119**(2): 161-70.
- Dackiw, A. P., J. E. Lee, et al. (2001). "Adrenal cortical carcinoma." World J Surg **25**(7): 914-26.
- de Fraipont, F., M. El Atifi, et al. (2005). "Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy." J Clin Endocrinol Metab **90**(3): 1819-29.
- Demokan, S., Y. Suoglu, et al. (2006). "Microsatellite instability and methylation of the DNA mismatch repair genes in head and neck cancer." Ann Oncol **17**(6): 995-9.
- Demunter, A., L. Libbrecht, et al. (2002). "Loss of membranous expression of beta-catenin is associated with tumor progression in cutaneous melanoma and rarely caused by exon 3 mutations." Mod Pathol **15**(4): 454-61.
- Deng, C. X. (2006). "BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution." Nucleic Acids Res **34**(5): 1416-26.
- Dhomen, N. and R. Marais (2007). "New insight into BRAF mutations in cancer." Curr Opin Genet Dev **17**(1): 31-9.
- Ding, Q., W. Xia, et al. (2005). "Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin." Mol Cell **19**(2): 159-70.
- Duval, A., J. Gayet, et al. (1999). "Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability." Cancer Res **59**(17): 4213-5.

- Edmonston, T. B., K. H. Cuesta, et al. (2000). "Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers." Hum Pathol **31**(12): 1506-14.
- Erickson, L. A., L. Jin, et al. (2001). "Pathologic features and expression of insulin-like growth factor-2 in adrenocortical neoplasms." Endocr Pathol **12**(4): 429-35.
- Eshleman, J. R. and S. D. Markowitz (1996). "Mismatch repair defects in human carcinogenesis." Hum Mol Genet **5 Spec No**: 1489-94.
- Fishel, R., A. Ewel, et al. (1994). "Binding of mismatched microsatellite DNA sequences by the human MSH2 protein." Science **266**(5189): 1403-5.
- Fisher, B. E. (1999). "The path to DNA repair." Environ Health Perspect **107**(8): A402-3.
- Fragoso, M. C., S. Domenice, et al. (2003). "Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene." J Clin Endocrinol Metab **88**(5): 2147-51.
- Fukushima, H., H. Yamamoto, et al. (2001). "Frequent alterations of the beta-catenin and TCF-4 genes, but not of the APC gene, in colon cancers with high-frequency microsatellite instability." J Exp Clin Cancer Res **20**(4): 553-9.
- Furuuchi, K., M. Tada, et al. (2000). "Somatic mutations of the APC gene in primary breast cancers." Am J Pathol **156**(6): 1997-2005.
- Gafa, R., I. Maestri, et al. (2000). "Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability." Cancer **89**(10): 2025-37.
- Galiatsatos, P. and W. D. Foulkes (2006). "Familial adenomatous polyposis." Am J Gastroenterol **101**(2): 385-98.
- Gamallo, C., J. Palacios, et al. (1999). "beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas : relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome." Am J Pathol **155**(2): 527-36.
- Gao, Z. H., S. Suppola, et al. (2002). "Association of H19 promoter methylation with the expression of H19 and IGF-II genes in adrenocortical tumors." J Clin Endocrinol Metab **87**(3): 1170-6.
- Garber, J. E., A. M. Goldstein, et al. (1991). "Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome." Cancer Res **51**(22): 6094-7.
- Gaujoux, S., F. Tissier, et al. (2008). "Wnt/beta-catenin and 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A signaling pathways alterations and somatic beta-

- catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors." J Clin Endocrinol Metab **93**(10): 4135-40.
- Gicquel, C., E. Baudin, et al. (1997). "Adrenocortical carcinoma." Ann Oncol **8**(5): 423-7.
- Gicquel, C., X. Bertagna, et al. (2001). "Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors." Cancer Res **61**(18): 6762-7.
- Gicquel, C., N. Boulle, et al. (2001). "[Involvement of the IGF system in the pathogenesis of adrenocortical tumors]." Ann Endocrinol (Paris) **62**(2): 189-92.
- Gicquel, C., M. Leblond-Francillard, et al. (1994). "Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas." Clin Endocrinol (Oxf) **40**(4): 465-77.
- Gicquel, C., M. L. Raffin-Sanson, et al. (1997). "Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors." J Clin Endocrinol Metab **82**(8): 2559-65.
- Giles, R. H., J. H. van Es, et al. (2003). "Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer." Biochim Biophys Acta **1653**(1): 1-24.
- Giordano, T. J. (2006). "Molecular pathology of adrenal cortical tumors: separating adenomas from carcinomas." Endocr Pathol **17**(4): 355-63.
- Giordano, T. J., D. G. Thomas, et al. (2003). "Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis." Am J Pathol **162**(2): 521-31.
- Groden, J., A. Thliveris, et al. (1991). "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." Cell **66**(3): 589-600.
- Grumbach, M. M., B. M. Biller, et al. (2003). "Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma")." Ann Intern Med **138**(5): 424-9.
- Gryfe, R., H. Kim, et al. (2000). "Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer." N Engl J Med **342**(2): 69-77.
- Halford, S., P. Sasieni, et al. (2002). "Low-level microsatellite instability occurs in most colorectal cancers and is a nonrandomly distributed quantitative trait." Cancer Res **62**(1): 53-7.
- Hart, M. J., R. de los Santos, et al. (1998). "Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta." Curr Biol **8**(10): 573-81.

- He, X., M. Semenov, et al. (2004). "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way." Development **131**(8): 1663-77.
- Hedgepeth, C. M., M. A. Deardorff, et al. (1999). "Regulation of glycogen synthase kinase 3beta and downstream Wnt signaling by axin." Mol Cell Biol **19**(10): 7147-57.
- Henry, I., M. Jeanpierre, et al. (1989). "Molecular definition of the 11p15.5 region involved in Beckwith-Wiedemann syndrome and probably in predisposition to adrenocortical carcinoma." Hum Genet **81**(3): 273-7.
- Heppner, C., M. Reincke, et al. (1999). "MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms." J Clin Endocrinol Metab **84**(1): 216-9.
- Herbet, M., J. J. Feige, et al. (2009). "Insights into the role of genetic alterations in adrenocortical tumorigenesis." Mol Cell Endocrinol **300**(1-2): 169-74.
- Hertel, N. T., N. Carlsen, et al. (2003). "Late relapse of adrenocortical carcinoma in Beckwith-Wiedemann syndrome. Clinical, endocrinological and genetic aspects." Acta Paediatr **92**(4): 439-43.
- Hinoi, T., H. Yamamoto, et al. (2000). "Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and axin facilitates glycogen synthase kinase-3 beta-dependent phosphorylation of beta-catenin and down-regulates beta-catenin." J Biol Chem **275**(44): 34399-406.
- Hisada, M., J. E. Garber, et al. (1998). "Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome." J Natl Cancer Inst **90**(8): 606-11.
- Hoang, J. M., P. H. Cottu, et al. (1997). "BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines." Cancer Res **57**(2): 300-3.
- Hoeflich, A., R. Reisinger, et al. (2001). "Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter?" Cancer Res **61**(24): 8601-10.
- Hollstein, M., D. Sidransky, et al. (1991). "p53 mutations in human cancers." Science **253**(5015): 49-53.
- Horvath, A., S. Boikos, et al. (2006). "A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia." Nat Genet **38**(7): 794-800.
- Hsu, W., L. Zeng, et al. (1999). "Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain." J Biol Chem **274**(6): 3439-45.

- Hughes, T. A. and H. J. Brady (2005). "Expression of axin2 is regulated by the alternative 5'-untranslated regions of its mRNA." J Biol Chem **280**(9): 8581-8.
- Icard, P., P. Goudet, et al. (2001). "Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group." World J Surg **25**(7): 891-7.
- Ikeda, S., M. Kishida, et al. (2000). "GSK-3beta-dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin." Oncogene **19**(4): 537-45.
- Ikeda, S., S. Kishida, et al. (1998). "Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin." EMBO J **17**(5): 1371-84.
- Ilvesmaki, V., A. I. Kahri, et al. (1993). "Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas." J Clin Endocrinol Metab **77**(3): 852-8.
- Imai, K. and H. Yamamoto (2008). "Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics." Carcinogenesis **29**(4): 673-80.
- Ionov, Y., M. A. Peinado, et al. (1993). "Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis." Nature **363**(6429): 558-61.
- Jass, J. R. (2004). "Sporadic versus hereditary forms of colorectal cancer with the DNA microsatellite instability phenotype: to 'lump' or 'split'?" Fam Cancer **3**(2): 83.
- Jho, E. H., T. Zhang, et al. (2002). "Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway." Mol Cell Biol **22**(4): 1172-83.
- Johnson, V., E. Volikos, et al. (2005). "Exon 3 beta-catenin mutations are specifically associated with colorectal carcinomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome." Gut **54**(2): 264-7.
- Kikuchi, A. (1999). "Roles of Axin in the Wnt signalling pathway." Cell Signal **11**(11): 777-88.
- Kikuchi, A. (2000). "Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway." Biochem Biophys Res Commun **268**(2): 243-8.
- Kim, M. S., S. S. Kim, et al. (2009). "Frameshift mutations of Wnt pathway genes AXIN2 and TCF7L2 in gastric carcinomas with high microsatellite instability." Hum Pathol **40**(1): 58-64.

- Kinzler, K. W., M. C. Nilbert, et al. (1991). "Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21." Science **253**(5020): 661-5.
- Kinzler, K. W., M. C. Nilbert, et al. (1991). "Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers." Science **251**(4999): 1366-70.
- Kitagawa, M., S. Hatakeyama, et al. (1999). "An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin." EMBO J **18**(9): 2401-10.
- Kjellman, M., M. Holst, et al. (1999). "No overrepresentation of congenital adrenal hyperplasia in patients with adrenocortical tumours." Clin Endocrinol (Oxf) **50**(3): 343-6.
- Klibanski, A., A. E. Stephen, et al. (2006). "Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 36-2006. A 35-year-old pregnant woman with new hypertension." N Engl J Med **355**(21): 2237-45.
- Kloos, R. T., M. D. Gross, et al. (1995). "Incidentally discovered adrenal masses." Endocr Rev **16**(4): 460-84.
- Koch, A., A. Hrychyk, et al. (2007). "Mutations of the Wnt antagonist AXIN2 (Conductin) result in TCF-dependent transcription in medulloblastomas." Int J Cancer **121**(2): 284-91.
- Koch, A., N. Weber, et al. (2004). "Mutations and elevated transcriptional activity of conductin (AXIN2) in hepatoblastomas." J Pathol **204**(5): 546-54.
- Koinuma, K., Y. Yamashita, et al. (2006). "Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability." Oncogene **25**(1): 139-46.
- Korinek, V., N. Barker, et al. (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma." Science **275**(5307): 1784-7.
- Kupka, S., B. Haack, et al. (2008). "Large proportion of low frequency microsatellite-instability and loss of heterozygosity in pheochromocytoma and endocrine tumors detected with an extended marker panel." J Cancer Res Clin Oncol **134**(4): 463-71.
- Laghi, L., P. Bianchi, et al. (2008). "Differences and evolution of the methods for the assessment of microsatellite instability." Oncogene **27**(49): 6313-21.
- Laiho, P., V. Launonen, et al. (2002). "Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas." Cancer Res **62**(4): 1166-70.

- Lam, W. W., I. Hatada, et al. (1999). "Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation." J Med Genet **36**(7): 518-23.
- Lammi, L., S. Arte, et al. (2004). "Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer." Am J Hum Genet **74**(5): 1043-50.
- Latronico, A. C., M. Reincke, et al. (1995). "No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms." J Clin Endocrinol Metab **80**(3): 875-7.
- Laurell, C., D. Velazquez-Fernandez, et al. (2009). "Transcriptional profiling enables molecular classification of adrenocortical tumours." Eur J Endocrinol **161**(1): 141-52.
- Leung, J. Y., F. T. Kolligs, et al. (2002). "Activation of AXIN2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling." J Biol Chem **277**(24): 21657-65.
- Li, F. P., J. F. Fraumeni, Jr., et al. (1988). "A cancer family syndrome in twenty-four kindreds." Cancer Res **48**(18): 5358-62.
- Li, X., H. J. Yost, et al. (2001). "Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in Xenopus." EMBO J **20**(15): 4122-31.
- Libe, R. and J. Bertherat (2005). "Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases." Eur J Endocrinol **153**(4): 477-87.
- Libe, R., A. Fratticci, et al. (2008). "Phosphodiesterase 11A (PDE11A) and genetic predisposition to adrenocortical tumors." Clin Cancer Res **14**(12): 4016-24.
- Libe, R., L. Groussin, et al. (2007). "Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity." Clin Cancer Res **13**(3): 844-50.
- Lindor, N. M., L. J. Burgart, et al. (2002). "Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors." J Clin Oncol **20**(4): 1043-8.
- Liu, C., Y. Li, et al. (2002). "Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism." Cell **108**(6): 837-47.
- Liu, W., X. Dong, et al. (2000). "Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling." Nat Genet **26**(2): 146-7.

- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 781-810.
- Luchtenborg, M., M. P. Weijnenberg, et al. (2005). "Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study." BMC Cancer **5**: 160.
- Lustig, B., B. Jerchow, et al. (2002). "Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors." Mol Cell Biol **22**(4): 1184-93.
- Maher, E. R. and W. Reik (2000). "Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited." J Clin Invest **105**(3): 247-52.
- Malkin, D., F. P. Li, et al. (1990). "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms." Science **250**(4985): 1233-8.
- Martensson, A., A. Oberg, et al. (2007). "Beta-catenin expression in relation to genetic instability and prognosis in colorectal cancer." Oncol Rep **17**(2): 447-52.
- Masi, G., E. Lavezzo, et al. (2009). "Investigation of BRAF and CTNNB1 activating mutations in adrenocortical tumors." J Endocrinol Invest **32**(7): 597-600.
- Mazzuco, T. L., I. Bourdeau, et al. (2009). "Adrenal incidentalomas and subclinical Cushing's syndrome: diagnosis and treatment." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **16**(3): 203-10.
- McNicol, A. M. (2008). "A diagnostic approach to adrenal cortical lesions." Endocr Pathol **19**(4): 241-51.
- McNicol, A. M., A. L. Struthers, et al. (1997). "Proliferation in Adrenocortical Tumors: Correlation with Clinical Outcome and p53 Status." Endocr Pathol **8**(1): 29-36.
- Messerini, L., M. Ciantelli, et al. (1999). "Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic mucinous colorectal cancers." Hum Pathol **30**(6): 629-34.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, et al. (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." Science **275**(5307): 1787-90.
- Moser, A. R., E. M. Mattes, et al. (1993). "ApcMin, a mutation in the murine Apc gene, predisposes to mammary carcinomas and focal alveolar hyperplasias." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(19): 8977-81.
- Mostowska, A., B. Biedziak, et al. (2006). "Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms may be a risk factor for selective tooth agenesis." J Hum Genet **51**(3): 262-6.

- Moul, J. W., J. T. Bishoff, et al. (1993). "Absent ras gene mutations in human adrenal cortical neoplasms and pheochromocytomas." J Urol **149**(6): 1389-94.
- Murphy, K. M., S. Zhang, et al. (2006). "Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers." J Mol Diagn **8**(3): 305-11.
- Nakamura, M., Y. Miki, et al. (2009). "An analysis of potential surrogate markers of target-specific therapy in archival materials of adrenocortical carcinoma." Endocr Pathol **20**(1): 17-23.
- Nakamura, Y., I. Nishisho, et al. (1991). "Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in familial polyposis coli patients and sporadic colorectal tumors." Princess Takamatsu Symp **22**: 285-92.
- Nakazumi, H., H. Sasano, et al. (1998). "Expression of cell cycle inhibitor p27 and Ki-67 in human adrenocortical neoplasms." Mod Pathol **11**(12): 1165-70.
- Namour, F., A. Ayav, et al. (2006). "Lack of association between microsatellite instability and benign adrenal tumors." World J Surg **30**(7): 1240-6.
- Nishisho, I., Y. Nakamura, et al. (1991). "Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients." Science **253**(5020): 665-9.
- Nystrom, A., J. E. Cheetham, et al. (1992). "Molecular analysis of patients with Wiedemann-Beckwith syndrome. II. Paternally derived disomies of chromosome 11." Eur J Pediatr **151**(7): 511-4.
- Ocker, M., R. Sachse, et al. (2000). "PCR-SSCP analysis of human adrenocortical adenomas: absence of K-ras gene mutations." Exp Clin Endocrinol Diabetes **108**(8): 513-4.
- Ohgaki, H., P. Kleihues, et al. (1993). "p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors." Int J Cancer **54**(3): 408-10.
- Ohgaki, H., J. M. Kros, et al. (2004). "APC mutations are infrequent but present in human lung cancer." Cancer Lett **207**(2): 197-203.
- Ortega, P., A. Moran, et al. (2008). "Differential Wnt pathway gene expression and E-cadherin truncation in sporadic colorectal cancers with and without microsatellite instability." Clin Cancer Res **14**(4): 995-1001.
- Palacios, J. and C. Gamallo (1998). "Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas." Cancer Res **58**(7): 1344-7.

- Parmar, J., R. E. Key, et al. (2008). "Development of an adrenocorticotropin-responsive human adrenocortical carcinoma cell line." J Clin Endocrinol Metab **93**(11): 4542-6.
- Parsons, R., G. M. Li, et al. (1993). "Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells." Cell **75**(6): 1227-36.
- Peifer, M. and P. Polakis (2000). "Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus." Science **287**(5458): 1606-9.
- Peltomaki, P., R. A. Lothe, et al. (1993). "Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome." Cancer Res **53**(24): 5853-5.
- Perucho, M. (1999). "Correspondence re: C.R. Boland et al., A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res., 58: 5248-5257, 1998." Cancer Res **59**(1): 249-56.
- Perucho, M. (2003). "Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes." Oncogene **22**(15): 2223-5.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pohlink, C., A. Tannapfe, et al. (2004). "Does tumor heterogeneity limit the use of the Weiss criteria in the evaluation of adrenocortical tumors?" J Endocrinol Invest **27**(6): 565-9.
- Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev **14**(15): 1837-51.
- Polakis, P. (2007). "The many ways of Wnt in cancer." Curr Opin Genet Dev **17**(1): 45-51.
- Pyatt, R., R. B. Chadwick, et al. (1999). "Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin. Implications for microsatellite instability testing." Am J Pathol **155**(2): 349-53.
- Rajagopalan, H. and C. Lengauer (2004). "hCDC4 and genetic instability in cancer." Cell Cycle **3**(6): 693-4.
- Reincke, M., M. Karl, et al. (1994). "p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies." J Clin Endocrinol Metab **78**(3): 790-4.

- Reincke, M., P. Mora, et al. (1997). "Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis." J Clin Endocrinol Metab **82**(9): 3054-8.
- Renkonen, E. T., P. Nieminen, et al. (2005). "Adenomatous polyposis families that screen APC mutation-negative by conventional methods are genetically heterogeneous." J Clin Oncol **23**(24): 5651-9.
- Rescorla, F. J. (2006). "Malignant adrenal tumors." Semin Pediatr Surg **15**(1): 48-56.
- Ribic, C. M., D. J. Sargent, et al. (2003). "Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer." N Engl J Med **349**(3): 247-57.
- Risinger, J. I., G. L. Maxwell, et al. (2005). "Gene expression profiling of microsatellite unstable and microsatellite stable endometrial cancers indicates distinct pathways of aberrant signaling." Cancer Res **65**(12): 5031-7.
- Rong, H., T. Boterberg, et al. (2001). "8-Prenylnaringenin, the phytoestrogen in hops and beer, upregulates the function of the E-cadherin/catenin complex in human mammary carcinoma cells." Eur J Cell Biol **80**(9): 580-5.
- Roose, J., M. Molenaar, et al. (1998). "The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors." Nature **395**(6702): 608-12.
- Rosenberg, D., L. Groussin, et al. (2002). "cAMP pathway alterations from the cell surface to the nucleus in adrenocortical tumors." Endocr Res **28**(4): 765-75.
- Rubinfeld, B., I. Albert, et al. (1997). "Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene." Cancer Res **57**(20): 4624-30.
- Rubinfeld, B., P. Robbins, et al. (1997). "Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines." Science **275**(5307): 1790-2.
- Sagae, S., K. Kobayashi, et al. (1999). "Mutational analysis of beta-catenin gene in Japanese ovarian carcinomas: frequent mutations in endometrioid carcinomas." Jpn J Cancer Res **90**(5): 510-5.
- Salahshor, S. and J. R. Woodgett (2005). "The links between axin and carcinogenesis." J Clin Pathol **58**(3): 225-36.
- Samowitz, W. S., K. Curtin, et al. (2001). "Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**(9): 917-23.

- Samowitz, W. S., M. L. Slattery, et al. (1999). "BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms." Am J Pathol **154**(6): 1637-41.
- Sasano, H., T. Suzuki, et al. (1994). "ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia: immunohistochemical and in situ hybridization studies of steroidogenic enzymes." Mod Pathol **7**(2): 215-9.
- Satoh, S., Y. Daigo, et al. (2000). "AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1." Nat Genet **24**(3): 245-50.
- Schteingart, D. E., G. M. Doherty, et al. (2005). "Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference." Endocr Relat Cancer **12**(3): 667-80.
- Schulte, K. M., M. Heinze, et al. (2000). "Complete sequencing and mRNA expression analysis of the MEN-I gene in adrenal myelolipoma." Horm Metab Res **32**(5): 169-73.
- Schulte, K. M., M. Mengel, et al. (2000). "Complete sequencing and messenger ribonucleic acid expression analysis of the MEN I gene in adrenal cancer." J Clin Endocrinol Metab **85**(1): 441-8.
- Seeling, J. M., J. R. Miller, et al. (1999). "Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A." Science **283**(5410): 2089-91.
- Segditsas, S. and I. Tomlinson (2006). "Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway." Oncogene **25**(57): 7531-7.
- Shen, W. T., C. Sturgeon, et al. (2005). "From incidentaloma to adrenocortical carcinoma: the surgical management of adrenal tumors." J Surg Oncol **89**(3): 186-92.
- Shields, J. M., K. Pruitt, et al. (2000). "Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'." Trends Cell Biol **10**(4): 147-54.
- Shimizu, Y., S. Ikeda, et al. (2002). "Frequent alterations in the Wnt signaling pathway in colorectal cancer with microsatellite instability." Genes Chromosomes Cancer **33**(1): 73-81.
- Siah, S. P., D. M. Quinn, et al. (2000). "Microsatellite instability markers in breast cancer: a review and study showing MSI was not detected at 'BAT 25' and 'BAT 26' microsatellite markers in early-onset breast cancer." Breast Cancer Res Treat **60**(2): 135-42.

- Sood, A. K., R. Holmes, et al. (2001). "Application of the National Cancer Institute international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer." Cancer Res **61**(11): 4371-4.
- Soon, L., F. Braet, et al. (2007). "Moving in the right direction-nanoimaging in cancer cell motility and metastasis." Microsc Res Tech **70**(3): 252-7.
- Soon, P. S., A. J. Gill, et al. (2009). "Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas." Endocr Relat Cancer **16**(2): 573-83.
- Soon, P. S., R. Libe, et al. (2008). "Loss of heterozygosity of 17p13, with possible involvement of ACADVL and ALOX15B, in the pathogenesis of adrenocortical tumors." Ann Surg **247**(1): 157-64.
- Soreide, K., E. A. Janssen, et al. (2006). "Microsatellite instability in colorectal cancer." Br J Surg **93**(4): 395-406.
- Soussi, T. (2000). "The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation." Ann N Y Acad Sci **910**: 121-37; discussion 137-9.
- Su, L. K., K. W. Kinzler, et al. (1992). "Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene." Science **256**(5057): 668-70.
- Suraweera, N., A. Duval, et al. (2002). "Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR." Gastroenterology **123**(6): 1804-11.
- Suraweera, N., J. Robinson, et al. (2006). "Mutations within Wnt pathway genes in sporadic colorectal cancers and cell lines." Int J Cancer **119**(8): 1837-42.
- Szajerka, A., P. Dziegiel, et al. (2008). "Immunohistochemical evaluation of metallothionein, Mcm-2 and Ki-67 antigen expression in tumors of the adrenal cortex." Anticancer Res **28**(5B): 2959-65.
- Tadjine, M., A. Lampron, et al. (2008). "Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas." Clin Endocrinol (Oxf) **68**(2): 264-70.
- Tadjine, M., A. Lampron, et al. (2008). "Detection of somatic beta-catenin mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD)." Clin Endocrinol (Oxf) **69**(3): 367-73.
- Tanaka, J., T. Watanabe, et al. (2008). "Silencing of secreted frizzled-related protein genes in MSI colorectal carcinogenesis." Hepatogastroenterology **55**(85): 1265-8.

- Taniguchi, K., L. R. Roberts, et al. (2002). "Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas." Oncogene **21**(31): 4863-71.
- Terzolo, M., A. Angeli, et al. (2007). "Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma." N Engl J Med **356**(23): 2372-80.
- Terzolo, M., A. Boccuzzi, et al. (2001). "Immunohistochemical assessment of Ki-67 in the differential diagnosis of adrenocortical tumors." Urology **57**(1): 176-82.
- Thibodeau, S. N., G. Bren, et al. (1993). "Microsatellite instability in cancer of the proximal colon." Science **260**(5109): 816-9.
- Thibodeau, S. N., A. J. French, et al. (1998). "Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1." Cancer Res **58**(8): 1713-8.
- Thorstensen, L., G. E. Lind, et al. (2005). "Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability." Neoplasia **7**(2): 99-108.
- Tissier, F., C. Cavard, et al. (2005). "Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors." Cancer Res **65**(17): 7622-7.
- Tolwinski, N. S., M. Wehrli, et al. (2003). "Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity." Dev Cell **4**(3): 407-18.
- Tseng, R. C., R. K. Lin, et al. (2008). "Epigenetic silencing of AXIN2/betaTrCP and deregulation of p53-mediated control lead to wild-type beta-catenin nuclear accumulation in lung tumorigenesis." Oncogene **27**(32): 4488-96.
- Tuupanen, S., I. Niittymaki, et al. (2008). "Allelic imbalance at rs6983267 suggests selection of the risk allele in somatic colorectal tumor evolution." Cancer Res **68**(1): 14-7.
- van de Wetering, M., E. Sancho, et al. (2002). "The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells." Cell **111**(2): 241-50.
- Vinson, G. P., J. P. Hinson, et al. (1994). "The neuroendocrinology of the adrenal cortex." J Neuroendocrinol **6**(3): 235-46.
- Vogelstein, B., D. Lane, et al. (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-10.

- von Kries, J. P., G. Winbeck, et al. (2000). "Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC." Nat Struct Biol **7**(9): 800-7.
- Wallis, Y. L., D. G. Morton, et al. (1999). "Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition." J Med Genet **36**(1): 14-20.
- Wang, J. and Z. G. Luo (2008). "The role of Wnt/beta-catenin signaling in postsynaptic differentiation." Commun Integr Biol **1**(2): 158-60.
- Weiss, L. M., L. J. Medeiros, et al. (1989). "Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma." Am J Surg Pathol **13**(3): 202-6.
- Weksberg, R., C. Shuman, et al. (2005). "Beckwith-Wiedemann syndrome." Am J Med Genet C Semin Med Genet **137C**(1): 12-23.
- Willert, K., C. Y. Logan, et al. (1999). "A Drosophila Axin homolog, Daxin, inhibits Wnt signaling." Development **126**(18): 4165-73.
- Winston, J. T., P. Strack, et al. (1999). "The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro." Genes Dev **13**(3): 270-83.
- Woerner, S. M., M. Kloor, et al. (2005). "Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas." Oncogene **24**(15): 2525-35.
- Wu, R., Y. Zhai, et al. (2001). "Diverse mechanisms of beta-catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas." Cancer Res **61**(22): 8247-55.
- Yamamoto, H., S. Kishida, et al. (1999). "Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability." J Biol Chem **274**(16): 10681-4.
- Yamamoto, H., S. Kishida, et al. (1998). "Axil, a member of the Axin family, interacts with both glycogen synthase kinase 3beta and beta-catenin and inhibits axis formation of Xenopus embryos." Mol Cell Biol **18**(5): 2867-75.
- Yamamoto, H., J. Perez-Piteira, et al. (1999). "Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features." Gastroenterology **116**(6): 1348-57.
- Yano, T., M. Linehan, et al. (1989). "Genetic changes in human adrenocortical carcinomas." J Natl Cancer Inst **81**(7): 518-23.

- Yashiro, T., H. Hara, et al. (1994). "Point mutations of ras genes in human adrenal cortical tumors: absence in adrenocortical hyperplasia." World J Surg **18**(4): 455-60; discussion 460-1.
- Zeng, G., M. Germinaro, et al. (2006). "Aberrant Wnt/beta-catenin signaling in pancreatic adenocarcinoma." Neoplasia **8**(4): 279-89.
- Zeng, Z. C., Z. Y. Tang, et al. (2005). "Radiation therapy for adrenal gland metastases from hepatocellular carcinoma." Jpn J Clin Oncol **35**(2): 61-7.
- Zhou, X., D. Fang, et al. (1998). "[Microsatellite instability in gastric carcinoma and intestinal metaplasia]." Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi **27**(5): 356-8.