



HAL
open science

Etude du rôle du gène suppresseur de tumeur WWOX et de ses partenaires dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et dans la carcinogenèse mammaire

Perla El Hage

► **To cite this version:**

Perla El Hage. Etude du rôle du gène suppresseur de tumeur WWOX et de ses partenaires dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et dans la carcinogenèse mammaire. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT: 2012PA11T098 . tel-00795900

HAL Id: tel-00795900

<https://theses.hal.science/tel-00795900>

Submitted on 1 Mar 2013

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD
Ecole doctorale de cancérologie

THESE

Sera présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Discipline : Cancérologie, Médecine, Santé

Par

EL HAGE Perla

Le 18 Décembre 2012

**Etude du rôle du gène suppresseur de tumeur WWOX et de ses
partenaires dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine
et dans la carcinogenèse mammaire.**

Directeur de thèse : Dr LALLEMAND François

Directeur du laboratoire : Dr LIDEREAU Rosette

Hôpital René Huguenin, Institut Curie, Saint-Cloud

Membres du jury :

Président : Dr AUCLAIR Christian

Rapporteurs : Dr SMADJA David

Dr GESPACH Christian

Examineur : Dr PRUNIER Céline

**A celle qui m'a donné la vie et des raisons pour la vivre,
A ma petite maman ;**

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier madame le docteur Rosette LIDEREAU, directrice du Laboratoire oncogénétique de l'Hôpital René Huguenin-Institut Curie, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Dr LIDEREAU, votre gentillesse, votre implication, votre courage et votre façon d'être ont fait de vous « LE MODELE » à mes yeux.

Dr. François LALLEMAND, mon merveilleux directeur de thèse, je te remercie pour ta passion, tes conseils et pour ta patience. Faire une thèse à tes côtés était un grand plaisir. François je te remercie aussi pour m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt sommaires que j'avais, au début de ma thèse, sur le sujet ; puis de m'avoir guidée, transmis ton savoir-faire scientifique, encouragée, conseillée tout en me laissant une grande autonomie, et en me faisant l'honneur de me déléguer plusieurs responsabilités dont j'espère avoir été à la hauteur.

Mes remerciements vont également à Dr Ivan BIECHE et Dr Kelthouma DRIOUCH pour les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, leurs suggestions et contributions durant ma thèse.

Je tiens à remercier le professeur Christian AUCLAIR de m'avoir acceptée dans son école doctorale de cancérologie.

Je souhaite également remercier les membres du Jury de thèse qui m'ont fait l'honneur de consacrer du temps à lire et juger ce travail.

Je remercie grandement la marraine de chaque doctorant de l'école doctorale de cancérologie, Mme Muriel NICOLETTI, qui a été présente pour chacun de nous.

Je tiens à remercier un par un les membres du service oncogénétique (Frédérique S., Soraya S., Magdalena C., Frédéric M., Abdel K., Catherine G, Catherine A., Florence C., Sophie V., Florian B., Adrien B., Sébastien N., Cédric L., Christophe G., Etienne R., Ambre P., Rana H., Sandrine C., Géraldine F., Pascal P., Chloé D., Florence L et Marie P.). Vous avez été ma deuxième famille, des frères et des sœurs typiques avec qui j'ai partagé ma vie personnelle aussi bien que professionnelle, beaucoup de rigolades et des délires et parfois de moments moins bons, mais c'est ça la famille après tout et c'est merveilleux.

Je remercie particulièrement Mme Maria Conceição TEIXEIRA, tu es le cœur de l'équipe. Sans toi, chacun de nous est perdu. Tu as été et tu seras toujours pour moi une amie sur laquelle je peux compter.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance à Dr Anne-Helene MONSORO-BURQ et à tous les membres de son équipe. Sans sa gentillesse, son

enseignement et son accueil chaleureux, la partie xénope n'aura jamais pu être. Dr MONSORO-BURQ m'a tout appris concernant le développement du xénope ainsi que les techniques de manipulation et a été très généreuse quant aux petits embryons.

J'ai également été accueillie chaleureusement dans l'équipe de Dr André MEGARBANE (Laboratoire de génétique humaine –Université Saint-Joseph- Beyrouth) au sein d'une collaboration sur un projet international financé par l'organisme « Cèdre ». Je remercie tous les membres de l'équipe et plus particulièrement Dr Eliane CHOUERY et Dr Joëlle ABOUGHOCHE pour leur temps, leur savoir-faire, leur générosité et leur gentillesse.

Parce qu'une thèse ne se résume pas seulement par le travail qui suit, je voudrais remercier mes amis, ceux de loin comme les plus proches, ils occuperont toujours une place privilégiée : Rosine SALEH, Hanan, EL-SHEIKH SAAD, Rajae DAHMANI, Noémie EIN-ELI, Marianne EYMARD et Rita MOUBARAK, Merci pour votre présence à mes côtés et votre soutien sans faille.

Je remercie également le président de l'université Paris sud XI de m'avoir permis de faire mes études supérieures au sein de cette excellente université. Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de l'hôpital René Huguenin et de l'Association de Recherche contre le cancer (ARC).

Je ne saurais clore cette page sans remercier mes parents, mes frères et ma grand-mère qui m'ont toujours épaulé durant cette thèse. Je ne sais comment vous remercier pour votre soutien, votre aide, votre présence, votre respect, votre écoute et vos conseils. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours suivie, quelle que soit la décision engagée, le choix posé et les difficultés à surmonter. Sans votre amour je ne serais jamais parvenue à réaliser ce travail. Je vous dois tout ce que je suis.

A tous ceux que j'ai cité sur cette page et tous ceux que j'ai oublié, un grand merci...

TABLE DES MATIERES

Abréviations.....	5
INTRODUCTION	9
Chapitre 1 : Le cancer.....	9
1.1. Généralités	9
1.2. Le cancer, une maladie multigénique.....	12
1.3. Les altérations génétiques ou mutations	13
1.3.1. L'origine des altérations génétiques.....	13
1.3.2. Les différentes altérations génétiques.....	14
1.3.3. Les sites fragiles.....	14
1.3.3.1. Les sites fragiles rares.....	15
1.3.3.2. Les sites fragiles communs (SFC).....	15
Chapitre 2 : Le gène <i>WWOX</i>	17
2.1. Généralités.....	17
2.1.1. Clonage.....	17
2.1.2. Structure du gène.....	17
2.1.3. Expression de <i>WWOX</i> dans les tissus normaux.....	18
2.1.4. La protéine <i>WWOX</i>	18
2.1.4.1. Les domaines WW.....	19
2.1.4.2. La famille SDR.....	20
2.1.4.3. Localisation cellulaire de <i>WWOX</i>	20
2.2. Fonction du gène <i>WWOX</i>	21
2.2.1. <i>WWOX</i> est un gène suppresseur de tumeur.....	21
2.2.1.1. <i>WWOX</i> est une molécule pro-apoptotique.....	21
2.2.1.2. Perte d'expression de <i>WWOX</i> dans les tumeurs.....	21
2.2.1.3. Perte d'expression de <i>WWOX</i> dans les lignées.....	22
2.2.1.4. Transformation cellulaire <i>in vitro</i>	22
2.2.1.5. Modèles animaux.....	23
2.2.2. Mécanismes moléculaires par lesquels <i>WWOX</i> inhibera la carcinogénèse.....	24
2.2.2.1. Partenaires moléculaires de <i>WWOX</i>	24
2.2.2.2. <i>WWOX</i> inhibe des protéines favorisant la carcinogénèse.....	26
2.2.2.3. <i>WWOX</i> coopère avec des gènes suppresseurs de tumeur.....	27

2.2.3. Autres fonctions de WWOX.....	27
Chapitre 3 : La voie Wnt/ β -caténine.....	29
3.1. Généralités.....	29
3.2. Description de la voie Wnt/ β -caténine.....	31
3.3. Pathologies et la voie Wnt/ β -caténine.....	34
3.4. BCL9-2 / BCL9 et la carcinogènèse.....	36
Chapitre 4 : Le cancer du sein.....	38
4.1. Incidence.....	38
4.2. Facteurs de risques.....	38
4.2.1. Facteurs de risques exogènes.....	38
4.2.2. Facteurs de risques endogènes.....	39
4.3. Anatomie de la glande mammaire.....	41
4.4. Classification des tumeurs mammaires.....	42
4.4.1. Classification histologique.....	42
4.4.2. Classification par stade.....	44
4.4.3. Classification par grade.....	44
4.4.4. Classification moléculaire.....	44
4.5. Implication de la voie Wnt/ β -caténine dans le cancer du sein.....	46
OBJECTIFS.....	48
RESULTATS.....	51
Article 1.....	52
Article 2:.....	67
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES.....	90
DISCUSSION.....	105
COLLABORATION.....	111
Article 3.....	112
BIBLIOGRAPHIE.....	144

Index des tableaux

Tableau 1 : les différents groupes WW.....	19
Tableau 2 : Partenaires moléculaires de WWOX et leurs fonctions.....	25
Tableau 3 : maladies humaines associées à des mutations de gènes impliquées dans la voie Wnt/ β -caténine.....	35
Tableau 4 : Gènes mutés les plus importants conférant une prédisposition héréditaire au cancer du sein.....	40
Tableau 5 : Séquences des amorces utilisés dans les q-PCR.....	95
Tableau 6 : Caractéristiques des 456 cancers mammaires relatifs à la surexpression de BCL9.	97

Index des figures

Figure 1 : Les propriétés acquises par une cellule cancéreuse.....	11
Figure 2 : Schéma du gène <i>WWOX</i>	18
Figure 3 : expression de <i>WWOX</i> dans les tissus normaux chez l'homme.	18
Figure 4: Schéma de la protéine <i>WWOX</i> humaine	19
Figure 5 : <i>WWOX</i> participe dans différentes voies de signalisations associées à des cancers par des interactions de type protéine-protéine.	28
Figure 6 : Les différentes voies de signalisations Wnt	30
Figure 7 : Régulation de l'assemblage du complexe d'axine pour la dégradation de la β -caténine.	32
Figure 8 : Complexes nucléaires co-activateurs TCF/ β -caténine.	34
Figure 9 : Schéma anatomique de la glande mammaire.	41
Figure 10 : Structure de l'Acinus mammaire.....	42
Figure 11 : Etapes de la cancérogenèse mammaire.	43
Figure 12 : Schéma représentatif du système double hybride chez la levure.	49
Figure 13 : Association <i>WWOX</i> - <i>BCL9</i>	91
Figure 14 : Effet de <i>WWOX</i> sur l'induction d'embryon possédant un double axe par <i>BCL9</i> .92	
Figure 15 : pourcentage des tumeurs présentant une surexpression de <i>BCL9</i> et <i>BCL9-2</i> par rapport aux normaux	96
Figure 16 : Expression <i>BCL9</i> et <i>BCL9-2</i> dans les lignées mammaires	100
Figure 17 : Représentation schématique d'une technique de CGH array	101

Abréviations

a.a	Acides aminés
ACK1	Activated CDC42 Kinase 1
ADH	Alcool Déshydrogénase
ADN	Acide Desoxyribo Nucléique
AP2	Activator Protein-2
ARN	Acide RiboNucléique
BCL9	B-Cell CLL/ Lymphoma 9
BCL9-2	B-Cell CLL/ Lymphoma Like
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
CaMK	Ca ⁺⁺ / calmodulin-dependent protein kinase
Cdc42	Cell division control protein 42
CDK	Cyclin-dependent kinase
CFS (SFCs)	Common Fragile Site
CK1ε	Casein Kinase 1ε
CMT1C	Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 1
CREB	CRE Binding protein
DEP	Disheveled, Egl-10, Pleckstrin
DIX	Disheveled axine
Dvl	Disheveled
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ENU	Ethyl-Nitros Ureas
FHIT	Fragile Histidine Triad protein
FMRP	RNA-binding protein Fragile X Mental Retardation Protein
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
Fz	Frizzled
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3
HDAC	Histone DeACetylase
HDL-C	Hight Density Level – Cholesterol
HRP	Horse Radish Peroxidase
HTLV1	Human T-Lymphotrope Virus of type 1
Hyal 2	Hyaluronoglucosaminidase 2
ICD	IntraCellular Domain
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KDa	KiloDalton
KO	Knock Out

LEF	Lymphoid Entancer binding Factor-1
LH	Luteinizing Hormone
LOH	Loss Of Heterozygoty
LRP	Leucine-Responsive Regulatory protein
Mb	Mégabase
Mdm2	Murine double minute 2
MEK	Mitogen activated Protein Kinase
MEKK1	Mitogen activated Protein Kinase Kinase 1
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate
NFκB	Nuclear Factor κB
NLS	Nuclear Localization Signal
NMBA	N-Nitrosomethyl-Benzylamine
Pb	Paire de base
PDZ	Postsynaptic Density 95, Dises Large Zonula occludens
PI 3-kinase	PhosphatidylInositol 3-kinase
PKC	Protein Kinase C
PLC	PhosphoLipase C
PTEN	Phosphatase and TENsion homolog
Rb	Retinoblastoma
RE	Récepteur des œstrogènes
RhoK	Rho associated Kinase
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RunX2	Runt-related transcription Factor 2
SDR	Short Chain alcohol deshydrogenase-reductase
SF	Sites Fragiles
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TAX	TransActivator of pX
TCF	T Cell Factor
TEM	Transition Epithélio- Méenchymateuse
TGF	Transforming Growth Factor
TMEM	TransMEMbrane protein
TNF	Tumor Necrosis Factor
TP53	Tumor Protein 53
TP73	Tumor Protein 73
UTR	UnTranslated Regions
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
Wnt	Wingless/ Integrated

WTX	Wlms Tumor gene on the X chromosome
WWOX	WW domain containing OXidoreductase
YAP	Yes Associated Protein
ZFRA	Zinc Finger-like protein that Regulates Apoptosis

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Le cancer

1.1. Généralités

Le cancer est une très vieille maladie, décrite sur des papyrus égyptiens, des écrits mésopotamiens, persans et indiens, depuis au moins 3500 ans avant Jésus-Christ. Il a même été retrouvé une pathologie de l'os vraisemblablement cancéreuse dans des os de dinosaures vieux d'environ 80 millions d'années. Le cancer modifie profondément le cours d'une vie. Malgré le fait que les chercheurs commencent à maîtriser cette maladie et que les pronostics de survie sont beaucoup plus positifs le cancer reste le plus souvent une pathologie grave.

La cellule, du latin 'cellula', qui veut dire 'petite chambre' est l'unité de structure élémentaire, fonctionnelle et reproductrice de tout organisme vivant. Chaque cellule est une entité vivante qui, dans le cas d'organismes multicellulaires, fonctionne de manière autonome et coordonnée avec les autres. La croissance des cellules des organismes pluricellulaires est hautement régulée. Le cancer est une maladie dans laquelle une cellule normale se transforme en une cellule qui prolifère à l'encontre des contraintes normales et qui est capable d'envahir des tissus environnants. Une telle cellule est dite cancéreuse.

Une cellule cancéreuse provoque, au sein du tissu où elle siège, la formation d'un amas cellulaire ou tumeur. Une tumeur est un cancer uniquement si ses cellules ont la capacité d'envahir d'autres tissus. Pour envahir un tissu, une cellule doit s'échapper de la tumeur, pénétrer dans le sang ou les vaisseaux lymphatiques (intravasation), sortir du système sanguin ou lymphatique (extravasation) pour s'implanter dans un tissu (qui peut être éloigné du tissu ou siège de la tumeur primaire) et s'y développer, ce qui aboutit à la formation d'une tumeur secondaire ou métastase.

Il a été proposé par Weinberg et Hanahan que le passage de la cellule normale à la cellule cancéreuse correspond à l'acquisition par la cellule normale de six propriétés (Hanahan and Weinberg 2000, Hanahan and Weinberg 2011) :

1- Les cellules cancéreuses prolifèrent d'une manière excessive et chronique:

Dans les tissus normaux, la prolifération des cellules est contrôlée en large part par la production et la sécrétion de facteurs de croissance. Ces molécules, en stimulant l'activité de voies de signalisation intracellulaires spécifiques, activent la croissance cellulaire (taille de la cellule) ainsi que la progression des cellules à travers le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est le laps de temps au cours duquel une cellule se divise en deux cellules filles. Il se

décompose en quatre phases : (1) La phase G1, phase de préparation à la phase S, (2) La phase S au cours de laquelle la cellule duplique son stock d'ADN, (3) la phase G2, phase de préparation à la phase M et (4) la phase M ou mitose. Dans la grande majorité des cellules cancéreuses, les effets positifs des facteurs de croissance sur la croissance et le cycle cellulaire sont constants.

2- Elles sont insensibles aux mécanismes anti-prolifératifs :

Les cellules cancéreuses doivent échapper à divers mécanismes moléculaires régulant négativement la prolifération cellulaire. (1) La plupart de ces mécanismes dépendent de gènes dits suppresseurs de tumeurs (cf.1.2). Ces gènes sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire en induisant soit la sénescence (état viable et non prolifératif) soit La mort cellulaire programmée ou apoptose. (2) Dans un tissu sain, la prolifération cellulaire est limitée également par des molécules extracellulaires (ex : des cytokines comme TGF- β , TNF α , etc.) contribuant au maintien de l'homéostasie tissulaire, ces signaux antiprolifératifs peuvent agir en induisant soit la quiescence (cellules arrêtés dans le cycle cellulaire) soit la différenciation entraînant un arrêt permanent de la prolifération. Les voies de signalisation spécifiques de ces facteurs antiprolifératifs sont très majoritairement altérées dans les tumeurs. (3) Les cellules cancéreuses doivent également échapper à l'inhibition de contact (mécanisme d'inhibition de la prolifération cellulaire activé par le contact cellule-cellule au sein d'un tissu).

3- inhibition de la mort cellulaire :

L'apoptose est un mécanisme physiologique permettant d'éliminer notamment les cellules présentant une prolifération excessive. Ce processus se manifeste par la rupture des membranes plasmiques et nucléaires, l'élimination du cytosol, la dégradation des chromosomes et la fragmentation du noyau. Le plus souvent, sinon toujours, les cellules tumorales ont la capacité d'inhiber cette mort cellulaire. Différents travaux suggèrent que les cellules cancéreuses affectent également le bon fonctionnement de deux autres types de mort cellulaire : la nécrose et l'autophagie.

4 - Capacité proliférative illimitée :

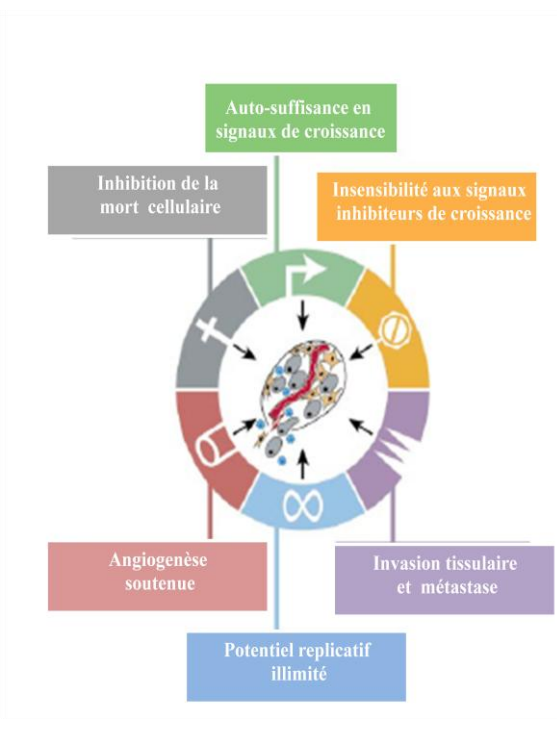
Le nombre usuel de divisions cellulaires pour une cellule humaine est de 50 à 60, après quoi elle cesse de se diviser et entre en sénescence. Cette limitation du nombre de divisions est causée par le raccourcissement normal des télomères à chaque division cellulaire. Les cellules tumorales se divisent sans limite visible grâce à leur capacité à maintenir la taille de leurs télomères notamment en stimulant l'activité de la télomérase.

5- Capacité de susciter l'angiogenèse :

La formation des capillaires sanguins est indispensable à l'approvisionnement des cellules en nutriments et oxygène. Ce processus est intense durant l'organogenèse. En revanche, une fois le tissu formé, l'angiogenèse devient transitoire. Les cellules tumorales ont un besoin important en oxygène et nutriments pour survivre. Elles vont donc stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. La capacité à induire et à maintenir l'angiogenèse est acquise au cours du développement de la tumeur, et ce, dès que la tumeur atteint une taille d'environ 1mm^3 (Folkman 2006).

6- Acquisition d'un pouvoir invasif et métastatique :

Comme nous l'avons déjà vu, au cours du développement de la plupart des tumeurs solides, des cellules se détachent de la tumeur primaire, passent dans le système sanguin ou lymphatique et colonisent les tissus adjacents ou plus distants où elles vont former des métastases. Différents travaux suggèrent que les cellules cancéreuses peuvent devenir invasives en activant un processus cellulaire nommé : transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). L'activation de TEM induit un changement de l'expression génique et augmente la capacité de la cellule à se mouvoir. Il est assez largement admis que ce processus cellulaire doit s'inverser afin que la cellule cancéreuse puisse s'établir dans un tissu et former une métastase.



(Hanahan and Weinberg 2000).

La plupart si ce n'est que tous les cancers acquièrent les mêmes capacités fonctionnelles durant leur développement, quoique par différentes stratégies.

Figure 1 : Les propriétés acquises par une cellule cancéreuse.

1.2. Le cancer, une maladie multigénique.

Le cancer, contrairement aux maladies monogéniques (maladie génétique qui est due à la présence d'une ou plusieurs mutations au sein d'un seul gène) comme la mucoviscidose, les myopathies ou certaines hémophilies, est une maladie multigénique qui a pour origine le dysfonctionnement de 10 à 20 gènes. Le dysfonctionnement des gènes est dû à des altérations épigénétiques (qui, sans toucher directement l'intégrité des gènes, changent leur fonctionnement en modifiant leur expression) ou génétiques (ou mutations, modification transmissible de la séquence nucléotidique d'un chromosome). Ces altérations génétiques ou mutations se produisent de manières successives et sur une très longue plage chronologique (5 à 20 ans). Il existe un grand nombre de différents cancers que l'on classe selon le tissu et type cellulaire dont ils proviennent. Pour chaque type de cancer, on a pu mettre en évidence d'une part une certaine spécificité des gènes altérés et d'autre part une chronologie dans le développement des événements. Comme il s'agit d'altérations génétiques somatiques qui ne sont présentes que dans le tissu malade, la plupart des cancers ne sont donc pas eux-mêmes héréditaires, seul un terrain plus ou moins favorable pouvant l'être. Les cancers familiaux représentent 10% des cancers humains et ils sont associés à une altération germinale ou constitutionnelle d'un gène. Cette altération est donc présente dans toutes les cellules de l'organisme, gamètes incluses.

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse est due à des altérations génétiques touchant 3 grandes catégories de gènes : les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes impliqués dans les systèmes de réparation de l'ADN.

1. **Les proto-oncogènes** sont des gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire qui peuvent être convertis par une mutation en un oncogène favorisant le cancer. Les proto-oncogènes ont un rôle d'activateurs du cycle cellulaire. L'altération génétique convertissant un proto-oncogène en oncogène modifie soit la fonction exercée par la protéine ou l'expression du gène. Ces altérations sont dominantes, il suffit qu'une des deux copies d'un gène soit modifiée, elles rendent les proto-oncogènes hyperactifs. On a identifié actuellement plus de 100 oncogènes. Les plus connus étant Ha-ras, myc ou abl.

2. **Les gènes suppresseurs de tumeurs** sont des régulateurs négatifs de la croissance et prolifération cellulaire. Leur altération contribue au processus tumorigène. Ces gènes sont capables d'induire l'apoptose, la sénescence ou un arrêt du cycle cellulaire. Le mode de transmission de ces gènes est récessif, c'est à dire que l'inactivation de ces gènes nécessite l'altération des deux allèles. Deux étapes sont donc nécessaires. La première pouvant être

somatique (sporadique) ou germinale (transmission héréditaire d'un allèle muté ou microdélété dans toutes les cellules). Si la première étape est d'origine germinale, on peut parler d'un gène de prédisposition à un cancer. Dans les deux cas, l'atteinte du second allèle est somatique et peut aboutir à la formation d'une tumeur dans les cellules déjà porteuses de la première altération. L'apparition de deux mutations somatiques dans une même cellule au niveau d'un même gène est un événement rarissime. Il existe des dizaines de gènes suppresseurs de tumeur, les plus connus étant p53 et Rb. Ces gènes peuvent être activés par une prolifération cellulaire excessive, une surexpression d'oncogènes ou des cassures d'ADN.

3. **Les gènes des multiples systèmes de réparation** détectent et réparent les lésions de l'ADN. Ces systèmes de réparation sont inactivés dans les cellules cancéreuses. L'inactivation de ces systèmes conduit à une instabilité génétique forte qui est observée dans toutes les cellules cancéreuses. Cette instabilité génétique entraîne une accumulation de mutations favorisant donc la cancérogenèse.

1.3. Les altérations génétiques ou mutations

1.3.1. L'origine des altérations génétiques.

L'origine des altérations génétique qui modifient les oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs et gènes des multiples systèmes de réparation est multiple. On les classe généralement en deux grandes catégories, exogène et endogène.

1- **L'origine exogène** correspond à toutes les expositions à des carcinogènes présents dans notre environnement : le tabac, l'amiante, les radiations γ , l'alcool, les ultraviolets du soleil et de nombreuses autres substances auxquelles un individu est exposé volontairement ou involontairement. Elles peuvent agir directement au niveau de l'ADN en provoquant des altérations favorisant l'apparition de cellules cancéreuses.

2- Les altérations **d'origine endogène** sont provoquées en partie par des molécules issues de notre métabolisme comme les espèces réactives à l'oxygène. Chaque jour notre ADN subit des millions d'agressions de la part de ces molécules mais dans la très grande majorité des cas, celles-ci sont réparées de manière très efficace. Néanmoins, il suffit d'une défaillance dans la réparation d'un gène important pour enclencher ou favoriser un processus de transformation cellulaire. Des travaux suggèrent que les systèmes de réparation de l'ADN ont une efficacité qui diminue avec l'âge.

Les mutations peuvent également apparaître suite à des erreurs causées par l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN et même lors de la recombinaison génétique (brassage entre les matériels génétiques parentaux) (Makridakis and Reichardt 2012).

1.3.2. Les différentes altérations génétiques.

Il existe différents types de mutations :

A. Les **mutations ponctuelles** ne touchant qu'un seul nucléotide :

- Les mutations faux-sens : le changement du nucléotide entraîne la modification de l'acide aminé. Ceci peut avoir ou non une répercussion sur la fonction de la protéine produite par le gène.
- Les mutations non-sens : le changement du nucléotide dans ce cas provoque la création d'un codon stop entraînant la synthèse d'une protéine tronquée.
- Les mutations silencieuses : elles ne modifient pas la séquence de la protéine, à cause de la redondance du code génétique (le nouveau triplet code le même acide aminé que le triplet d'origine).
- Les insertions et les délétions d'un nucléotide qui décalent le cadre de lecture.

B. Les **mutations chromosomiques**; ces mutations concernent un grand nombre de nucléotides dans l'ADN de telle sorte que la mutation peut parfois être observable sur un caryotype. Ces mutations regroupent les duplications, insertions, translocations et délétions. Il peut s'agir aussi de perte ou de gain de chromosomes.

1.3.3. Les sites fragiles.

Les sites fragiles (SF) sont des séquences d'ADN de plusieurs centaines de milliers de paires de bases conférant une instabilité génétique se traduisant par des délétions, des réarrangements, des amplifications, des insertions virales et des pertes d'hétérozygoties (LOH) (Glover 1988, Glover and Stein 1988). Les LOH sont dues à des mutations délétères qui se produisent sur un locus spécifique sur un seul allèle. Les SFs entraînent des points de constriction conduisant à des pertes de morceaux de chromosomes lorsque les cellules subissent un stress répliatif. Ce stress répliatif peut être induit *in vitro* par différentes molécules inhibitrices de la division cellulaire tel que le folate, la distamycin A, la bromodeoxyuridine, l'aphidicolin et le 5-azacytidine. Ces agents chimiques inhibent les polymérasés α , β et γ impliqués dans la répliation de l'ADN. Les points de cassures au niveau des sites fragiles peuvent être observés en cytogénétiques. Plusieurs études ont suggéré que les sites fragiles, en provoquant des pertes génétiques, seraient responsables de l'élimination de gènes suppresseurs de tumeurs, ce qui, par conséquent favoriserait la carcinogénèse. En induisant des amplifications, les sites fragiles provoqueraient également des surexpressions de proto-oncogène. Enfin, en facilitant l'insertion virale en début de gène,

les SFs pourraient induire la surexpression de proto-oncogènes ou au contraire si l'insertion se fait dans le gène, une inhibition d'expression d'un gène suppresseur de tumeur. C'est pourquoi de nombreuses équipes ont étudiés et étudient toujours les régions chromosomiques comportant des sites fragiles afin d'identifier des gènes jouant un rôle important dans le développement des cancers. Ces études ont effectivement pu démontrer l'implication de certains SFs dans la carcinogenèse.

Il existe deux types distincts de sites fragiles qui ont été classés en fonction des composés nécessaires à leur mise en évidence et par la fréquence avec laquelle ils sont présents dans la population :

1.3.3.1. Les sites fragiles rares

Les sites fragiles rares sont retrouvés dans moins de 5 % de la population. Ce sont les premiers à avoir été caractérisés et peuvent être mis en évidence suite à une exposition au folate, distamicyn A ou au bromodéoxyuridine (Sutherland et al 1984). L'instabilité génétique associée à ces sites fragiles rares est le facteur causal de différentes de maladie génétique telle que le syndrome fragile X (Bell et al 1991). Les sites fragiles rares sont composés de répétitions de deux ou trois nucléotides qui peuvent induire des cassures spontanées durant la réplication de l'ADN (Nancarrow et al 1995). Ces sites ne sont pas impliqués dans les cancers (Saxena 2012).

1.3.3.2. Les sites fragiles communs (SFC)

Les sites fragiles communs, aussi connus sous le nom de sites fragiles constitutifs, sont présents chez tous les individus. Ce sont des composants structuraux normaux des chromosomes (Sutherland et al 1998) et peuvent provoquer des cassures de l'ADN *in vitro* quant les cellules sont en présence d'aphidicolin, de bromodéoxyuridine ou de 5-azacytidine (Glover et al 1984). Les sites fragiles communs sont conservés chez la souris et d'autres mammifères chez lesquels ils ont été largement étudiés. Tous les sites fragiles ne provoquent pas des cassures avec la même fréquence (Yunis and Soreng 1984). Différentes études montrent un rôle de ces sites dans les cancers (Egeli et al 1997, Inoue et al 1997, Mangelsdorf et al 2000, Paige et al 2000, Tunca et al 2000). Ils sont responsables de délétions de gènes suppresseurs de tumeurs et d'amplifications génomiques des oncogènes (Hellman et al 2002). De plus, les SFCs sont des sites préférentiels pour l'intégration d'ADN viral qui peut entraîner le développement d'un cancer (Matovina et al 2009). A ce jour, il a été identifié 87 sites fragiles communs listés dans la base de données NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Onze SFCs ont été clonés et caractérisés de différentes façons, FRA2G, FRA3B, FRA4F, FRA6E, FRA6F, FRA7E, FRA7G, FRA7H, FRA9E, FRA16D et FRAXB (Glover 2006). Il a été montré que ces SFCs peuvent entraîner la perte de régions chromosomiques de plus d'un mégabase (>1Mb). FRA3B situé en 3p14.3 a été particulièrement étudié. Ce site fragile est contenu dans la séquence du gène FHIT (Ohta et al 1996). FRA3B facilite l'insertion virale et provoque des délétions et des translocations spécifiques à certains cancers (Boldog et al 1997). Une expression ectopique de FHIT dans ces lignées s'oppose le phénotype tumorigène suggérant que FHIT est un gène suppresseur de tumeur (Zanesi et al 2001).

Chapitre 2 : Le gène WWOX.

2.1. Généralités.

2.1.1. Clonage.

En 1990, des chercheurs ont démontré qu'au moins 30% des cancers de la prostate présentent une perte d'hétérozygotie au niveau des sites fragiles FRA16D et FRA10E contenus dans les bras longs des chromosomes 16 ou 10 respectivement. Ces résultats avaient suggérés la présence dans ces régions chromosomiques de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans cette pathologie (Carter et al 1990). Deux ans plus tard, une équipe japonaise a mis en évidence la perte d'hétérozygotie au niveau du site fragile 16D dans 40% des carcinomes hépatocellulaires (Nishida et al 1992). Et un peu plus tard, une équipe suédoise a retrouvé cette perte d'hétérozygotie dans les tumeurs du sein métastatiques (Lindblom et al 1993). Ces résultats avaient suggéré là encore la présence d'un gène suppresseur de tumeur dans la région 16q. En 1995 des chercheurs Texans ont défini la région minimale de perte d'hétérozygotie affectant le bras chromosomique 16q. Cette LOH a été retrouvée dans 89% de lésions de carcinomes ductaux et de lésions pré-invasives mammaires *in situ* (Aldaz et al 1995). A l'aide de marqueurs microsatellites, la région q23.3-24.1, recouvrant 2 à 3 Mb, a été identifiée comme la région la plus affectée par les pertes d'hétérozygoties. Une telle fréquence de LOH à un stade préinvasif du cancer du sein a suggéré là encore la présence d'un (ou de plusieurs) gène suppresseur de tumeur jouant un rôle important dans la cancérogenèse mammaire (Aldaz et al 1996).

Afin d'identifier le ou les gènes aux alentours du site fragile FRA16D en 16q23.3-24.1, la même équipe texane a séquencé et isolé les transcrits de la région d'intérêt. Elle a ainsi identifié et cloné un gène qui fût nommé « WW domain containing OXidoreductase » ou *WWOX* (Bednarek et al 2000, Ried et al 2000). *WWOX* est le seul gène identifié dans la région 16q23.3-24.1.

2.1.2. Structure du gène.

Le gène *WWOX* (*alias* : *FOR*; *WOX1*; *FRA16D*; *HHCMA56*; *PRO0128*; *SDR41C1*; *D16S432E*) s'étend sur une région génomique d'environ 1,2 Mb, il a une phase ouverte de lecture de 1245 paires de bases et est composé de 9 exons dont la taille varie de 58 à 1060 pb, un 5'UTR de 125pb et un 3'UTR de 870 pb avec un signal de polyadénylation commençant en position 2091. L'intron 8 comporte le site fragile FRA16D qui s'étend sur une région minimale de 260kb (Bednarek et al 2000, Ried et al 2000).

L'analyse de la séquence a permis d'identifier des points de cassures induisant des translocations dans cette zone (Chesi et al 1998). Ces translocations ont été décrites dans différents myélomes impliquant les chromosomes 14 et 16, à savoir : t (14 ;16)(q32 ;q23).



Figure 2 : Schéma du gène *WWOX*

2.1.3. Expression de *WWOX* dans les tissus normaux

WWOX est un gène ubiquitaire. Le niveau d'expression de ce gène est très variable dans les tissus normaux. L'expression la plus forte se retrouve dans les cellules épithéliales, surtout des organes hormono-régulés, la prostate, les testicules et les ovaires (Bednarek et al 2000).

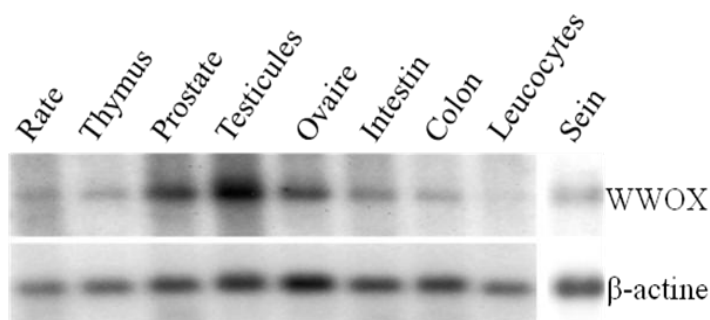


Figure 3 : expression de *WWOX* dans les tissus normaux chez l'homme.

Analyse Northern blot des ARN extraits de tissus normaux comme indiqué. La sonde *WWOX* détecte un ARNm de 2.2kb, notons que la plus haute expression de *WWOX* est observée dans les tissus hormono-régulés, les testicules, les ovaires et la prostate (Bednarek et al 2000).

Il existe au moins huit transcrits alternatifs de *WWOX* qui par épissage alternatif, sont tronqués en 3' (Chang et al 2003). Plusieurs transcrits alternatifs sont surexprimés dans les cellules cancéreuses. Cependant, les travaux de Watanabe et al. ont montré que ces transcrits codent des protéines qui sont dégradées par le protéasome, ces transcrits n'auraient donc pas de fonction biologique (Watanabe et al 2003).

2.1.4. La protéine *WWOX*

Le gène *WWOX* code une protéine de 46 KDa, constituée de 414 acides aminés et possédant des domaines connus.



Figure 4: Schéma de la protéine WWOX humaine

2.1.4.1. Les domaines WW

Les domaines WW sont des petits domaines d'environ 40 acides aminés. Ils interviennent dans les interactions entre protéines. Ces domaines contiennent, en général deux tryptophanes (W) essentiels hautement conservés qui sont séparés l'un de l'autre par 20 à 22 acides aminés. Les domaines WW sont divisés en quatre groupes suivant leur capacité de liaison à différents motifs riches en proline ou des motifs contenant des phosphosérines, proline et/ou thréonine (tableau 1). Différentes protéines s'associant aux domaines WW sont impliqués dans différentes maladies humaines tel que l'hypertension, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington, la dystrophie musculaire et le cancer (Bedford et al 1998, Chan et al 1996, Lu et al 1999, Sudol et al 1995).

Tableau 1 : les différents groupes WW.

WW groupe	Motif
I (Sudol et al 1995)	PPXY
II (Chan et al 1996)	PPLP
III (Bedford et al 1998)	Riches en prolines entourés d'arginine ou lysine.
IV (Lu et al 1999)	Riche en phospho-sérine-proline ou phospho-thréonine-proline.

Le coté N-terminal de WWOX comporte deux domaines WW (a.a.18-47 et 59-88). Le premier domaine WW de WWOX (a.a.18-49) est de classe I. Il comporte 2 résidus tryptophanes séparés par 22 acides aminés qui interagissent avec des protéines riches en proline *via* une petite poche hydrophobe formée par trois feuillets β antiparallèles. La tyrosine 33 du premier domaine WW peut être phosphorylée par la tyrosine kinase SRC en réponse a des stimuli de stress ou par des hormones stéroïdiennes sexuelles (Aqeilan et al 2004a). Le second domaine WW de WWOX (a.a. 59-88) est de classe II. Dans ce domaine, le second tryptophane est remplacé par une tyrosine.

De plus, la protéine WWOX comporte un signal de localisation nucléaire (NLS) entre les deux domaines WW (a.a.50-55) (Chang et al 2001). Le côté N-terminal comporte aussi une

séquence PEST (a.a 12-27). Les séquences PEST qui jouent le rôle de signal pour la dégradation de la protéine sont des séquences polypeptidiques riches en proline, glutamate, serine et thréonines qui sont souvent présentes dans des enzymes, des facteurs de transcriptions et des récepteurs à courte durée de vie (Rogers et al 1986).

2.1.4.2. La famille SDR

La protéine WWOX comporte un domaine présentant des homologues fortes avec les domaines SDR ou ADH (Bednarek et al 2000). L'alcool deshydrogénase est une enzyme qui oxyde des alcools par transfert d'un ou de plusieurs ions H^- à un accepteur, le coenzyme $NAD^+/NADPH^+$. L'analyse de la séquence de WWOX a permis d'identifier le site GANSGIG (131-137) qui pourrait être un site de liaison aux coenzymes NAD(H) ou NADP(H) et le site YNRSK (293-297) qui pourrait être un site de liaison d'un substrat. Le domaine SDR de WWOX est proche des domaines SDR d'enzymes impliqués dans le métabolisme des stéroïdes sexuels.

La famille SDR englobe une large variété d'enzymes qui agissent sur de divers substrats. Il existe au moins 3000 protéines contenant un domaine SDR (Oppermann et al 2001). La majorité des enzymes SDR ont une structure de 250-350 résidus avec un signal peptidique en C- ou N-terminal et un domaine transmembranaire. En se basant sur leurs caractéristiques fonctionnelles, les enzymes SDR peuvent être classés dans trois catégories (Oppermann et al 2001) :

- Les enzymes impliquées dans les métabolismes hormonaux.
- Les enzymes impliquées dans les métabolismes intermédiaires.
- Et les protéines SDR n'ayant pas de fonctions enzymatiques connus.

L'expression majoritaire de WWOX dans les tissus hormono-dépendants (Bednarek et al 2000), et le fait que le domaine SDR de WWOX ait des similitudes fortes avec des SDR d'enzymes liés au métabolisme des stéroïdes sexuels (Ludes-Meyers et al 2003) laissent penser que WWOX serait impliqué dans le métabolisme de ces molécules.

2.1.4.3. Localisation cellulaire de WWOX.

Il existe des désaccords importants en ce qui concerne la localisation cellulaire de WWOX. WWOX est majoritairement dans le cytoplasme (Bednarek et al 2001). La localisation mitochondriale de WWOX a été mise en évidence par immunofluorescence dans différentes lignées cellulaires. Une région dans le domaine SDR importante pour la localisation mitochondriale a été identifiée (Chang et al 2001, Chang 2002, Watanabe et al 2003).

Cependant, d'autres études montrent une localisation de *WWOX* dans l'appareil de Golgi (Bednarek et al 2001, Ludes-Meyers et al 2003, Ludes-Meyers et al 2004). *WWOX* a été trouvé localisé aussi dans le noyau, sa localisation nucléaire peut être induite par le TNF α (Chang et al 2001) l'œstradiol (Chang et al 2005) et la confluence (Watanabe et al 2003).

2.2. Fonction du gène *WWOX*

2.2.1. *WWOX* est un gène suppresseur de tumeur

De nombreux arguments expérimentaux et observations indiquent que *WWOX* est un gène suppresseur de tumeur.

2.2.1.1. *WWOX* est une molécule pro-apoptotique.

Une des caractéristiques d'un gène suppresseur de tumeur est sa capacité d'induire l'apoptose et plusieurs travaux montrent que *WWOX* est effectivement une protéine pro-apoptotique. En effet, il a été démontré que la surexpression de *WWOX* dans des lignées cancéreuses n'exprimant pas *WWOX* induit l'apoptose. La surexpression de *WWOX* dans les lignées cancéreuses mammaires (BT-474, HTB26 et HCC1937) (Iliopoulos et al 2007) ainsi que dans les lignées cancéreuses pulmonaires (A549 et H460) (Fabbri et al 2005) induit l'apoptose dépendante des caspases. Ceci n'a pas été observé dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 qui surexprime *WWOX* (Bednarek et al 2001). La surexpression de *WWOX* induit également l'apoptose dans des lignées cancéreuses de pancréas (Nakayama et al 2008) et de prostate (Qin et al 2006).

2.2.1.2. Perte d'expression de *WWOX* dans les tumeurs

L'expression de *WWOX* a été retrouvée altérée dans différents cancers : sein (Bednarek et al 2001, Driouch et al 2002, Guler et al 2004), ovaire (Paige et al 2001), os (Kurek et al 2010), œsophage (Kuroki et al 2002), poumons (Aqeilan et al 2007b), colon (Zelazowski et al 2011), prostate (Qin et al 2006), estomac (Aqeilan et al 2004a), pancréas (Bloomston et al 2009), système hématopoïétique (Jenner et al 2007), vessie (Ramos et al 2008), foie (Aderca et al 2008), col de l'utérus (Giarnieri et al 2010), thyroïde (Dias et al 2007), glande salivaire (Dincer et al 2010) et cerveau (Aarhus et al 2008). La perte d'expression de *WWOX* a été décrite comme un marqueur de mauvais pronostic dans le sein (Pluciennik et al 2006), la vessie (Ramos et al 2008), le foie (Aderca et al 2008), l'œsophage (Kuroki et al 2002) et l'ovaire (Paige et al 2001). Dans le cancer du sein la perte d'expression de *WWOX* est corrélée avec le sous type moléculaire basal (cf. 4.4.4) (Guler et al 2009). Ces observations

soutiennent l'idée que *WWOX* est un gène suppresseur de tumeur dont la perte d'expression favorise la carcinogénèse.

Le gène *WWOX* comprenant le site fragile FRA16D qui le rend susceptible aux cassures, à la perte d'hétérozygotie et aux délétions homozygotes notamment, en cas d'expositions à des carcinogènes. Ceci est soutenu par le fait que *WWOX* est altéré dans les carcinomes de l'œsophage (Kuroki et al 2002) et pulmonaires (Yendamuri et al 2003), les deux étant associés à l'utilisation du tabac et de l'alcool. De plus, l'expression de *WWOX* est altérée dans les carcinomes gastriques et ceci est fortement associé aux expositions aux carcinogènes environnementaux et alimentaires (Aqeilan et al 2004a).

D'autres mécanismes incluant des modifications épigénétiques et post transcriptionnelles ont été identifiés comme étant responsables de la régulation de la quantité de *WWOX* dans les cellules cancéreuses. L'inhibition de l'expression de *WWOX* induite par une hyperméthylation de *WWOX* a été observée dans différents types de cancers dont le cancer du pancréas, du sein et les carcinomes pulmonaires (Iliopoulos et al 2005, Kuroki et al 2004). Il a été montré que la tyrosine kinase Ack1 phosphoryle *WWOX* sur sa tyrosine 287 ce qui conduit à l'ubiquitination de *WWOX* et donc à sa dégradation par le protéasome (Mahajan et al 2005). Ack1 inhiberait ainsi la production de *WWOX* dans le cancer de la prostate.

En résumé, la perte d'expression de *WWOX* dans les cellules cancéreuses peut être due à des modifications génétiques, épigénétiques et post transcriptionnelles. Jusqu'à présent, des mutations de *WWOX* n'ont été que très rarement mises en évidence.

2.2.1.3. Perte d'expression de *WWOX* dans les lignées

La perte ou faible expression de *WWOX* et la présence de transcrits alternatifs de ce gène ont été détectés dans différentes lignées cellulaires cancéreuses de différentes origines (Driouch et al 2002, Paige et al 2001). Des transcrits aberrants manquant les exons 5, 6, 7 et 8 ont été retrouvés dans des lignées cellulaires de carcinomes pulmonaires, gastriques et mammaires (Aqeilan et al 2004a, Driouch et al 2002, Yendamuri et al 2003).

2.2.1.4. Transformation cellulaire *in vitro*.

La surexpression de *WWOX* dans la lignée mammaire HTB435 ayant une expression faible de ce gène, inhibe la croissance indépendante du support et la tumorigénèse (Bednarek et al 2001). Dans une étude ultérieure, il a été démontré que la surexpression de *WWOX* dans les lignées cellulaires du cancer du poumon augmente l'apoptose dépendante de la caspase-3

et induit une inhibition de la tumorigenèse Des résultats similaires ont été obtenus avec des cellules cancéreuses de sein (Iliopoulos et al 2007), prostate (Qin et al 2006) pancréas (Nakayama et al 2008) et ovaire (Gourley et al 2009). En outre, la restauration de l'expression de *WWOX* en utilisant les approches de modulation épigénétiques suppriment la tumorigénécité *in vitro* et *in vivo* (Cantor et al 2007). Tous ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle *WWOX* est un gène supprimeur de tumeur.

2.2.1.5. Modèles animaux.

Une étape importante dans la caractérisation fonctionnelle d'un gène est la production de modèles animaux. Chez la souris, le locus *Wwox* murin est homologue au *WWOX* humain et contient un site fragile commun *Fra8E1* hautement conservé (Krummel et al 2002). Pour cette raison le gène *Wwox* murin a été considéré comme un modèle approprié pour l'étude de la fonction supprimeur de tumeur du gène *WWOX* humain. En 2007, les premières souris *Wwox*^{-/-} ont été créés (Aqeilan et al 2007b). Les souris déficientes pour *Wwox*, naissent sans malformation visible, cependant, cette délétion de *Wwox* a causé des létalités post-natales handicapant ainsi l'étude du rôle supprimeur de tumeur chez les souris adultes. En effet, ces souris meurent à l'âge de trois semaines. Néanmoins, chez les souris KO *Wwox*, il a été observé des développements d'ostéosarcomes indiquant un rôle essentiel de *WWOX* en tant que gène supprimeur de tumeur dans ce type de cancer.

On ne connaît pas la raison de la mort des souris *Wwox*^{-/-}. Ces souris présentent des désordres métaboliques caractérisés par des hypocholestérolémie, hypotriglycéridémie, hypoalbuminémie, hypoprotéinémie, hypoglycémie et hypocalcémie (Aqeilan et al 2008). Les souris présentent aussi des organes hypotrophiés (os, rate, thymus, ovaire, tissu adipeux brun, cœur, foie, testicule) et hypertrophiés (cerveaux, glande pituitaire et surrénales) (Aqeilan and Croce 2007, Aqeilan et al 2008). Les souris déficientes pour *Wwox* n'ont pas de comportements anormaux ou des habilités motrices affaiblies. A un stade plus avancé, précédent leur mort, ces souris *Wwox* KO, deviennent léthargiques et montrent des signes de dépérissement. La complexité phénotypique liée à la déficience en *Wwox* chez les souris KO soutient l'importance de *WWOX* pour la survie et suggère que d'autres protéines comportant des domaines WW ou SDR ne compensent pas la perte de *WWOX* pour ces phénotypes.

En outre, il a été mis en évidence que des souris femelles hypomorphes (le produit du gène est synthétisé et il a la même fonction que le produit sauvage mais la mutation créée au sein de ce gène fait que, soit il est produit en plus faible quantité soit il est moins actif)

développent de façon spontanée des lymphomes de cellule B soutenant là encore le rôle suppresseur de tumeur de WWOX. (Ludes-Meyers et al 2007).

Des souris hétérozygotes *Wwox*^{+/-} présentent une espérance de vie supérieure aux souris *Wwox*^{-/-} (Aqeilan et al 2007b). Elles ont été suivies pendant deux ans et il a été observé un développement spontané de tumeurs pulmonaires et mammaires chez ces souris hétérozygotes vieillissantes plus élevé que chez les souris sauvages. Une simple baisse de l'expression de WWOX suffirait donc à induire la carcinogenèse (haploinsuffisance). Le facteur âge suggère que WWOX pourrait contribuer à l'évolution d'autres altérations génétiques qui mènent à la formation de tumeurs.

Suite à ces observations, d'autres tests ont été fait sur ces souris hétérozygotes *Wwox*^{+/-}. Dans une étude, les souris ont été traitées par un mutagène chimique, l'ENU. Quatre semaines plus tard, une incidence très élevée de formation de tumeur a été observée chez les souris hétérozygotes. Parmi ces tumeurs, des leucémies lymphoblastiques, des tumeurs pulmonaires, mammaires et hépatiques (Aqeilan et al 2008).

Dans une autre étude, les souris hétérozygotes *Wwox*^{+/-} ont été traités par le carcinogène œsophagiens préétablis, NMBA. Quinze semaines plus tard, toutes les souris hétérozygotes avaient développés des adénomes et des carcinomes invasifs au niveau de l'œsophage. Par contre, seulement 29% des souris sauvages avaient développés le même type de tumeurs(Kuroki et al 2002).

Toutes ces données indiquent que la perte d'expression de WWOX dans les modèles murins contribue à un développement de tumeur et laissent penser que la perte d'expression de WWOX dans les tumeurs humaines pourrait être un événement crucial de la transformation cellulaire. En conclusion, l'ensemble de ces observations suggère fortement que le gène WWOX code une protéine suppresseur de tumeur altérée dans différents types de cancers. L'inactivation de WWOX dans les cellules cancéreuses peut être due à des modifications génétiques, épigénétiques et post transcriptionnelles.

2.2.2. Mécanismes moléculaires par lesquels WWOX inhiberai la carcinogenèse.

2.2.2.1. Partenaires moléculaires de WWOX.

Différentes études ont mis en évidence un nombre important de partenaires moléculaires de WWOX suggérant des rôles de cette protéine dans diverses fonctions cellulaires :

prolifération, différenciation, apoptose et suppression de tumeur. La protéine WWOX est capable de se lier par son domaine WW de groupe I à différentes protéines par leurs motifs PPXY. Mais il existe aussi des partenaires de WWOX décrits n'ayant pas de motif PPXY.

Le tableau suivant résume la plupart des partenaires moléculaires de WWOX décrits dans la littérature ainsi que leurs fonctions.

Tableau 2 : Partenaires moléculaires de WWOX et leurs fonctions.

Partenaire de WWOX	Fonction
P73 (Aqeilan et al 2004c)	Facteur de transcription pro-apoptotique (Protéine suppresseur de tumeur).
SIMPLE (Ludes-Meyers et al 2004)	Petite protéine membranaire des endosomes. La mutation de ce gène est impliquée dans la maladie CMT1C.
Ap2 α et γ (Aqeilan et al 2004b)	Facteur de transcription impliqué dans la prolifération et le développement des cellules mammaires, souvent surexprimé dans les cancers mammaires.
ICD (domaine intra cellulaire de ErbB4) (Aqeilan et al 2005)	Récepteur tyrosine kinase impliqué dans la carcinogénèse mammaire.
Ack1 (Mahajan et al 2005)	Sa surexpression favorise le cancer de la prostate.
c-Jun (Gaudio et al 2006)	Facteur de transcription qui, avec c-fos, forme AP1. Régule la prolifération, différenciation et l'apoptose de différents types cellulaire.
Ezrin (Jin et al 2006)	Protéine du cytosquelette qui participe à l'adhérence, la motilité et la survie cellulaire. cette protéine est aussi impliquée dans l'invasion des cellules cancéreuses mammaires.
Runx2 (Aqeilan et al 2008)	Régulateur transcriptionnel des gènes impliqués dans la différenciation des ostéoblastes et la morphogénèse squelettique favorise la formation des métastase osseuse de cancer du sein.
P53, (liaisons indépendantes de PPXY)(Chang et al 2007)	Facteurs de transcription impliqué dans la réparation de l'ADN, l'arrêt de croissance et l'apoptose.
Jnk « c-jun N-terminal kinase » (liaison indépendante de PPXY) (Chang et al 2003)	Membre des MAP kinases, jouant des rôles anti et pro apoptotiques.
Tau (liaison indépendante de PPXY) (Sze et al 2004)	La mutation du gène tau a été associée à différents troubles neurodégénératifs tel que la maladie d'Alzheimer.
TAX (protéine virale) (Fu et al 2010)	TAX est une onco-protéine virale qui induit la tumorigénèse <i>via</i> la voie de signalisation non-canonique NF κ B.
Creb (Li et al 2009)	WWOX phosphoryle sur la tyrosine 33, s'accumule dans le noyau des neurones sectionnées chez le rat, se lie à CREB et inhibe son activité liée à la survie cellulaire, et augment l'activité du promoteur NF κ B qui est responsable de l'apoptose.
Hyal2 (Hsu et al 2009)	Hyal-2 est une hyaluronidase impliquée dans le cancer. TGF β 1 se lie au récepteur hyal-2, ce qui induit la formation du complexe WWOX/HYAL-2 ainsi que sa localisation dans le noyau induisant ainsi l'apoptose.

Zfra (Hsu et al 2008)	La surexpression de <i>WWOX</i> induit la libération du cytochrome C de la mitochondrie. Cette libération induit l'apoptose. Zfra, est capable de s'associer à <i>WWOX</i> sur les domaines WW1 et ADH et d'inhiber sa fonction apoptotique.
TMEM207 (Takeuchi et al 2012).	TMEM 207 est une protéine transmembranaire capable de se lier à <i>WWOX</i> via son motif PPXY. Cette association favoriserait l'invasion et la formation de métastases des "gastric signet-ring cell carcinoma".

2.2.2.2. *WWOX* inhibe des protéines favorisant la carcinogénèse.

Différentes études portant sur les partenaires de *WWOX* montrent que ce dernier est capable de se lier à des proto-oncoprotéines impliquées dans la cancerogénèse : EZRIN, AP2- γ , AP2- α , le domaine intracellulaire (ICD) de ErbB4, RunX2 et JUN.

WWOX se lie à AP2- γ et AP2- α , deux membres de la famille de facteurs de transcription AP2 qui jouent un rôle important dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire de différents tissus et organes au cours de l'embryogénèse (Hilger-Eversheim et al 2000). Les facteurs de transcription AP2- γ sont impliqués dans la carcinogénèse mammaire. Le gène codant AP2- γ est localisé sur le locus 20q13.2 fréquemment amplifié dans les lignées cellulaires et dans les carcinomes mammaires et lui confère un rôle d'oncogène (Tummala et al 2003). AP2- γ possède un motif 56PPPYY62 qui se lie avec une haute affinité au domaine WW1 de *WWOX*. L'association *WWOX*-AP2- γ résulte en la séquestration de ce dernier dans le cytoplasme. Cette séquestration inhibe l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription AP2- γ , ainsi que son activité oncogénique (Aqeilan et al 2004b).

WWOX reconnaît aussi le motif PPVY de C-JUN, qui, avec C-FOS forme le facteur de transcription nucléaire AP-1. C-JUN joue un rôle dans la prolifération et l'apoptose des cellules épithéliales. La phosphorylation de c-JUN causée par une surexpression de la kinase MEK1, augmente son interaction avec *WWOX*, de ce fait, c-JUN est séquestré dans le cytoplasme et son activité transcriptionnelle médiée par l'activation de JNK est inhibée (Gaudio et al 2006).

HER4/ERBB-4 est un membre d'une famille de récepteurs tyrosine kinases qui inclut les facteurs de croissance épidermique (ERBB-1, ERBB-2, et ERBB-3). ERBB-4 régule la différenciation et la prolifération cellulaire (Yarden and Sliwkowski 2001). La liaison du ligand sur ERBB-4 induit la libération par clivage de la partie cytoplasmique du récepteur. La protéine cytoplasmique de ERBB-4 va alors pouvoir migrer dans le noyau et activer la transcription. Ce phénomène est amplifié dans le cancer du sein (Hollmen et al 2012). *WWOX* est capable de lier par son domaine WW1 les deux motifs riches en prolines PPXY

de ERBB-4. Il séquestre le fragment cytoplasmique de ERBB-4 dans le cytoplasme induisant une diminution de son activité transactivatrice. En outre, La protéine YAP interagit avec le récepteur tyrosine kinase ERBB-4 et agit comme coactivateur transcriptionnel du fragment cytoplasmique de ERBB-4. Elle contient des domaines WW de classe I reconnaissant des motifs PPXY. Il existe une compétition entre WWOX et YAP pour l'association avec ERBB-4 et l'association WWOX-ERBB-4 est dominante (Aqeilan et al 2005). WWOX inhibe donc ERBB-4 en séquestrant la partie cytoplasmique de cette protéine dans le cytoplasme, et aussi, en créant une compétition avec YAP pour ERBB-4.

Dans le noyau, WWOX est capable de s'associer à RunX2 et d'inhiber, par un mécanisme inconnu, son l'activité transcriptionnelle (Aqeilan et al 2008). WWOX est donc capable d'inhiber diverse molécules liées à la transcription *via* différents mécanismes.

Enfin, WWOX est capable d'interagir avec l'Ezrin. Ezrin a été décrite comme protéine impliquée dans l'invasion des cellules cancéreuses mammaires (Elliott et al 2005). Il est donc probable que WWOX s'oppose à la carcinogénèse mammaire en inhibant Ezrin.

2.2.2.3. WWOX coopère avec des gènes suppresseurs de tumeur.

Le premier partenaire moléculaire de WWOX identifié est p73, l'homologue de p53. La protéine p73 est considérée comme un suppresseur de tumeur (Aqeilan et al 2004c). Le gène TP73 code 7 isoformes (α - η) générés par épissage alternatif en 3'. La protéine WWOX *via* WW1 est capable d'interagir avec le domaine 482PPPPY488 de différents isoformes de p73, P73 α , P73 β et Δ Np73. Cette interaction fait que P73, qui est une protéine nucléaire, reste séquestrée dans le cytoplasme interdisant à cette dernière de stimuler la transcription. Dans le cytoplasme, P73 augmente l'activité pro-apoptotique de WWOX indépendamment de son activité transcriptionnelle. Elle joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. Chang a également montré que WWOX s'associe à P53 et suggère que WWOX est indispensable à la fonction pro-apoptotique de P53 (Chang 2002).

2.2.3. Autres fonctions de WWOX.

En dehors de son rôle suppresseur de tumeur, différents travaux suggèrent d'autres fonctions de WWOX. En s'associant avec Ezrin, WWOX serait impliquée dans la régulation de la sécrétion de HCl dans les cellules pariétales gastriques (Jin et al 2006).

La présence de son domaine SDR et son expression forte dans les cellules hormono-régulées suggèrent que WWOX soit impliqué dans le métabolisme des stéroïdes sexuels.

L'étude des modèles animaux a démontré l'implication de WWOX dans la différenciation ostéogénique (Aqeilan et al 2008).

Figure 5 : WWOX participe dans différentes voies de signalisations associées à des cancers par des interactions de type protéine-protéine.

Les interactions de WWOX avec ses partenaires dans les voies de signalisations sont affectées par l'absence ou la diminution de l'expression de WWOX. WWOX, par son domaine WW1, se lie à différentes protéines sur leurs motifs PPXY et les séquestre dans le cytoplasme inhibant ainsi leur fonction transactivatrice. Parmi ces protéines, *Ap2a γ* , p73, ErbB4 et le fragment juxta-membranaire de Met (CTF). De plus WWOX entre en compétition avec d'autres protéines ayant un domaine WW1 pour son interaction avec certaines protéines. Par exemple, WWOX compétitionne avec YAP pour l'interaction avec ErbB4ICD et inhibe l'activité de ICD induite par YAP. En plus de la séquestration des fragments actifs de ErbB4 et Met, WWOX lie et stabilise la forme full length de ces protéines. Dans les ostéoblastes et probablement dans certaines tumeurs solides, WWOX s'associe avec RunX2 et inhibe sa fonction transactivatrice. En réponse à des signaux de stress de type UV, le complexe WWOX-Jun est significativement augmenté. Ceci induit la séquestration de Jun dans le cytoplasme inhibant ainsi sa fonction transactivatrice médiée par l'activation de Jnk (Salah et al 2010).

Chapitre 3 : La voie Wnt/ β -caténine

3.1.Généralités.

Historiquement, la mise en évidence de la voie de signalisation intracellulaire Wnt/ β -caténine a débuté par l'identification, en 1982, du gène Wnt1, nommé initialement Int-1, en tant que site préférentiel d'intégration du virus MMTV (Reya and Clevers 2005). Wnt-1 code une protéine sécrétée riche en cystéine. Par la suite, le gène de drosophile wg, impliqué dans l'embryogenèse, a été identifié en tant que gène homologue de Wnt-1. Plus tardivement, l'homologue du Wnt-1 chez le Xénope (Wnt11, impliqué lui aussi dans l'embryogenèse) a également été mis en évidence. L'étude de la drosophile et du xénope a permis de définir une voie très conservée au cours de l'évolution, activée par le ligand Wnt1 ; la voie Wnt/ β -caténine. Cette voie régule la stabilité de la β -caténine non liée à la membrane plasmique. Cette protéine a deux rôles bien distincts. Dans le noyau, elle régule la transcription de gènes et à la membrane plasmique, elle est impliquée dans les interactions cellule-cellule. Cette voie de signalisation contrôle l'embryogenèse ainsi que le développement et l'homéostasie dans plusieurs tissus chez l'adulte (Willert and Jones 2006). Elle agit en modulant la prolifération, différenciation et migration cellulaire, ainsi que l'apoptose, l'établissement de la polarité cellulaire et tissulaire et la prolifération des cellules souches (Reya and Clevers 2005). Cette voie est complexe et l'ensemble de ses rôles physiologiques est encore loin d'être déchiffré. On trouve dans cette voie des protéines actrices du nom de Wingless, Frizzled et Disheveled qui désignent des mutants du développement chez la drosophile. Certaines altérations génétiques de cette voie chez l'homme provoquent des pathologies; plusieurs altérations somatiques ou germinales sont liées à l'oncogenèse.

Chez les mammifères, Wnt1 fait partie d'une famille de 19 membres. Les protéines Wnt sont des morphogènes (Morrell et al 2008). Ce sont des protéines d'environ 350 à 400 acides aminés riches en cystéine. Elles possèdent du côté N-terminal un signal peptidique responsable de leur sécrétion. La sécrétion de ces protéines requiert deux types de modifications lipidiques les rendant hydrophobes et donc faiblement soluble (Reya and Clevers 2005). Une mutation interdisant l'une de ces modifications lipidiques peut entraîner l'accumulation de la protéine Wnt dans le réticulum endoplasmique et ainsi une défaillance sécrétoire (Takada et al 2006). La protéine murine Wnt3A a été la première à être purifiée et caractérisée de manière biochimique grâce à un potentiel de sécrétion élevé (Willert et al 2003). Les protéines Wnt modulent la voie Wnt/ β -caténine, mais pas seulement. D'autres voies ont été identifiées en tant que voie sous contrôle de ces protéines. Ces voies sont la voie

Wnt/PCP « Planar Cell Polarity » et Wnt/Ca⁺⁺ (la voie calcium). Il a été montré récemment que les protéines Wnt activent également les récepteurs tyrosines kinases Ryk et Ror2 (van Amerongen et al 2008).

Figure 6 : Les différentes voies de signalisations Wnt

Dans la voie dépendante de la β -caténine, Wnt active de multiples voies de signalisations intracellulaires. Suite au modèle le plus accepté de la voie dépendante de la β -caténine, en absence de ligand Wnt, CK1 α et GSK3 β phosphorylent la β -caténine dans le complexe d'axine. La β -caténine phosphorylée est ubiquitinilée et ceci induit sa dégradation par le protéasome. En présence de ligand Wnt, il se lie aux récepteurs Fz et LRP5/6, la β -caténine s'accumule donc dans le cytoplasme et migre au noyau où induit la transcription des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine. Dans les voies de signalisation indépendantes de la β -caténine, certains Fz activent la voie PCP dans laquelle les petites protéines G (Rho et Rac), JNK et la Rho-kinase sont actives. La voie PCP régule le cytosquelette et régule la polarité et la migration cellulaire. Des protéines Wnt et Fz peuvent induire l'augmentation de la concentration de Ca⁺⁺ intracellulaire et active CaMK et PKC résultant en l'inhibition de la voie de signalisation dépendante de la β -caténine et stimule la migration cellulaire. Wnt5a se lie à Ror2 et active la voie JNK ou interagit avec la filamine A induisant la migration cellulaire. la signalisation par Ror2 et Wnt5a *via* Cdc42 activent JNK et entraîne l'expression de photocadhérine paraxiale et la régulation des mouvements convergents au cours de la gastrulation chez le Xénope. Les ligands Wnt1, Wnt3a et Dwn5 se lient à Ryk et contrôlent la guidance axonale et la migration de la glande salivaire, et ce probablement *via* Src (Kikuchi et al 2009).

La voie Wnt/PCP a été identifiée chez la drosophile. Elle est médiée par les récepteurs à sept domaines transmembranaires Fz formant une famille de 10 membres chez les mammifères. Ces récepteurs activés stimulent les petites protéines G tel que Rho et Rac ainsi que JNK et la Rho-kinase (Prockop et al 2003). Cette voie est impliquée dans la migration et la polarité cellulaire chez la drosophile et le xénope mais son rôle exact chez les mammifères reste encore mal connu.

La voie Wnt/Ca⁺⁺ induit, *via* l'activation de récepteurs Fz, la libération de calcium. Un niveau élevé de calcium cytosquelétique active la calcineurine phosphatase qui active le

facteur de transcription NF-AT (Tada et al 2002). Cette voie semble inhiber la voie Wnt/ β -caténine et stimule la migration cellulaire.

Chez la drosophile, Ryk favorise le guidage axonal et la migration des glandes salivaires vraisemblablement *via* l'activation de la tyrosine kinase Src (van Amerongen et al 2008).

Ror2 est impliqué dans l'embryogenèse chez le xénope et la souris. Ce récepteur agirait, au moins en partie, en modulant l'activité Jnk.

De nombreux résultats expérimentaux suggèrent fortement que les ligands Wnt ne sont pas strictement spécifiques d'une voie donnée. La réponse d'une cellule à ces ligands semble être défini plutôt par la nature et l'abondance des récepteurs des ligands Wnt qu'elle exprime (van Amerongen et al 2008).

3.2. Description de la voie Wnt/ β -caténine.

Comme déjà signalé, cette voie régule la stabilité de la β -caténine (cf. 3.1).

En absence de ligand Wnt, la voie Wnt/ β -caténine est en mode « off ». La protéine d'échafaudage axine, interagit *via* des domaines différents avec APC, les sérines thréonines kinases GSK3 α/β et CK1 $\alpha/\delta/\epsilon$ ainsi que la β -caténine. Ce complexe est nommé : complexe de dégradation de la β -caténine. L'axine s'associe avec APC *via* son domaine RGS. Les composants de ce complexe assurent ensemble la phosphorylation séquentielle de la β -caténine sur la sérine 45 par CK1, puis sur la thréonine 41, la sérine 37 et la sérine 33 par la GSK3 (Kimelman and Xu 2006). La phosphorylation de la β -caténine sur les sérines 33 et 37 entraîne son ubiquitination et donc sa dégradation par le protéasome.

L'axine et l'APC sont aussi phosphorylées par GSK3 et CK1. Ces phosphorylations renforcent leur association à la β -caténine, favorisant donc la phosphorylation et la dégradation de la β -caténine (Huang and He 2008, Kimelman and Xu 2006).

PP1 et PP2A sont des sérines/thréonines phosphatases impliquées dans la modulation de la formation du complexe de dégradation de la β -caténine. Elles se lient à l'axine et/ou APC et contrent l'action de GSK3 et/ou CK1 au sein du complexe. Ainsi PP1 déphosphoryle l'axine et favorise la dissociation du complexe (Luo et al 2007) tandis que PP2A déphosphoryle la β -caténine inhibant ainsi sa dégradation. (Su et al 2008).

Le rôle d'APC au sein du complexe de dégradation de la β -caténine n'est pas clair. Des études suggèrent que APC protège la β -caténine de la déphosphorylation médiée par PP2A favorisant ainsi la dégradation de la β -caténine (Su et al 2008).

Figure 7 : Régulation de l'assemblage du complexe d'axine pour la dégradation de la β -caténine.

Les composants clés du complexe d'axine –axine, APC, GSK3 β et CK1- activent la phosphorylation de la β -caténine par β -Tcrp pour sa dégradation. En plus de la phosphorylation de la β -caténine, GSK3 β et CK1 phosphorylent axine et APC et augmentent leur liaison à la β -caténine et la stabilité du complexe de dégradation, pour entretenir la phosphorylation de la β -caténine. La figure illustre la phosphorylation (par CK1 et GSK3 β) et la déphosphorylation (par PP2A) de la β -caténine. APC pourrait agir en prévenant la déphosphorylation de la GSK3 β par PP2A. APC facilite la dégradation de l'axine et l'inverse est probable aussi (indique en pointille). PP1 déphosphoryle axine et antagonisent la phosphorylation de CK1 et régulent négativement l'association GSK3-axine induisant le désassemblage du complexe (Brown 2001).

En présence d'un ligand Wnt, la voie est en mode « on », conduisant à la stabilisation de la β -caténine. Les mécanismes moléculaires par lesquels Wnt stabilise la β -caténine sont encore de nos jours assez mal définis. Le modèle le plus largement admis est le suivant :

Initialement, la protéine Wnt se lie à un membre de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires Fz (Logan and Nusse 2004) et au corécepteur LRP5 ou LRP6 (He et al 2004). LRP5/6 ont chacun cinq motifs PPPSPXS du côté cytoplasmique essentiels pour leur fonction (MacDonald et al 2008). Suite à la liaison d'un ligand Wnt à Fz et LRP5/6, ces motifs sont doublement phosphorylés par la GSK3 et la protéine membranaire CK1 γ et deviennent des points d'ancrage pour l'axine. Cette liaison induit également l'association de Fz à son partenaire cytoplasmique Dvl - Le terme Dvl regroupe une famille de trois protéines chez les mammifères Dvl1, 2 et 3 (Semenov and Snyder 1997). Elles contiennent chacune

trois domaines conservées :le domaine DIX en N-terminal responsable de la polymérisation de Dvl (Smalley et al 2005), un domaine central PDZ responsable de la transduction du signal à partir de la membrane en interagissant directement avec Fz (Punchihewa et al 2009), et un domaine en C-terminal DEP qui interagit avec d'autres protéines importantes dans la signalisation (Wong et al 2000). Les protéines Dvl sont des composants essentiels de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, WNT/PCP et WNT/ Ca^{++} .- Dvl associé a Fz s'oligomérisé formant la aussi un point d'ancrage pour l'axine (Gao and Chen 2010). La formation de ces points d'ancrage conduit au recrutement de l'axine à la membrane plasmique et donc à la dissociation du complexe de dégradation de la β -caténine. En conséquence, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme et le noyau où elle lie les facteurs de transcriptions de la famille TCF/LEF (Behrens et al 1996). Les facteurs de cette famille interagissent directement avec l'ADN au niveau de sites spécifiques du type (A/T)(A/T)CAA(A/T)GG *via* leurs domaines nommés WRE. En absence d'une signalisation Wnt, les facteurs TCF agissent comme des répresseurs transcriptionnels en formant un complexe avec le corépresseur Groucho/TLE (Cavallo et al 1998). Groucho inhibe la transcription en recrutant des HDACs. La liaison de la β -caténine à un facteur TCF convertit ce dernier en activateur transcriptionnel des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine en créant une compétition avec Groucho pour les facteurs TCFs est en recrutant des coactivateurs. Ces coactivateurs sont des protéines impliquées dans l'initiation de la transcription, la modification des histones de l'ADN ainsi que BCL9 et BCL9-2 (Chen et al 1999, Daniels and Weis 2005).

Le gène humain *BCL9* est localisé en 1q21 et code une protéine de 140 KDa (Sustmann et al 2008). Ce gène a initialement été identifié en clonant la translocation (1 ; 14) (q21 ; q32) retrouvée chez un patient souffrant d'une leucémie lymphoblastique des cellules B (Willis et al 1998). Le gène *BCL9-2* (*BCL9* « Like ») est un homologue de *BCL9*. Il est localisé en 11q23.3 et code une protéine de 200 KDa (Brembeck et al 2006). *BCL9* et *BCL9-2* se lient à la β -caténine et recrutent Pygopus (Thompson et al 2002). Ce trimère est impliqué dans l'import et la rétention nucléaire de la β -caténine (Townesley et al 2004) et contribue directement à l'activation de la transcription par la β -caténine (Hoffmans et al 2005). Chez les mammifères, *BCL9-2* et *BCL9* jouent un rôle important dans la transmission des effets positifs de la voie Wnt/ β -caténine lors de la régénération du muscle (Brack et al 2009) et du côlon (Deka et al 2010). Cependant, ces deux molécules ne sont pas impliquées dans le développement et l'homéostasie du côlon (Deka et al 2010). *BCL9* et *BCL9-2* semblent donc être importantes pour la voie Wnt/ β -caténine uniquement dans certaines situations pathologiques comme la régénération.

Figure 8 : Complexes nucléaires co-activateurs TCF/ β -caténine.

Lors de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, TCF/ β -caténine recrute plusieurs complexes co-activateurs des gènes cibles de Wnt. Quelques uns de ces complexes sont représentés dans cette figure. Les lignes pointillées représentent les interactions avec la β -caténine ou entre les complexes. Lors d'une transcription active des gènes cibles de Wnt, APC induit l'échange entre la β -caténine/co-activateurs et co-represseurs CtBP, TLE et HDAC de manière cyclique (flèche rouge à deux sens) pendant que TCF reste liée à WRE. Ac et Me symbolisent les modifications d'histones (Acétylation et Méthylation) (Brown 2001).

Les gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine sont multiples et spécifiques du type cellulaire. Ils sont répertoriés dans une bibliothèque en ligne maintenue à jour (<http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>). Parmi ces gènes, beaucoup jouent des rôles essentiels dans les cancers, en particulier cycline D1 et Myc, deux gènes codant des régulateurs positifs du cycle cellulaire. L'expression de divers régulateurs de la voie Wnt/ β -caténine, comme Fz, LRP, axine et TCF/LEF sont sous le contrôle du complexe β -caténine-TCF/LEF.

3.3. Pathologies et la voie Wnt/ β -caténine.

En tenant compte de l'importance de cette voie durant le développement et l'homoeostasie, il est évident que des mutations au niveau de ses composants seraient associés à des pathologies (MacDonald et al 2009).

Tableau 3 : maladies humaines associées à des mutations de gènes impliquées dans la voie Wnt/ β -caténine.

Gène	Fonction	Maladie humaine
<i>PORCINE</i>	Impliqué dans les modifications lipidiques de Wnt	perte de fonction entraîne une hypoplasie cutanée focale <i>X-linked</i> .
<i>WNT3</i>	Ligand de la voie Wnt/ β -caténine	perte de fonction entraîne une Tétrahydro-Amélie.
<i>WNT4</i>	Ligand de la voie Wnt/ β -caténine	perte de fonction entraîne une Régression du canal de Muller.
<i>WNT5B</i>	Ligand de la voie Wnt/ β -caténine	?? Diabète de type II
<i>WNT7A</i>	Ligand de la voie Wnt/ β -caténine	perte de fonction responsable du Syndrome de Fuhrmann
<i>WNT10A</i>	Ligand de la voie Wnt/ β -caténine	perte de fonction entraîne une Hypoplasie dermique.
<i>WNT10B</i>	Ligand de la voie Wnt/ β -caténine	perte de fonction entraîne une obésité.
<i>RSPO1</i>	Agoniste de Wnt.	Perte de fonction entraîne une réversion de sex XX accompagnée d'une hyperkératose plantaire.
<i>RSPO4</i>	Agoniste de Wnt	perte de fonction entraîne un hyponychium congénital.
<i>SOST</i>	Antagoniste de LRP5/6 exprime dans les ostéocytes.	perte de fonction entraîne une Augmentation de la masse osseuse, la sclérose et la maladie de <i>Van Buchem</i> .
<i>NDP</i>	Ligand de LRP5 et FZD4 durant le développement oculaire.	perte de fonction entraîne une Vitreorétinopathie exudative familiale.
<i>LRP5</i>	Co-récepteur de Wnt	Gain de fonction entraîne une tumeur de la hyperparathyroïdie. Perte de fonction entraîne un défaut vasculaire des yeux ou l'ostéoporose.
<i>LRP6</i>	Co-récepteur de Wnt	perte de fonction entraîne une maladie coronaire et l'ostéoporose.
<i>FZD4</i>	Récepteur de Wnt	perte de fonction entraîne une vitreorétinopathie exudative familiale.
<i>Axin 1</i>	facilite la dégradation de la β -caténine Agit comme suppresseur de tumeur.	perte de fonction entraîne une duplication caudale ou un cancer.
<i>Axin 2</i>	facilite la dégradation de la β -caténine Agit comme suppresseur de tumeur.	perte de fonction entraîne une agénésie des dents ou un cancer.
<i>APC</i>	facilite la dégradation de la β -caténine Agit comme suppresseur de tumeur.	perte de fonction entraîne la polypose adénomateuse familiale.
<i>WTX</i>	facilite la dégradation de la β -caténine Agit comme suppresseur de tumeur.	perte de fonction entraîne le cancer de Wilms.
<i>β-caténine (CTNNB1)</i>	Effecteur primaire de Wnt	Gain de fonction entraîne un cancer.
TCF4	Partenaire transcriptionnel de β -caténine	Diabète de type II.

De nombreuses maladies humaines sont associées à des mutations de gènes liés à la voie Wnt/ β -caténine (tableau 3). Par exemple, des mutations de LRP5 sont associées à une augmentation de la densité osseuse (Boyden et al 2002), et différents déficits vasculaires des

yeux (Gong et al 2001, Toomes et al 2004). Des mutations de l'axine2 sont liées à un défaut du développement dentaire (Lammi et al 2004).

Une dérégulation de la signalisation Wnt/ β -caténine a été décrite dans différents cancers humains, notamment, le cancer du côlon, les carcinomes hépatocellulaires, les leucémies et le mélanome (Gregorieff and Clevers 2005, Moon et al 2004, Radtke et al 2005, Reya and Clevers 2005). Ces cancers sont souvent associés à des mutations au niveau des protéines du complexe de dégradation de la β -caténine ou, au niveau des sites de phosphorylation de la β -caténine qui sont ciblés par les kinases de ce complexe. Ces mutations conduisent à une accumulation nucléaire de β -caténine, une expression continue des gènes cibles, tel que la cycline D1, Myc et donc à l'activation de la prolifération cellulaire (Clevers 2005).

Dans la plupart des cancers colorectaux, il a été identifié des mutations héréditaires ou sporadiques du gène suppresseur de tumeur APC. Une mutation héréditaire de APC est la cause génétique du cancer héréditaire du colon nommé FAP. Ces mutations produisent des protéines APC incapables de lier l'axine et/ou de dégrader la β -caténine. La β -caténine va alors s'accumuler dans le cytoplasme et le noyau, ce qui résulte en une expression continue de gènes impliqués dans la prolifération et plus particulièrement c-Myc (Kinzler and Vogelstein 1996). Les rares tumeurs contenant un gène APC sauvage possèdent une protéine axine inactivée par mutation ou une β -caténine mutée ne pouvant plus être détruite par le complexe de dégradation.

3.4.BCL9-2 / BCL9 et la carcinogénèse

Une surexpression de *BCL9* a été décrite dans différents cancers humains (Mani et al 2009, Takada et al 2012a, Takada et al 2012b). Une amplification du chromosome 1q21 contenant le locus *BCL9*, a été observée dans différents cancers humains (Beroukhim et al 2010) et a été associée à la progression tumorale, une diminution de la survie et à un mauvais pronostic clinique (Takada et al 2012a). La potentialisation de l'activité de la β -caténine médiée par *BCL9* augmente la prolifération, la migration, l'invasion, l'angiogénèse, le potentiel métastatique de certaines lignées de myélomes et de cancer du côlon (Mani et al 2009).

BCL9-2 est surexprimé dans le cancer du sein et dans le cancer colorectal (Adachi et al 2004, Brembeck et al 2011, Deka et al 2010, Sakamoto et al 2007, Toya et al 2007). A l'aide de modèles animaux, il a été montré que *BCL9-2* induit la carcinogénèse intestinale chez la souris (Brembeck et al 2011). Comme déjà vu, l'ablation de *BCL9* et *BCL9-2* dans l'épithélium colique de souris n'affecte en rien, alors que l'activité de la voie Wnt/ β -caténine

est indispensable pour, le développement et l'homéostasie de ce tissu (Deka et al 2010). Cependant, cette ablation inhibe significativement la prolifération tumorale induite chimiquement. Elle entraîne également au sein de ces tumeurs une baisse de l'expression de gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine liés à la transition EMT et aux cellules souches. BCL9 et BCL9-2 semblent donc être importantes pour la voie Wnt/ β -caténine uniquement dans certaines situations pathologiques comme la régénération et le cancer. L'ensemble de ces observations suggèrent fortement que BCL9 et BCL9-2 favorisent la carcinogenèse en activant la voie Wnt/ β -caténine. BCL9 et BCL9-2 pourraient être des cibles cliniques dans les tumeurs où la voie Wnt/ β -caténine est suractivée. Ceci pourrait atténuer les phénomènes tumoraux en laissant le tissu normal intact.

Chapitre 4 : Le cancer du sein

4.1. Incidence

Le cancer du sein est un problème majeur de santé publique puisque c'est le cancer le plus diagnostiqué chez les femmes (23 % de tous les cancers) à travers le monde, autant avant qu'après la ménopause. Dans le monde, plus de 1.3 millions de cas de cancer du sein surviennent chaque année. Les taux d'incidence sont élevés (plus de 80 pour 100 000 femmes) dans les régions développées (Europe de l'ouest, Amérique du nord), mais plus faibles (moins de 40 pour 100 000 femmes) dans les régions en développement (Afrique, Asie, Amérique du sud). En France, environ 42000 nouveaux cas sont diagnostiqués. On estime actuellement qu'une femme sur 9 sera atteinte d'un cancer du sein au cours de sa vie, et une femme sur 27 en mourra. Le cancer du sein représente la principale cause de mortalité chez les femmes entre 35 et 65 ans et cause chaque année plus de 400 000 décès.

Ce cancer peut aussi survenir chez les hommes mais est extrêmement rare ; environ 200 fois moins fréquent que chez la femme (Ferlay et al 2010).

Le cancer du sein touche la glande mammaire. Les cellules malignes se multiplient de manière désordonnée jusqu'à créer une tumeur et métastase dans des tissus spécifiques os, poumons, ganglions lymphatiques, foies et cerveaux. La plupart du temps, la progression d'un cancer du sein prend plusieurs mois et même quelques années (Lerebours and Lidereau 2002).

4.2. Facteurs de risques

Il est très difficile de déterminer la cause d'un cancer du sein. Des études scientifiques ont montré que certaines caractéristiques propres à la personne ou des comportements étaient plus souvent observés chez les femmes ayant eu un cancer du sein que chez les autres femmes.

Les femmes présentant l'une des caractéristiques, appelés facteurs de risque, ont ainsi un risque plus élevé que les autres de développer un jour un cancer du sein. Ces facteurs de risques peuvent être endogènes, c'est-à-dire constitutifs des individus ou exogènes, liés à l'environnement et aux modes et conditions de vie.

4.2.1. Facteurs de risques exogènes.

Les hormones :

- Une puberté précoce (premières règles avant 12 ans) et une ménopause tardive (après 55 ans) ;
- Une absence de grossesse ou première grossesse après 40 ans ;

- Le traitement substitutif hormonal de la ménopause augmente sensiblement le risque de survenue d'un cancer du sein.

L'obésité : Pour des raisons incomprises, l'obésité aggrave le risque de cancer du sein, et en particulier de prolifération rapide de cancer. Ceci a été démontré in vitro et in vivo, ainsi quand les cellules tumorales sont Co-cultives avec des adipocytes matures, ces dernières augmentent les capacités invasives du cancer. De manière générale, l'obésité doublerait le risque du cancer du sein.

La consommation d'alcool : Augmentation en moyenne de 30% du risque de cancer du sein pour trois verres d'alcool par jour.

Les radiations ionisantes : l'exposition du tissu mammaire aux radiations ionisantes avant l'âge de 40 ans, est associée a un risque de cancer du sein multiplié par trois, pour une exposition évaluée à 1 gray. Les radiations ionisantes augmentent le risque de cancer du sein dans la mesure où elles endommagent l'ADN.

Manque de vitamine D : il est connu que la vitamine D et ses analogues pharmaceutiques ont des effets d'anti-prolifération et de pro-différenciation, ce qui a des implications pour la prévention et le traitement des cancers en général. Plus récemment, la vitamine D s'est révélée apte à limiter la production excessive d'oestrogènes en agissant sur l'aromatase.

4.2.2. Facteurs de risques endogènes.

Le sexe : le sexe féminin est le facteur le plus important du cancer du sein. 99% des cancers du sein apparaissent chez la femme et seuls 1% des hommes sont concernés (Ferlay et al 2010).

L'âge : L'âge est un facteur important. Le plus souvent, dans 75% des cas, le cancer du sein survient chez les femmes de plus de 50 ans. Le taux de survie 5 ans après le diagnostic varie de 80 % à 90 %, selon l'âge et le type de cancer. Le nombre de personnes atteintes a progressé légèrement, mais régulièrement, au cours des 3 dernières décennies. Par contre, le taux de mortalité a continuellement diminué au cours de la même période, grâce aux progrès réalisés en matière de dépistage, de diagnostic et de traitement.

L'âge de la femme à la première grossesse : les femmes n'ayant pas d'enfant ou âgées de plus de 30 ans au moment de leur première maternité, sont exposées à un risque de cancer du sein légèrement plus élevé que les femmes ayant un premier enfant avant l'âge de 25 ans (MacMahon et al 1970). En effet, il a été démontré que la grossesse protège le sein du développement de tumeurs par la modification des cellules mammaires dans le sens d'une

plus grande différenciation. Or, les cellules différenciées sont moins sensibles aux carcinogènes, en particulier hormonaux.

La durée de vie génitale : l'apparition du cycle menstruel à un jeune âge (avant 12 ans) et son interruption (ménopause) à un âge plus avancé que la normale sont liées à un risque légèrement plus élevé de cancer du sein (Brinton et al 1988).

Les prédispositions génétiques héréditaires : Quelques cancers (seulement 5 à 10% d'entre eux) ont des prédispositions génétiques héréditaires. Une femme dont la mère ou la sœur a déjà eu un cancer du sein risque deux fois plus que les autres femmes de développer un cancer du sein. En 2008, dix gènes ont été associés à un risque accru de cancer du sein. Neuf sont liés au système de réparation de l'ADN. Le dixième code une protéine qui inhibe l'action de l'enzyme AKT1 (enzyme dont l'inhibition joue un rôle dans les cancers non-génétiques). Deux des dix gènes (BRCA1 et BRCA2) sont à eux seuls responsables de la moitié des cancers à prédisposition génétique héréditaire, soit 2,5 à 5% de tous les cancers du sein. Le mode de transmission est du type autosomique dominant. Chez une femme, la présence d'une seule mutation du gène a 80% de chance d'avoir un cancer de sein avant 60 ans (au lieu de 10% en l'absence de mutation).

Tableau 4 : Gènes mutés les plus importants conférant une prédisposition héréditaire au cancer du sein.

Gène muté	Fréquence	Fonction
<i>BRCA1</i>	20% des cancers du sein héréditaires ~ 5% de tous les cancers du sein.	Réparation de l'ADN et contrôle du cycle cellulaire.
<i>BRCA2</i>	20% des cancers du sein héréditaires ~ 5% de tous les cancers du sein	Réparation de l'ADN et contrôle du cycle cellulaire.
<i>TP53</i>	>1% des cancers du sein héréditaires 20 a 40% de tous les cancers du sein	Réparation de l'ADN, contrôle du cycle cellulaire et apoptose.
<i>CHEK2</i>	5% des cancers du sein héréditaires	Réparation de l'ADN et contrôle du cycle cellulaire impliquant BRCA1 et TP53
<i>PTEN</i>	0.1% des cancers du sein héréditaires	Contrôle du cycle cellulaire et de l'invasion cellulaire.

4.3. Anatomie de la glande mammaire

La glande mammaire est une glande exocrine dont la fonction est de produire et d'excréter le lait. Cette glande est apparentée aux glandes sudoripares par son origine embryologique et sa structure histologique. Elle est localisée dans le sein qui repose sur les muscles pectoraux. La glande mammaire est constituée de 10 à 20 lobes entourés et séparés par du tissu adipeux. Chaque lobe est constitué de lobules et est drainé par un canal galactophore. Chaque lobule est constitué d'acini (ou alvéoles) regroupés de façon dense autour d'un canalicule intra-lobulaire (ou canal alvéolaire). Plusieurs canaux alvéolaires se réunissent pour former le canal lobulaire (ou canalicule extra-lobulaire), et plusieurs canaux lobulaires se réunissent pour former le canal galactophore.

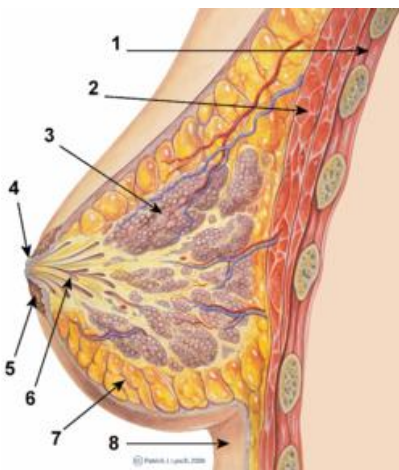


Figure 9 : Schéma anatomique de la glande mammaire.

- 1-Cage thoracique
- 2-Muscles pectoraux : le grand pectoral, le petit pectoral et le sous-clavier.
- 3-Lobes et lobules mammaire : système ramifié de canaux excréteurs terminés en cul-de-sac par des portions sécrétrices tubulo-alvéolaires. Chaque glande mammaire est constituée de 10 à 20 lobes drainés par des canaux galactophores ou collecteurs « lactifères » s'ouvrant individuellement à la peau au niveau du mamelon. Chaque lobe est constitué de plusieurs lobules, et chaque lobule est constitué de tubulo-alvéoles correspondant à la partie sécrétrice de la glande.
- 4-Mamelon (aussi appelé papille ou ostion papillaire) : c'est la partie colorée située au sommet du ballon du sein.
- 5-Aréole : zone circulaire plus ou moins pigmentée entourant le mamelon. Sa surface est parsemée de quelques éminences formées par des glandes sébacées ; les glandes aréolaires.
- 6-canaux galactophore : petits conduits par lesquels le lait est amené vers les orifices du mamelon.

7-tissu adipeux : tissu conjonctif contenant en majorité des cellules graisseuses appelées adipocytes. C'est un des plus grands réservoirs à énergie du corps humain. Il sécrète différentes hormones, les adipokines (leptine, TNF α) est capable de transformer certaines hormones, en particulier des stéroïdes sexuels.

8- peau

Deux compartiments tissulaires constituent la glande mammaire : le stroma et l'épithélium qui constitue les canaux et les alvéoles (tubulo-alvéoles) correspondant à la partie productrice et excrétrice de lait. Les tubulo-alvéoles sont constituées des cellules luminales sécrétrices au contact de la lumière, entourée de cellules myoépithéliales ou cellules basales qui évacuent le lait en se contractant et d'une membrane basale. Le stroma, ou mésenchyme, comprend la matrice extracellulaire ainsi qu'une variété de types cellulaires dont les fibroblastes, myofibroblastes, cellules endothéliales et leucocytes infiltrant. Ils assurent le soutien de l'organe et régulent la fonction de l'épithélium mammaire par l'intermédiaire d'interactions paracrines, physiques et hormonales (Polyak and Kalluri 2010).

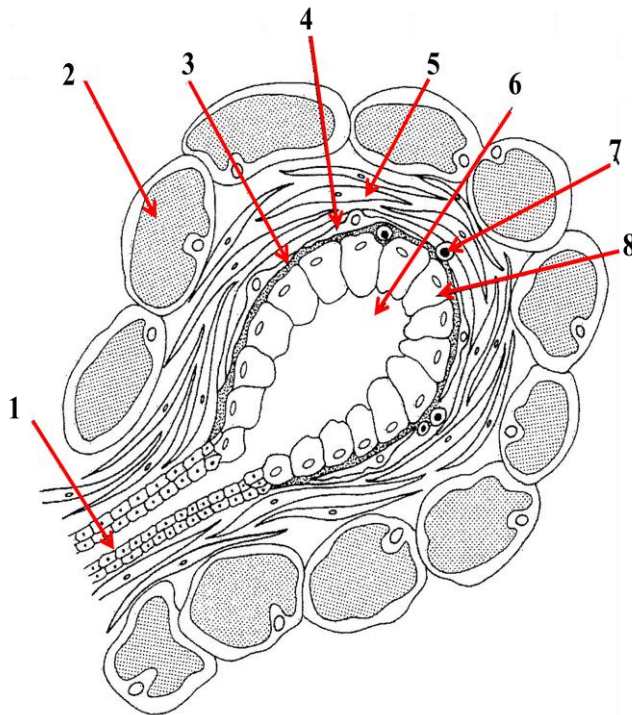


Figure 10 : Structure de l'Acinus mammaire.

- 1- Canal lobulaire.
- 2- Cellule adipeuse.
- 3- Membrane basale.
- 4- Cellule myoépithéliale ou cellule basale.
- 5- Fibroblaste, cellule du tissu conjonctif.
- 6- Lumière de l'alvéole.
- 7- vaisseau sanguin.
- 8- Cellule épithéliale alvéolaire ou cellule luminale.

Les tissus mammaires sont influencés par des hormones produites par les femmes en quantité variable tout au long de leur vie (puberté, grossesse, allaitement...). Ces hormones sont l'œstrogène et la progestérone.

4.4. Classification des tumeurs mammaires.

4.4.1. Classification histologique

Les adénocarcinomes représentent 98% des tumeurs malignes du sein. On distingue les adénocarcinomes non infiltrants (ou « *in situ* ») des adénocarcinomes infiltrants (ou invasifs) (Mallon et al 2000).

1- les adénocarcinomes non infiltrants (ou « *in situ* »)

ils représentent 15% des adénocarcinomes mammaires. La prolifération épithéliale maligne est située soit dans la lumière du canal galactophore, il s'agit d'un carcinome intracanalalaire soit dans les acini situés dans les lobules, il s'agit alors d'un carcinome intralobulaire. Dans ces cancers, la membrane basale est toujours respectée (absence d'infiltration). Ils sont le plus souvent découverts lors d'un examen de dépistage systématique par mammographie. Dans certains cas, ce cancer « *in situ* » peut être révélé par un écoulement de sang du mamelon ou un eczéma local. Le diagnostic des cancers *in situ* est important car ces tumeurs peuvent

devenir infiltrantes et le traitement à un stade pré-invasif permet généralement une guérison définitive.

2- Les adénocarcinomes infiltrants (ou invasifs).

Les adénocarcinomes infiltrants représentent 75% des adénocarcinomes mammaires.

Ces cancers envahissent les tissus autour des canaux de lactation, mais demeurent à l'intérieur du sein. Par contre, si la tumeur n'est pas traitée, elle peut se disséminer à d'autres parties du corps (Os, poumons, foie...) et générer des métastases. Il existe différents types d'adénocarcinomes infiltrants.

a- Carcinome canalaire. Il représente 70 % des adénocarcinomes infiltrants et se forme dans les canaux de lactation. Les cellules cancéreuses traversent la paroi des canaux.

b- Carcinome lobulaire infiltrant : il représente 5-15 % des adénocarcinomes infiltrants. Les cellules cancéreuses apparaissent dans les lobules regroupés dans les lobes. Puis, elles traversent la paroi des lobules et se disséminent dans les tissus environnants.

c- Carcinome inflammatoire. Un cancer rare qui se caractérise principalement par un sein qui peut devenir rouge, enflé et chaud. La peau du sein peut aussi prendre l'aspect d'une peau d'orange. Ce type de cancer progresse plus rapidement et est plus difficile à traiter.

d- carcinomes métabasiques de différents types : épidermique, à cellules fusiformes, chondroïde et osseux et de type mixte.

e- Autres carcinomes (médullaires, colloïdes ou mucineux, tubulaires, apocrine, adénoïdes kystique, papillaires). Ces types de cancer du sein sont plus rares. Les principales différences entre ces types de cancer reposent sur le type de cellules touchées.

f- Maladie de Paget. Un cancer rare qui se manifeste par une petite plaie au mamelon qui ne guérit pas.

Les chances de guérison dépendent du type de cancer et de son stade d'évolution au moment où on entreprend les traitements. Divers facteurs influencent la rapidité à laquelle une tumeur va croître.

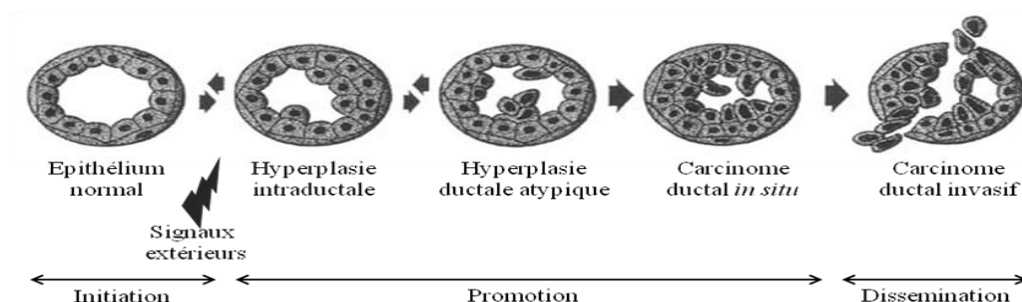


Figure 11 : Etapes de la cancérogenèse mammaire.

4.4.2. Classification par stade

Le stade de la tumeur est déterminé par sa taille, la présence ou non de ganglions envahis, et de métastases.

Il existe 5 stades :

- Stade 0 : c'est le carcinome canalaire in situ (les cellules sont localisées dans un canal galactophore et n'ont pas migrées à l'extérieur) et le carcinome lobulaire in situ (les cellules sont localisées dans la membrane d'un lobule).
- Stade T1 : la tumeur mesure 2 centimètres ou moins, le cancer ne s'est pas propagé aux ganglions.
- Stade T2 : Soit la tumeur mesure entre 2 et 5 centimètres, le cancer s'est propagé aux ganglions lymphatiques voisins, ou les deux.
- Stade T3 : Le cancer s'est propagé aux ganglions lymphatiques et parfois aux tissus voisins (muscle, peau).
- Stade T4 : Le cancer a produit des métastases dans d'autres parties du corps. On parle d'extension aux structures adjacentes.

4.4.3. Classification par grade

L'examen histologique, effectué lors de la biopsie, permet de classer le cancer par grades. Plus le grade est élevé, plus la tumeur est agressive. Trois paramètres morphologiques sont pris en compte pour définir le grade d'une tumeur : l'architecture tumorale, la forme du noyau et le nombre de cellules en mitose.

Trois grades ont été définis :

- Grade 1 : Cancer à croissance lente avec des risques faibles de propagation.
- Grade 2 : C'est l'évolution moyenne.
- Grade 3 : Il s'agit d'un cancer à évolution rapide avec des risques élevés de propagation.

4.4.4. Classification moléculaire.

L'utilisation de techniques génomiques à haut débit comme les puces à ADN a permis de classer les tumeurs de sein selon leur expression génétiques.

Quatre sous-types moléculaires de carcinomes ont été décrits à partir de gènes différemment exprimés entre les types tumoraux et nommée « signature intrinsèque » en les comparants au tissu normal (Perou et al 2000, Sorlie et al 2003) : le type luminal A (25 à 40 % des cas) et B (20 à 25% des cas), le type basal (15 à 18% des cas), le type ERBB2 (– 15%

des cas) et le type « normal-like », ce type étant vraisemblablement un artéfact lié à une forte contamination des premiers profils d'expression génique réalisés (Parker et al 2009).

Toutefois, certains sous types apparaissent eux-mêmes hétérogènes et doivent être encore mieux décrits. Pour chaque sous classe, les marqueurs biologiques exprimés ainsi que les types histologiques des tumeurs ont été étudiés.

- Le sous type basal

Les tumeurs de types basal ou *basal-like* sont caractérisés par l'expression de gène identique à ceux exprimés par les lignées de cellules myoépithéliales. Ce type est le mieux identifié par les différentes études génomiques. Ces tumeurs n'expriment pas les récepteurs à l'œstradiol et à la progestérone, elles n'exprime pas également le récepteur ERBB2, en revanche, elles expriment au moins un marqueur de cellule basal (CK5/6, EGFR, vimentine, active musculaire lisse, C-kit) (Livasy et al 2006, Nielsen et al 2004). Ces tumeurs présentent un taux élevé de mutation de P53, leur grade est de III. Ce sous-type a le pronostic le plus défavorable pour la survie globale et sans rechute. Ces tumeurs sont dites : « triple négatif » (RE -, RP -, ERBB2-).

- Le sous- type ERBB 2

Ce groupe inclus toutes les tumeurs exprimant fortement ERBB2. Un progéniteur luminal serait à l'origine de ces tumeurs, ce groupe comprend les tumeurs de type apocrine et des canaux infiltrant de grade II et III. Leur pronostic est défavorable.

- Le sous-type luminal

Ce groupe comprend les tumeurs exprimant les récepteurs à l'œstradiol (RE+) dont l'expression génétique est proche de celle des cellules épithéliales lumineales dont le profil immunohistochimique est caractérisé par l'expression de CR8/18 et CK 19. Ces tumeurs sont de faible grade avec des formes histologiques particuliers : cribriforme, mucineux, lobulaire et carcinomes canaux infiltrants de grade I et II. Il y a deux sous-types lumineux : luminal A avec le pronostic le plus favorable et luminal B avec un pronostic moins bon (Sorlie et al 2003).

- Le sous type *Normal like* :

Dans ce groupe, l'expression génique est proche de celle du tissu mammaire normal. Le phénotype des tumeurs de ce sous-type n'est pas décrit. Leur pronostic est intermédiaire.

Il reste environ 10 à 15% de tumeurs inclassées n'appartenant pas aux groupes précédemment décrits. Certains sous types sont eux-mêmes hétérogènes tels que les sous-types Luminal A (hétérogénéité des tumeurs au niveau de l'expression de ER), basal

(hétérogénéité des tumeurs au niveau de l'expression de P53 et BRCA1) et ERBB2 (hétérogénéité des tumeurs au niveau de l'expression de ER).

Tableau 5 : caractéristiques des principaux sous-types moléculaires du cancer du sein.

Sous-type	Origine	Phénotype	Type histologique du carcinome	Pronostic
Basal	cellule Myoépithéliale	RE- ERBB2-	- Canalaire de grade III	Défavorable
		PR- CK5/6+ EGFR+	- Médullaire - Métaplastique	
HER2	Non connu	ERBB22+ CK8/18+ CK19+	- Apocrine - Canalaire de grade II et III	Défavorable
Luminal	Cellule luminale	RE+ CK8/18+ CK19+	- Canalaire de grade I	Favorable

4.5. Implication de la voie Wnt/ β -caténine dans le cancer du sein.

L'utilisation de différents modèles animaux a permis de mettre en évidence que la surexpression de Wnt-1 induit la carcinogénèse mammaire chez la souris et que cet effet est dépendant de LRP5 (Lindvall et al 2006, Nusse and Varmus 1982). Dans le cancer du sein chez l'homme, la β -caténine est fréquemment localisée dans le comportement nucléaire, indiquant une activité intense de la voie Wnt/ β -caténine (Geyer et al 2011). La localisation nucléaire de la β -caténine est associée aux cancers mammaires triples négatifs. De plus, la suractivation de la voie wnt/ β -caténine a été trouvée associée aux sous types moléculaire basal et luminal B (Smid et al 2008). Ces observations suggèrent fortement que la voie Wnt/ β -caténine soit impliquée dans le cancer de sein chez l'homme.

Cependant, on ne trouve pas, ou rarement, dans le cancer du sein comme dans le cancer du côlon de mutations dans les gènes APC, axine ou β -caténine conduisant à une suractivation de la voie Wnt/ β -caténine (Alexander et al 2012). D'autres mécanismes seraient donc responsables de la suractivation de cette voie dans le cancer du sein. Différentes études suggèrent que ces mécanismes pourraient être la surexpression de ligands Wnt, de LRP6 et/ou de la sous expression d'inhibiteurs extracellulaires de cette voie comme sFRP1 (Alexander et al 2012).

La surexpression de Wnt1 dans la glande mammaire de souris induit la prolifération de cellules ayant des propriétés de cellules souches, et cet effet est crucial à Wnt1 pour stimuler la carcinogénèse mammaire (Li et al 2003, Shackleton et al 2006). En outre, la stimulation de la prolifération de ces cellules par Wnt1 est dépendante de LRP5 (Lindvall et al 2006).

La suractivation de la voie Wnt/ β -caténine induirait donc la carcinogenèse mammaire en stimulant la prolifération de cellules souches ou progénitrices.

OBJECTIFS

Objectifs de la thèse :

L'objectif de ce travail de thèse est d'arriver à mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables du cancer du sein. La stratégie adoptée est l'étude du mode d'action moléculaire du gène suppresseur de tumeur *WWOX* dont le rôle dans la carcinogenèse mammaire est suggéré fortement par divers observations et arguments expérimentaux. Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet qui a débute longtemps avant mon arrivé dans mon laboratoire d'accueil.

L'hôpital René Huguenin est un centre de lutte contre le cancer du sein. En plus du service hospitalier, différentes équipes de recherches cherchent depuis des années à mieux comprendre les mécanismes moléculaires du cancer du sein ainsi que de mettre en évidence de nouveaux marqueurs à valeurs cliniques. Dans le laboratoire d'oncogénétique, K. Driouch a recherché les gènes suppresseurs de tumeur présents dans les régions chromosomiques spécifiquement altérées dans les métastases de cancer du sein (Driouch et al 1998, Driouch et al 2002). Cette démarche a abouti au clonage du gène *WWOX* localisé en 16q23.3-24.1, et comprenant le site fragile FRA16D (Bednarek et al 2001, Chang et al 2001, Ried et al 2000). Par la suite l'étude fonctionnelle de ce gène a été entreprise. Dr Lallemand, mon directeur de thèse, en collaboration avec l'entreprise 'Hybrigenics' a recherché de nouveaux partenaires de *WWOX* à l'aide du système de double hybride chez la levure.

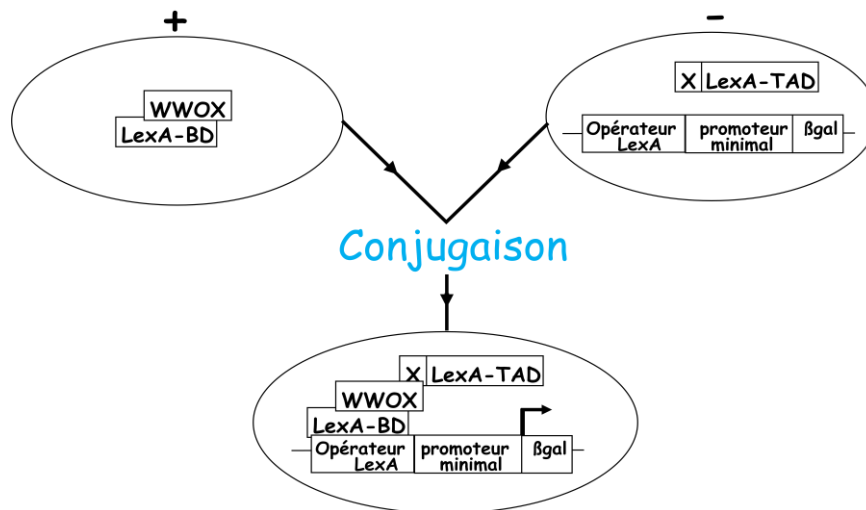


Figure 12 : Schéma représentatif du système double hybride chez la levure.

Le principe du système double hybride chez la levure est basé sur la reconstruction d'un facteur de transcription quand deux protéines interagissent. A l'aide de ce système, nous avons recherché les partenaires moléculaires de *WWOX* et ce, en réalisant la conjugaison de deux types de levure. Le premier type exprime *WWOX* fusionnée à un domaine protéique s'associant spécifiquement à l'opérateur LexA. Le deuxième possède dans son génome le gène de la β-galactosidase sous contrôle de l'opérateur LexA. De plus, ce type de levure exprime une banque de cDNA, symbolisée par X, fusionnée à un domaine protéique capable d'activer la transcription, le domaine AD. Après conjugaison, si la protéine X interagit avec *WWOX*, le domaine AD est recruté sur l'opérateur LexA et ainsi la transcription de la β-galactosidase est activée. L'expression de la β-galactosidase permet donc d'isoler les levures exprimant un partenaire moléculaire de *WWOX*. L'identification de ce partenaire passe par la purification et le séquençage du cDNA codant pour X ainsi que l'interrogation de banques de données appropriées.

Deux « appâts » ont été utilisés : WWOX « Wild Type » et FROIII, une forme tronquée de WWOX possédant les domaines WW et une partie du domaine SDR. Cette approche a permis d'identifier de nombreux nouveaux partenaires de WWOX dont Dvl-2 et BCL9-2. BCL9-2 a été retrouvé dans les deux criblages FORIII et WWOX WT et Dvl-2 a été retrouvé dans le criblage FORIII.

BCL9-2 et Dvl-2 sont des acteurs essentiels de la voie de signalisation intracellulaire Wnt/ β -caténine, voie impliquée dans le développement de différents cancers.

Cependant, aucune donnée bibliographique n'avait encore évoqué un rôle de WWOX dans la modulation de cette voie. Nous avons alors entrepris l'étude du rôle de WWOX et de ses partenaires moléculaires dans la régulation de la voie Wnt/ β -caténine et la carcinogenèse mammaire:

1. Tout d'abord, nous avons voulu valider les résultats du double hybride et rechercher les domaines d'interaction à l'aide d'expériences de co-immunoprecipitation.

2. Nous avons déterminé le rôle de WWOX dans la modulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Pour cela, nous avons eu recours à différentes approches expérimentales dont principalement le système de la luciférase « assay » utilisant un plasmide nommé TOP Flash qui permet de quantifier l'activité de la voie Wnt/ β -caténine au sein d'une lignée cellulaire.

3. Suite à cela, nous avons étudié les mécanismes moléculaires par lesquels WWOX régule l'activité de la voie Wnt/ β -caténine.

4. Nous avons également étudié le rôle des partenaires de WWOX dans la cancérogenèse mammaire. En ayant recours à la tumorotèque de l'hôpital René Huguenin, nous avons déterminé l'expression des partenaires de WWOX que nous avons mis en évidence dans des tumeurs de sein par RT-PCR.

Nos résultats ont fait l'objet de deux articles :

Le premier, a été publié dans le journal scientifique 'Oncogene' le 16 juillet 2009, le second est en cours de soumission.

Dans ce manuscrit j'ai inséré les deux articles et je présente des résultats ne faisant pas encore le sujet d'un article. A la fin du manuscrit, je présente également un article réalisé en collaboration avec une équipe travaillant au CEA.

RESULTATS

Article 1

Inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway by the WWOX tumor suppressor protein.

Auteurs: Nadège Bouteille^{1,2}, Kelthouma Driouch^{1,2}, Perla El Hage^{1,2}, Soraya Sin^{1,2}, Etienne Formstecher³, Jacques Camonis⁴, Rosette Lidereau^{1,2} and François Lallemand^{1,2}

¹Centre Rene´ Huguenin, FNCLCC, St-Cloud, France

²INSERM, U735, St-Cloud, France

³Hybrigenics, 3-5 Impasse Reille, Paris, France

⁴INSERM U528, Institute Curie, 26 rue d'Ulm, Paris Cedex 05, France

Oncogene, le 16 juillet 2009 ; 28(28) :2569-80.

PMID : 19465938

L'objectif de ce travail vise à déterminer le rôle du gène suppresseur de tumeur *WWOX* dans la régulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

En utilisant le système double-hybride, nous avons observé une association physique entre la protéine Dvl-2 et FORIII, une forme tronquée de *WWOX* (figure 1a).

Nous avons alors validé l'association obtenue par le système double hybride à l'aide d'expériences de co-immunoprécipitations. Pour cela, nous avons transfecté des cellules 293 par des plasmides étiquetés codant pour *WWOX* ou FORII et Dvl-2. Suite à la lyse des cellules, nous avons immunoprécipité Dvl-2 et identifié à l'aide d'anticorps spécifiques *WWOX* WT ou FORIII dans l'immunoprécipité. Nous avons ainsi validé les associations *WWOX*-Dvl-2 et FORIII-Dvl-2 aucun changement au niveau de l'association *WWOX*-Dvl-2 n'a été trouvé en absence ou en présence de Wnt3a dans le milieu cellulaire suggérant que la voie Wnt/ β -caténine ne régule pas cette interaction (figure 1b, 1c et 1d). A l'aide d'anticorps spécifiques, nous avons observé une association entre *WWOX* et Dvl-2 endogènes. *WWOX* et Dvl-2 produits à des niveaux physiologiques peuvent donc interagir (figure 1e). Nous avons aussi vu que *WWOX* et FORII sont capable de se lier à Dvl-1 et Dvl-3 cohérant avec le fait qu'il existe une homologie forte entre les différentes protéines Dvl (figure 1g et 1h).

Par la suite, nous avons voulu connaître les sites de liaisons impliqués dans l'interaction *WWOX*-Dvl-2. Pour cela nous avons créé des vecteurs d'expression codant différentes

régions de WWOX et Dvl-2 et à l'aide d'expériences de co-immunoprécipitations, nous avons pu suggérer que les domaines PDZ et DEP de Dvl-2 et les domaines WW de WWOX soient responsables de la liaison WWOX-Dvl-2 (figure 2).

Afin de voir si WWOX a un effet sur la régulation de la voie Wnt/ β -caténine, nous avons testé l'effet de WWOX sur l'activité transcriptionnelle de Dvl-2 et de Wnt-3a. A l'aide d'expériences de luciférase « assay » utilisant le plasmide TOP Flash qui contient 6 domaines TCF répétés contrôlant la transcription de la luciférase. Le résultat de ces expériences montre que WWOX et non FORIII, inhibe l'activité transcriptionnelle de Dvl-2 de manière dose dépendante. Le domaine SDR de WWOX semble donc nécessaire à son effet sur la voie Wnt/ β -caténine (figure 3a et 3b). De même, à l'aide du système de luciférase « assay » nous avons déterminé l'effet de WWOX sur l'activité transcriptionnelle de Wnt3a et Dvl-2 en utilisant un plasmide contenant le gène de la luciférase sous contrôle du promoteur de la cycline D1. La surexpression de WWOX inhibe les effets positifs de Wnt3a et Dvl-2 sur l'activité de ce promoteur de manière dose dépendante. De la même manière nous avons observé une inhibition de l'activité transcriptionnelle de Dvl-1 par WWOX dans les lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et BT-474 (figure 3h et 3i). Nous avons également observé une augmentation de l'activité transcriptionnelle de Wnt-3a dans les cellules dans lesquels l'expression de WWOX endogène a été inhibé à l'aide d'un si-RNA spécifique (figure 4).

Dans la voie Wnt/ β -caténine, Dvl-2 transmet les effets positifs de Wnt sur la stabilité de la β -caténine. Afin de voir si WWOX joue un rôle sur cette stabilité, nous avons inhibé WWOX endogène à l'aide d'un si-RNA spécifique et nous avons déterminé l'effet de cette inhibition sur l'expression endogène de la β -caténine induite par Wnt3a. En absence de WWOX endogène, nous avons pu observer une augmentation de la stabilité de la β -caténine induite par Wnt3a dans les lysats cellulaires (figure 5).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que WWOX est un nouvel inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine qui agirait en liant et inhibant l'activité de Dvl-2.

Afin de comprendre le mécanisme par lequel WWOX inhibe la fonction de Dvl-2 dans la voie Wnt/ β -caténine, nous avons étudié plusieurs hypothèses :

(1) Différentes études montrent que l'activation de la voie Wnt/ β -caténine induit la phosphorylation de Dvl-2 et du corécepteur LRP6 sur la sérine 1490 (Cong et al 2004, Davidson et al 2005, Hino et al 2003, Zeng et al 2008). Ces événements seraient indispensables à la transmission du signal Wnt. WWOX pourrait empêcher la

phosphorylation de Dvl-2 ou LRP6 inhibant ainsi l'activité de la voie Wnt/ β -caténine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons déterminé l'effet de l'inhibition de l'expression de *WWOX* sur la phosphorylation de Dvl-2 et LRP6 induite par Wnt3a. L'inhibition de l'expression de *WWOX* n'a eu aucun effet sur l'état de phosphorylation de Dvl-2 ou LRP6 ni même sur leur niveau de production (figure 5). *WWOX* n'inhibe donc pas la voie Wnt/ β -caténine en empêchant la phosphorylation de Dvl-2 et LRP-6 par Wnt ni en inhibant la stabilité de ces deux molécules.

(2) *WWOX* pourrait agir en inhibant l'association Dvl-2 avec le complexe de dégradation de la β -caténine qui semble être cruciale à Dvl-2 pour inhiber GSK3 β (Hino et al 2001, Kishida et al 2001). A cette fin, nous avons voulu voir si l'expression de *WWOX* affecte cette association. Par co-immunoprecipitation, nous avons vu que *WWOX* n'a aucun effet sur l'association Dvl-2-Axine (figure 7) ni sur l'association de Dvl-2 avec d'autres membres du complexe de dégradation de la β -caténine (Frat et CK1 ϵ) (résultats non montrés).

(3) Dvl-2 a besoin d'aller au noyau afin d'exercer sa fonction dans la voie Wnt/ β -caténine. Le rôle de Dvl-2 dans le noyau est peu connu, des travaux suggèrent qu'il pourrait, en association avec la protéine JUN, stabiliser l'interaction β -caténine-TCF (Itoh et al 2005, Torres and Nelson 2000, Yokoyama et al 2007). Il a été démontré que *WWOX* est capable de séquestrer dans le cytoplasme plusieurs facteurs de transcriptions inhibant ainsi leur fonction. Nous avons alors pensé que *WWOX* pourrait lier et séquestrer Dvl-2 dans le cytoplasme inhibant ainsi sa fonction. L'exportation nucléaire de Dvl-2 est intense par rapport à son importation dans ce compartiment cellulaire, Dvl-2 est donc majoritairement cytoplasmique. Pour tester notre hypothèse, nous avons alors construit un vecteur codant une forme mutée de Dvl-2 au niveau de son site d'exportation nucléaire, ce mutant est majoritairement localisé dans le noyau. En présence de *WWOX* transfecté, ce mutant se trouve dans le cytoplasme soutenant ainsi notre hypothèse (figure 8).

L'ensemble de nos résultats montrent que *WWOX* est un nouveau régulateur de la voie Wnt/ β -caténine. Il agit, au moins en partie, en séquestrant Dvl-2 dans le cytoplasme.

ORIGINAL ARTICLE

Inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway by the WWOX tumor suppressor protein

N Bouteille^{1,2}, K Driouch^{1,2}, P El Hage^{1,2}, S Sin^{1,2}, E Formstecher³, J Camonis⁴, R Lidereau^{1,2} and F Lallemand^{1,2}

¹Centre René Huguenin, FNCLCC, St-Cloud, France; ²INSERM, U735, St-Cloud, France; ³Hybrigenics, 3-5 Impasse Reille, Paris, France and ⁴INSERM U528, Institute Curie, 26 rue d'Ulm, Paris Cedex 05, France

The *WWOX* gene encodes a candidate tumor suppressor protein (WWOX) implicated in a variety of human diseases such as cancer. To better understand the molecular mechanisms of WWOX action, we investigated novel partners of this protein. Using the two-hybrid system and a coimmunoprecipitation assay, we observed a physical association between WWOX and the Dishevelled protein (Dvl) family signaling elements involved in the Wnt/ β -catenin pathway. We found that enforced WWOX expression inhibited, and inhibition of endogenous WWOX expression stimulated the transcriptional activity of the Wnt/ β -catenin pathway. Inhibition of endogenous WWOX expression also enhanced the effect of Wnt-3a on β -catenin stability. Moreover, we observed the sequestration of Dvl-2 wild type and Dvl-2NESm, a mutated form of Dvl-2 predominantly localized in the nucleus, in the cytoplasm compartment by WWOX. Our results indicate that WWOX is a novel inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway. WWOX would act, at least in part, by preventing the nuclear import of the Dvl proteins. *Oncogene* advance online publication, 25 May 2009; doi:10.1038/onc.2009.120

Keywords: WWOX; dishevelled; Wnt; β -catenin; signaling pathway

Introduction

The WW domain-containing oxidoreductase gene (*WWOX*), located at 16q23.3–24.1, encompasses the common fragile site, FRA16D (Bednarek *et al.*, 2000; Ried *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2001). The 16q23.3–24.1 region is a frequent target of loss of heterozygosity in various carcinomas (Ludes-Meyers *et al.*, 2003). Homozygous deletion of *WWOX* exons has been found in different cancer cell lines (Mangelsdorf *et al.*, 2000; Paige *et al.*, 2000, 2001), and hypermethylation of the *WWOX* promoter has been detected in both cancer cell

lines and primary tumors (Ishii *et al.*, 2003; Kuroki *et al.*, 2004; Iliopoulos *et al.*, 2005). The expression of WWOX is reduced or lost in many different cancers (Aqeilan *et al.*, 2007c). Notably, it has been established that *WWOX* is inactivated in invasive breast carcinoma (Guler *et al.*, 2004, 2005; Chang *et al.*, 2005; Nunez *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). The decrease of WWOX expression is frequently associated with a worse clinical outcome for patients (Pluciennik *et al.*, 2006; Hezova and Ehrmann JKolar 2007; Aqeilan *et al.*, 2007a). Several tumor types, such as human breast tumors, overexpress aberrant transcripts (Driouch *et al.*, 2002; Ludes-Meyers *et al.*, 2003). Moreover, *WWOX* has the capacity to function as a tumor suppressor gene both *in vitro* and *in vivo* (Bednarek *et al.*, 2001; Kuroki *et al.*, 2004; Fabbri *et al.*, 2005; Iliopoulos *et al.*, 2007; Ludes-Meyers *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2007; Aqeilan *et al.*, 2007b, 2007c). Together, these findings suggest that *WWOX* is a tumor suppressor gene.

WWOX encodes a 46-kDa protein consisting of two N-terminal WW domains and a C-terminal short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) domain (Bednarek *et al.*, 2000; Ried *et al.*, 2000). The WW domain is characterized by interaction with a proline-containing ligand and mediates protein–protein interactions (Ludes-Meyers *et al.*, 2004). The SDR domain is shared by steroid-hormone-metabolizing enzymes. *WWOX* seems to be able to induce apoptosis both in the nuclear and in the cytoplasmic compartments. *WWOX* would therefore inhibit tumor progression by facilitating cell death.

Mammalian Dishevelled proteins (Dvls) form a family of three members (Dvl-1, Dvl-2 and Dvl-3) sharing three conserved domains termed DIX, PDZ and DEP (Wharton, 2003). Dvls play a key role in the three different pathways activated on Wnt receptor activation: the canonical Wnt/ β -catenin pathway, the planar cell polarity pathway and the Wnt/ Ca^{2+} pathway (Kikuchi *et al.*, 2006). Wnt proteins constitute a large family of cysteine-rich secreted ligands that play pivotal roles in embryonic development and also control homeostatic self-renewal in a number of adult tissues (Clevers, 2006).

The Wnt/ β -catenin pathway is specifically activated by several Wnts, including Wnt-1, -3a, -8 and -8b. Aberrant activation of this pathway plays an important

Correspondence: Dr F Lallemand, Hauts-de-seine, 4INSERM U528, Service Oncogénétique, Centre René Huguenin, 35 rue Dailly, St-Cloud 92210, France,

E-mail: f.lallemand@stcloud-huguenin.org

Received 22 September 2008; revised 6 March 2009; accepted 8 April 2009

role in the development of many human cancer types (Clevers, 2006; Kikuchi *et al.*, 2006). Wnt initiates signaling events by binding to two receptor molecules: Frizzled proteins and lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6 (LRP5/6). In the absence of Wnt, cytoplasmic β -catenin binds a multiprotein complex (β -catenin-degradation complex) composed notably of the glycogen synthase kinase β , Axin, Dvl, Frat, casein kinase 1 ϵ and adenomatous polyposis coli. In this complex, β -catenin is phosphorylated by glycogen synthase kinase 3 β . This phosphorylation induces the ubiquitination and thus the degradation of β -catenin by the 26S proteasome. Wnt binding to its receptor induces the activity of Dvl proteins, which in turn inhibit β -catenin phosphorylation by glycogen synthase kinase 3 β and thereby the accumulation of β -catenin in the cytoplasm and nucleus (Yokoyama and Yin DMalbon 2007). In the nucleus, β -catenin binds to proteins of the T-cell factor (TCF)/lymphoid enhancer factor-1 family and stimulates TCF/lymphoid enhancer factor-1-dependent transcription of Wnt target genes.

Here, we report evidence that WWOX interacts with the three members of the Dvl family. This finding led us to study the role of WWOX in the modulation of the Wnt/ β -catenin pathway.

Results

WWOX interacts with Dvl-2

To gain insight into the molecular action of WWOX, we used a yeast two-hybrid screen to identify novel partners of this protein. As bait, we used FORIII, a WWOX isoform, possessing the WW domains required for protein-protein interactions and a truncated SDR domain (Figure 1a). Dvl-2 is one of the novel FORIII interactors isolated in our yeast two-hybrid system (data not shown). To confirm the ability of FORIII and Dvl-2 to form a complex, we transfected 293 cells with 3xflag-FORIII and/or HA-Dvl-2 plasmid(s). We then immunoprecipitated the cell extracts with anti-HA and immunoblotted the immunoprecipitates with anti-flag to determine the presence of 3xflag-FORIII. We detected 3xflag-FORIII in the immunoprecipitate of cells expressing both 3xflag-FORIII and HA-Dvl-2, but not of cells expressing either 3xflag-FORIII or HA-Dvl-2 alone (Figure 1b). In the same way, we analysed the ability of wild-type WWOX to associate with Dvl-2. We also detected 3xflag-WWOX in the HA-immunoprecipitate from cells expressing both 3xflag-WWOX and HA-Dvl-2, but not in negative control transfections (Figure 1c). We detected the same WWOX-Dvl-2 interaction in the absence or in the presence of Wnt-3a, suggesting that the Wnt/ β -catenin pathway may not regulate the interaction (Figure 1d). Taken together, these results indicate that WWOX interacts with Dvl-2 *in vivo*.

We immunoprecipitated 293 cell extracts either with no specific IgG or with an antibody against Dvl-2, and then immunoblotted the immunoprecipitates with an

anti-WWOX antibody (Figure 1e). In this experiment, WWOX specifically coprecipitated with Dvl-2 indicating that WWOX and Dvl-2 associate at endogenous levels of expression (Figure 1f).

We also found that WWOX and FORIII associated with Dvl-1 and Dvl-3, the other two members of the Dvl family, in a coimmunoprecipitation assay (Figures 1g and h, and data not shown). Therefore, WWOX has the ability to interact with all three members of the Dvl family. This finding is consistent with the fact that Dvl proteins possess very closely related domains.

Binding domains

To identify the binding domain of Dvl-2 for WWOX, we generated expression vectors coding for different regions of Dvl-2 and tested their abilities to complex with WWOX in a coimmunoprecipitation assay (Figures 2a and b). Dvl-2 (2–231) containing the DIX domain did not interact with WWOX. Dvl-2 (232–739) containing the PDZ and the DEP domains, and Dvl-2 (2–409) containing the DIX and PDZ domains associated with WWOX. These results suggest that the region containing residues 231–409 of Dvl-2 is mainly responsible for the Dvl-2-WWOX interaction.

In the same way, we also searched for the binding domain of WWOX for Dvl-2 (Figures 2c and d). Consistent with the observation that FORIII interacts with Dvl-2, we found that the WW domains associated with this protein. Moreover, we also found that the SDR domain interacted with Dvl-2. These results indicate that the complete binding domain of WWOX for Dvl-2 contains the WW and at least part of the SDR domains.

WWOX inhibits the Wnt/ β -catenin pathway transcriptional activity

Dvl proteins are key components of the Wnt/ β -catenin pathway. Our finding that WWOX interacts with these proteins therefore raises the possibility that WWOX acts as a regulator of this pathway. To test this, we examined the effect of WWOX on the transcriptional activities of Dvl proteins and Wnt-3a ligand in 293 cells. We carried out luciferase assays with the reporter plasmid TOPflash, which contains six TCF-binding elements. Overexpression of Dvl-2 enhanced luciferase activity by twofold, and ectopically expressed WWOX inhibited this Dvl-2-dependent activity in a dose-dependent manner (Figure 3a). However, FORIII did not affect Dvl-2 transcriptional activity (Figure 3b). With the reporter plasmid FOPflash containing mutated TCF-binding sites, we found that the observed effects of Dvl-2 and WWOX on TOPflash were strictly dependent on TCF-binding sites (data not shown). Ectopically expressed WWOX, but not FORIII, inhibited both Dvl-1 and Dvl-3 transcriptional activities too (Figures 3c and d, and data not shown). Therefore, WWOX, but not FORIII, inhibits the TCF-dependent transcriptional activity of all three members of the Dvl family.

WWOX overexpression also inhibited the positive effect of Wnt-3a on TCF transcriptional activity in a dose-dependent manner (Figure 3e). The SDR domain

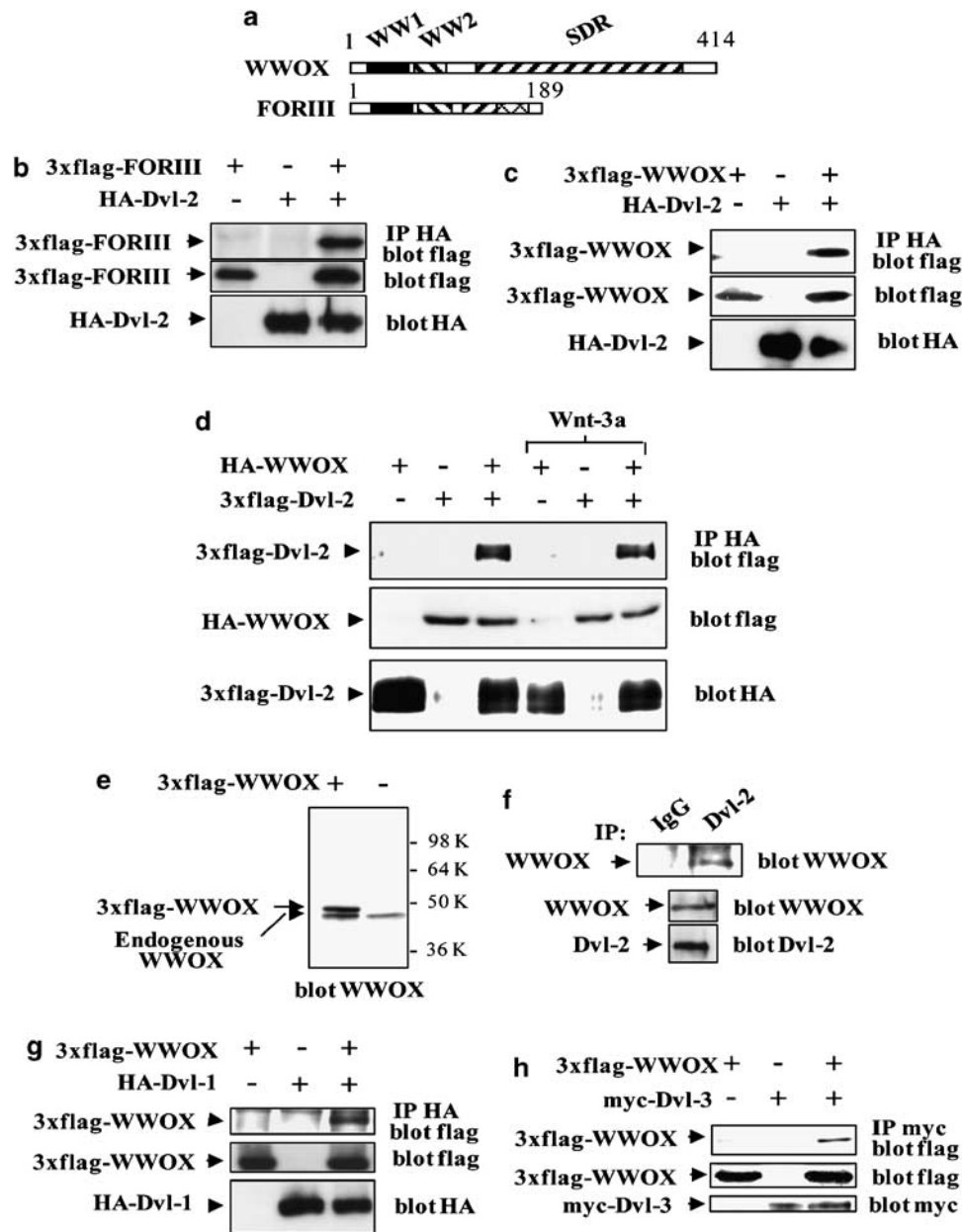


Figure 1 Interactions of WWOX and FORIII with Dvl proteins. (a) Schematic representations of human WWOX and FORIII proteins. (b) FORIII interacts with Dvl-2 *in vivo*. A total of 293 cells were transfected with 3xflag-FORIII and HA-Dvl-2 plasmids as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-HA antibody (IP HA). Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-HA (blot HA) and/or anti-flag (blot flag) antibody(ies). (c) WWOX-Dvl-2 association *in vivo*. A total of 293 cells were transfected with 3xflag-WWOX and HA-Dvl-2 expression vectors as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-HA antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-HA and/or anti-flag antibody(ies). (d) Effect of Wnt-3a on WWOX-Dvl-2 interaction. A total of 293 cells were transfected with HA-WWOX and 3xflag-Dvl-2 expression vectors as indicated. Twenty-four hours later, cells were treated for 16 h with or without Wnt-3a-conditioned medium. Cell lysates were then prepared and immunoprecipitated with anti-HA antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-HA and/or anti-flag antibody(ies). (e) Specificity of the anti-WWOX antibody. Extracts of 293 cells transfected with empty vector or 3xflag-WWOX plasmid were immunoblotted with the anti-WWOX antibody to detect endogenous WWOX and 3xflag-WWOX. (f) Interaction between endogenous WWOX and Dvl-2. Lysates of 293 cells were immunoprecipitated either with normal rabbit IgG as a negative control (IgG) or with anti-Dvl-2 antibody (Dvl-2). Immunoprecipitates (highest panel) and cell lysates (middle and lowest panels) were examined by immunoblotting with anti-Dvl-2 and/or anti-WWOX antibody(ies). (g) and (h) Interactions of WWOX and FORIII with Dvl-1 and Dvl-3. A total of 293 cells were transfected with 3xflag-WWOX, 3xflag-FORIII, HA-Dvl-1 and myc-Dvl-3 plasmids as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-HA (f) or anti-myc antibody (g). Immunoprecipitates and cell lysates were immunoblotted with anti-flag, anti-HA and anti-myc antibodies.

alone was sufficient to inhibit this transcriptional activity (Figure 3f). FORIII did not influence the transcriptional activity of Wnt-3a, but inhibited the

ability of WWOX to repress this transcriptional activity. As TOPflash is a synthetic promoter and cyclin D1 is one of the target genes of the Wnt/ β -catenin pathway

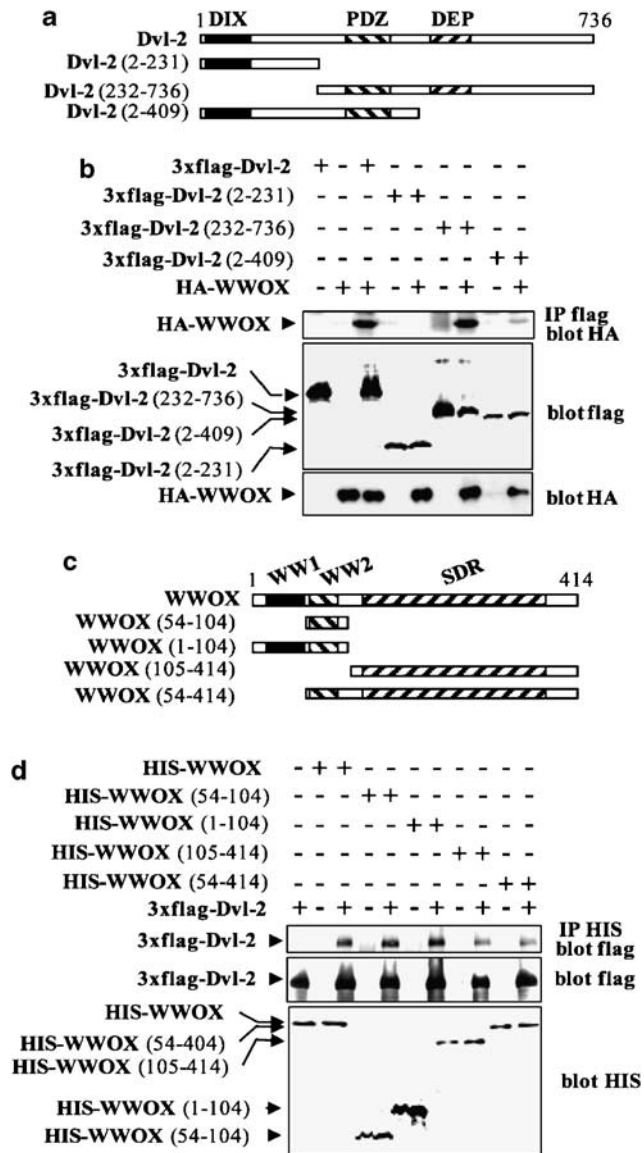


Figure 2 Binding domains. (a) Schematic representations of human Dvl-2 and its mutants. (b) Binding domain of Dvl-2 for WWOX. A total of 293 cells were transfected with HA-WWOX, 3xflag-Dvl-2, 3xflag-Dvl-2 (2-231), 3xflag-Dvl-2 (232-736) and 3xflag-Dvl-2 (2-409) plasmids as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-flag antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-flag and anti-HA antibodies as indicated. (c) Schematic representations of human WWOX and its mutants. (d) Binding domain of WWOX for Dvl-2. A total of 293 cells were transfected with 3xflag-Dvl-2, HIS-WWOX, HIS-WWOX (54-104), HIS-WWOX (1-104), HIS-WWOX (105-414) and HIS-WWOX (54-414) plasmids as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-HIS antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-flag and anti-HIS antibodies.

(Polakis, 2000), we also determined the effect of WWOX on Wnt-3a-induced transcriptional activity in a luciferase assay using the natural cyclin D1 promoter ligated to a luciferase gene (D1-Luc/D1A-848pXP2) (Herber *et al.*, 1994). WWOX overexpression inhibited the positive effect of Wnt-3a and of Dvl-2 on cyclin D1 promoter

activity in a dose-dependent manner (Figure 3g and data not shown).

We also observed that the ectopic expression of WWOX inhibited the TCF-dependent transcriptional activity of Dvl-1 in two human mammary carcinoma cell lines, MCF-7 and BT-474 (Figures 3h and i). These results indicate that WWOX is able to inhibit the Wnt/ β -catenin pathway in different cancer cell types, notably in breast cancer cells.

Importantly, we found that knockdown of endogenous WWOX in 293 cells by a WWOX-specific small interfering RNA (siRNA) resulted in an increase in Wnt-3a-stimulated TOPflash activity (Figure 4).

Taken together, these results indicate that WWOX is a novel negative regulator of the Wnt/ β -catenin pathway, and that the SDR domain is essential and sufficient for this inhibitory effect.

Knockdown of endogenous WWOX expression enhances the effect of Wnt-3a on β -catenin stability

In the Wnt/ β -catenin pathway, Dvl proteins transmit the positive effect of Wnt on β -catenin stability (Kikuchi *et al.*, 2006). We determined the effect of siRNA WWOX on the endogenous β -catenin expression induced by Wnt-3a. We observed that knockdown of WWOX in 293 cells by a WWOX-specific siRNA resulted in an increase in Wnt-3a-induced β -catenin stability (Figure 5). The quantification of the β -catenin expression indicates that WWOX siRNA elevated the basal level of this expression. This result is in agreement with our observation that WWOX siRNA elevated the basal level of the TCF-dependent transcriptional activity (Figure 4). Our results therefore support the idea that WWOX inhibits the transcriptional activity of the Wnt/ β -catenin pathway by binding and inhibiting Dvl proteins.

WWOX does not affect Wnt-3a-induced Dvl-2 and LRP6 phosphorylation, and the expression and stability of Dvl-2

We then searched for the molecular mechanism by which WWOX inhibits the Wnt/ β -catenin pathway. Several works indicate that Wnt-induced phosphorylation of Dvl (p-Dvl) and LRP6 at Ser¹⁴⁹⁰ (p-LRP6 (S1490)) initiates the Wnt/ β -catenin pathway; moreover, Dvl is an important component that controls Wnt-induced LRP6 phosphorylation at Ser¹⁴⁹⁰ (Hino *et al.*, 2003; Cong and Schweizer LVarmus 2004; Davidson *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2005, 2008; Klimowski *et al.*, 2006; Bilic *et al.*, 2007). Through its binding to Dvl, WWOX could repress Wnt-induced Dvl and/or LRP6 phosphorylation, thereby inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway activity. To verify these possibilities, we examined the effect of siRNA WWOX on the Wnt-3a-induced Dvl-2 and LRP6 phosphorylation (Figure 5). Wnt-3a caused a weak phosphorylation of Dvl-2, which is monitored by a decrease in the electrophoretic mobility of p-Dvl-2 (Gonzalez-Sancho *et al.*, 2004). Wnt-3a also led to phosphorylation of LRP6 at Ser¹⁴⁹⁰. We found that the depletion of endogenous WWOX did not enhance the ability of Wnt-3a to phosphorylate Dvl-2 or LRP6.

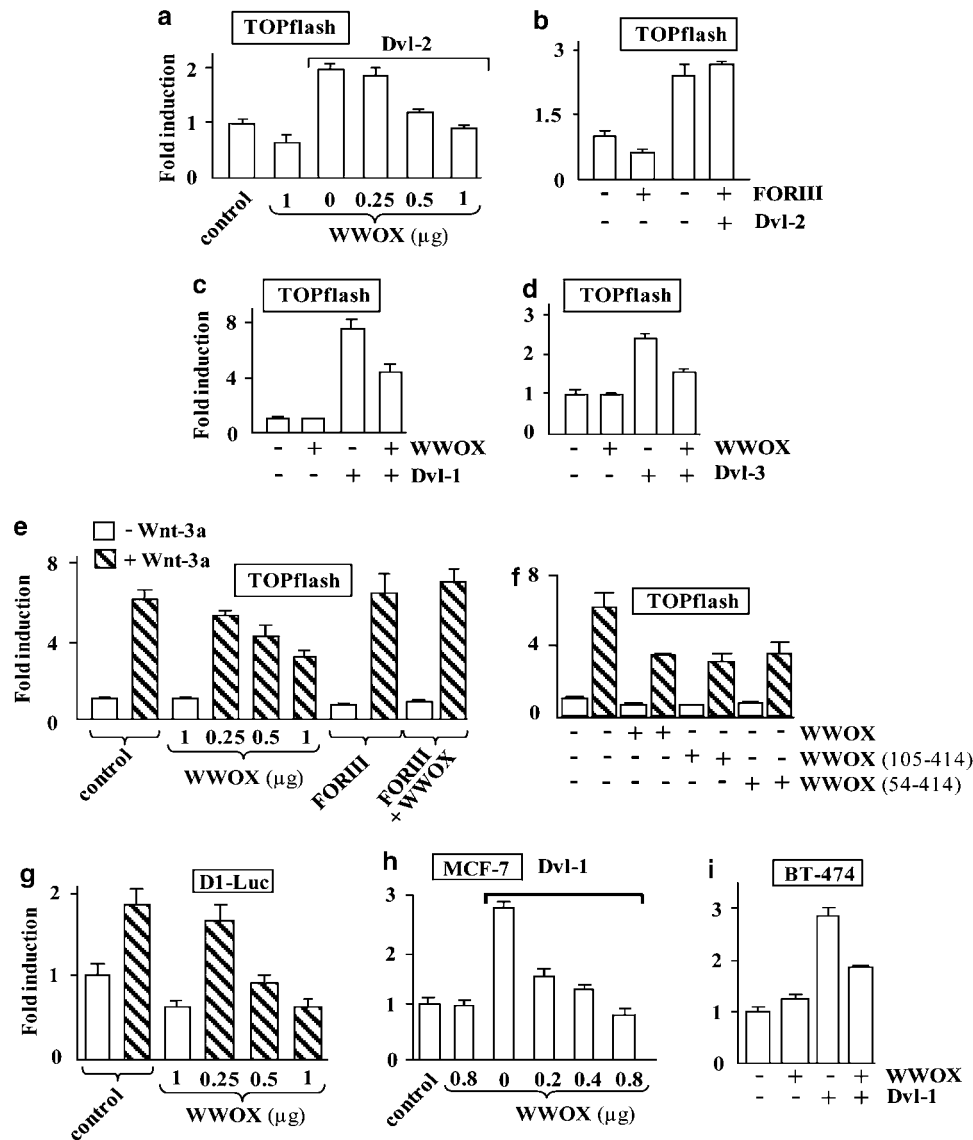


Figure 3 WWOX inhibits the transcriptional activity of the Wnt/ β -catenin pathway. (a and b) WWOX, but not FORIII, inhibits Dvl-2-mediated TCF transcriptional activity in a dose-dependent manner. A total of 293 cells were transfected with pRL-TK Renilla and TOPflash in combination with Dvl-2 (0.3 μ g), (a) increasing amounts of WWOX and (b) FORIII (1 μ g) expression vectors as indicated. Twenty-four hours later, cell extracts were prepared and luciferase activities quantified. (c and d) WWOX inhibits Dvl-1 and Dvl-3-mediated TCF transcriptional activities. A total of 293 cells were transfected with pRL-TK Renilla and TOPflash in combination with WWOX (1 μ g), (e) Dvl-1 (0.3 μ g) and (d) Dvl-3 (0.3 μ g) plasmids as indicated. Twenty-four hours later, cell extracts were prepared and luciferase activities quantified. (e and f) Effects of WWOX and FORIII on Wnt-3a transcriptional activity. A total of 293 cells were transfected with pRL-TK Renilla and TOPflash in combination with WWOX and (e) FORIII (1 μ g) or (f) WWOX (105–414) and WWOX (54–414) expression vector as indicated. Twenty-four hours later, cells were treated for 16 h with (crossed bar) or without (white bar) Wnt-3a-conditioned medium. Cell extracts were then prepared and luciferase activities quantified. (g) Effect of WWOX on Wnt-3a induced cyclin D1 promoter activity. A total of 293 cells were transfected with pRL-TK Renilla and D1-Luc/D1 Δ -848pXP2 (D1-Luc) in combination with increasing amounts of WWOX expression vector as indicated. Twenty-four hours later, cells were treated for 16 h with (crossed bar) or without (white bar) Wnt-3a-conditioned medium. Cell extracts were then prepared and luciferase activities quantified. (h and i) WWOX inhibits Dvl-1-mediated TCF transcriptional activity in MCF-7 and BT-474 breast cancer cell lines. (h) MCF-7 and (i) BT-474 cells were transfected with pRL-TK Renilla and TOPflash in combination with Dvl-1 (0.3 μ g) and WWOX expression vectors as indicated. Twenty-four hours later, cell extracts were prepared and luciferase activities quantified. In all the experiments, Firefly luciferase activity was normalized to Renilla luciferase activity and expressed as mean \pm s.d. of triplicates from a representative experiment.

Furthermore, we observed that knockdown of WWOX did not change the endogenous expression of Dvl-2 (Figure 5) and that overexpression of WWOX did not affect the ectopic expression of Dvl-2 (Figure 6).

Taken together, these results suggest that WWOX does not inhibit the Wnt/ β -catenin pathway by affecting either Wnt-induced Dvl-2 and LRP6 phosphorylation or expression/stability of Dvl-2.

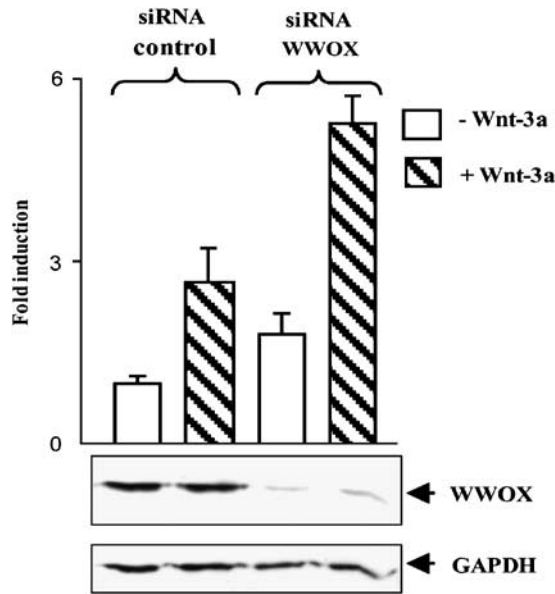


Figure 4 The siRNA WWOX stimulates the transcriptional activity of Wnt-3a. A total of 293 cells were transfected with siRNA control or siRNA WWOX. Forty-eight hours later, cells were transfected once again with the siRNA and also with pRL-TK Renilla and TOPflash reporter constructs. Thirty hours later, cells were treated for 16 h with (crossed bar) or without (white bar) Wnt-3a-conditioned medium. Cell extracts were then prepared and luciferase activities quantified. Firefly luciferase activity was normalized to Renilla luciferase activity and expressed as mean \pm s.d. of triplicates from a representative experiment. Cell extracts were also examined by immunoblotting with anti-WWOX and anti-GAPDH (loading control) antibodies.

WWOX does not inhibit the interaction of Dvl-2 with the β -catenin-degradation complex

In the β -catenin-degradation complex, Dvl-2 binds directly to Axin. This interaction seems to be crucial for Dvl-2 to inhibit glycogen synthase kinase 3 β -dependent degradation of β -catenin (Kishida *et al.*, 1999, 2001; Smalley *et al.*, 1999; Kadoya *et al.*, 2000; Hino *et al.*, 2001). WWOX would therefore inhibit the function of Dvl-2 in the Wnt/ β -catenin pathway by disrupting Dvl-2-Axin association. To test this, we examined whether WWOX inhibits the binding of Dvl-2 to Axin in intact cells. myc-Axin, 3xflag-Dvl-2 and HIS-WWOX were coexpressed in 293 cells (Figure 7). When the expression levels of HIS-WWOX increased, the amounts of 3xflag-Dvl-2 complexed with myc-Axin did not change. We also found that WWOX did not affect the ability of Dvl-2 to form complexes with Frat and casein kinase 1 ϵ (data not shown). These results suggest strongly that WWOX does not inhibit the Wnt/ β -catenin pathway by disrupting the interaction of Dvl-2 with the β -catenin-degradation complex.

WWOX sequesters Dvl-2 in the cytoplasmic compartment

Recent findings indicate that Dvl proteins shuttle between the cytoplasm and the nucleus and that their nuclear localizations are crucial for their functions in the Wnt/ β -catenin pathway (Torres MANelson 2000; Itoh *et al.*, 2005; Yokoyama and Yin DMalbon 2007; Gan

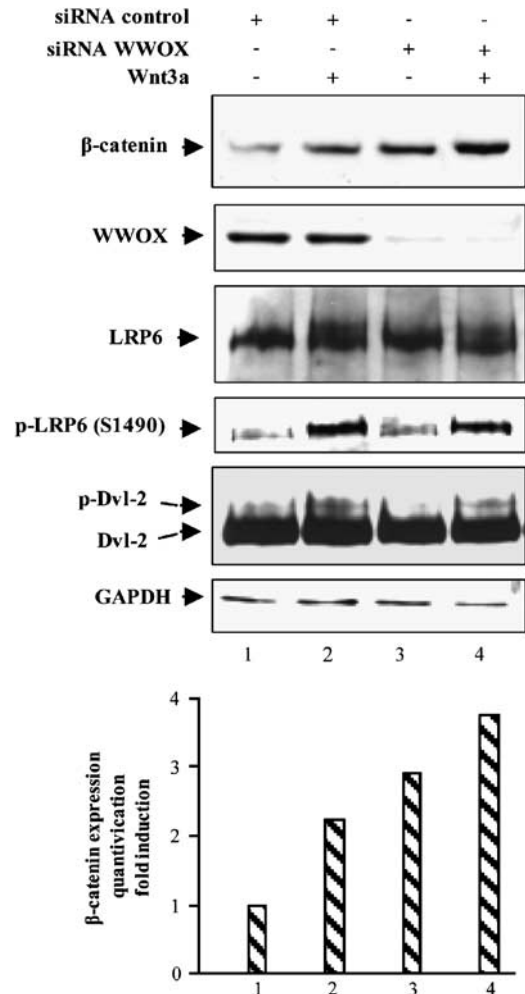


Figure 5 Inhibition of endogenous WWOX expression enhances the positive effect of Wnt-3a on β -catenin stability, but not on Dvl-2 and LRP6 phosphorylation. A total of 293 cells were transfected with siRNA control or siRNA WWOX. Forty-eight hours later, cells were transfected once again with the siRNA. Thirty hours later, cells were treated for 16 h with or without Wnt-3a-conditioned medium. Cell extracts were then prepared and examined by immunoblotting with β -catenin, WWOX, LRP6, p-LRP6(S1490), Dvl-2 and GAPDH (loading control) antibodies.

et al., 2008). WWOX sequesters various transcription factors in the cytoplasmic compartment, thereby inhibiting their transcriptional activities (Aqeilan *et al.*, 2004a, 2004b; Gaudio *et al.*, 2006). These results and ours therefore raise the possibility that WWOX would inhibit the transcriptional activity of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by preventing the entry of Dvl into the nucleus. To test this hypothesis, we first examined the effect of WWOX on the subcellular localization of Dvl-2 by immunofluorescence experiments in MCF-7 cells. When green fluorescent protein (GFP)-WWOX was expressed alone, it was distributed extensively in the cytoplasm in distinct perinuclear particles, and 3xflag-Dvl-2 expressed alone was observed to be localized mainly throughout the cytoplasm, in keeping with earlier reports (Lee and Ishimoto AYanagawa 1999; Bednarek *et al.*, 2001) (Figures 8a and b). The nuclear

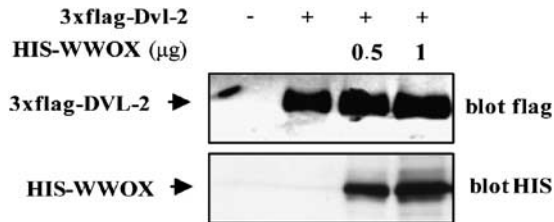


Figure 6 WWOX effect on Dvl-2 stability. A total of 293 cells were transfected with 3xflag-Dvl-2 and HIS-WWOX plasmids as indicated. Forty-eight hours later, cell lysates were prepared and examined by immunoblotting with anti-HA and anti-HIS antibodies.

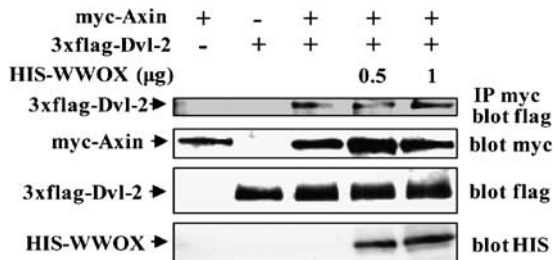


Figure 7 WWOX does not inhibit the interaction of Dvl-2 with Axin. A total of 293 cells were transfected with myc-Axin, 3xflag-Dvl-2 and HIS-WWOX plasmids as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-myc antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-HIS, anti-myc and/or anti-flag antibody(ies).

Dvl-2 level at steady state is low because of a highly efficient nuclear export (Itoh *et al.*, 2005). In cells expressing both GFP-WWOX and 3xflag-Dvl-2, the two exogenous proteins colocalized in the cytoplasm concentrated in distinct particles (Figure 8c). More than 90% of transfected cells showed this colocalization. Moreover, it has recently been reported that *Xenopus* Dvl (Xdsh) accumulates in cell nuclei when the specific nuclear-export signal (NES) in Xdsh is disrupted by mutagenesis (Itoh *et al.*, 2005). To test our hypothesis according to which WWOX sequesters Dvl-2 in the cytoplasm, we determined the effect of WWOX on the subcellular localization of Dvl-2 with a mutated NES. When leucines 519 and 521 located in the NES of mouse Dvl-2 were substituted with alanines, the mutated Dvl-2, Dvl-2NESm, was localized predominantly in the nucleus as expected (Figure 8d) By contrast, in cells cotransfected with GFP-WWOX and Dvl-2NESm, 50% of cells showed cytoplasmic staining of Dvl-2NESm, suggesting that WWOX prevents the nuclear import of Dvl-2 (Figure 8e). We examined the transfected cells by transmitted light image but did not detect any unwell cells (data not shown); moreover, the nuclei looked normal (Figure 8). The WWOX/Dvl-2 complexes were localized in the cytoplasm all around the nucleus in the majority of the cotransfected MCF-7 cells. We therefore excluded the possibility that the proteins were retained in the endoplasmic reticulum when coexpressed. We have obtained similar results with 293 and COS-7 cells.

Taken together, these results indicate that WWOX is a novel inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway. The colocalization of WWOX with Dvl-2 wild type or Dvl-2NESm in the cytoplasmic compartment suggests that WWOX would act, at least in part, by sequestering Dvl proteins in the cytoplasmic compartment, thereby inhibiting their function in β -catenin stabilization.

Discussion

To unravel the molecular function of WWOX, we used a yeast two-hybrid system and coimmunoprecipitation assay to identify novel partners of this tumor suppressor protein. We found that WWOX interacts with all three members of the Dvl family. As these proteins are key mediators of the Wnt/ β -catenin pathway (Kikuchi *et al.*, 2006), we studied the modulatory effect of WWOX on this pathway. We obtained evidence that WWOX is a novel negative regulator of the Wnt/ β -catenin pathway.

Recently, it has been shown that Dvl proteins shuttle between the cytoplasm and the nucleus, and that their nuclear localizations are crucial for their functions in the Wnt/ β -catenin pathway (Itoh *et al.*, 2005; Yokoyama and Yin DMalbon 2007; Gan *et al.*, 2008). Itoh *et al.* showed notably that the nuclear localization of *Xenopus* Dvl is essential for its ability to stabilize β -catenin (Itoh *et al.*, 2005; Gan *et al.*, 2008). Here, we observe the colocalization of WWOX with Dvl-2 wild type or Dvl-2NESm (a mutated form of Dvl-2 predominantly localized in the nucleus) in the cytoplasmic compartment (Figure 8). Therefore, we propose that WWOX inhibits the transcriptional activity of the Wnt/ β -catenin pathway by preventing the nuclear import of the Dvl proteins, thereby inhibiting their positive effect on β -catenin stabilization. Our observation that the inhibition of endogenous WWOX expression enhances the effect of Wnt-3a on β -catenin stability supports this hypothesis. WWOX has earlier been shown to associate with p73, AP2- γ , c-Jun and ErbB-4 in the cytoplasm and prevents their translocation into the nucleus, thereby inhibiting their transcriptional activity (Aqeilan *et al.*, 2004a, 2004b, 2005; Gaudio *et al.*, 2006). The sequestration of protein in the perinuclear compartment by WWOX seems, therefore, to be an important mechanism antagonizing the function of various proteins involved in the modulation of transcription, including Dvl proteins, in this study.

The results of Itoh *et al.*, 2005 and ours indicate that Dvl proteins have to enter into the nucleus to stabilize β -catenin. One explanation of these results is that β -catenin degradation may occur in the nucleus and that nuclear Dvl proteins inhibit this degradation. Consistent with this hypothesis, the number of components of the β -catenin-degradation complex (adenomatous polyposis coli, Axin, etc.) also seems to shuttle between the cytoplasm and the nucleus (Willert K Jones 2006). Alternatively, nuclear Dvl proteins may participate in the sequestration of β -catenin in the nucleus, thereby preventing its cytoplasmic degradation.

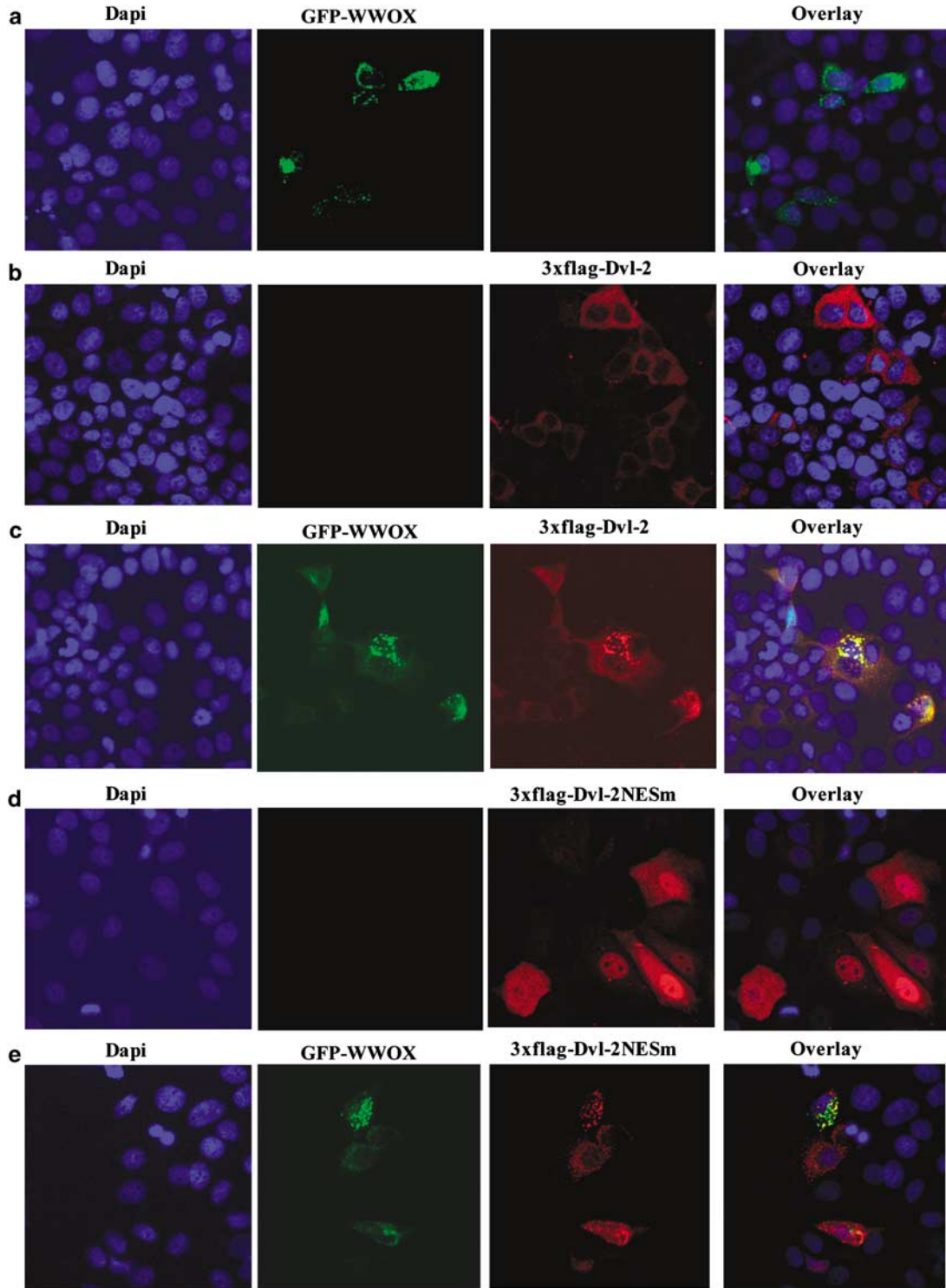


Figure 8 WWOX sequesters Dvl-2 in the cytoplasmic compartment. MCF-7 cells were transfected with GFP-WWOX (Green) (a, c and e), 3xflag-Dvl-2 (red) (b and c) and 3xflag-Dvl2NESm (red) (d and e) plasmids as indicated. The cells were then immunostained with anti-flag antibody, followed by Texas Red-conjugated secondary antibody and the nucleus was stained with DAPI. The nuclear GFP-WWOX, 3xflag-Dvl-2 and 3xflag-Dvl-2NESm expressions were visualized by fluorescence microscopy and the images were overlaid. 3xflag-Dvl-2 and GFP-WWOX colocalization appears in yellow in the cytoplasmic compartment.

The *FORIII* transcript sequence predicts a protein possessing two WW domains and a truncated SDR domain. *FORIII* may thus be able to bind proteins that

recognize WWOX WW domains, but not be able to carry out the enzymatic function of WWOX. Consequently, *FORIII* would act as a competitor of WWOX.

Supporting this idea, overexpression of FORIII both prevents the interaction of WWOX with Dvl-2 and inhibits the effect of WWOX on Wnt-3a-dependent transcriptional activity (Figure 3e and data not shown). If FORIII is indeed a competitor for WWOX, its overexpression could facilitate tumor progression by inhibiting the negative effect of WWOX on tumor growth. This is supported by reports that various *WWOX* transcripts lacking exons coding for the SDR domain are expressed only in cancers, or are overexpressed in cancers. Moreover, truncated WWOX proteins have been observed in hematopoietic malignancies (Ishii *et al.*, 2003). However, several reports show that truncated WWOX proteins are absent, despite the presence of the corresponding aberrant *WWOX* transcripts, in oral squamous cell carcinoma and in a variety of cancer cell lines (Watanabe *et al.*, 2003; Pimenta *et al.*, 2006). This absence could be explained by the rapid degradation of truncated WWOX proteins through the proteasomal machinery (Watanabe *et al.*, 2003). Furthermore, we did not detect endogenous FORIII in 293 cells or in several breast cancer cell lines with our anti-WWOX antibody (Figure 1e and data not shown), and aberrant *WWOX* transcripts may thus facilitate the progression of only certain tumors.

Mutations at various points of the Wnt/ β -catenin pathway have been found to lead to malignant transformation of a wide variety of human tissues (Polakis, 2000; Brown, 2001). In colon cancer, for example, 85% of tumors have loss-of-function mutations in *APC*, resulting in elevated β -catenin protein levels and subsequent TCF/lymphoid enhancer factor-1- β -catenin transcriptional activity. High β -catenin transcriptional activity has also been reported in 60% of human breast tumors and has been found to correlate with poor patient outcome (Lin *et al.*, 2000). The genetic events leading to high β -catenin activity in breast cancer have not yet been elucidated. We hypothesized that the lack of WWOX expression, which is frequent in breast cancer tissues (Driouch *et al.*, 2002; Guler *et al.*, 2004, 2005; Chang *et al.*, 2005), might constitutively stimulate the Wnt/ β -catenin pathway and thereby contribute to enhancing tumor growth. Our observation that knock-down of WWOX enhances Wnt-3a transcriptional activity, as well as that WWOX overexpression inhibits Dvl-1 transcriptional activity in MCF-7 and BT474 cells, supports this hypothesis.

Materials and methods

DNA constructs

FORIII and *WWOX* cDNAs were obtained by reverse transcriptase PCR of total RNA from breast cancer cell line, SKBR3, (for *FORIII*) and human thymus (Clontech, Palo Alto, CA, USA) (for *WWOX*). The cDNAs were cloned into pEGFP-C1 (Clontech) (for GFP-WWOX), pCMV-hemagglutinin (HA) (BD Bioscience Clontech, Palo Alto, CA) (for HA-WWOX), p3xflag-CMV-7.1 (Sigma, St Louis, MO, USA) (for 3xflag-WWOX and 3xflag-FORIII) and pcDNA3.1/HIS

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (for HIS-WWOX) by using standard protocols. 3xflag-Dvl2, 3xflag-Dvl2 (2–231), 3xflag-Dvl2 (232–736), 3xflag-Dvl2 (2–409), HIS-WWOX (54–104), HIS-WWOX (1–104), HIS-WWOX (105–414) and HIS-WWOX (54–414) plasmids were constructed by inserting the appropriate cDNA fragments generated by PCR into p3xflag-CMV-7.1 or pcDNA3.1/HIS vector. All constructs were verified by DNA sequencing.

To generate Dvl-2NESm, site-directed mutagenesis was used to modify the NES motif of mouse Dvl-2 by using the QuickChange kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The leucines 519 and 521 located in the NES of Dvl-2 were mutated to alanines.

Yeast Two-Hybrid Cloning and Analysis

FORIII cDNA was cloned into plasmid pB27 derived from the original plasmid pBTM116 (Vojtek ABHollenberg 1995). Random-primed cDNA libraries from human placenta poly(A⁺) RNA were constructed into plasmid pP6 derived from the original plasmid pGADGH (Barel, 1993). The libraries were transformed into yeast strain Y187, and ten million independent yeast colonies were collected, pooled and stored at –80 °C as equivalent aliquot fractions of the same library. The mating protocol has been described elsewhere (Rain *et al.*, 2001). Each screen was carried out to ensure that a minimum of 50 million interactions was tested. The prey fragments of the positive clones were amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions on a PE3700 Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The resulting sequences were used to identify the corresponding gene in the GenBank database (NCBI, Bethesda, MD, USA) with a fully automated procedure.

Cell culture and Wnt-3a conditioned medium

Human embryonic kidney 293 cells, human mammary carcinoma cell line, BT-474, and mouse fibroblast L cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium. Monkey African green kidney COS-7 cells and human mammary carcinoma cell line, MCF-7, were cultured in minimum essential medium. The Dulbecco's modified Eagle's medium and minimum essential medium were supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (penicillin 50 μ g/ml, streptomycin 50 μ g/ml and neomycin 100 μ g/ml). All cell lines were grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% (v/v) CO₂ in air. To prepare a conditioned medium containing Wnt-3a (Wnt-3a-CM), Wnt-3a-producing L cells (Shibamoto *et al.*, 1998) seeded at a density of 10⁶ cells in 94-mm-diameter dishes containing 10 ml of culture medium were cultured for 4 days. The conditioned medium was then centrifuged at 1000 g for 10 min, filtered through a nitrocellulose membrane and diluted fourfold (Figures 3 and 5) or sixfold (Figure 4) in fresh culture medium. As a negative control, conditioned medium from L cells that had been transfected with the empty vector, pGKneo, was prepared in the same way (Shibamoto *et al.*, 1998).

Antibodies

The following antibodies were used in this study: WWOX produced by inoculating rabbits with the entire human protein, HA (Eurogentec, Liège, Belgium); flag (Sigma); His, GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), β -catenin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); myc (BD Bioscience Clontech); Dvl-2, LRP6 and p-LRP6 (S1490) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

Reporter assays

Cells were transfected with the TOPflash (Upstate, NY, USA), FOPflash (Upstate), D1-Luc/D1A-848pXP2 and pRL-TK Renilla (Stratagene) reporter constructs and expression vectors, as indicated by using the Fugene 6 method (Roche, Nutley, USA). Firefly and Renilla luciferase activities were measured with a commercial kit (Dual-Luciferase Assay System, Promega, Madison, WI, USA).

siRNA experiments

siRNA control (Catalog no.: 1027281) and siRNA WWOX (Catalog no.: SI0277775) were purchased from Qiagen (Valencia, CA, USA). Cells were transfected with siRNA, or with siRNA, pRL-TK Renilla and TOPflash reporter constructs as indicated using HiPerfect transfection Reagent (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

Coimmunoprecipitation and western blotting

The methods are described in detail elsewhere (Lallemant *et al.*, 2005). Aliquots containing identical β -galactosidase activity were used for each coimmunoprecipitation experiment. For endogenous WWOX-Dvl-2 complex, cell extracts containing 700 μ g of total protein were subjected to direct immunoprecipitation with anti-Dvl2 antibody (Santa Cruz Biotechnology). Endogenous WWOX and Dvl2 were detected by immunoblotted cell extracts containing 30 μ g of total protein with appropriate antibodies. Quantifications of western blot were carried out using software BIO-1D from Vilber Lourmat (Marne la vallée, France).

Immunofluorescence

Cells were transfected with GFP-WWOX and 3xflag-Dvl-2 plasmids as indicated. Forty-eight hours later, cells were fixed for 10 min with phosphate-buffered saline containing 4%

paraformaldehyde and permeabilized for 10 min with phosphate-buffered saline plus 0.1% Triton X-100. Cells were then incubated with phosphate-buffered saline containing 5% goat serum and mouse anti-flag antibody (Sigma) for 1 h followed by anti-mouse-IgG Texas Red-conjugated (Santa Cruz Biotechnology) for 1 h. Cells were then stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (1 μ g/ml) and examined with a fluorescence microscope (Axiovert 200m, using X40/1.2 c-apochromat length, LSM 510 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany)).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Trevor Dale for donating HA-Dvl-2 (mouse) expression vector, Dr Akira Kikuchi for donating pCCN/Dvl-1 (human) and pEF-BOS-myc/Dvl-3 (human) plasmids, Dr Howe PH for donating pCDNA3-myc/Axin (human) and Dr Shinji Takada for donating mouse fibroblast L cells producing Wnt-3a and L cells stably transfected with the pGKneo plasmid. We thank Ivan Bièche and Christian Gespash for useful comments, Florence Copigny and Cédric Lefol for excellent technical assistance, and Philippe Leclerc (IFR 93, kremelin Bicêtre, France) for immunofluorescence analysis. This work was supported by a GenHomme Network Grant (02490-6088) to Hybrigenics and Institut Curie. We thank all the Hybrigenics staff for their contribution and the staff of the Drosoman laboratory, headed by Jacques Camonis and supported by Institut Curie.

References

- Aqeilan RI, Donati V, Gaudio E, Nicoloso MS, Sundvall M, Korhonen A *et al.* (2007a). Association of Wwox with ErbB4 in breast cancer. *Cancer Res* **67**: 9330–9336.
- Aqeilan RI, Donati V, Palamarchuk A, Trapasso F, Kaou M, Pekarsky Y *et al.* (2005). WW domain-containing proteins, WWOX and YAP, compete for interaction with ErbB-4 and modulate its transcriptional function. *Cancer Res* **65**: 6764–6772.
- Aqeilan RI, Hagan JP, Aqeilan HA, Pichiorri F, Fong LY, Croce CM. (2007b). Inactivation of the Wwox Gene Accelerates Forestomach Tumor Progression *in vivo*. *Cancer Res* **67**: 5606–5610.
- Aqeilan RI, Palamarchuk A, Weigel RJ, Herrero JJ, Pekarsky Y, Croce CM. (2004a). Physical and functional interactions between the Wwox tumor suppressor protein and the AP-2gamma transcription factor. *Cancer Res* **64**: 8256–8261.
- Aqeilan RI, Pekarsky Y, Herrero JJ, Palamarchuk A, Letofsky J, Druck T *et al.* (2004b). Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 4401–4406.
- Aqeilan RI, Trapasso F, Hussain S, Costinean S, Marshall D, Pekarsky Y *et al.* (2007c). Targeted deletion of Wwox reveals a tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 3949–3954.
- Barel P. (1993). *Cellular Interactions In Development: A Practical Approach* In: Hartley DA (ed) Oxford University Press: Oxford, 153–179.
- Bednarek AK, Keck-Waggoner CL, Daniel RL, Laffin KJ, Bergsagel PL, Kiguchi K *et al.* (2001). WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer Res* **61**: 8068–8073.
- Bednarek AK, Laffin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. (2000). WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res* **60**: 2140–2145.
- Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M *et al.* (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* **316**: 1619–1622.
- Brown AM. (2001). Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle? *Breast Cancer Res* **3**: 351–355.
- Chang NS, Pratt N, Heath J, Schultz L, Slevin D, Carey GB *et al.* (2001). Hyaluronidase induction of a WW domain-containing oxidoreductase that enhances tumor necrosis factor cytotoxicity. *J Biol Chem* **276**: 3361–3370.
- Chang NS, Schultz L, Hsu LJ, Lewis J, Su MS, CI. (2005). 17beta-Estradiol upregulates and activates WOX1/WWOXv1 and WOX2/WWOXv2 *in vitro*: potential role in cancerous progression of breast and prostate to a premetastatic state *in vivo*. *Oncogene* **24**: 714–723.
- Clevers H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**: 469–480.
- Cong F, Schweizer L, Varmus H. (2004). Casein kinase Iepsilon modulates the signaling specificities of dishevelled. *Mol Cell Biol* **24**: 2000–2011.
- Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stanek P *et al.* (2005). Casein kinase I gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **438**: 867–872.

- Driouch K, Prydz H, Monese R, Johansen H, Lidereau R, Frengen E. (2002). Alternative transcripts of the candidate tumor suppressor gene, WWOX, are expressed at high levels in human breast tumors. *Oncogene* **21**: 1832–1840.
- Fabbri M, Iliopoulos D, Trapasso F, Aqeilan RI, Cimmino A, Zaneni N *et al.* (2005). WWOX gene restoration prevents lung cancer growth *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 15611–15616.
- Gan XQ, Wang JY, Xi Y, Wu ZL, Li YPLi L. (2008). Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction. *J Cell Biol* **180**: 1087–1100.
- Gaudio E, Palamarchuk A, Palumbo T, Trapasso F, Pekarsky Y, Croce CM *et al.* (2006). Physical association with WWOX suppresses c-Jun transcriptional activity. *Cancer Res* **66**: 11585–11589.
- Gonzalez-Sancho JM, Brennan KR, Castelo-Soccio LA, Brown AM. (2004). Wnt proteins induce dishevelled phosphorylation via an LRP5/6-independent mechanism, irrespective of their ability to stabilize beta-catenin. *Mol Cell Biol* **24**: 4757–4768.
- Guler G, Uner A, Guler N, Han SY, Iliopoulos D, Hauck WW *et al.* (2004). The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma. *Cancer* **100**: 1605–1614.
- Guler G, Uner A, Guler N, Han SY, Iliopoulos D, McCue P *et al.* (2005). Concordant loss of fragile gene expression early in breast cancer development. *Pathol Int* **55**: 471–478.
- Herber B, Truss M, Beato M, Muller R. (1994). Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* **9**: 1295–1304.
- Hezova R, Ehrmann J, Kolar Z. (2007). WWOX, a new potential tumor suppressor gene. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **151**: 11–15.
- Hino S, Kishida S, Michiue T, Fukui A, Sakamoto I, Takada S *et al.* (2001). Inhibition of the Wnt signaling pathway by Idax, a novel Dvl-binding protein. *Mol Cell Biol* **21**: 330–342.
- Hino S, Michiue T, Asashima M, Kikuchi A. (2003). Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *J Biol Chem* **278**: 14066–14073.
- Iliopoulos D, Fabbri M, Druck T, Qin HR, Han SY, Huebner K. (2007). Inhibition of breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*: effect of restoration of Wwox expression. *Clin Cancer Res* **13**: 268–274.
- Iliopoulos D, Guler G, Han SY, Johnston D, Druck T, McCorkell KA *et al.* (2005). Fragile genes as biomarkers: epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer. *Oncogene* **24**: 1625–1633.
- Ishii H, Vecchione A, Furukawa Y, Sutheesophon K, Han SY, Druck T *et al.* (2003). Expression of FRA16D/WWOX and FRA3B/FHIT genes in hematopoietic malignancies. *Mol Cancer Res* **1**: 940–947.
- Itoh K, Brott BK, Bae GU, Ratcliffe MJ, Sokol SY. (2005). Nuclear localization is required for Dishevelled function in Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* **280**: 3110–3115.
- Kadoya T, Kishida S, Fukui A, Hinoi T, Michiue T, Asashima M *et al.* (2000). Inhibition of Wnt signaling pathway by a novel axin-binding protein. *J Biol Chem* **275**: 37030–37037.
- Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. (2006). Regulation of Wnt signaling by protein–protein interaction and post-translational modifications. *Exp Mol Med* **38**: 1–10.
- Kishida M, Hino S, Michiue T, Yamamoto H, Kishida S, Fukui A *et al.* (2001). Synergistic activation of the Wnt signaling pathway by Dvl and casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* **276**: 33147–33155.
- Kishida S, Yamamoto H, Hino S, Ikeda S, Kishida M, Kikuchi A. (1999). DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Mol Cell Biol* **19**: 4414–4422.
- Klimowski LK, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Virshup DM. (2006). Site-specific casein kinase Iepsilon-dependent phosphorylation of Dishevelled modulates beta-catenin signaling. *FEBS J* **273**: 4594–4602.
- Kuroki T, Yendamuri S, Trapasso F, Matsuyama A, Aqeilan RI, Alder H *et al.* (2004). The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis. *Clin Cancer Res* **10**: 2459–2465.
- Lallemand F, Seo SR, Ferrand N, Pessah M, L'Hoste S, Rawadi G *et al.* (2005). AIP4 restricts transforming growth factor-beta signaling through a ubiquitination-independent mechanism. *J Biol Chem* **280**: 27645–27653.
- Lee JS, Ishimoto A, Yanagawa S. (1999). Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J Biol Chem* **274**: 21464–21470.
- Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y *et al.* (2000). Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4262–4266.
- Ludes-Meyers JH, Bednarek AK, Popescu NC, Bedford M, Aldaz CM. (2003). WWOX, the common chromosomal fragile site, FRA16D, cancer gene. *Cytogenet Genome Res* **100**: 101–110.
- Ludes-Meyers JH, Kil H, Bednarek AK, Drake J, Bedford MT, Aldaz CM. (2004). WWOX binds the specific proline-rich ligand PPXY: identification of candidate interacting proteins. *Oncogene* **23**: 5049–5055.
- Ludes-Meyers JH, Kil H, Nunez MI, Conti CJ, Parker-Thornburg J, Bedford MT *et al.* (2007). WWOX hypomorphic mice display a higher incidence of B-cell lymphomas and develop testicular atrophy. *Genes Chromosomes Cancer* **46**: 1129–1136.
- Mangelsdorf M, Ried K, Woollatt E, Dayan S, Eyre H, Finnis M *et al.* (2000). Chromosomal fragile site FRA16D and DNA instability in cancer. *Cancer Res* **60**: 1683–1689.
- Nunez MI, Ludes-Meyers J, Abba MC, Kil H, Abbey NW, Page RE *et al.* (2005). Frequent loss of WWOX expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor status. *Breast Cancer Res Treat* **89**: 99–105.
- Paige AJ, Taylor KJ, Stewart A, Sgouros JG, Gabra H, Sellar GC *et al.* (2000). A 700-kb physical map of a region of 16q23.2 homozygously deleted in multiple cancers and spanning the common fragile site FRA16D. *Cancer Res* **60**: 1690–1697.
- Paige AJ, Taylor KJ, Taylor C, Hillier SG, Farrington S, Scott D *et al.* (2001). WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11417–11422.
- Pimenta FJ, Gomes DA, Perdigo PF, Barbosa AA, Romano-Silva MA, Gomez MV *et al.* (2006). Characterization of the tumor suppressor gene WWOX in primary human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* **118**: 1154–1158.
- Pluciennik E, Kusinska R, Potemski P, Kubiak R, Kordek R, Bednarek AK. (2006). WWOX—the FRA16D cancer gene: expression correlation with breast cancer progression and prognosis. *Eur J Surg Oncol* **32**: 153–157.
- Polakis P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**: 1837–1851.
- Qin HR, Iliopoulos D, Nakamura T, Costinean S, Volinia S, Druck T *et al.* (2007). WWOX suppresses prostate cancer cell growth through modulation of ErbB2-mediated androgen receptor signaling. *Mol Cancer Res* **5**: 957–965.
- Rain JC, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S *et al.* (2001). The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* **409**: 211–215.
- Ried K, Finnis M, Hobson L, Mangelsdorf M, Dayan S, Nancarrow JK *et al.* (2000). Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells. *Hum Mol Genet* **9**: 1651–1663.
- Shibamoto S, Higano K, Takada R, Ito F, Takeichi M, Takada S. (1998). Cytoskeletal reorganization by soluble Wnt-3a protein signalling. *Genes Cells* **3**: 659–670.
- Smalley MJ, Sara E, Paterson H, Naylor S, Cook D, Jayatilake H *et al.* (1999). Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription. *EMBO J* **18**: 2823–2835.
- Torres MA, Nelson WJ. (2000). Colocalization and redistribution of dishevelled and actin during Wnt-induced mesenchymal morphogenesis. *J Cell Biol* **149**: 1433–1442.

- Vojtek AB, Hollenberg SM. (1995). Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol* **255**: 331–342.
- Wang X, Chao L, Jin G, Ma G, Zang Y, Sun J. (2009). Association between CpG island methylation of the WWOX gene and its expression in breast cancers. *Tumour Biol* **30**: 8–14.
- Watanabe A, Hippo Y, Taniguchi H, Iwanari H, Yashiro M, Hirakawa K *et al.* (2003). An opposing view on WWOX protein function as a tumor suppressor. *Cancer Res* **63**: 8629–8633.
- Wharton Jr KA. (2003). Runnin with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol* **253**: 1–17.
- Willert K, Jones KA. (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* **20**: 1394–1404.
- Yokoyama N, Yin DM, Malbon CC. (2007). Abundance, complexation, and trafficking of Wnt/beta-catenin signaling elements in response to Wnt3a. *J Mol Signal* **2**: 11.
- Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C *et al.* (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* **135**: 367–375.
- Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R *et al.* (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* **438**: 873–877.

Article 2:

Inhibition of the BCL9-2 function in the Wnt/ β -catenin pathway by WWOX and HDAC3.

Auteurs : Perla El Hage¹, Ambre Petitalot¹, Anne-Hélène Monsoro-Burq^{2,3}, Kelthouma Driouch¹, Etienne Formstecher⁴, Jacques Camonis⁵, Michèle Sabbah⁶, Rosette Lidereau¹ and François Lallemand¹

¹*Institut Curie, hôpital René Huguenin, 35 rue Dailly, 92210 Saint Cloud, France.*

²*Institut Curie, CNRS UMR3347, INSERM U1021, Centre Universitaire, 91405 Orsay Cedex, France ;*

³*Université Paris Sud-11, Centre Universitaire, 91405 Orsay Cedex, France;*

⁴*Hybrigenics, 3-5 impasse Reille, 75014 Paris, France;*

⁵*INSERM U528, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris Cedex 05, France;*

⁶*INSERM U938, hôpital Saint-Antoine, Université Pierre et Marie Curie, Paris 75012, France.*

Article en cours de soumission

Suite à ce premier article, nous avons entrepris l'étude du complexe WWOX-BCL9-2 dans la modulation de la voie Wnt/ β -caténine.

Suite à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, la β -caténine s'accumule dans le noyau où elle se lie aux facteurs TCF/LEF-1 et active la transcription des gènes cibles de la voie. BCL9-2 est capable de se lier à la β -caténine et recruter Pygopus (Thompson et al 2002). Ce trimère serait impliqué dans l'import et la rétention nucléaire de la β -caténine (Townsend et al 2004) et contribue directement à l'activation de la transcription par la β -caténine (Hoffmans et al 2005) (voir chapitre 3.2).

Comme dans notre étude précédente, nous avons tout d'abord validé l'association BCL9-2-WWOX à l'aide d'expérience de co-immunoprécipitation (Figure 1A). En outre, nous

avons pu observer l'association entre BCL9-2 transfectée et WWOX endogène (complexe semi-endogène) (Figure 1B). Suite à cette confirmation, nous avons voulu connaître les domaines responsables de cette association. BCL9-2 ne présente aucune homologie correspondant à des domaines connus. Le domaine WW1 de WWOX est capable de se lier à des motifs riches en proline de type PPPY. Nous avons identifié un motif PPPY dans BCL9-2 ainsi que dans Dvl-2 (Figure 2A). Nous avons muté la tyrosine de ses motifs en alanine et nous avons vu que les mutants BCL9-2Y561A et Dvl-2Y568A perdent fortement leur capacité à s'associer à WWOX (Figure 2B et 2C). Le domaine WW1 contient une tyrosine dont la phosphorylation a été décrite comme importante pour sa liaison aux motifs PPPY (Sudol et al 1995). Nous avons donc eu recours à un mutant WWOX dans lequel la tyrosine 33 est remplacée par une arginine (WWOXY33R). Le mutant WWOXY33R s'associe plus faiblement à Dvl-2 et BCL9-2 que WWOX « wild type » (Figure 2D et 2E). Ces résultats montrent que les motifs PPPY de Dvl-2 et BCL9-2, et le domaine WW1 de WWOX, sont importants pour les interactions WWOX-Dvl-2 et WWOX-BCL9-2.

Afin de voir si WWOX régule la fonction de BCL9-2 dans la voie Wnt/ β -caténine, nous avons effectué des expériences de luciférase « assay » utilisant le plasmide TOPflash ainsi que des vecteurs codant BCL9-2, WWOX et/ou une forme de la β -caténine mutée ne pouvant plus être phosphorylée par GSK3 β et donc détruite par le complexe de dégradation de la β -caténine. Nous avons utilisé cette β -caténine mutée afin de s'affranchir des effets de WWOX sur la stabilité de cette protéine. Les résultats indiquent que l'effet positif de BCL9-2 sur l'activité transcriptionnelle de la β -caténine est inhibé par WWOX (Figure 3A). Ces résultats ont été validés en étudiant les effets de la β -caténine, BCL9-2 et WWOX sur l'activité du promoteur de la cycline D1 (figure 3B). WWOX inhibe également l'amplification de l'activité transcriptionnelle de Wnt3a induite par BCL9-2 (Figure 3C). En outre, l'inhibition de la production de WWOX endogène stimule l'activité transcriptionnelle liée à BCL9-2 (Figure 3D).

Afin de valider ces résultats à l'aide d'un modèle physiologique, nous avons utilisé le modèle du développement du xénope. Ce modèle est fréquemment utilisé pour l'étude des régulateurs de la voie Wnt/ β -caténine. L'activation de la voie Wnt/ β -caténine au côté ventral d'embryons de xénope, par l'injection d'ARNm codant un activateur comme Wnt7b (ligand de la voie Wnt/ β -caténine chez le xénope), entraîne la formation d'embryon ayant un double axe dorsal. Pour déterminer les effets d'une protéine sur la modulation de cette voie, on injecte, avec les ARNm Wnt7b, des ARNm codant la protéine d'intérêt et l'on quantifie le

nombre d'embryons possédant un double axe. Nous avons tout d'abord déterminé si WWOX était capable d'inhiber l'activité de la voie Wnt/ β -caténine dans ce modèle. Nous avons trouvé que l'injection d'ARNm codant Wnt7b induit un nombre important d'embryons à double axe et que cet effet de Wnt7b est fortement inhibé quand les ARNm Wnt7b sont coinjectés avec des ARNm codant WWOX (Figure 4A). Nous avons alors étudié les effets de WWOX sur l'activité de BCL9-2 dans ce modèle. Nous avons observé une augmentation de la quantité de doubles axes en coinjectant BCL9-2 avec β -caténine par rapport à l'injection de la β -caténine seule. L'injection de WWOX inhibe fortement cet effet amplificateur de BCL9-2 (Figure 4B).

L'ensemble de ces résultats démontre que WWOX est capable d'inhiber la fonction de BCL9-2 dans la voie Wnt/ β -caténine qui est l'amplification de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine.

Nous nous sommes ensuite attachés à l'étude des mécanismes moléculaires par lesquels WWOX inhibe l'activité de BCL9-2. Nous avons eu recours à des expériences d'immunolocalisation pour voir si, comme dans le cas de Dvl-2, WWOX séquestre BCL9-2 dans le cytoplasme. Nous avons trouvé que la localisation nucléaire de BCL9-2 n'est pas perturbée par WWOX infirmant notre hypothèse (Figure 5).

Nous avons alors émis l'hypothèse que WWOX agirait en dissociant les associations BCL9-2-Pygopus et/ou β -caténine. Cependant, à l'aide d'expériences de co-immunoprécipitation, nous avons vu que WWOX n'a aucun effet sur ces associations (Figure 5B et C).

Différents travaux ont montré que certaines histones déacétylases nucléaires (HDACs) inhibent la voie Wnt/ β -caténine (Cavallo et al 1998, Zhang et al 2006). Les HDACs sont des inhibiteurs généraux de la transcription. Ils agissent en déacétylant les histones ce qui conduit à un repliement plus dense de l'ADN et donc à une impossibilité aux facteurs de transcription d'accéder à leurs sites de liaison spécifiques. Afin de mieux comprendre l'inhibition de la fonction de BCL9-2 dans la voie Wnt/ β -caténine par WWOX, nous avons entrepris l'étude du rôle des HDACs dans cette inhibition. Notre hypothèse était que WWOX inhibait l'activité transcriptionnelle de BCL9-2 en recrutant une (ou plusieurs) HDACs sur cette dernière. Afin de tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord cherché si WWOX avait la capacité de créer des complexes avec des HDAC. Nous avons trouvé par co-immunoprécipitation que WWOX interagit avec HDAC1 et 3 (Figure 6A). Si notre hypothèse est juste, alors ces

HDAC devaient être capables d'inhiber BCL9-2, de plus, les domaines de liaison des HDACs et BCL9-2 sur WWOX devaient être différents. Nous avons trouvé que HDAC3, et non pas HDAC1, inhibe fortement l'activité transcriptionnelle de BCL9-2 (Figure 6B et résultats non-présentés). En outre, la mutation du domaine WW1 de WWOX est sans conséquence sur l'association HDAC3-WWOX alors que cette mutation inhibe fortement l'association BCL9-2-WWOX suggérant fortement que les domaines de liaison de BCL9-2 et HDAC3 sur WWOX sont donc distincts (Figure 6C).

Suite à cela nous avons directement déterminé par co-immunoprecipitation l'effet de WWOX sur l'association BCL9-2-HDAC3. Nous avons obtenu un résultat inattendu, WWOX est sans effet sur cette association (Figure 7A). Cependant, nous avons mis en évidence que HDAC3 renforce considérablement l'association WWOX-BCL9-2 (Figure 7B). En outre, en utilisant une forme mutée de HDAC3 (Y298F) dépourvue d'activité déacétylase, nous avons trouvé que HDAC3 agit sur cette interaction, ainsi que sur l'activité transcriptionnelle de BCL9-2, indépendamment de son activité déacétylase (Figure 8).

En conclusion, nous avons mis en évidence deux nouveaux inhibiteurs de l'activité transcriptionnelle de BCL9-2, WWOX et HDAC3. HDAC3 agit sur, au moins en partie, en renforçant l'association WWOX-BCL9-2 et cela indépendamment de son activité déacétylase

Inhibition of the BCL9-2 function in the Wnt/ β -catenin signaling pathway by the tumor suppressor WWOX and HDAC3.

P El Hage¹, A Petitalot¹, A-H Monsoro-Burq^{2,3}, K Driouch¹, E Formstecher⁴, J Camonis⁵,
Michèle Sabbah⁶, Rosette Lidereau¹ and François Lallemand¹

¹Institut Curie, hôpital René Huguenin, 35 rue Dailly, 92210 Saint Cloud, France. ²Institut Curie, CNRS UMR3347, INSERM U1021, Centre Universitaire, 91405 Orsay Cedex, France ; ⁴Université Paris Sud-11, Centre Universitaire, 91405 Orsay Cedex, France; ⁴Hybrigenics, 3-5 impasse Reille, 75014 Paris, France; ⁵INSERM U528, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris Cedex 05, France; ⁶INSERM U938, hôpital Saint-Antoine, Université Pierre et Marie Curie, Paris 75012, France.

Running title: *WWOX, HDAC3 and BCL9-2 function in Wnt pathway*

To whom correspondence should be addressed: F Lallemand, Institut Curie, hôpital René Huguenin, 35 rue Dailly, 92210 Saint Cloud, France, Tel.: (33) 1 47 11 15 66; Fax: (33) 1 47 11 16 96; E-mail: francois.lallemand@Curie.net

Keywords: WWOX; BCL9-2; Wnt/ β -catenin pathway; HDAC

SUMMARY

WW domain-containing oxidoreductase (*WWOX*) is a tumor suppressor gene that encompasses the common fragile site FRA16D on chromosome 16q23.3-24.1. The molecular mechanism by which *WWOX* tumor suppressor function is still largely unknown. We previously defined *WWOX* as a novel inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway acting in the cytoplasm by preventing the nuclear import of Dvl-2. Here, we confirm the inhibitory effect of *WWOX* on the Wnt/ β -catenin pathway activity *in vivo* by using the *Xenopus* secondary axis formation assay. Furthermore, we highlight that *WWOX* interacts with the component of the Wnt/ β -catenin pathway B-cell CLL/lymphoma 9-like protein (*BCL9-2*). *BCL9-2* has a proline-rich PPPY motif crucial for its interaction with the WW1 domain of *WWOX*. *WWOX* inhibits the positive effects of *BCL9-2* on β -catenin and Wnt3a transcriptional activities. *WWOX* does not affect the subcellular localisation of *BCL9-2* and its ability to interact with β -catenin and Pygopus. However, we found that *WWOX* interacts with the nuclear histone deacetylase-1 and -3 (*HDAC1* and *HDAC3*). *HDAC3*, but not *HDAC1*, also inhibits the transcriptional activity of *BCL9-2* and promotes the *WWOX*-*BCL9-*

2 interaction. The inactive mutant HDAC3 (Y298F), devoid of deacetylase activity, inhibits BCL9-2 activity and enhances WWOX-BCL9-2 interaction as well. Together, these results suggest a novel molecular mechanism regulating the BCL9-2 function in the Wnt/ β -catenin pathway, which is the recruitment of WWOX on BCL9-2 by HDAC3 independently of its deacetylase activity.

WWOX encodes a pro-apoptotic protein composed of two N-terminal WW domains, involved in protein-protein interactions, and a C-terminal short-chain dehydrogenase domain (SDR) shared by steroid hormone-metabolizing enzymes (1-3). *WWOX* is located in chromosome region 16q23.3-24.2 which contains the second most active common human fragile site FRA16D. Its expression is altered in various cancer types such as breast cancer. The decrease of *WWOX* expression in breast cancer is associated with a bad clinical outcome for patients (4,5). While *WWOX* ectopic expression in different cell lines inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*. Targeted ablation of the murine *WWOX* gene leads to the development of osteosarcoma. Moreover, the incidence of tumor formation in *WWOX*^{+/-} mice is significantly higher than in *WWOX*^{+/+} mice. The spontaneous tumors in *WWOX*^{+/-} mice include lung and mammary tumors (3,6). These findings suggest *WWOX* as a candidate tumor suppressor gene, however, the

molecular function of WWOX remains largely unknown.

The canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway modulates multiple developmental processes and controls homeostatic self-renewal in a number of adult tissues (7-9). Its aberrant activation plays an important role in the development of many human cancer types. This signaling pathway regulates the stability of β -catenin (10). In the absence of secreted Wnt ligand, β -catenin not associated to plasmic membrane, interacts with the β -catenin-degradation complex composed notably of the glycogen synthase kinase3 β (GSK3 β), axin, and the adenomatous polyposis coli protein (APC). In this complex, β -catenin is phosphorylated by GSK3 β , which induces its ubiquitination and thus its degradation by the 26S proteasome. In contrast, Wnt ligand binding to its two receptor molecules: Frizzled and low density lipoprotein receptor-related protein, induces the activity of dishevelled proteins (Dvl-1, Dvl-2 and Dvl-3) which in turn inhibit β -catenin phosphorylation by GSK3 β (11). This inhibition allows β -catenin accumulation in the cytoplasm and nucleus. In the nucleus, β -catenin associates with, and stimulates the transcriptional activity of members of the T cell factor/Lymphoid enhancer factor family (Tcf/Lef), thereby activating the target genes of the Wnt/ β -catenin pathway.

BCL9-2, a component of the vertebrate BCL9 family, is a nuclear cofactor of the Wnt/ β -catenin signaling pathway (12-14). In the nucleus, BCL9-2 binds to β -catenin and enhances its transcriptional activity by recruiting Pygopus which in turn recruits components of the chromatin remodelling machinery (15,16). Different reports indicate that BCL9-2 stimulates also the nuclear import of β -catenin (12,13). BCL9-2 is overexpressed in breast and colon cancers (13,17-20). BCL9-2 promotes the early stages of intestinal tumor progression in mice (17). Conditional ablation of Bcl9-2 and Bcl9 (a Bcl9-2 homologue) in the intestinal epithelium does not affect the development and homeostasis of this tissue, while the role of the Wnt/ β -catenin pathway in these processes is crucial (7). However, this ablation impairs regeneration and provokes, in chemically induced colon tumors, a decrease of tumor growth and expression of Wnt target genes involved in the regulation of EMT and

stem cell traits (18). Therefore, in mammals, BCL9-2 and BCL9 appear not to be required for Wnt/ β -catenin signaling in normal intestinal physiology. In contrast, BCL9/BCL9-2 proteins may play a particular role under pathological conditions, such as regeneration or in tumors.

Recently, we defined WWOX as a novel negative regulator of the Wnt/ β -catenin pathway in different human breast cancer cell lines, acting, at least in part, by sequestering Dvl-2 in the cytoplasm (21). In the present study, we confirm that WWOX inhibits this Wnt signaling *in vivo* by determining its antagonist effects on axis duplication induced by Wnt7b in *Xenopus* embryos. We show that WWOX binds and inhibits the BCL9-2 function in the Wnt/ β -catenin pathway. Moreover, we found that HDAC3 inhibits also the BCL9-2 transcriptional activity and promotes WWOX-BCL9-2 association independently of its deacetylase activity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture and Wnt-3a conditioned medium - Human embryonic kidney 293 cells and the human breast cancer cell line MCF-7 were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). 293 were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, and MCF-7 cells were maintained in Minimum Essential Medium, containing 10% fetal bovine serum and antibiotics (penicillin 50 μ g/ml, streptomycin 50 μ g/ml, and neomycin 100 μ g/ml) at 37°C with 5% CO₂. The preparation of the Wnt3a-conditioned medium has been described elsewhere (21).

Plasmids - 3xflag-BCL9-2, HA- β -catenin, HA-Pygopus-2, HA-HDAC3 and HDAC3Y298F expression vectors were constructed by inserting the appropriate cDNAs into p3xflag-CMV-7.1 (Sigma, St Louis, MO, USA) or pCMV2 (Gene Therapy Systems, San Diego, CA, USA) vectors. The cDNAs were obtained by PCR of Flag mBCL9-2 (mouse wild type, from F.H. Brembeck), Flag- β -catenin (human wild-type, from Dr. Z. Sun), hPygopus2(pDA660) (human wild type, from K. Basler), Flag-HDAC3 (see below) and pFlag-HDAC3 (Y298F) (human, from Min-Zu Wu). 3xflag-BCL9-2Y561A and 3xflag-Dvl-2Y568A were obtained by site-directed PCR mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA, USA). All constructs were verified by DNA sequencing. GFP-WWOX, Myc-WWOX, Myc-WWOXY33R, 3xflag-Dvl-2, β -catenin Δ GSK, Flag-HDAC1 and Flag-HDAC3

expression vectors have already been described (21-25). For *Xenopus* secondary axis assay, plasmids for Wnt7b and β -catenin mRNA *in vitro* synthesis were described previously (26,27). Human WWOX was subcloned into pCS107 plasmid.

Antibodies - The following antibodies were used in this study: WWOX antibody has already been described (21); antibody anti-flag (Sigma); antibody anti-HA (Covance, Meryville, CA, USA) and antibody anti-myc (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA).

***Xenopus* secondary axis assay** - *Xenopus laevis* embryos were collected after *in vitro* fertilization according to standard procedures (28). Secondary axes were induced by activating Wnt canonical signaling ventrally, using *in vivo* micro-injection into 2-cell stage embryos (29). Messenger RNA encoding either *Xenopus* Wnt7b, human β -catenin, mouse BCL9-2, or human WWOX were synthesized using mMessageMachine kit (Ambion, Austin, TX, USA) and injected ventrally at 50 pg, 0.5-1 ng and 1 ng per embryo respectively. Embryos were fixed at tadpole stage 22 and analyzed for secondary axis formation. They were further processed for *in situ* hybridization with *sox2* probe, to mark the central nervous system (dorsal axis) formation (30,31).

Yeast Two-Hybrid Cloning and Analysis - The methods have been described in detail elsewhere (21). In this study we used WWOX wild type as bait. A confidence score (PBS, for Predicted Biological Score) was attributed to each interaction as previously described (32). The protein interactions from this publication have been submitted to the IMEx (<http://www.imexconsortium.org>) consortium through IntAct [pmid: 19850723] and assigned the identifier IM-15968.

Luciferase assays - The methods have been described in detail elsewhere (21). In this study we transfected cells seeded at a density of 80×10^3 in 24-well plates. Firefly luciferase activity was normalized to Renilla luciferase activity and expressed as mean \pm s.d. of triplicates from a representative experiment. Results are shown as fold induction of the luciferase activity compared to control cells transfected with empty vectors alone.

siRNA experiments - siRNA control (Catalog no.: 1027281) and siRNA WWOX (Catalog no.: SI02777775, target sequence: 5'-

CCCATCGATTTACAGATATTA-3') were purchased from Qiagen (Valencia, CA, USA). Cells were transfected with siRNA alone by HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen), and with siRNA and plasmids by TransMessenger Transfection Reagent (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

Co-immunoprecipitation and western blotting - The methods have been described in detail elsewhere (33). Aliquots containing identical β -galactosidase activities were used for each co-immunoprecipitation experiment.

Immunofluorescence - Cells were seeded at a density of 2×10^5 in p60 plates each containing a glass cover slide, 24 hours later they were transfected. 24 hours later, cells were fixed (PBS, 4% paraformaldehyde, 10 min) and permeabilized (PBS, 0.1% Triton X-100, 10 min). Cells were then incubated with PBS containing 5% goat serum and anti-flag antibody (Sigma) (Figure 6), or anti-flag and anti-HA (Santa Cruz, Biotechnology) antibodies (Figure 9A), followed by Texas Red-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz, Biotechnology) (Figure 6), or by Cy5 (Jackson,) and Alexa (Invitrogen)-conjugated secondary antibodies (Figure 9A). Cells were then stained with DAPI and examined with fluorescence microscope (Eclipse Ti-S Nikon (Melville, New York, USA) for the Figure 6, and Axiovert 200 m, using X40/1.2c-apochromat length, LSM 510 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany) for Figure 9).

Statistical analysis - All statistical calculations were performed using PASW Statistics (version 18.0; SPSS Inc, Chicago, IL). Comparisons were performed using a two-sided unpaired Student *t* test. P values less than .05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

WWOX interacts with the component of the Wnt/ β -catenin pathway BCL9-2 - To gain insight into the molecular action of WWOX, we undertook the identification of its protein partners. For this, we performed two yeast two-hybrid screens. As bait, we used FORIII (21) (a WWOX isoform, possessing the WW domains and a truncated SDR domain) and WWOX wild type to screen at saturation a highly complex human placenta library. One clone corresponding to amino acids 456-714 of the component of the Wnt/ β -catenin pathway BCL9-2 was found to interact with both baits. BCL9-2 was recovered as a prey in only four screens (our screens and

two others) in more than one thousand and three hundreds performed on the same placenta library, strongly suggesting that the BCL9-2-WWOX interaction is highly specific.

The results of our yeast two-hybrid screens robustly suggest that the sequestration of Dvl-2 in the cytoplasm should not be the sole molecular mechanism by which WWOX inhibits the Wnt/ β -catenin signaling pathway. To investigate this hypothesis, we undertook the study of the role of the WWOX-BCL9-2 interaction in the regulation of the Wnt/ β -catenin pathway activity.

To validate the results from our yeast two-hybrid screen, we performed co-immunoprecipitation experiments in 293 cells. We determined that WWOX formed a complex with BCL9-2 in these cells *in vivo* (Figure 1A). By using semi-endogenous immunoprecipitation, we also highlighted that transfected BCL9-2 interacted with endogenous WWOX (Figure 1B).

The N-terminal part of WWOX contains a class 1 WW-domain (WW1) shown to associate specifically with PPXY motifs (34). The replacement of the tyrosine residues by alanine in the PPXY motifs of several protein partners of WWOX, or the Y33R point mutation in the WW1, inhibits the association of WWOX with these protein partners (23,35-37). We detected a PPPY motif both in BCL9-2 (PPPY561) and in Dvl-2 (PPPY568) (Figure 2A). To identify the regions responsible for WWOX-BCL9-2 association, we therefore generated a mutated form of BCL9-2 in which the Tyrosine561 was substituted to alanine (BCL9-2Y561A) and determined the ability of this mutant to bind WWOX by co-immunoprecipitation in 293 cells. We found that Y561A point mutation in BCL9-2 inhibited the WWOX-BCL9-2 interaction (Figure 2B). In the same way, we also observed that the point mutation Y568A in the PPPY motif of Dvl-2 (Dvl-2Y568A) inhibited WWOX-Dvl-2 association (Figure 2C). To investigate the involvement of WW1 in the WWOX-BCL9-2 and WWOX-Dvl-2 associations, we tested the ability of WWOXY33R to bind BCL9-2 and Dvl-2. Figure 2D shows that Y33R point mutation in WWOX decreased strongly the WWOX-BCL9-2 interactions. We noticed that WWOX-Dvl-2 binding is also affected although only partially, by similar mutation

(Figure 2E), suggesting that these are not the sole motifs involved. These observations indicate that PPPY motif and class 1 WW-domain are critical for WWOX-BCL9-2 interaction.

WWOX inhibits the BCL9-2 function in the Wnt/ β -catenin signaling pathway - In the Wnt/ β -catenin pathway, BCL9-2 enhances the transcriptional activity of β -catenin. The observations that WWOX inhibits the transcriptional activity of the Wnt/ β -catenin pathway (21) and binds BCL9-2 raise the hypothesis that WWOX might affect the BCL9-2 function in this signaling pathway. As we have already shown that WWOX inhibits the Wnt/ β -catenin pathway in different breast cell lines (21), we examined this possibility by performing luciferase assays using human TOPflash containing six Tcf-binding elements as a reporter plasmid and the breast cancer cell line MCF-7. To prevent any effect of WWOX on β -catenin stability, we also used a constitutively active form of β -catenin (β -catenin Δ GSK) which carries a mutation in the GSK3 β phosphorylation sites and is consequently refractory to degradation (24). We found that ectopic expression of WWOX inhibited both β -catenin transcriptional activity and the promotion of β -catenin transcriptional activity by BCL9-2 (Figure 3A). When a reporter plasmid containing mutated Tcf-binding sites (FOPflash) was used, little change in reporter activity was observed, confirming the specificity of this finding

We confirmed our results in a luciferase assay using the natural cyclin D1 promoter ligated to a luciferase gene (D1-Luc/D1 Δ -848pXP2) (38) (Figure 3B).

We also found that ectopic BCL9-2 expression in the 293 cells enhanced the transcriptional activity of Wnt3a and had no effect in the absence of Wnt3a in keeping with previous report (12) (Figure 3C). Moreover, overexpression of WWOX inhibited both Wnt3a effect and the promotion of Wnt3a transcriptional activity by BCL9-2. In these experiments, we did not use MCF-7 cells because of their insensitivity to Wnt3a.

Importantly, using a validated WWOX siRNA (21), we also observed that the transcriptional activity induced by BCL9-2 overexpression was enhanced when endogenous *WWOX* expression was depleted (Fig. 3D).

It has been shown that the Wnt/ β -catenin pathway and BCL9, the homologue of BCL9-2, induce secondary axis in early-stage *Xenopus*

embryos (39). Therefore, in order to validate our results *in vivo*, we thought to study the effect of WWOX on the ability of BCL9-2 to induce secondary axis during *Xenopus* development. First, we determined if WWOX was able to inhibit the Wnt/ β -catenin activity in this model. Injection of Wnt7b mRNA, encoding a canonical ligand of the Wnt/ β -catenin pathway, induced secondary body axis when injected into the ventral side of two-cell stage *Xenopus* blastulae (68% of double axis, n=198; Figure 4A). However, co-injection of WWOX mRNA together with Wnt7b mRNA strongly decreased the secondary axis frequency (33% of double axis, n=157; Figure 4A), confirming the inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway activity by WWOX *in vivo*. When WWOX was overexpressed alone, we did not detect any effect on *Xenopus* development (Fig 4A), suggesting that WWOX is not involved in embryogenesis. This conclusion is supported by the fact that *WWOX*-null mice or *Drosophila* do not display any obvious embryonic defect (40-44). Then, we tested the inhibitory effect of WWOX on axis-inducing activity of BCL9-2. We found that BCL9-2 enhanced the axis-inducing activity of β -catenin and that WWOX inhibited this BCL9-2 effect (19.5% of double axis with β -catenin (n=95), 57% of double axis with BCL9-2 and β -catenin (n=101), 12.5% of double axis with β -catenin and WWOX (n=76) and 22% of double axis with β -catenin, BCL9-2 and WWOX (n=85), Figure 4B).

All together, these results indicate that WWOX inhibits the BCL9-2 function in the Wnt/ β -catenine pathway.

WWOX does not affect the BCL9-2 subcellular localization, and, the BCL9-2- β -catenin and BCL9-2-Pygopus associations - Then, we studied the molecular mechanism by which WWOX inhibits BCL9-2 transcriptional activity. WWOX sequesters various transcription factors in the cytoplasm thereby inhibiting their transcriptional activities (3). WWOX may therefore inhibit the transcriptional activity of BCL9-2 by sequestering it into the cytoplasm. To test this possibility, we examined the effect of WWOX on the subcellular localization of BCL9-2 by immunofluorescence experiments

in MCF-7 cells. GFP-WWOX expressed alone was distributed in the cytoplasm in distinct perinuclear particles and also diffusely in the nucleus; BCL9-2 expressed alone, or with GFP-WWOX, was observed exclusively in the nucleus (Fig. 5A). These results therefore invalidate our hypothesis that WWOX may sequester BCL9-2 into the cytoplasm. WWOX may affect BCL9-2 transcriptional activity by inhibiting its ability to interact with protein partners crucial to its function. To check this hypothesis, we determined the effect of WWOX on BCL9-2- β -catenin interaction by co-immunoprecipitation assays in 293 cells. As Hepatocyte growth factor (HGF) induces tyrosine phosphorylation of β -catenin and promotes interaction with BCL9-2 (12), after transfection, we cultivated the cells in the presence of HGF (Fig. 5B). We also determined the effect of WWOX on the BCL9-2-Pygopus association. We found that ectopic expression of WWOX did not affect the ability of BCL9-2 to associate with either β -catenin or Pygopus (Figure 5B and A).

HDAC3 binds WWOX and inhibits BCL9-2 transcriptional activity - Lef-1, Groucho/TLE and Dapper1 proteins were reported to act as repressors of the transcriptional activity of the Wnt/ β -catenin pathway mainly by binding with the co-repressors HDACs in the nucleus (45-50). These observations led us to address whether HDAC proteins might also contribute to the inhibitory effect of WWOX on the transcriptional activity of BCL9-2. First, we examined the ability of WWOX to interact with different HDAC proteins by using co-immunoprecipitation assay in 293 cells. We found that WWOX interacted strongly with the nuclear proteins HDAC1 and 3, but only very weakly, if at all, with HDAC5 (Figure 6A and data not shown). We also compared the capacity of WWOX wild type and WWOXY33R to form a complex with HDAC3. In contrary to BCL9-2, HDAC3 interacted with WWOXY33R and WWOX wild type with the same efficiency, suggesting that the binding domains of HDAC3 and BCL9-2 on WWOX are distinct (compare Figure 2D with 6B). We obtained similar results with HDAC1 (data not shown).

We then examined the effects of the HDAC proteins in the transcriptional activity of BCL9-2. We found that HDAC3, but not HDAC1, repressed strongly the transcriptional activity of β -catenin Δ GSK and the enhancement of β -catenin transcriptional activity by BCL9-2 by using

luciferase assays in MCF-7 cells (Fig. 6C and data not shown).

HDAC3 promotes the WWOX-BCL9-2 association and inhibits BCL9-2 activity independently of its deacetylase activity – Our previous results indicate that WWOX and HDAC3 inhibit BCL9-2 transcriptional activity (Fig. 3, 4 and 6A) and suggest that the binding domains of HDAC3 and BCL9-2 on WWOX are distinct. Therefore, WWOX might inhibit BCL9-2 activity by recruiting HDAC3 on BCL9-2. We tested this hypothesis by using co-immunoprecipitation experiments in 293 cells. We found that HDAC3 bound BCL9-2, however, surprisingly; WWOX did not promote the HDAC3-BCL9-2 association (Figure 7A). To explain our results we then thought that HDAC3 might recruit WWOX on BCL9-2. We effectively found that HDAC3 enhanced strongly the WWOX-BCL9-2 interaction (7B).

To determine the involvement of the deacetylase activity of HDAC3 in its effect on BCL9-2 activity, we studied an inactive HDAC3 mutant (Y298F) devoid of deacetylase activity (51). HDAC3Y298F reinforced the WWOX-BCL9-2 association (Fig. 8A). We also found that TSA, a general inhibitor of HDACs, did not impair the ability of WWOX to interact with BCL9-2 (data not shown). Furthermore, HDAC3Y298F inhibited strongly BCL9-2 transcriptional activity (Fig. 8B).

All together, our results robustly suggest that HDAC3 inhibits BCL9-2 transcriptional activity by recruiting WWOX on BCL9-2 independently of its deacetylase activity.

DISCUSSION

We previously defined WWOX as an inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway acting in the cytoplasm by preventing the nuclear import of Dvl-2 (21). In the present study, we validate the inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway activity by WWOX *in vivo* by using *Xenopus* secondary axis assay. We highlight that WWOX interacts with BCL9-2 and inhibits its function in the Wnt/ β -catenin pathway which is the amplification of the transcriptional activity of β -catenin. We determine that WWOX inhibits the BCL9-2 transcriptional activity by using luciferase assay and *Xenopus* secondary axis assay.

Furthermore, we provide experimental arguments suggesting that HDAC3 is a novel inhibitor of BCL9-2 acting by recruiting WWOX on BCL9-2 independently of its deacetylase activity.

Deacetylation of histone by HDACs tightens their interaction with DNA, resulting in a closed chromatin structure and the inhibition of gene transcription (50). HDACs also regulate the post-transcriptional acetylation status of many non-histone proteins such as transcription factors inducing modifications in protein stability, protein-protein interaction, and protein-DNA association. HDAC proteins are involved in the regulation of the Wnt/ β -catenin pathway. Different nuclear inhibitors of the Wnt/ β -catenin, such as Dapper1, Groucho, act by recruiting HDAC to the members of the Tcf/Lef family (48). We found that WWOX and HDAC3 inhibit BCL9-2 transcriptional activity and that HDAC3 promotes the WWOX-BCL9-2 association, suggesting that HDAC3 acts on BCL9-2 activity by recruiting WWOX on BCL9-2. The recruitment of WWOX to BCL9-2 by HDAC3 implies that the binding domains of HDAC3 and BCL9-2 on WWOX are distinct. Our finding suggesting that these binding domains are indeed different is thus consistent with our hypothesis (Fig. 6B). We found that TSA does not inhibit the ability of HDAC3 to reinforce the WWOX-BCL9-2 association (data not shown) and that the inactive mutant HDAC3Y298F, as HDAC3 wild type, inhibits BCL9-2 transcriptional activity and promotes the WWOX-BCL9-2 association. These results indicate that HDAC3 acts on BCL9-2 activity independently of its deacetylase activity (Fig. 8). To our knowledge, this is the first time it is described that a HDAC acts independently of its deacetylase activity. HDAC3 may act as a bridge facilitating the WWOX-BCL9-2 interaction. This implies that WWOX, HDAC3 and BCL9-2 form a trimeric complex.

WWOX associates with HDAC3 and BCL9-2 which are two nuclear proteins and our immunofluorescence experiments show that WWOX does not modify the subcellular localization of BCL9-2 (Fig. 5). These observations strongly suggest that WWOX interacts with BCL9-2 and HDAC3 in the nucleus compartment. Therefore, WWOX seems to inhibit the canonical Wnt/ β -catenin pathway through at least two different mechanisms, the sequestration of Dvl-2 in the cytoplasm (21) and the inhibition of BCL9-2 in the nucleus (the present study). Consistent with our hypothesis that WWOX can act in the cytoplasm and the

nucleus, several reports showed that WWOX modulates the activity of various proteins in both compartments. WWOX was shown to sequester p73 (23), AP2- γ (36), ErbB-4 (37) and c-Jun (35) in the cytoplasm thereby inhibiting their transcriptional activity. On the other hand, it has been reported that WWOX, which contains a nuclear localization signal (52), can also bind different proteins in the nucleus and repress their transcriptional activity. Notably, WWOX associates with RUNX2 (a crucial transcription regulator of osteoblast differentiation) when this protein is already bound to osteocalcin promoter, and suppresses its transcriptional activity (44). In the nucleus of injured neurons, murine WWOX physically interacts with CREB and inhibits its transcriptional activity (53). The molecular mechanisms by which WWOX modulates RUNX2 and CREB in the nucleus are unknown. HDAC3 interacts with, and represses the positive effect of, RUNX2 on osteocalcin promoter activity (54). Interestingly, in breast cancer MDA-MB-231 cells, restoration of *WWOX* expression inhibited *RunX2* and RUNX2 target genes related to metastasis, suggesting an important role of RUNX2 in breast tumor suppressor function of WWOX (44). The role of HDAC3 in the RUNX2-WWOX association should therefore be further investigated.

The molecular mechanism by which WWOX inhibits carcinogenesis remains largely elusive. Constitutive activation of the Wnt/ β -catenin signaling is implicated in various types of cancer such as breast and colon cancers (55-57). BCL9-2 expression is associated with histological high nuclear grade in breast cancers, suggesting that the upregulation of BCL9-2 may contribute to breast carcinogenesis by activating Wnt signaling (20). BCL9-2 expression is also aberrantly elevated in colorectal tumors and different observations strongly suggest that this upregulation contributes also to colon carcinogenesis by activating Wnt signaling (13,17,18). The inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway signaling by WWOX in the breast cancer cell lines raise therefore the possibility that lack of *WWOX* expression, frequently observed in breast cancer, might constitutively stimulate the Wnt/ β -catenin pathway and thereby enhance breast tumor growth. Moreover, a significantly better survival was observed among patients with colorectal tumor exhibiting high level of WWOX mRNA (58). The inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway signaling by WWOX could therefore also reduce the development of colorectal tumors. Further studies on the WWOX-Wnt/ β -catenin and WWOX-BCL9-2 interactions should lead to a better understanding of molecular mechanisms on a broad range of cancers.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. WWOX-BCL9-2 interaction. (A) WWOX interacts with BCL9-2 *in vivo*. 293 cells were transfected with myc-WWOX and 3xflag-BCL9-2 as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-flag antibody (IP flag). Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-flag (blot flag) and anti-myc (blot Myc) antibodies as indicated. (B) BCL9-2-endogenous WWOX association. 293 cells were transfected with 3xflag-BCL9-2 as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-flag antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-flag and anti-WWOX antibodies as indicated.

FIGURE 2 Role of the PPPY motifs and the WW1 domain in the BCL9-2-WWOX and Dvl-2-WWOX interactions. (A) Schematic representations of human WWOX, mouse BCL9-2 and mouse Dvl-2 used in this study. (B and C) Involvement of the PPPY motif of BCL9-2 and Dvl-2 in the BCL9-2-WWOX and Dvl-2-WWOX interactions. 293 cells were transfected with myc-WWOX in combination with (B) 3xflag-BCL9-2 and 3x-flag-BCL9-2Y561A, or, (C) 3xflag-Dvl-2 and 3x-flag-Dvl-2Y568A as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-flag antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-flag and anti-myc antibodies as indicated. (D and E) Involvement of the WW1 domain of WWOX in the BCL9-2-WWOX and Dvl-2-WWOX interactions. 293 cells were transfected with myc-WWOX and myc-WWOXY33R in combination with (D) 3xflag-BCL9-2 or (E) 3xflag-Dvl-2 as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-flag antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-flag and anti-myc antibodies as indicated

FIGURE 3. WWOX inhibits the BCL9-2 function in the Wnt/ β -catenin pathway. (A, B) Overexpression of WWOX inhibits the positive effect of BCL9-2 on the transcriptional activity of β -catenin. MCF-7 cells were transfected with pRL-TK Renilla and (A) TOPflash or FOPflash, or, (B) D1-Luc/D1 Δ -848pXP2 (D1-Luc) reporter constructs in combination with BCL9-2, β -catenin Δ GSK and WWOX as indicated. Twenty-four hours later, cell extracts were prepared and luciferase activities quantified. (C) Overexpression of WWOX inhibits the positive effect of BCL9-2 on the transcriptional activity of Wnt3a. 293 cells were transfected with pRL-TK Renilla and TOPflash reporter constructs in combination with BCL9-2 and WWOX as indicated. (D) Inhibition of endogenous WWOX expression enhances the transcriptional activity of BCL9-2. 293 cells were transfected with siRNA control or siRNA WWOX. Forty-eight hours later, cells were transfected once again with the siRNAs and also with pRL-TK Renilla and TOPflash reporter constructs in combination with BCL9-2 as indicated. For B and C, thirty hours later, cells were treated for 16 h with (crossed bar) or without (white bar) Wnt-3a-conditioned medium. Cell extracts were then prepared and luciferase activities quantified.

FIGURE 4. WWOX interferes with the Wnt7b and BCL9-2 activities *in vivo*. Early ventral activation of canonical Wnt signaling induces secondary dorsal axis formation *in vivo* in *Xenopus* embryos. This effect is efficiently obtained with Wnt7b (A) or β -catenin and BCL9-2 (B) and is strongly counteracted by WWOX co-injection. Typical embryo morphology is shown, with *in situ* hybridization with a *sox2* probe, labelling dorsal axis central nervous system (blue). A total of 2 independent experiments was performed and pooled for statistical analysis.

FIGURE 5. WWOX does not affect BCL9-2 subcellular localization, and, the BCL9-2- β -catenin and BCL9-2-Pygopus associations. (A, B, C) WWOX does not perturb the BCL9-2 subcellular localization. MCF-7 cells were transfected with (A) GFP-WWOX (Green), (B) 3xflag-BCL9-2 (red) or (C) GFP-WWOX and 3xflag-BCL9-2 as indicated. The cells were then immunostained with anti-flag antibody, followed by Texas Red-conjugated secondary antibody and the nucleus was stained with DAPI. The nucleus, GFP-WWOX, and 3xflag-BCL9-2 were visualized by fluorescence microscopy and the images were overlaid. BCL9-2 remained exclusively in the nucleus in the

presence or absent of GFP-WWOX. (D) WWOX does not inhibit the BCL9-2- β -catenin association. 293 cells were transfected with 3xflag-BCL9-2, HA- β -catenin and myc-WWOX as indicated. After transfection, cells were cultivated in the presence of HGF (40ng/ml) for 18 hours. Cell lysates were then immunoprecipitated with anti-flag antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-flag, anti-myc and anti-HA antibodies as indicated. (C) WWOX does not affect the BCL9-2-Pygopus association. 293 cells were transfected with 3xflag-BCL9-2, HA-Pygopus and myc-WWOX as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-HA antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-flag, anti-myc and anti-HA antibodies as indicated.

FIGURE 6. HDAC3 binds WWOX and inhibits BCL9-2 transcriptional activity. (A) WWOX-HDAC1 and 3 associations. 293 cells were transfected with myc-WWOX, flag-HDAC1 and flag-HDAC3 as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-flag antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-flag and anti-myc antibodies as indicated. (B) HDAC3, but not BCL9-2, associates with WWOX and WWOXY298F with the same efficiency. 293 cells were transfected with myc-WWOX, myc-WWOXY298F, 3xflag-BCL9-2 and flag-HDAC3 as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-flag antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-flag and anti-myc antibodies as indicated. (C) Inhibition of the BCL9-2 transcriptional activity by HDAC3. MCF-7 cells were transfected with pRL-TK Renilla and TOPflash or FOPflash reporter constructs in combination with BCL9-2, β -catenin Δ GSK and HDAC3 as indicated. Twenty-four hours later, cell extracts were prepared and luciferase activities quantified.

FIGURE 7. HDAC3 promotes WWOX-BCL9-2 association. (A) WWOX does not influence the HDAC3-BCL9-2 association. 293 cells were transfected with myc-WWOX, 3xflag-BCL9-2 and HA-HDAC3 as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-flag antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-flag, anti-HA and anti-myc antibodies as indicated. (B) HDAC3 enhances the ability of WWOX to interact with BCL9-2. 293 cells were transfected with myc-WWOX, 3xflag-BCL9-2 and HA-HDAC3 as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-flag antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-flag, anti-HA and anti-myc antibodies as indicated.

FIGURE 8. The inactive mutant HDAC3Y298F promotes the WWOX-BCL9-2 association and inhibits the BCL9-2 transcriptional activity. (A) Effect of HDAC3Y298F on ability of WWOX to interact with BCL9-2. 293 cells were transfected with myc-WWOX, 3xflag-BCL9-2 and HA-HDAC3Y298F as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-flag antibody. Immunoprecipitates and cell lysates were examined by immunoblotting with anti-flag, anti-HA and anti-myc antibodies as indicated. (B) Inhibition of the BCL9-2 transcriptional activity by HDAC3Y298F. MCF-7 cells were transfected with pRL-TK Renilla and TOPflash or FOPflash reporter constructs in combination with BCL9-2, β -catenin Δ Gsk and HDAC3Y298F as indicated. Twenty-four hours later, cell extracts were prepared and luciferase activities quantified.

FIGURE 1. WWOX-BCL9-2 interaction.

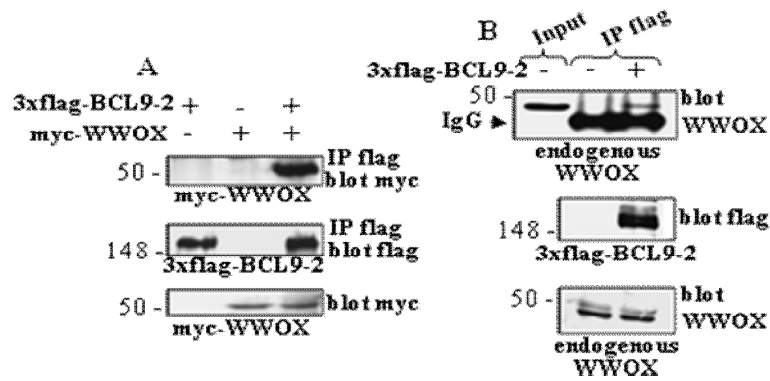


FIGURE 2 Role of the PPPY motifs and the WW1 domain in the BCL9-2-WWOX and Dvl-2-WWOX interactions.

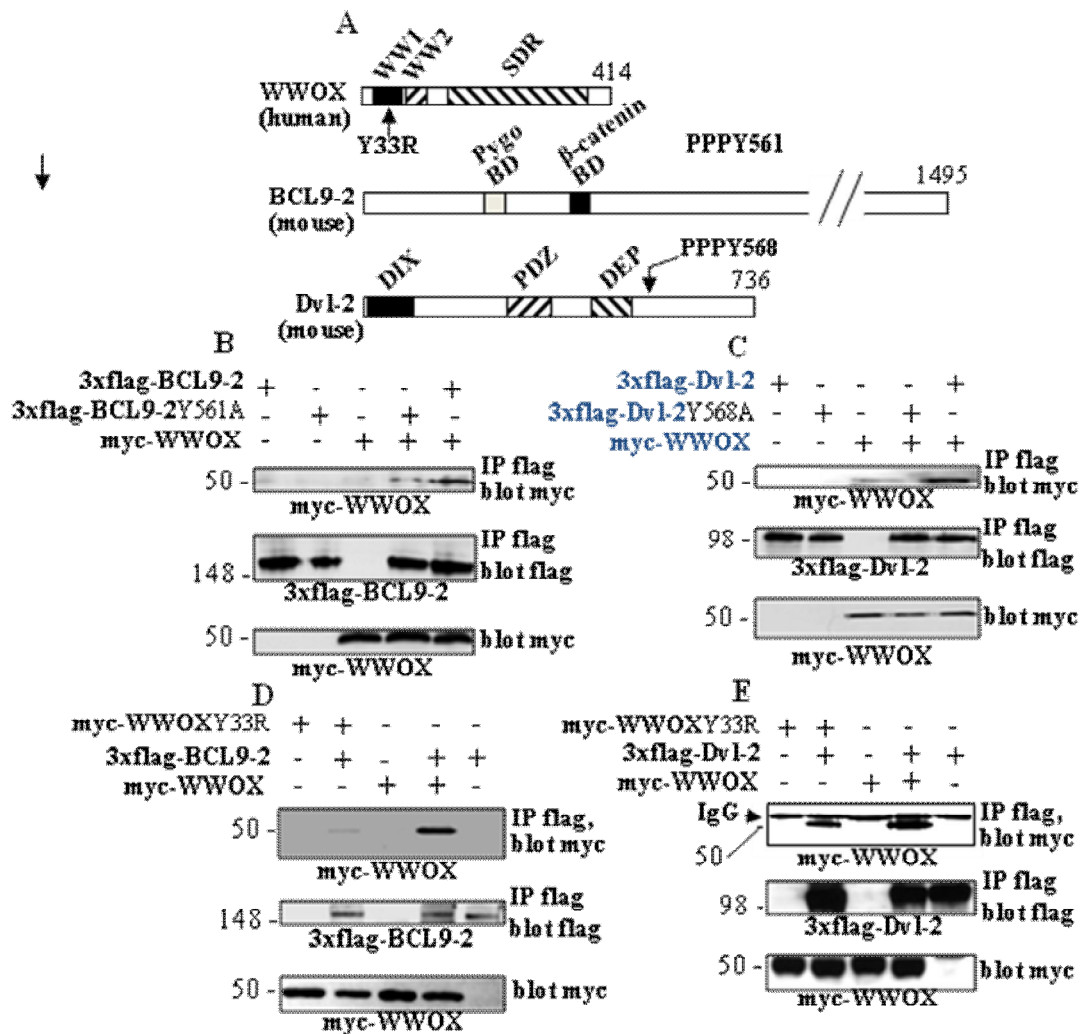


FIGURE 3. WWOX inhibits the BCL9-2 function in the Wnt/ β -catenin

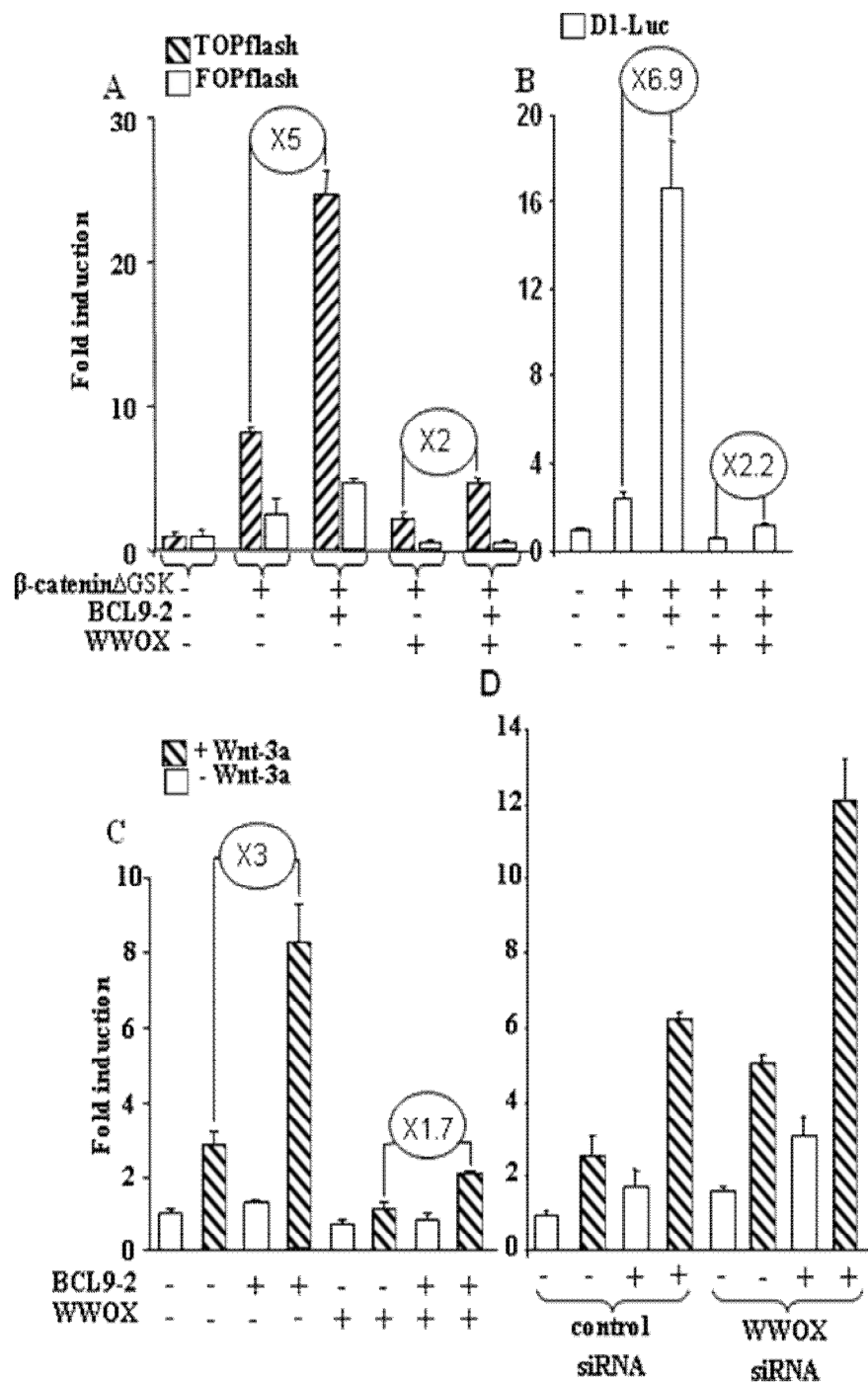


FIGURE 4. WWOX interferes with the Wnt7b and BCL9-2 activities *in vivo*.

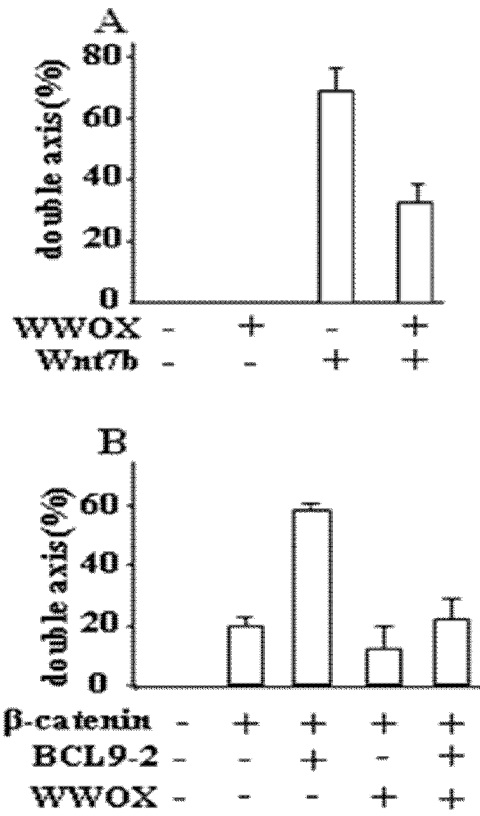


FIGURE 5. WWOX does not affect BCL9-2 subcellular localization, and, the BCL9-2- β -catenin and BCL9-2-Pygopus associations.

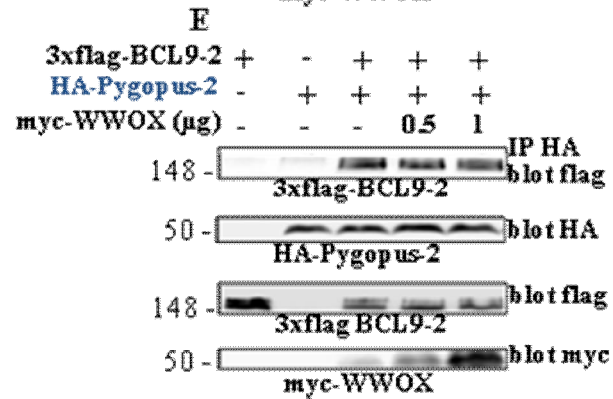
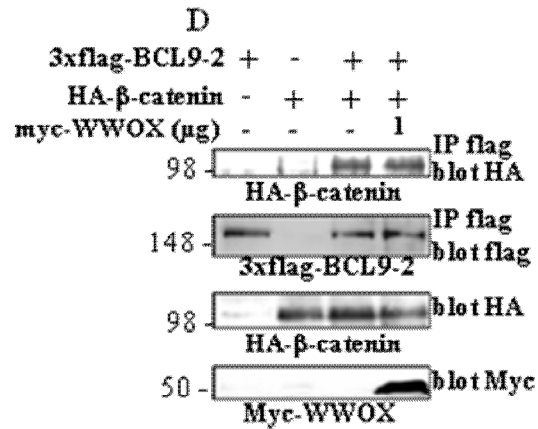
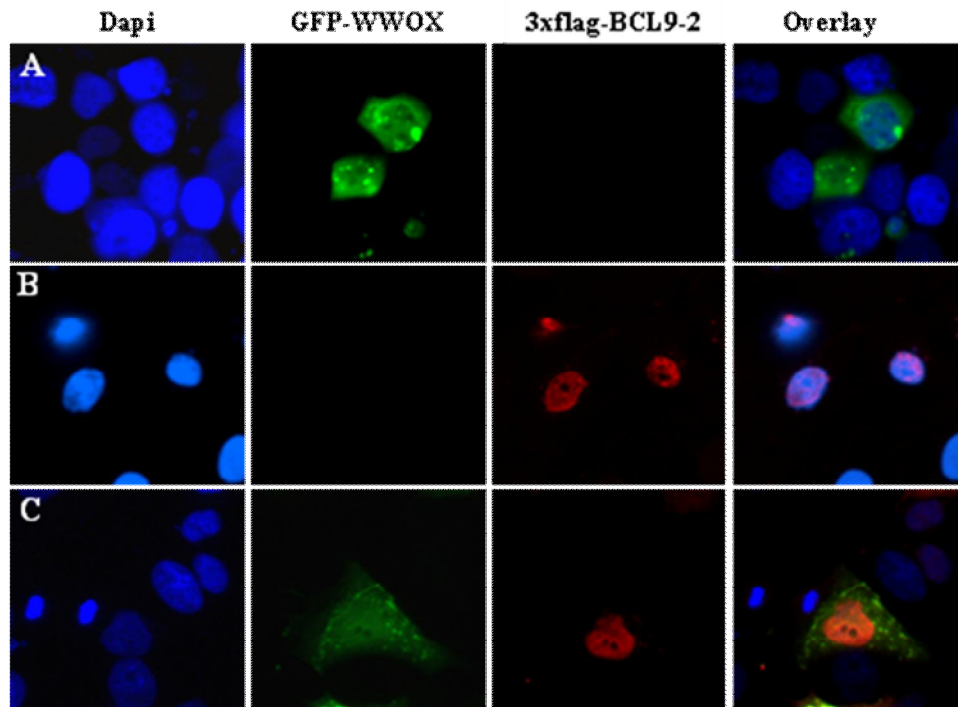


FIGURE 6. HDAC3 binds WWOX and inhibits BCL9-2 transcriptional activity

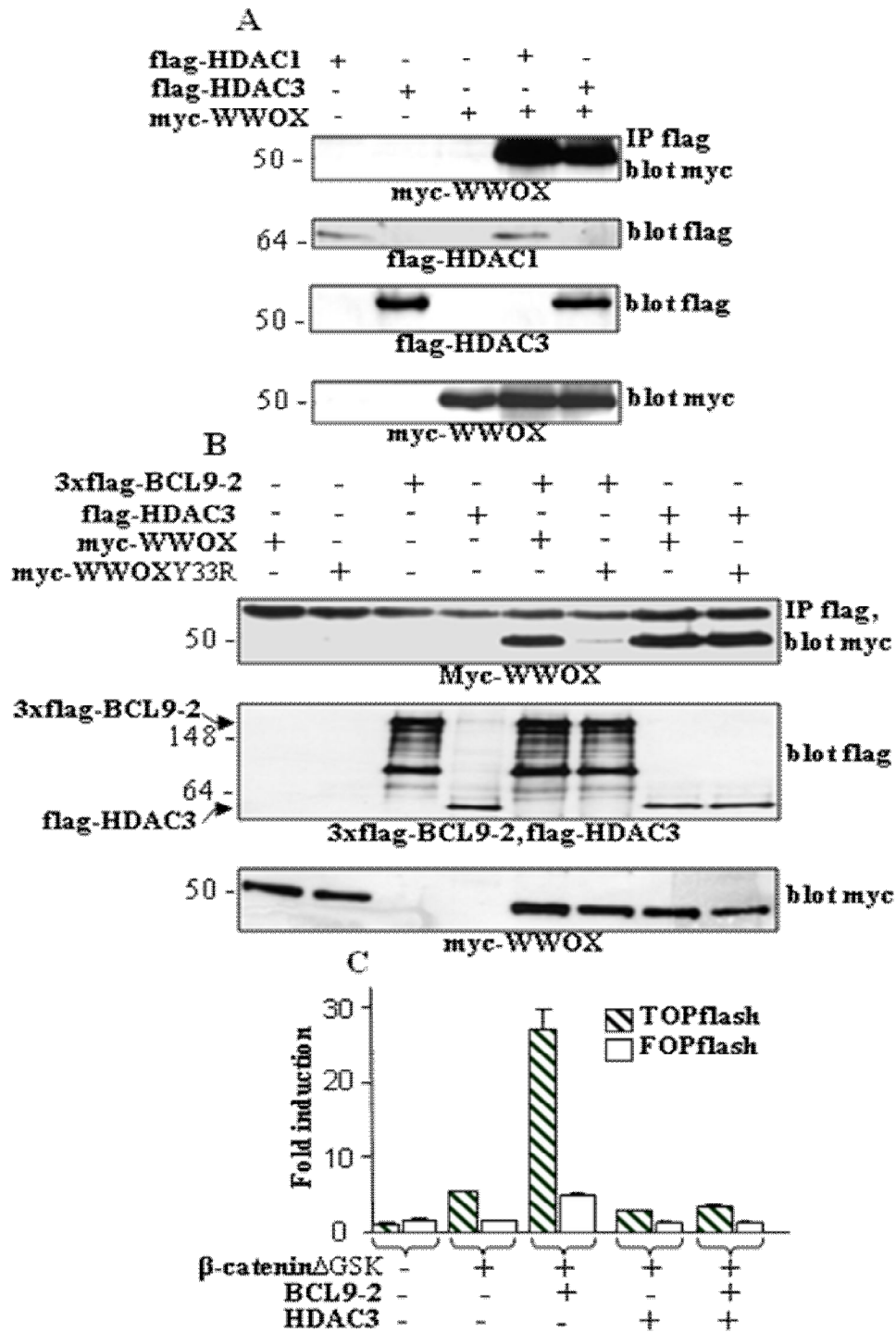


FIGURE 7. HDAC3 promotes WWOX-BCL9-2 association.

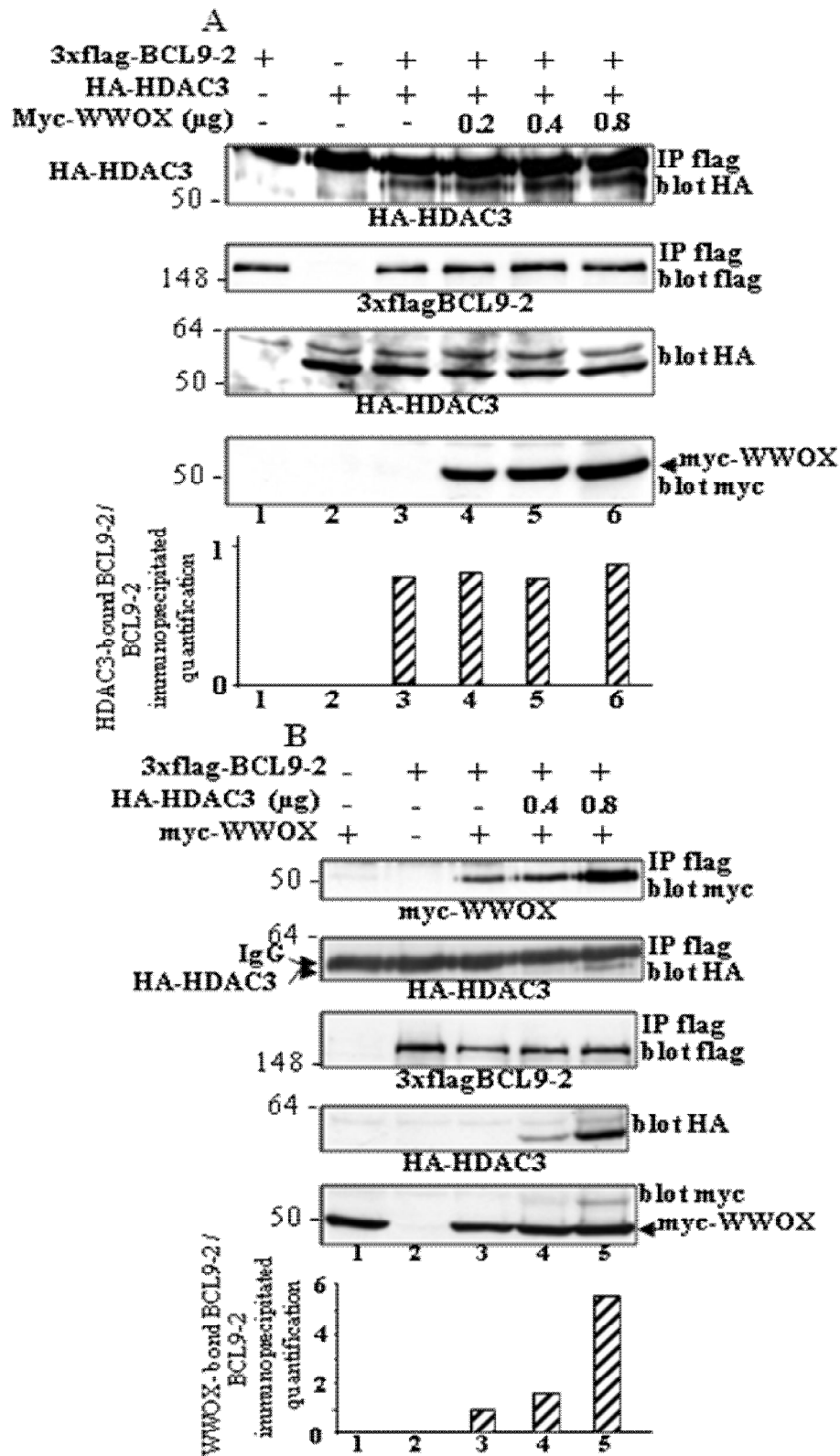
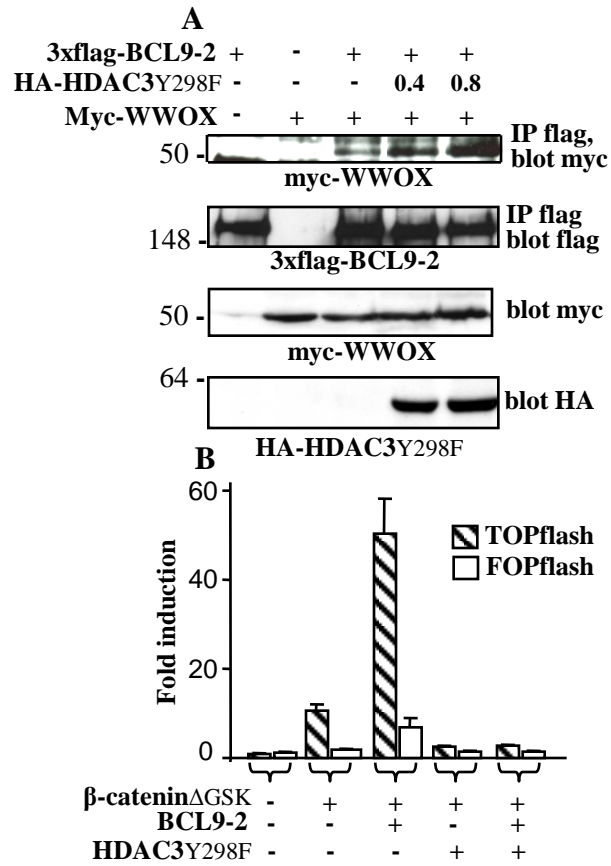


FIGURE 8. The inactive mutant HDAC3Y298F promotes the WWOX-BCL9-2 association and inhibits the BCL9-2 transcriptional activity.



REFERENCES

1. Aqeilan, R. I., and Croce, C. M. (2007) *J Cell Physiol* **212**, 307-310
2. Salah, Z., Aqeilan, R., and Huebner, K. (2010) *Future Oncol* **6**, 249-259
3. Del Mare, S., Salah, Z., and Aqeilan, R. I. (2009) *J Cell Biochem* **108**, 737-745
4. Aqeilan, R. I., Donati, V., Gaudio, E., Nicoloso, M. S., Sundvall, M., Korhonen, A., Lundin, J., Isola, J., Sudol, M., Joensuu, H., Croce, C. M., and Elenius, K. (2007) *Cancer Res* **67**, 9330-9336
5. Pluciennik, E., Kusinska, R., Potemski, P., Kubiak, R., Kordek, R., and Bednarek, A. K. (2006) *Eur J Surg Oncol* **32**, 153-157
6. Abdeen, S. K., Salah, Z., Maly, B., Smith, Y., Tufail, R., Abu-Odeh, M., Zanesi, N., Croce, C. M., Nawaz, Z., and Aqeilan, R. I. (2011) *Oncogene*
7. Clevers, H. (2006) *Cell* **127**, 469-480
8. MacDonald, B. T., Tamai, K., and He, X. (2009) *Dev Cell* **17**, 9-26
9. Alexander, C. M., Goel, S., Fakhraldeen, S. A., and Kim, S. (2012) *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**
10. Kikuchi, A., Kishida, S., and Yamamoto, H. (2006) *Exp Mol Med* **38**, 1-10
11. Wharton, K. A., Jr. (2003) *Dev Biol* **253**, 1-17
12. Brembeck, F. H., Schwarz-Romond, T., Bakkers, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M., and Birchmeier, W. (2004) *Genes Dev* **18**, 2225-2230
13. Adachi, S., Jigami, T., Yasui, T., Nakano, T., Ohwada, S., Omori, Y., Sugano, S., Ohkawara, B., Shibuya, H., Nakamura, T., and Akiyama, T. (2004) *Cancer Res* **64**, 8496-8501
14. Hoffmans, R., and Basler, K. (2007) *Mech Dev* **124**, 59-67
15. Chen, J., Luo, Q., Yuan, Y., Huang, X., Cai, W., Li, C., Wei, T., Zhang, L., Yang, M., Liu, Q., Ye, G., Dai, X., and Li, B. (2010) *Mol Cell Biol* **30**, 5621-5635
16. Andrews, P. G., He, Z., Popadiuk, C., and Kao, K. R. (2009) *Biochem J* **422**, 493-501
17. Brembeck, F. H., Wiese, M., Zatul, N., Grigoryan, T., Dai, Y., Fritzmann, J., and Birchmeier, W. (2011) *Gastroenterology*
18. Deka, J., Wiedemann, N., Anderle, P., Murphy-Seiler, F., Bultinck, J., Eyckerman, S., Stehle, J. C., Andre, S., Vilain, N., Zilian, O., Robine, S., Delorenzi, M., Basler, K., and Aguet, M. (2010) *Cancer Res* **70**, 6619-6628
19. Sakamoto, I., Ohwada, S., Toya, H., Togo, N., Kashiwabara, K., Oyama, T., Nakajima, T., Ito, H., Adachi, S., Jigami, T., and Akiyama, T. (2007) *Cancer Sci* **98**, 83-87
20. Toya, H., Oyama, T., Ohwada, S., Togo, N., Sakamoto, I., Horiguchi, J., Koibuchi, Y., Adachi, S., Jigami, T., Nakajima, T., and Akiyama, T. (2007) *Cancer Sci* **98**, 484-490
21. Bouteille, N., Driouch, K., Hage, P. E., Sin, S., Formstecher, E., Camonis, J., Lidereau, R., and Lallemand, F. (2009) *Oncogene* **28**, 2569-2580
22. Herber, B., Truss, M., Beato, M., and Muller, R. (1994) *Oncogene* **9**, 1295-1304
23. Aqeilan, R. I., Pekarsky, Y., Herrero, J. J., Palamarchuk, A., Letofsky, J., Druck, T., Trapasso, F., Han, S. Y., Melino, G., Huebner, K., and Croce, C. M. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4401-4406
24. Creighton, M. P., Roel, G., Eichhorn, P. J., Hijmans, E. M., Maurer, I., Destree, O., and Bernards, R. (2005) *Genes Dev* **19**, 376-386
25. Sabbah, M., Prunier, C., Ferrand, N., Megalophonos, V., Lambein, K., De Wever, O., Nazaret, N., Lachuer, J., Dumont, S., and Redeuilh, G. (2011) *Mol Cell Biol* **31**, 1459-1469
26. Baker, J. C., Beddington, R. S., and Harland, R. M. (1999) *Genes Dev* **13**, 3149-3159

27. Grammer, T. C., Liu, K. J., Mariani, F. V., and Harland, R. M. (2000) *Dev Biol* **228**, 197-210
28. Sive HL, G. R., Harland RM. (2000) *Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, N.Y.*
29. Weaver, C., and Kimelman, D. (2004) *Development* **131**, 3491-3499
30. Mizuseki, K., Kishi, M., Matsui, M., Nakanishi, S., and Sasai, Y. (1998) *Development* **125**, 579-587
31. Monsoro-Burq, A. H. (2007) *CSH Protoc* **2007**, pdb prot4809
32. Formstecher, E., Aresta, S., Collura, V., Hamburger, A., Meil, A., Trehin, A., Reverdy, C., Betin, V., Maire, S., Brun, C., Jacq, B., Arpin, M., Bellaiche, Y., Bellusci, S., Benaroch, P., Bornens, M., Chanut, R., Chavrier, P., Delattre, O., Doye, V., Fehon, R., Faye, G., Galli, T., Girault, J. A., Goud, B., de Gunzburg, J., Johannes, L., Junier, M. P., Mirouse, V., Mukherjee, A., Papadopoulo, D., Perez, F., Plessis, A., Rosse, C., Saule, S., Stoppa-Lyonnet, D., Vincent, A., White, M., Legrain, P., Wojcik, J., Camonis, J., and Daviet, L. (2005) *Genome Res* **15**, 376-384
33. Lallemand, F., Seo, S. R., Ferrand, N., Pessah, M., L'Hoste, S., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Camonis, J., and Atfi, A. (2005) *J Biol Chem* **280**, 27645-27653
34. Ludes-Meyers, J. H., Kil, H., Bednarek, A. K., Drake, J., Bedford, M. T., and Aldaz, C. M. (2004) *Oncogene* **23**, 5049-5055
35. Gaudio, E., Palamarchuk, A., Palumbo, T., Trapasso, F., Pekarsky, Y., Croce, C. M., and Aqeilan, R. I. (2006) *Cancer Res* **66**, 11585-11589
36. Aqeilan, R. I., Palamarchuk, A., Weigel, R. J., Herrero, J. J., Pekarsky, Y., and Croce, C. M. (2004) *Cancer Res* **64**, 8256-8261
37. Aqeilan, R. I., Donati, V., Palamarchuk, A., Trapasso, F., Kaou, M., Pekarsky, Y., Sudol, M., and Croce, C. M. (2005) *Cancer Res* **65**, 6764-6772
38. Herber, B., Truss, M., Beato, M., and Muller, R. (1994) *Oncogene* **9**, 2105-2107
39. Kennedy, M. W., Cha, S. W., Tadjuidje, E., Andrews, P. G., Heasman, J., and Kao, K. R. (2010) *Dev Dyn* **239**, 271-283
40. Aqeilan, R. I., Hassan, M. Q., de Bruin, A., Hagan, J. P., Volinia, S., Palumbo, T., Hussain, S., Lee, S. H., Gaur, T., Stein, G. S., Lian, J. B., and Croce, C. M. (2008) *J Biol Chem*
41. Aqeilan, R. I., Trapasso, F., Hussain, S., Costinean, S., Marshall, D., Pekarsky, Y., Hagan, J. P., Zanasi, N., Kaou, M., Stein, G. S., Lian, J. B., and Croce, C. M. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3949-3954
42. Ludes-Meyers, J. H., Kil, H., Parker-Thornburg, J., Kusewitt, D. F., Bedford, M. T., and Aldaz, C. M. (2009) *PLoS One* **4**, e7775
43. O'Keefe, L. V., Liu, Y., Perkins, A., Dayan, S., Saint, R., and Richards, R. I. (2005) *Oncogene* **24**, 6590-6596
44. Aqeilan, R. I., Hassan, M. Q., de Bruin, A., Hagan, J. P., Volinia, S., Palumbo, T., Hussain, S., Lee, S. H., Gaur, T., Stein, G. S., Lian, J. B., and Croce, C. M. (2008) *J Biol Chem* **283**, 21629-21639
45. Billin, A. N., Thirlwell, H., and Ayer, D. E. (2000) *Mol Cell Biol* **20**, 6882-6890
46. Levanon, D., Goldstein, R. E., Bernstein, Y., Tang, H., Goldenberg, D., Stifani, S., Paroush, Z., and Groner, Y. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11590-11595
47. Brantjes, H., Roose, J., van De Wetering, M., and Clevers, H. (2001) *Nucleic Acids Res* **29**, 1410-1419
48. Gao, X., Wen, J., Zhang, L., Li, X., Ning, Y., Meng, A., and Chen, Y. G. (2008) *J Biol Chem* **283**, 35679-35688
49. Chen, G., Fernandez, J., Mische, S., and Courey, A. J. (1999) *Genes Dev* **13**, 2218-2230

50. Kim, H. J., and Bae, S. C. (2011) *Am J Transl Res* **3**, 166-179
51. Wu, M. Z., Tsai, Y. P., Yang, M. H., Huang, C. H., Chang, S. Y., Chang, C. C., Teng, S. C., and Wu, K. J. (2011) *Mol Cell* **43**, 811-822
52. Chang, N. S., Pratt, N., Heath, J., Schultz, L., Sleve, D., Carey, G. B., and Zevotek, N. (2001) *J Biol Chem* **276**, 3361-3370
53. Li, M. Y., Lai, F. J., Hsu, L. J., Lo, C. P., Cheng, C. L., Lin, S. R., Lee, M. H., Chang, J. Y., Subhan, D., Tsai, M. S., Sze, C. I., Pugazhenthii, S., Chang, N. S., and Chen, S. T. (2009) *PLoS One* **4**, e7820
54. Schroeder, T. M., Kahler, R. A., Li, X., and Westendorf, J. J. (2004) *J Biol Chem* **279**, 41998-42007
55. Lin, S. Y., Xia, W., Wang, J. C., Kwong, K. Y., Spohn, B., Wen, Y., Pestell, R. G., and Hung, M. C. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4262-4266
56. Brown, A. M. (2001) *Breast Cancer Res* **3**, 351-355
57. Polakis, P. (2000) *Genes Dev* **14**, 1837-1851
58. Zelazowski, M. J., Pluciennik, E., Pasz-Walczak, G., Potemski, P., Kordek, R., and Bednarek, A. K. (2011) *Tumour Biol*

Acknowledgements-We thank all the Hybrigenics staff for their contribution. We are grateful to FH Brembeck, RI Aqeilan, S Zijie, R Bernards, K Basler, A Atfi, M-Z Wu and E Seto for plasmids; and S Takada for mouse fibroblast L cells producing Wnt-3a and L cells stably transfected with the pGKneo plasmid.

FOOTNOTES

Perla El Hage was supported by grant from l'Association de la Recherche sur le Cancer (ARC) and A-H Monsoro-Burq was supported by grants from Ligue contre le Cancer and CNRS (ATIP program). This work was supported by the Association d'Aide à la Recherche Cancérologique de Saint-Cloud (ARCS). This work was also supported by a GenHomme Network Grant (02490-6088) to Hybrigenics and Institut Curie.

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

En parallèle de notre étude portant sur les mécanismes moléculaires par lesquels WWOX inhibe la voie Wnt/ β -caténine, nous avons aussi étudié le rôle des nouveaux partenaires de WWOX que nous avons mis en évidence dans la carcinogenèse mammaire. Pour ce faire, nous avons réalisé des études d'expression.

(1). Etude de l'expression des partenaires de WWOX par RT-PCR dans 456 échantillons de tumeurs mammaires.

Objectif :

Dans notre perspective d'étude du rôle des partenaires moléculaires de WWOX dans la cancérogenèse mammaire, nous avons analysé par la technique de RT-PCR l'expression de WWOX, BCL9-2, Dvl-2 et BCL9 dans une série de 456 tumeurs.

Dans notre étude nous avons inclus BCL9 car nous avons mis en évidence par coimmunoprécipitation l'interaction WWOX-BCL9. En outre, nous avons trouvé que WWOX inhibe l'activité transcriptionnelle de BCL9.

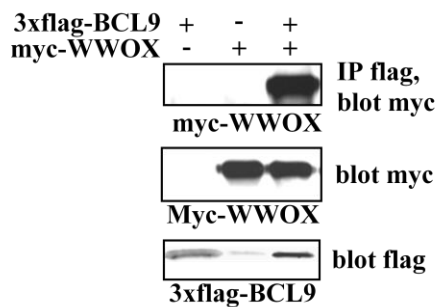


Figure 13 : Association WWOX-BCL9.

Des cellules 293 sont transfectées par des vecteurs d'expression 3xflag-BCL9 et myc-WWOX comme indiqué. 24 heures après, les extraits cellulaires sont immunoprécipités par un anticorps anti-flag. Les immunoprécipités et les extraits cellulaires sont analysés par western blot avec les anticorps anti-flag et anti-myc comme indiqué.

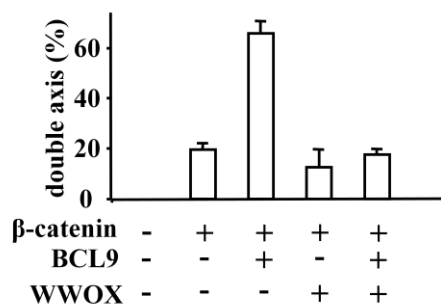


Figure 14 : Effet de WWOX sur l'induction d'embryon possédant un double axe par BCL9.

Matériels et méthodes de la RT-PCR :

1. Patients et échantillons :

Nous avons analysé 456 échantillons de biopsies tumorales recueillies chez des patientes traitées à l'Institut Curie, Hôpital René Huguenin, Saint-Cloud, France. Ces échantillons tumoraux contiennent plus que 70% de cellules tumorales, ce qui est convenable pour l'analyse.

Les échantillons tumoraux ont été prélevés au moment de la chirurgie, avant tout traitement adjuvant et radiothérapie, puis congelés et conservés dans l'azote liquide jusqu'à l'extraction des ARN totaux. Chaque échantillon correspond a une patiente ayant un dossier médical sur lequel est précisé l'âge de la patiente, le grade de la tumeur et les statuts ER , PR, et HER2.

Le statut ER et PR est analysé en routine sur les tumeurs congelés à l'aide de « binding ligand assay» depuis 1988. Cette technique a utilisé les enzymes immunologiques (ER-EIA Monoclonal, PgR-EIA Monoclonal, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) entre 1988 et 2000. Et à partir de l'an 2000, les analyses immunohistochimiques se font sur des sections paraffines. Le statut de HER2 est aussi analysé en routine par immunohistochimie.

2. Extraction des ARN.

L'extraction de l'ARN total est basée sur la technique utilisant le thiocyanate de guanidine, le phénol et le chloroforme (Technique RNABle®, Eurobio). Deux mL de RNABle® sont ajoutés aux cellules (broyat de tumeurs), suivi de 200 µL de chloroforme. Après agitation manuelle puis centrifugation (15 min, 4°C, 15000g), la phase supérieure, contenant l'ARN total, est récupérée. Cet ARN total est ensuite précipité par ajout volume à volume d'isopropanol durant 1 heure à 4°C. Le surnageant est éliminé après centrifugation (15 min,

4°C, 15000g). Le culot d'ARN total est rincé et décollé avec 1 mL d'éthanol 70% (4°C) qui est éliminé après centrifugation (15 min, 4°C, 15000g). Après séchage du culot, celui-ci est resuspendu dans de l'eau dépourvue de RNase (le volume d'eau ajouté est fonction de la taille du culot soit 10 à 20 µL). La solution obtenue est alors dosée par spectrophotométrie (Nanodrop® ND-1000). Cette technique permet également de vérifier la qualité de l'ARN par les rapports suivants : ARN/protéines : 260 nm/280nm >1,7 ; ARN/phénol : 260nm/230nm >1.7. La solution d'ARN total est alors conservée à -80°C.

3. Synthèse de l'ADN complémentaire

La réaction de Reverse-Transcription est réalisée dans un thermocycleur de type GeneAmp PCR system 9700® (Perkin-ElmerAppliedBiosystems, Foster City, CA), avec le kit Superscript™ II RNaseH-Reverse Transcriptase (Invitrogen®, Cergy pontoise, France), à partir de 1 µg d'ARN total, sous un volume final de 20 µL. La composition du mélange réactionnel est la suivante : tampon RT 1X, DTT 10mM, dNTP 0.5 mM, randomhexamers (nucléotides) 3µg, Rnasin (RNase inhibiteur) 20U, reverse transcriptase 100U. La réaction se déroule en trois phases : 10 minutes à 20°C, 30 minutes à 42°C, et 5 minutes à 99°C pour inactiver la réverse transcriptase. Ces étapes permettent l'hybridation et la synthèse d'ADNc par adjonction de nucléotides complémentaires au brin d'ARN sous l'action de la reverse transcriptase. La solution d'ADNc obtenue (20µL) est ensuite diluée (1/25 à 1/400), pour la réaction de PCR, avec de l'eau stérile.

4. RT-PCR quantitative en temps réel

La quantification des taux de transcrits des gènes cibles a été réalisée par PCR en temps réel (ABI Prism™ 7900 SequenceDetection System, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA).

Les réactions d'amplification ont été réalisées à l'aide du kit Power SYBR® Green PCR Master Mix® (Perkin-ElmerAppliedBiosystems, Foster City, CA) à partir de 2,5 ng d'ADNc, sous un volume final de 15 µl. La composition du mélange réactionnel est la suivante : tampon Power SYBR® Green 1X, MgCl₂ 5mM, dNTPs, amorces avant et arrière 300nM, AmpliTaq Gold®. La réaction d'amplification comporte les étapes suivantes : 10 minutes à 95°C, 50 cycles d'amplification (95°C/15s, 65°C/1min.). Pendant lesquels on aura d'abord dénaturation des ADNc, puis hybridation des amorces et élongation. Toutes les réactions de PCR ont été faites en duplicata.

La quantité de transcrits d'un gène cible est déduite du Ct «*Cycle threshold*» qui correspond au nombre de cycles de PCR nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence significatif.

Pour prendre en compte la quantité et la qualité des ARN totaux et l'efficacité de l'étape de reverse transcription, nous avons évalué le niveau d'expression d'un gène de référence ubiquitaire: *TBP*, codant pour la *TATA box-binding protein* du complexe TFIID. Il s'agit d'un contrôle endogène dont l'expression reste stable au cours de la carcinogenèse mammaire. Les échantillons ont tous été normalisés par rapport à leur contenu en *TBP*.

Le niveau de transcrits du gène cible est rapporté à celui du gène de référence, selon la formule :

$$N_{\text{cible}} = 2^{(\Delta\text{Ct échantillon})}$$

(Où la valeur du ΔCt de l'échantillon est obtenue en soustrayant la valeur du Ct du gène cible à la valeur du Ct du gène de référence *TBP*)

Pour chaque gène, le taux de transcrits de chaque échantillon, est ensuite normalisé à la médiane des taux de transcrits des dix échantillons de tissus mammaires normaux.

5. Choix des amorces nucléotidiques et des sondes.

Avant de choisir les amorces nucléotidiques de chacun de ces gènes, une analyse complète *in silico* des séquences d'ADNc a été réalisée à partir des bases de données de séquences nucléotidiques et en utilisant le logiciel d'alignement BLASTN:

- Analyse des ESTs (dbEST) permettant d'avoir une information sur le niveau d'expression des gènes cibles et des tissus dans lesquels ils sont exprimés.
- Recherche d'éventuels rétroseudogènes (Human G+T)
- Recherche de similarités avec d'autres membres de la même famille afin d'avoir une totale spécificité (nr)
- Recherche d'éventuels épissages alternatifs.

Deux couples d'amorces oligonucléotidiques ont été choisis pour chaque gène à l'aide du logiciel Oligo6.0® (National Biosciences, Plymouth, MN). Les amorces nucléotidiques ont été placées dans des régions codantes communes entre tous les variants du gène étudié. Afin d'éviter toute amplification d'ADN génomique contaminant l'ARN, l'une des deux amorces chevauche systématiquement deux exons. D'une manière générale, les produits de PCR ont une taille comprise entre 70 et 120 nucléotides avec des amorces d'une taille entre 19 et 26 nucléotides.

Les amorces ont ensuite été testées afin de sélectionner le couple le plus performant. Cette sélection a été faite en utilisant:

- un pool positif d'ADNc (RT positive) provenant d'ARN extrait à partir d'un mélange de tissus (cerveau, testicule, placenta, sein normal, sein tumoral)
- un pool négatif ne contenant aucun ADNc (RT négative)
- un pool négatif chargé en ADN génomique permettant de vérifier l'absence de fixation des amorces sur l'ADN génomique
- un « blanc » ou NTC (*Non Template Control*) permettant de contrôler l'absence de formation de dimères d'amorces.

Enfin, une électrophorèse nous a permis de vérifier la spécificité des produits de PCR. Les produits des réactions avec des pools positifs pour les couples choisis ont été testés en utilisant un gel d'agarose de 2% avec le marqueur de taille correspondant, la mise en évidence d'une seule bande de migration à la bonne taille pour chaque réaction confirme la spécificité de l'amplification PCR. Les gènes cibles testés dans cette étude sont BCL9, BCL9-2 et Dvl-2. Les séquences nucléotidiques des sondes d'hybridation et des amorces sont montrées dans le tableau 5. Afin d'éviter les amplifications par contamination génomique d'ADN, une des deux amorces a été placée dans un exon différent.

Tableau 5 : Séquences des amorces utilisés dans les q-PCR.

Amorce	Séquence
BCL9-Upper	CAGGAAACACACAGAGTAGCCCTAA
BCL9-Lower	GGTTTCCAGATGGGGACATCA
DVL2-Upper	AGTGGTGGCTGTGAGAGCTACCTA
DVL-2-Lower	CACTGGAGCCATCGTTGTCATT
BCL9-2-Upper	AGCCTCCCTCGCAGTTCGTAT
BCL9-2-Lower	ACTGCCTCTGCAGCCGTGTT

Résultats :

Les résultats de la RT-PCR effectués sur nos 456 biopsies tumeurs montrent une surexpression d'un facteur supérieur à 3 de *BCL9* dans 22% des tumeurs mammaire par rapport aux cellules de sein normales mais pas de surexpression de *BCL9-2* ni de *Dvl-2*. Nous avons trouvé une corrélation positive entre l'expression de *BCL9* et celle de *WWOX* ($p=0.0000045$). Suite à cela, nous avons regardé les caractéristiques des tumeurs présentant une surexpression de *BCL9* d'un facteur supérieur ou égal à 3. Les tumeurs surexprimant *BCL9* d'un facteur supérieur à 3 sont en majorité des tumeurs de grade histologique I et qui expriment les récepteurs hormonaux ER α et PR. Ce sont des tumeurs de bon pronostic et hormono-sensibles. *BCL9* pourrait donc être un marqueur de bon pronostic.

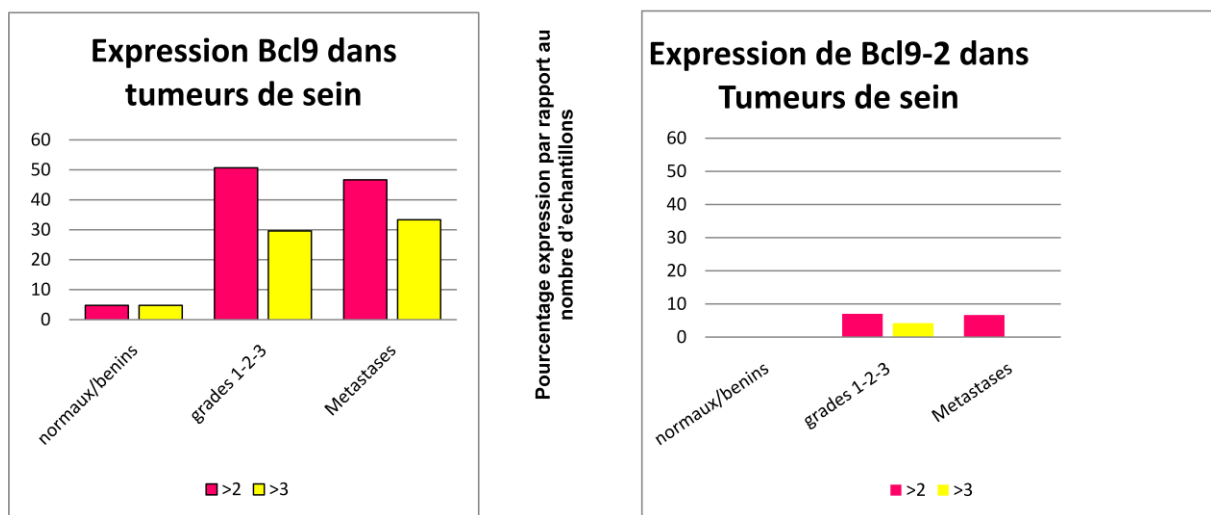


Figure 15 : pourcentage des tumeurs présentant une surexpression de *BCL9* et *BCL9-2* par rapport aux normaux

Tableau 6 : Caractéristiques des 456 cancers mammaires relatifs à la surexpression de BCL9.

	Population totale (%)	Nombre des patientes (%)		<i>p</i> ^a
		expression BCL9 mRNA ≤3 par rapport à la normale	expression BCL9 mRNA >3 par rapport à la normale	
<i>Total</i>	456 (100.0)	355 (77.9)	101 (22.1)	
<i>Age</i>				
≤50	98 (21.5)	80 (22.5)	18 (17.8)	0.31 (NS)
>50	358 (78.5)	275 (77.5)	83 (82.2)	
<i>SBR grade histologique</i> ^{b,c}				
I	58 (13)	34 (9.7)	24 (24.5)	0.00011
II	229 (51.2)	177 (50.7)	52 (53.1)	
III	160 (35.8)	138 (39.5)	22 (22.4)	
	9	6	3	
<i>Statut des ganglions lymphatiques</i> ^d				
0	119 (26.1)	92 (26.0)	27 (26.7)	0.72 (NS)
1-3	237 (52.1)	182 (51.4)	55 (54.5)	
>3	99 (21.8)	80 (22.6)	19 (18.8)	
	1	1		
<i>Taille macroscopique de la tumeur</i> ^e				
≤25mm	223 (49.8)	171 (49.0)	52 (52.5)	0.54 (NS)
>25mm	225 (50.2)	178 (51.0)	47 (47.5)	
	8	6	2	
<i>Statut ERα</i>				
Négatif	118 (25.9)	105 (29.6)	13 (12.9)	0.00072
Positif	338 (74.1)	250 (70.4)	88 (87.1)	
<i>Status PR</i>				
Négatif	194 (42.5)	166 (46.8)	28 (27.7)	0.00064
Positive	262 (57.5)	189 (53.2)	73 (72.3)	
<i>Status ERBB2</i>				
Négatif	357 (78.3)	281 (79.2)	76 (75.2)	0.40 (NS)
Positif	99 (21.7)	74 (20.8)	25 (24.8)	
<i>Sous-type moléculaire</i>				
RH- ERBB2-	68 (14.9)	61 (17.2)	7 (6.9)	0.0012
RH- ERBB2+	45 (9.9)	40 (11.3)	5 (5.0)	
RH+ ERBB2-	289 (63.4)	220 (62.0)	69 (68.3)	
RH+ ERBB2+	54 (11.8)	34 (9.6)	20 (19.8)	

<i>Status de la mutation</i>				
<i>PIK3CA</i>				
wild type	307 (67.3)	248 (69.9)	59 (58.4)	0.031
muté	149 (32.7)	107 (30.1)	42 (41.6)	
<i>Expression de l'ARNm KI67</i>				
médiane	12.5 (0.80-117)	12.7 (0.80-117)	11.0 (1.88-94.5)	0.49 (NS)
<i>Expression de l'ARNm EGFR</i>				
médiane	0.22 (0.00-106)	0.22 (0.00-78.1)	01 (0.02-106)	0.41 (NS)
<i>Rechute</i>				
No	287 (62.9)	222 (62.5)	65 (64.4)	0.74 (NS)
Yes	169 (37.1)	133 (37.5)	36 (35.6)	

a) χ^2 Test

b) Scarff Bloom Richardson classification.

c) Information available for 447 patients.

d) Information available for 455 patients.

e) Information available for 448 patients.

f) Kruskal Wallis's H Test

Log-rank test seuil à 3 : p = 0.90 (NS)

Log-rank test cut-off optimal : p = 0.082 (NS)

(2) Expression de BCL9-2 et BCL9 dans les lignées cancéreuses mammaires.

Suite à cette analyse nous avons étudié l'expression de *BCL9-2* et *BCL9* dans différentes lignées mammaires

Matériel et méthode :

1. Culture cellulaire :

Les différentes lignées cellulaires mammaires utilisées pour ce test sont obtenus de ATCC « American Tissue Type Culture » et sont testés en routine pour l'absence de mycoplasme.

Les cellules décongelées sont mises en culture dans des boîtes de pétri en présence d'un milieu adapté (MEM ou DMEM avec Rouge de phénol et supplémenté à 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotiques PSN). Les cellules sont maintenues en culture dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère saturée à 5% de CO₂ et 95% d'humidité relative.

2. Lyse des cellules

Les boîtes de cultures sont récupérées quand les cellules atteignent 80% de confluence. On effectue un lavage PBS et à partir de ce moment, la manipulation se fait à 4°C. Nous rajoutons 1mL de tampon de lyse TNMG additionné d'anti-protéases et anti-phosphatase,

orthovanadate, aprotinine et PMSF et nous récupérons les cellules et nous les laissons incuber 15 minutes le temps d'avoir une lyse optimale. Suite à cela, les lysats cellulaires sont centrifugés (14000g, 15 minutes, 4°C). Le surnageant contenant les protéines est récolté.

3. Dosage des protéines.

Le dosage des protéines se fait avec un kit spécifique (biorad) dont les réactifs agissent selon le principe d'un test bradford.

4. dénaturation

La dénaturation des protéines se fait grâce au « sample buffer » contenant du SDS qui sert à les charger négativement et provoque leur dénaturation à 95°C pendant 5 minutes.

5. migration sur gel SDS-Page et transfert

La même quantité protéique de chaque échantillon est déposée dans un puit différent d'un gel SDS-Page dénaturant à 10% d'acrylamide. La migration se fait à 150 volts en présence du tampon de migration. Ensuite le transfert sur membrane de nitrocellulose (Hybond™ C extra, Amersham, Biosciences) se fait dans des cassettes appropriées à froid pendant 1 heure à 100 volts en présence d'un tampon de transfert (50mM Tris Base, 40mM Glycine)

6. visualisation des protéines sur la membrane a l'aide du rouge ponceau.

Après avoir récupéré la membrane, nous l'avons incubé pendant quelques minutes en rouge ponceau puis lavée au PBS1% pour avoir une idée sur l'équivalence de la quantité de protéines déposées.

7. Blocage de la membrane

Le blocage de la membrane prévient les liaisons non-spécifiques des anticorps. Pour cela, nous incubons la membrane dans du PBS-Tween contenant 5% de lait écrémé pendant 15 minutes puis nous effectuons plusieurs lavages avant d'ajouter les anticorps.

8. Incubation des anticorps.

Une incubation « overnight » de la membrane en présence des anticorps spécifique anti-BCL9 (monoclonal de souris, Abcam, ab54833) au 1:100 et anti-BCL9-2 (polyclonal de lapin, Eurogentec) au 1:1000 est suivie de quelques lavages puis d'incubation pendant 30 minutes d'anticorps secondaire couplé à l'HRP.

9. Développement

Nous utilisons le kit ECL+. La révélation se fait en chambre noire avec des films manuels et des développements traditionnels dans des bains de révélateurs et de fixateurs .

Résultats

Les extraits mammaires sont déposés de gauche à droite par rapport à leur agressivité (les moins agressives à gauche). D'une manière surprenante, les protéines BCL9 et BCL9-2 ont le même profil de production, elles sont produites d'avantage dans les lignées mammaires agressives, alors que nous avons trouvé que seul *BCL9* est surexprimé dans les tumeurs de sein.

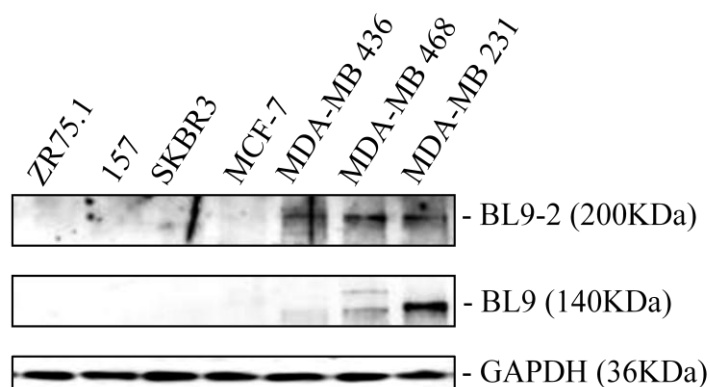


Figure 16 : Expression *BCL9* et *BCL9-2* dans les lignées mammaires

(3). Etude du profil génétique de *BCL9* par CGH array.

La surexpression de *BCL9* d'un facteur 3 par rapport aux cellules normales de sein a été retrouvée dans 22% des tumeurs mammaires. Afin de trouver les causes de cette surexpression, nous avons analysé les résultats CGH array effectués sur une série de 45 tumeurs. 8 tumeurs de la série choisie présentent une surexpression de *BCL9* d'un facteur supérieur à 3 et 21 tumeurs sur les 45 présentent une surexpression d'un facteur supérieur à 2.

Matériel et méthode

Nous avons utilisé des puces pangénomiques (44 000 sondes).

A partir d'ADN extrait, nous avons procédé à l'hybridation génomique comparée (Comparative Genomic Hybridization, CGH) sur des puces « Human Genom CGH Microarray 44B (p/n G4410B) » d'Agilent ©.

1. Principe de la CGH sur puces à ADN

On réalise une hybridation compétitive entre l'ADN d'un échantillon avec celui d'un contrôle. Cette hybridation est réalisée sur une micropuce contenant plusieurs milliers de sondes où se fixeront les ADNs patient et contrôle, chacun marqué par un fluorochrome

différent. L'intensité de cette fluorescence permettra de dire si l'ADN à tester est équivalents par rapport à l'ADN témoin ou à l'inverse en défaut ou en excès.

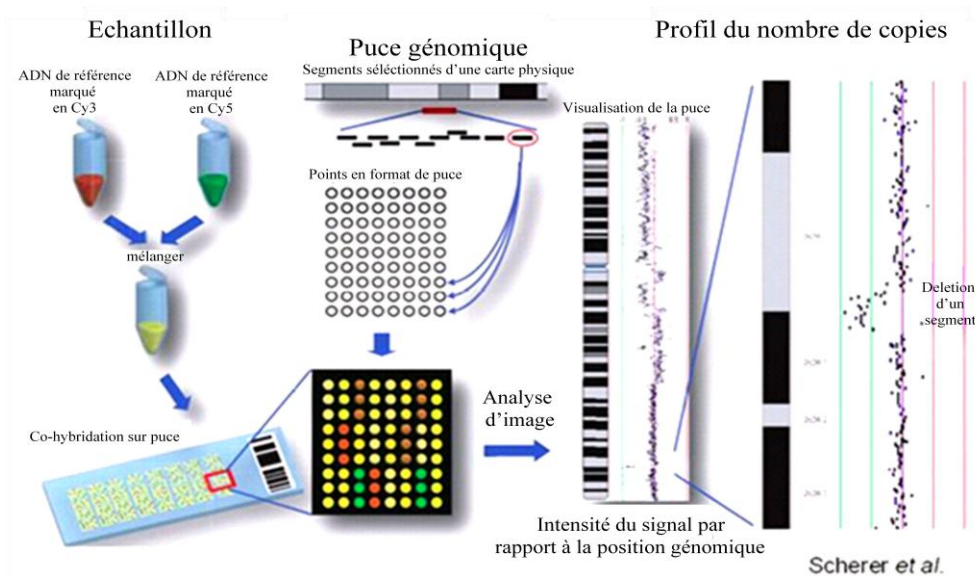


Figure 17 : Représentation schématique d'une technique de CGH array

2. Protocole de l'hybridation génomique comparative.

La technique d'hybridation génomique comparative comporte 8 étapes.

- Pour chaque échantillons patient et pool de référence on part d'une quantité de 3µg d'ADN pour un volume final de 50µl.
- Chaque échantillon patient est traité en parallèle avec un pool de 16 ADN XX ou XY de référence.
- L'étude a été faite sur 45 patients avec leur accord écrit
- Les réactifs utilisés sont achetés chez la société Agilent

3. Extraction de l'ADN

Les ADN sont extraits à partir d'échantillons de tumeurs solides congelés. L'extraction a été réalisée en Phénol-chloroforme.

4. Digestion de l'ADN génomique

L'ADN est digéré par un mélange de 2 enzymes de restriction. Après incubation dans un bain-marie à 37°C pendant 2 heures, les échantillons sont chauffés à 65°C pendant 20 minutes pour inactiver les enzymes, et les tubes centrifugés.

5. Marquage des ADN

Les ADNs patients sont ensuite marqués par le fluorochrome Cy5-dUTP et le pool de référence (XX ou XY) par la Cy3-dUTP. On mélange ensuite avec un mix contenant des Random Primer et l'enzyme Exo Klenow. Le tout est incubé dans un bain-marie à 37°C pendant 2 heures.

Chauffer à 65°C pendant 10 minutes pour inactiver les enzymes puis centrifuger.

Une étape de purification sur colonne est faite pour éliminer le fluorochrome non incorporé.

6. Pooler de façon équimolaire les ADN marqués en Cy3 et Cy5

7. Hybridation sur lames CGH-array

500µl du mélange est déposé sur une lame « gasket », au centre puis en étalant à gauche et à droite sans faire de bulles. La Puce 44B d'Agilent® est placée, face imprimée vers le bas, recouvrant la lame « gasket » constituée de joints plastiques pour l'étanchéité.

La chambre d'hybridation est ensuite fermée en évitant de former des bulles puis, est hybridée à 65°C dans un four rotatif à 20 rpm pendant 40 heures.

8. Lavages post-hybridation

Après incubation les lames vont être lavées avant la lecture par le scanner.

Deux bains de lavage avec un Buffer 1 et un Buffer 2 sont nécessaires. Le Buffer 1 est utilisé à RT durant 5 min et le Buffer2 à 37°C durant 1 min.

9. Le scan des lames

Une fois lavée, la lame est positionnée dans le scanner *Agilent*®. Le logiciel utilisé est *Agilent Scanner Control*. Les paramètres sont une PMT de 100%, une résolution de 10µM.

10. Traitement des images

Le scanner mesure l'intensité de signal de fluorescence verte et rouge. Le résultat brut de l'analyse se présente sous forme d'une image numérisée (format TIFF) qui est ensuite analysée par le logiciel *Feature Extraction Software* (Agilent ©).

11. Analyse des résultats

L'interprétation des résultats est réalisée au moyen du logiciel *DNA Analytics* dont les paramètres utilisés pour notre étude sont les suivants :

- z-score threshold 2.5
- Cut off : 2
- Window : 2Mb

Résultats:

Toutes les tumeurs présentant une surexpression de *BCL9* possèdent une polyploïdie du bras 1q sauf une qui présente une amplification de ce gène, l'expression de *BCL9* dans cette tumeur est la plus élevée. Nous avons vu aussi que les 7 autres tumeurs ainsi qu'une grande partie des tumeurs présentant une surexpression de *BCL9* d'un facteur 2 possèdent une polyploïdie. La duplication du bras entier est un phénomène fréquent dans le cancer du sein (Ghazani et al 2007). La duplication du chromosome 1q est en effet retrouvée dans plus de 50% des tumeurs mammaires humaines.

La surexpression de *BCL9* peut donc s'expliquer, au moins en partie, par des polyploïdies et amplifications.

Tableau 1 : Profil d'expression de *BCL9* par rapport au profil CGH dans 45 tumeurs mammaires.

N° de dossier (tumorothèque de curie)	Expression BCL9/TBP	CGH-1q21
5452	1.83	N
5402	1.77	Poly1q
5403	3.88	Poly1q
4566	1.10	N
5404	3.36	Poly1q
5405	2.59	Poly1q
4590	1.90	N
5408	2.50	N
5409	2.34	Poly1q
5458	1.44	N
5313	1.65	N
5459	1.32	N
5460	1.53	N
5463	1.51	N
5464	2.87	Poly1q
4624	3.02	Poly1q
5472	3.43	Poly1q
5474	2.29	N
5476	2.83	Poly1q
5399	1.40	N
4351	13.16	Amplification
5449	1.91	N
5392	0.70	N
5393	2.72	Poly1q
4699	1.15	Poly1q
5394	2.21	Poly1q
5478	2.36	N
5395	1.98	N
5396	2.39	Poly1q
5461	2.92	Poly1q
5468	5.40	Poly1q
5469	2.69	Poly1q
5470	2.34	N
5397	0.67	N
4591	1.55	Poly1q
5475	3.01	Poly1q
5477	3.03	Poly1q

DISCUSSION

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la carcinogenèse mammaire, nous avons entrepris l'étude de la fonction du gène suppresseur de tumeur *WWOX*. Nous avons eu recours au système double hybride et à des expériences de co-immunoprecipitation pour identifier de nouveaux partenaires moléculaires de *WWOX*. Nous avons mis en évidence la capacité de *WWOX* à s'associer avec des composants de la voie de signalisation intracellulaire Wnt/ β -caténine : Dvl-2 ainsi que les deux protéines homologues BCL9-2 et BCL9 (Adachi et al 2004, Brembeck et al 2004, Hoffmans and Basler 2007, Kikuchi et al 2006, Kramps et al 2002). Cette voie de signalisation régule la stabilité du facteur transcriptionnel β -caténine. Elle est impliquée dans l'embryogenèse ainsi que le développement et l'homéostasie de divers tissus chez l'adulte (Clevers 2006, MacDonald et al 2009). Sa régulation est complexe et jusqu'à ce jour, malgré de nombreuses études approfondies et l'intérêt porté par différentes communautés scientifiques à cette voie, elle reste mal connue. Des mutations au niveau de différents acteurs établis de cette voie sont associées à différentes pathologies (MacDonald et al 2009). La voie Wnt/ β -caténine est fréquemment suractivée dans les cancers, cette suractivation favorise, voire induit, le cancer comme les cancers du côlon et sein.

Suite aux résultats obtenus par le système double hybride et les validations effectuées par co-immunoprecipitation, nous avons supposé que *WWOX* puisse jouer un rôle dans la régulation de la voie Wnt/ β -caténine. Notre objectif fut alors de mieux comprendre la fonction de *WWOX* dans cette voie. Nous avons pu démontrer que *WWOX* est un nouveau régulateur négatif de la voie Wnt/ β -caténine, à l'aide d'expériences de luciférase « assay » réalisées avec des cellules cancéreuses de sein en culture (cf. figure 3 et 4 de l'article 1), et en utilisant un modèle physiologique, le développement du xénope (cf. figure 4 de l'article 2).

Nous nous sommes alors attachés à l'étude des mécanismes moléculaires par lesquels *WWOX* inhibe la voie Wnt/ β -caténine.

Avant ce travail de recherche, il était connu que *WWOX* inhibe l'activité transcriptionnelle de différentes protéines comme p73, AP2 α/γ , c-Jun et la partie cytoplasmique de ErbB-4, en les séquestrant dans le cytoplasme (Aqeilan et al 2004b, Aqeilan et al 2004c, Aqeilan et al 2005, Gaudio et al 2006). Il était également connu que Dvl-2 migre entre le cytoplasme et le noyau, et que sa localisation nucléaire est cruciale pour sa fonction dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Gan et al 2008, Itoh et al 2005,

Yokoyama et al 2007). Dans leur étude publiée en 2005, Itoh et son équipe ont pu démontrer que la localisation nucléaire de *dvl* chez le xénope est indispensable à sa fonction dans la voie Wnt/ β -caténine, c'est-à-dire à la transmission des effets positifs de cette voie de signalisation sur la stabilité de la β -caténine (Itoh et al 2005). Ces résultats suggèrent deux explications, (1) la dégradation de la β -caténine pourrait se produire dans le noyau et Dvl-2 nucléaire inhiberait cette dégradation. Le fait que les composants du complexe de dégradation de la β -caténine comme APC et l'axine naviguent entre les compartiments nucléaire et cytoplasmique est compatible avec cette hypothèse (Willert and Jones 2006). (2) Les protéines Dvls participeraient à la séquestration de la β -caténine dans le noyau, empêchant ainsi sa dégradation dans le cytoplasme.

Nous avons donc pensé que WWOX pourrait inhiber l'activité transcriptionnelle liée à la voie Wnt/ β -caténine en séquestrant Dvl-2 dans le cytoplasme. L'exportation de Dvl-2 du compartiment nucléaire est intense par rapport à son importation, Dvl-2 est donc majoritairement localisée dans le cytoplasme. Afin de mettre en évidence la séquestration de Dvl-2 dans le cytoplasme par WWOX, nous avons eu recours à une forme de Dvl-2 mutée dans son motif d'export nucléaire (NES) et donc localisée majoritairement dans le noyau. Grâce à l'utilisation de ce mutant, nous avons pu montrer que WWOX séquestre Dvl-2 dans le compartiment cytoplasmique. Nous avons alors conclu que WWOX inhibe la voie Wnt/ β -caténine en séquestrant Dvl-2 dans le cytoplasme. En faveur de notre conclusion, nous avons montré que l'inhibition de l'expression endogène de WWOX par des siRNA spécifiques, augmente l'effet positif de Wnt3a sur la stabilité de la β -caténine.

Nous nous sommes ensuite focalisées sur l'étude du rôle du complexe WWOX-BCL9-2 dans la régulation de la voie Wnt/ β -caténine. Nous avons démontré que WWOX inhibe la fonction de BCL9-2 dans cette voie de signalisation, c'est-à-dire l'amplification de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. WWOX est sans effet sur la localisation nucléaire de cette protéine ainsi que sur sa capacité à se lier à ses partenaires moléculaires indispensables à sa fonction à savoir : Pygopus et la β -caténine. D'autres études devraient être entreprises afin d'élucider le mécanisme d'action de WWOX.

Avant ce travail de recherche, il était connu que différentes protéines inhibent l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt/ β -caténine dans le noyau en recrutant des histones déacétylases (HDAC) sur des membres de la famille TCF/LEF-1 (Billin et al 2000, Brantjes

et al 2001, Chen et al 1999, Kim and Bae 2011, Levanon et al 1998). La déacétylation des histones par les HDACs renforce leur interaction avec l'ADN ce qui conduit à une structure chromatinienne fermée et donc en l'inhibition de la transcription des gènes (Kim and Bae 2011). Les HDACs régulent également l'état d'acétylation de plusieurs protéines « non-histones » tels que des facteurs de transcription comme p53 (Zhang et al 2011). La déacétylation des protéines « non-histones » peut entraîner des modifications de la stabilité des protéines. Elle peut également moduler des interactions du type protéine-protéine et protéine-ADN.

Nous avons alors pensé à étudier l'implication des HDACs dans l'effet inhibiteur de WWOX sur l'activité transcriptionnelle de BCL9-2. Nous avons trouvé que WWOX interagit avec HDAC3 et que cette HDAC inhibe l'activité transcriptionnelle de BCL9-2. Cependant, d'une manière inattendue, nous avons montré que HDAC3 augmente l'association WWOX-BCL9-2, et que WWOX est sans effet sur l'interaction HDAC3-BCL9-2. Ces résultats suggèrent que HDAC3 inhibe la fonction de BCL9-2 dans la voie Wnt/ β -caténine en recrutant WWOX sur BCL9-2. HDAC3 formerait un pont entre BCL9-2 et WWOX. Nous avons mis en évidence que les domaines de liaison de HDAC3 et BCL9-2 sur WWOX sont différents, ce qui est en faveur de notre hypothèse.

WWOX se lie à HDAC3 et BCL9-2, deux protéines nucléaires et WWOX est sans effet sur la localisation cellulaire de BCL9-2. Ces observations suggèrent fortement que WWOX se lie à, et inhibe l'activité transcriptionnelle de, BCL9-2 dans le compartiment cellulaire. WWOX inhiberait donc la voie Wnt/ β -caténine via deux mécanismes, la séquestration de Dvl-2 dans le cytoplasme et l'inhibition de l'activité de BCL9-2 dans le noyau. Conformément à notre hypothèse que WWOX agit sur la voie Wnt/ β -caténine dans le cytoplasme et le noyau, plusieurs rapports ont montré que WWOX module l'activité de diverses protéines dans ces deux compartiments cellulaires. WWOX séquestre p73 (Aqeilan et al 2004c), AP2- γ (Aqeilan et al 2004b), ErbB-4 (Aqeilan et al 2007a) et c-Jun (Gaudio et al 2006) dans le cytoplasme, inhibant ainsi leur activité transcriptionnelle. D'autre part, il a été rapporté que WWOX, qui contient un signal de localisation nucléaire (Chang et al 2001), peut également se lier à différentes protéines dans le noyau et réprimer leur activité transcriptionnelle. Notamment, WWOX s'associe à RUNX2 (un régulateur de transcription essentiel à la différenciation ostéoblastique) lorsque cette protéine est déjà liée au promoteur de l'ostéocalcine, et supprime son activité transcriptionnelle (Aqeilan et al 2008). Dans le noyau des neurones altérés de rat, WWOX interagit physiquement avec CREB dans le noyau

et inhibe son activité transcriptionnelle (Li et al 2009). Les mécanismes moléculaires par lesquels WWOX module l'activité de RUNX2 et CREB dans le noyau sont inconnus.

Il est intéressant de noter qu'il a été montré que HDAC3 s'associe avec RUNX2 et réprime son activité transcriptionnelle (Schroeder et al 2004). En outre, dans la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231, la restauration de l'expression de *WWOX* inhibe RUNX2 ainsi que les gènes cibles de RUNX2 lié à la progression tumorale mammaire, suggérant un rôle important de RUNX2 dans la fonction de gène suppresseur de tumeur mammaire de WWOX (Aqeilan et al 2008). L'étude du rôle de HDAC3 dans l'association WWOX-RUNX2 devrait donc être entreprise.

Nos résultats suggèrent que WWOX inhibe la voie de signalisation Wnt / β -caténine par au moins deux mécanismes différents, la séquestration de Dvl-2 dans le cytoplasme et l'inhibition de la BCL9-2 dans le noyau. Différentes observations suggèrent que WWOX pourrait réguler cette voie de signalisation par l'interaction avec d'autres partenaires. Dans le noyau, c-Jun se lie au complexe β -caténine-TCF menant à sa stabilisation (Gan et al 2008). La séquestration de c-Jun dans le cytoplasme par WWOX a été démontrée (Gaudio et al 2006). Par conséquent, l'effet inhibiteur de WWOX sur l'entrée de c-Jun dans le noyau pourrait constituer un autre mécanisme moléculaire par lequel WWOX inhibe la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

Le mécanisme moléculaire par lequel WWOX inhibe la cancérogenèse reste mal connu. L'activation constitutive de la voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans différents types de cancer, comme le cancer du sein et du côlon (Brown 2001, Polakis 2000). Une suractivation de la voie Wnt/ β -caténine a été identifiée dans 60% des tumeurs mammaires humaines et a été décrite comme un marqueur de mauvais pronostic (Lin et al 2000). Cependant, l'événement génétique entraînant cette suractivité dans le cancer du sein reste inconnu. BCL9-2 est surexprimée dans les cancers du sein et du côlon (Toya et al 2007). Différentes études suggèrent fortement que cette protéine est nécessaire à la carcinogenèse colique induite par la voie Wnt/ β -caténine (Adachi et al 2004, Brembeck et al 2011, Deka et al 2010).

Nos résultats suggèrent que l'inhibition de l'expression de *WWOX*, fréquemment observée dans le cancer du sein (Chang et al 2005, Driouch et al 2002, Guler et al 2004), pourrait conduire à une suractivation de la voie Wnt/ β -caténine et par conséquent à une stimulation de

la carcinogenèse mammaire. En outre, une survie significativement meilleure a été observée chez les patients atteints de tumeur colorectale présentant un niveau élevé d'ARNm *WWOX* (Zelazowski et al 2011). L'inhibition de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine par *WWOX* pourrait donc également réduire le développement des tumeurs colorectales. En accord avec nos hypothèses, une étude très récente a pu montrer une corrélation positive entre l'inhibition de l'expression de *WWOX* et la localisation nucléaire de la β -caténine (indiquant une activité élevée de la voie Wnt/ β -caténine) (Zelazowski et al 2011).

La poursuite de l'étude des relations existant entre *WWOX*, la voie Wnt/ β -caténine et *BCL9-2* devraient conduire à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à plusieurs types de cancers.

BCL9 est un homologue de *BCL9-2*. nous avons mis en évidence par coimmunoprécipitation l'interaction *WWOX-BCL9*. En outre, nous avons trouvé que *WWOX* inhibe l'activité transcriptionnelle de *BCL9* (cf. résultats supplémentaires (1) et introduction § 3.4). Dans notre perspective d'étude du rôle des partenaires moléculaires de *WWOX* dans la cancérogenèse mammaire, nous avons mis en évidence une surexpression de *BCL9* dans 22% des tumeurs mammaires invasives par rapport aux cellules de normales, suggérant un rôle de *BCL9* dans ce type de cancer. Cette surexpression se retrouve plutôt dans les tumeurs de grade 1 et exprimant les récepteur ER et PR, donc de bon pronostique. *BCL9* pourrait donc être un marqueur de bon pronostique. Afin de déterminer si *BCL9* est effectivement impliquée dans ce type de cancer, il faudrait établir des modèles cellulaires permettant de définir le pouvoir tumorigène de *BCL9* dans le cancer du sein.

COLLABORATION

Article 3 (en collaboration):

Inhibition of transforming growth factor β -signaling at the nuclear envelope: characterization of MAN1-Smad2/3-PPM1A interactions.

Auteurs : Benjamin Bourgeois¹, Bernard Gilquin¹, Carine Tellier-lebègue¹, Wei Wu², Javier Pérez³, Perla El Hage⁴, François Lallemand⁴, Howard J. Wormal² and Sophie Zinn-Justin¹

¹*Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie, URA CNRS 2096, CEA Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France;*

²*Department of Medicine and Department of Pathology and cell Biology, College of physicians and surgeons, Columbia University, New York, New York 10032, USA;*

³*Synchrotron SOLEIL, BP 48, 91192, Gif-sur-yvette Cedex, France;*

⁴*Institut Curie, hôpital René Huguenin, 35 rue Dailly, 92210 Saint Cloud, France;*

Article en révision à « Science Signaling »

Au sein d'une collaboration avec l'équipe du Dr ZINN-JUSTIN, j'ai eu l'occasion de participer aux certaines expériences cellulaires décrites dans cet article.

L'étude porte sur la mise en évidence du rôle de la protéine de la membrane nucléaire interne MAN1 dans la régulation de la de voie de signalisation au TGF- β .

Des mutations de plusieurs protéines de l'enveloppe nucléaire entraînent de nombreuses maladies génétiques connus sous le nom de « envelopathies » (Dauer and Worman 2009). Ces protéines interviennent dans de multiples fonctions cellulaires et notamment dans la régulation de voies de signalisation impliquées dans la balance entre prolifération et différenciation cellulaire *via* des interactions directs avec certains régulateurs transcriptionnels (Andres and Gonzalez 2009, Barascu et al 2012). Une meilleur compréhension du rôle de ces protéines au sein de ces voies de signalisation peut à terme permettre de mieux comprendre l'effet de leurs mutations dans l'établissement de ces maladies. Dans ce cadre, la protéine ancrée à la membrane nucléaire interne MAN1 est retrouvée muté dans plusieurs maladies

génétiqes osseuses dues à une dérégulation de la voie TGF-beta. Le but de ce travail à donc été de mettre en évidence le rôle de MAN1 dans la régulation de cette voie de signalisation.

La protéine MAN1 possède un domaine nucléoplasmique C-terminal capable de se lier aux protéines R-SMAD (Raju et al 2003). L'activation de la voie TGF- β induit la phosphorylation des R-SMADs (SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 et SMAD8). Suite à leur phosphorylation, ces protéines vont pouvoir se lier au co-médiateur SMAD4, migrer dans le noyau, interagir avec différents facteurs de transcription, des coactivateurs ou des corépresseurs pour moduler ainsi l'expression de multiples gènes (Massague et al 2005). L'interaction des protéines R-SMADs avec des protéines cytoplasmiques ou nucléaires régulent négativement la voie de signalisation TGF- β (Ishimura et al 2006). Notament, l'interaction de MAN1 avec SMAD2 et SMAD3 régulent négativement la voie de signalisation TGF- β (Pan et al 2005). Des études sur des souris déficientes MAN1 induisent différentes perturbations morphologiques dues à la dérégulation de la voie TGF- β .

Les mécanismes moléculaires par lesquels MAN1 inhibe la voie TGF- β en se liant à SMAD2/3 n'est toujours pas clair. Le but de cette étude a été de mettre au clair le mode d'action de MAN1 dans ce contexte.

En premier lieu, il a été effectuée une modélisation du complexe SMAD2-MAN1 sur la base d'expériences de SAXS et de RMN. Ensuite il a été démontré que MAN1 et FAST1 rentrent en compétition pour la liaison avec SMAD2. La liaison du facteur de transcription FAST1 à SMAD2 est essentiel à l'activation de la transcription de différents gènes (Attisano et al 2001, Chen et al 1996, Randall et al 2002). Afin de valider ces résultats, nous avons effectuée des expériences de co-immunoprecipitations afin de voir l'effet de MAN1 sur la formation du complexe FAST1-SMAD2 (figure 4B). Le résultat obtenu valide l'hypothèse selon laquelle MAN1 induit la dissociation partielle du complexe SMAD2-FAST1.

Dans la suite de l'étude, il a été démontré par des expériences de filtration sur gel et de calorimétrie que MAN1 peut se lier *in vitro* aux complexes SMAD2-SMAD4 et SMAD3-SMAD4.

De plus, nous avons voulu étudier l'effet de MAN1 sur la formation des hétérodimères R-SMAD-SMAD4 et sur l'état de phosphorylation de SMAD2 et SMAD3. A l'aide d'expériences de surexpression et de co-immunoprecipitation, nous avons obtenu les résultats suivants :

1. MAN 1 induit la dissociation partielle des complexes SMAD2-SMAD4 indépendamment de l'activation constitutive du récepteur TGF- β (Figure 6A).

2. SMAD4 se lie de façon moins efficace avec SMAD3 en présence de MAN1 (Figure 6B).

La formation des hétérodimères SMAD2-SMAD4 et SMAD3-SMAD4 est régulée par la phosphorylation des R-SMADs sur leurs motifs SSMS localisés en C-terminal (Massague et al 2005). La déphosphorylation de ces séquences entraîne la dissociation des complexes. Nos résultats suggèrent que la surexpression de MAN1 pourrait induire la déphosphorylation de SMAD2 et de SMAD3 indépendamment de l'activation constitutive de TGF- β (figure 6C et D).

Par la suite, des expériences de spectrométrie montrent que MAN1 se lie au complexe SMAD2-SMAD3 ainsi qu'à la phosphatase PPM1A spécifique des R-SMADs.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude suggèrent un nouveau modèle par lequel la voie TGF- β est inactivée au niveau de l'enveloppe nucléaire. MAN1 se lierait aux complexes SMAD2-SMAD4 et SMAD3-SMAD4 puis recruterait sur ces complexes la phosphatase PPM1A. Ce recrutement induirait la déphosphorylation des R-SMADs et donc la dissociation des complexes R-SMAD-SMAD4.

ABSTRACT

The inner membrane of the nuclear envelope is involved in the regulation of developmental processes and tissue homeostasis; however, most of the corresponding molecular mechanisms are unclear. MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds to transcription factors Smad2 and Smad3 and inhibits transforming growth factor- β signaling. Genetic depletion of MAN1 in mice leads to profound developmental anomalies and heterozygous loss-of-function mutations in humans cause sclerosing bone dysplasia. We have modelled the 3D structure of the MAN1-Smad2 complex from nuclear magnetic resonance and small angle X-ray scattering data. As predicted by this model, MAN1 competes in vitro and in cells with the transcription factor FAST1 for Smad2 binding. The model further predicts and in vitro experiments show that MAN1 binds to the activated Smad2/3-Smad4 complex. However, in cells, MAN1 only binds to Smad2/3. Overexpression of MAN1 leads to dephosphorylation of the Smad2/3 C-terminus, thus hindering its recognition by Smad4, and MAN1 binds directly to PPM1A, which catalyzes Smad2/3 dephosphorylation. These results demonstrate a novel mechanism for inactivation of transforming growth factor- β signaling localized to the nuclear envelope in which MAN1 competes with transcription factors for Smad2/3 binding and facilitates Smad2/3 interaction with their phosphatase PPM1A.

Abbreviations

TGF- β , transforming growth factor- β ; LEM motif, lamina-associated protein 2-emerinman1 motif; WH, winged helix; UHM, U2AF homology motif; ULM, UHM ligand motif; SIM, Smad interaction motif; LIC, ligation independent cloning; FPLC, fast protein liquid chromatography; SAXS, Small Angle X-ray scattering; ITC, isothermal titration calorimetry; NMR, nuclear magnetic resonance; HSQC, heteronuclear single quantum correlation; TROSY, transverse relaxation optimized spectroscopy; IP, immunoprecipitation; IB, immunoblot.

INTRODUCTION

Emerging evidence demonstrates that the nuclear envelope functions as a signaling node in development and disease (1). Alterations in nuclear envelope structure and composition occur during metazoan development and tissue differentiation and mutations in genes encoding proteins of the nuclear envelope cause a wide range of mostly tissue-selective diseases (2). Several inner nuclear membrane proteins regulate critical signaling pathways and can be viewed as intranuclear regulators of signaling pathways that receive and transduce signals from the extracellular matrix and cytoskeleton, participating in cellular responses to developmental cues or stress (3, 4).

Perhaps the clearest example of a nuclear envelope protein regulating a key cell signaling pathway is that of MAN1. MAN1 is an integral protein of the inner nuclear membrane with two transmembrane segments and nucleoplasmic domains (5). Its first nucleoplasmic segment contains the LEM motif, which is shared by other integral proteins of the inner nuclear membrane (5-7). The second nucleoplasmic domain near the Cterminus directly binds to R-Smads (8-13). Receptors activated by cytokines of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily interact with and catalyze phosphorylation of R-Smads (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 and Smad8) (14). Upon phosphorylation, two activated R-Smads form a complex with Smad4 that is translocated to the nucleus where it interacts with various transcription factors, co-activators or corepressors to modulate the expression of a multitude of genes (14). Interactions of R-Smads with cytoplasmic or nuclear proteins including I-Smads (Smad6 and Smad7) can downregulate the TGF- β signaling (14-16). Similarly, interactions of MAN1 with Smad1 or Smad2 and Smad3 respectively down-regulate bone morphogenic protein or TGF- β signaling (8-12).

Data from model organisms and human genetics support the function of MAN1 in down-regulating TGF- β signaling. MAN1-deficient mice die during embryogenesis as a result of abnormal yolk-sac vascularization (17, 18) and exhibit abnormal heart morphogenesis resulting from aberrant expression of left-side-specific genes responsible for left-right asymmetry (19), defects linked to enhanced TGF- β signaling. Similarly, tissue-specific defects resulting from deletion of the MAN1 homolog in *Drosophila* (20) and abnormalities caused by overexpression or knockdown of the *Xenopus* MAN1 homolog in embryos (8, 9) also appear to result from alterations in signaling by TGF- β family members. Heterozygous loss-of-function mutations in *LEMD3*, the gene encoding MAN1, cause the sclerosing bone

dysplasia osteopoikilosis that is sometimes associated with connective tissue nevi in the skin (Buschke-Ollendorff syndrome), phenotypes that can be explained by enhanced TGF- β signaling in these tissues (10).

Although MAN1 directly interacts with the MH2 domains of Smad2 and Smad3 (11, 13), the biophysical mechanism by which this inhibits TGF- β signaling is not clear. MAN1 could simply act as a “sink” for activated nuclear Smads, sequestering them at the inner nuclear membrane and competitively inhibiting interactions with other nuclear factors involved in gene regulation. Another possibility is that MAN1 functions as a scaffold protein recruiting Smads and enzymes catalyzing their dephosphorylation to the inner nuclear membrane. Although no supporting data exist, a function in recruiting an activated nuclear phosphoprotein and its deactivating phosphatase has been hypothesized for MAN1 (12) as well as a paralog, NET25, which regulate extracellular signal-regulated kinases (21). MAN1 has also been shown to immunoprecipitate the phosphatase PP1 (22). Finally, it is possible that MAN1 competitively inhibits other proteins that bind to Smad2 and Smad3. To test these hypotheses, we have used small angle X-ray scattering (SAXS), isothermal calorimetry (ITC) and protein binding experiments to model the interaction of MAN1 with Smad2. We show that the MAN1 C-terminal region competes with the transcription factor FAST1 (Forkhead Activin Signal Transducer 1) for Smad2 recognition, leading to dissociation of the FAST1 . Smad2 complex. In addition, this region of MAN1 binds to both the MH2 domain of Smad2/3 and PPM1A phosphatase, enhancing dephosphorylation of the Smads.

RESULTS

Residues Y366 and W368 of Smad2 are involved in MAN1 binding

The C-terminal, nucleoplasmic region of MAN1 contains a U2AF homology motif (UHM) and winged helix (WH) domain connected by a linker region (13). We have previously shown that the linker region, UHM domain and C-terminus are involved in binding to Smad2 (13). Smad2 generally recognizes its protein binding partners via its MH2 domain and we have shown that this is also the case for binding to MAN1 (11, 13). To further define the MAN1 - Smad2 interaction, we generated cDNA constructs that expressed Smad2 with various amino acid substitutions and examined binding of the proteins to MAN1.

We tested 10 Smad2 residues involved in homotrimerization (D300, R310, K375, K420, D450) (23), binding to the plasma membrane Smad anchor for receptor activation (SARA) (Y268, Y339, Y366, W368, W448) (24), binding to Smad4 after activation (D450) (23, 25) or binding to transcription factors in the nucleus (Y366, W368) (25, 26). We introduced 6 single amino acid substitutions in Smad2 (Figure 1): Y268A and Y339A (defective in SARA binding), Y366A and W368A (defective in SARA and transcription factor binding), W448A (defective in SARA binding) and D450H (defective in Smad4 binding). Furthermore, we constructed 4 double mutants: D300H-R310H and K375AK420A (unable to form homotrimers) (23), Y366A-W368A (unable to bind to the *Xenopus* transcription factors Mixer and FAST1 and corresponding to a patch on Smad2 involved in SARA recognition) (24-26) and Y268A-W448A (corresponding to another patch on Smad2 involved in SARA recognition) (24). We also constructed a phosphomimetic triple mutant in which the C-terminal sequence SSMS that is phosphorylated upon activation was replaced by EEME (Figure 1). Introduction of these three amino acid substitutions into a construct of the linker and MH2 domain of Smad2, which we called S2LMH2EEE (Figure 1), led to the stabilization of the trimeric form of Smad3 as observed by gel filtration analysis (27) and also to the stabilization of the trimeric form of Smad2 in our purification conditions (13). Thus, the phosphomimetic form of the whole Smad2 protein is predicted to behave as a trimeric Smad2 protein.

We performed yeast two-hybrid assays to assess the interaction between these Smad2 mutants and the MAN1 fragment from amino acid 730 to 911, which is sufficient to bind to the MH2 domain (11). The single mutant D450H, double mutants D300H-R310H, K375A-

K420A and phosphomimetic triple mutant, which have specific oligomerization behaviors, all bound to MAN1 similar to wild type Smad2 (Figure 2A). This was consistent with our previous finding that MAN1 recognized both the monomeric and trimeric MH2 domain of Smad2 (13). Based on atomic resolution data on the Smad2 MH2 domain - SARA peptide complex (24), we then tested if some of the three Smad2 patches involved in SARA recognition were also involved in MAN1 binding. The five single mutants Y268A, Y339A, Y366A, W368A and W448A bound to MAN1 similar to the wild type Smad2 MH2 domain (Suppl. Figure 1). The double mutant Y268A-W448A was also unaffected in its ability to bind MAN1; however, the double mutant Y366A-W368A did not interact with it (Figure 2A). To verify that the Y366A and W368A amino acid substitutions did not affect the 3D structure of Smad2, we checked by gel filtration the oligomeric state of the phosphomimetic triple mutant S2LMH2EEE with and without these changes. Consistent with the fact that Y366 and W368 are solvent-exposed in the trimeric structure of the Smad2 MH2 domain (23), the changes to these residues did not affect the MH2 domain global shape and capacity to oligomerize (Figure 2B). As measured by ITC, the affinity of wild type S2LMH2EEE and the Y268A-W448A and Y366A-W368A mutants for the MAN1 fragment from amino acid 755 to 911 (MAN1Luhm) was 1.4 mM, 1.4 mM and 33.0 mM, respectively (Figure 2C and Table 1). Thus, in vitro, the Smad2 mutant Y366AW368A binds MAN1 approximately 25 times more weakly than wild type Smad2. These results are consistent with the Smad2 MH2 helix α_2 comprising Y366 and the loop joining α_2 and β_8 containing W368 being involved in MAN1 binding.

The Smad2-MAN1 complex modeled from SAXS and mutagenesis data

MAN1 binds Smad2 through a surface involving the linker between its WH and UHM domain, the ULM-binding cavity of its UHM domain and its C-terminus (13). In particular, substituting residues W765 and Q766 to alanines result in the disappearance of the ITC heat release signal observed in the case of the native MAN1-Smad2 interaction (Suppl. Figure 2). Inversely, the fragment of Smad2 from amino acid 186 to amino acid 467 binds to MAN1 through its helix α_2 and loop joining α_2 and β_8 . To integrate these results into a model of the Smad2-MAN1 complex, we recorded SAXS data on the Smad2 fragment S2LMH2EEE alone and in complex with the fragment MAN1Luhm, which contained residues 755 to 911 of MAN1. This Smad2 fragment is composed of a predicted unstructured N-terminal segment and the crystallized MH2 globular domain (23). The MAN1 fragment consists of a globular UHM domain, a flexible N-terminus anchored onto the UHM domain and a disordered C-

terminus (13). SAXS analysis performed on the free Smad2 fragment was consistent with the presence of a trimeric oligomer. The same analysis performed on the Smad2-MAN1 complex was consistent with the presence of a trimeric Smad2 oligomer bound to three MAN1 fragments. We calculated 6,000 models of the trimeric Smad2 fragment and 12,000 models of this same oligomer bound to three MAN1 fragments. In these models, the N-terminal part of the Smad2 fragment was in a random conformation, the MH2 trimer structure corresponded to that solved by X-ray crystallography (23) and the MAN1 fragment structure was that previously calculated from SAXS and NMR data (13). Furthermore, a distance constraint forced the W765 and Q766 residues of MAN1 to be close to the Y366 and W368 residues of Smad2. Each of the models were then analyzed by calculating a theoretical SAXS curve using CRY SOL (28) and comparing it to the experimental SAXS curve. For both complexes, we identified 20 models that were consistent with the mutagenesis and SAXS data. In these models, the distance constraint between MAN1 W765 and Q766 and Smad2 Y366 and W368 was respected and the fit between the calculated and experimental SAXS data was characterized by chi-scores less than 2. Thus, it is possible to propose 3D models of the MAN1-Smad2 complex consistent with the available heterogeneous experimental data (Figure 3).

MAN1 and FAST1 compete for Smad2 binding

Our molecular model predicted that there could be synergistic or competitive interactions with the MAN1-Smad2 complex. The first nuclear DNA binding protein identified to interact with the Smad2 MH2 domain was the *Xenopus* winged-helix forkhead factor FAST1 (29). FAST-related proteins have been identified in zebrafish, mice and humans and belong to the FoxH1 family of forkhead transcription factors (30). Interaction of FAST-related proteins with Smad2 is essential for transcriptional activation of their targeted genes. This interaction is mediated by Smad2 residues Y366 and W368 (26, 31). Similar to FAST-related proteins, our yeast two-hybrid assay and ITC data demonstrated that MAN1 binds Smad2 through residues Y366 and W368. Our MAN1-Smad2 3D model also showed that a MAN1 positioning onto the Smad2 Y366 and W368 residues was consistent with the SAXS structural data. These results suggested a competition between FAST1 and MAN1 for Smad2 binding. We therefore tested the *in vitro* binding of the MAN1 fragment MAN1Luhm to the Smad2 phosphomimetic triple mutant S2LMH2EEE in the presence of a 25 residue peptide from human FAST1. The peptide LDALFQGVPPNKSIVD VWVSHPRDL was chosen based on its homology to the Smad interacting motif of *Xenopus* FAST1 (32), which competes with

full-length FAST1 for Smad2-Smad4 complex recognition (25). ITC analysis confirmed the binding of the FAST1 peptide to the Smad2 MH2 phosphomimetic domain (Suppl. Figure 3) and indicated that the affinity of MAN1 for this Smad2 region was decreased in presence of the FAST1 peptide (Figure 4A and Table 1). We then measured the effect of MAN1 overexpression on the formation of FAST1-Smad2 complexes in cells. Flag-tagged MAN1, Myc-tagged FAST1 and hemagglutinin (HA)-tagged constitutively activated TGF- β receptor were overexpressed in transfected 293T cells together with Flag-tagged Smad2. Myc-FAST1 was immunoprecipitated and the amount of bound Flag-Smad2 was determined. Independent of the level of constitutively activated TGF- β receptor, the amount of Flag-Smad2 bound to Myc-FAST1 was lower in the presence than in the absence of MAN1 overexpression (Figure 4B). These results showed that MAN1 competes with FAST1 to bind Smad2 and that in vivo MAN1 induces partial dissociation of Smad2 and FAST1.

MAN1 does not interfere with the in vitro formation of active Smad2/Smad4 and Smad3/Smad4 complexes.

Smad4 binds to Smad2 and facilitates translocation of the heteromeric complex into the nucleus where it can bind DNA. X-ray structures of the heterotrimeric complexes between two phosphorylated Smad2 MH2 domains (S2MH2-P) and one Smad4 MH2 domain (S4MH2) on one side, and two phosphorylated Smad3 MH2 domains (S3MH2-P) and one S4MH2 on the other side, revealed that these complexes were structurally organized as the homotrimeric forms of S2MH2-P and S3MH2-P (33). We previously showed that MAN1 recognized both the monomeric and the trimeric MH2 domain of Smad2 (13). Our yeast two hybrid experiments further confirmed that the MAN1. Smad2 interaction is not regulated by the oligomerization state of Smad2. Consistently, our related 3D model of the MAN1-Smad2 complex suggested that MAN1 binds to both Smad2 homotrimers and Smad2-Smad4 heterotrimers. To validate this model, we tested the in vitro binding of MAN1Luhm to activated Smad2 and Smad3 assembled into Smad4-containing heterotrimers (see Figure 1 for schematic diagrams of constructs). We purified the phosphomimetic Smad2 fragment S2LMH2EEE and the fragment of Smad4 called S4LMH2, both of which contain the MH2 domain involved in heterotrimerization. We mixed these two protein fragments in a 1:1 ratio and verified by gel filtration the formation of the S2LMH2EEE-S4LMH2 heterotrimer, the interaction between MAN1Luhm and S2LMH2EEE and the lack of interaction between MAN1Luhm and S4LMH2 (Figure 5A). Mixing equal quantities of MAN1Luhm, S2LMH2EEE and S4LMH2 revealed that MAN1 bound to the Smad2-Smad4 heterotrimer.

Using ITC, we observed that MAN1Luhm has an affinity of 1.3 +/- 0.1 mM for the Smad2-Smad4 heterotrimer, while it has an affinity of 1.4 • }0.1 mM for the Smad2 homotrimer (Figure 5B and Table 1). This demonstrated that MAN1 recognized both the Smad2 homotrimer and the Smad2-Smad4 heterotrimer with micromolar affinities. We carried out similar experiments to measure the binding of MAN1 to the Smad3-Smad4 heterotrimer. We produced and purified a phosphomimetic Smad3 fragment S3LMH2EEE. Gel filtration showed that MAN1Luhm, S3LMH2EEE and S4LMH2 co-eluted (Figure 5C). ITC gave Kd values of 1.7 +/- 0.1 mM for the interaction between the MAN1 fragment and the Smad3-Smad4 heterotrimer and 1.8 +/-0.1 mM for the interaction with the Smad3 homotrimer (Figure 5D and Table 1). This showed that, similar to Smad2, MAN1 recognized both the Smad3 homotrimer and the Smad3-Smad4 heterotrimer with micromolar affinities.

MAN1 interferes with formation of active R-Smad-Smad4 heterotrimers and decreases phosphorylation of Smad2 and Smad3 in cells

Having shown that MAN1 binds to the Smad2-Smad4 and Smad3-Smad4 heterotrimers in vitro, we examined these interactions in cells. Myc-tagged Smad2 and HA-tagged Smad4 were overexpressed in transfected 293T cells together with Flag-MAN1 and HA-tagged constitutively active TGF- β receptor. We immunoprecipitated Myc-Smad2 and determined the amount of HA-Smad4 bound to Myc-Smad2. Overexpression of MAN1 induced partial Smad2-Smad4 dissociation in 293T cells, independent of the level of constitutively activated TGF- β receptor (Figure 6A). Similarly, when Myc-Smad3 and HA-Smad4 were overexpressed, HA-Smad4 bound less efficiently to Myc-Smad3 after transfection with the Flag-MAN1 vector as determined by immunoprecipitation with anti-Myc antibodies (Figure 6B). Hence, MAN1 was able to induce partial Smad3-Smad4 dissociation in cells independent of the level of constitutively activated TGF- β receptor. Formation of Smad2-Smad4 and Smad3-Smad4 heterotrimers is regulated by phosphorylation of the C-terminal SSMS sequences of Smad2 and Smad3 (14). Dephosphorylation of these sequences leads to the dissociation of the heterotrimers. We therefore measured the amount of phosphorylated Smad2 and Smad3 with MAN1 overexpression in 293T cells. Cells were transfected with different concentrations of plasmid to give increasing Flag-MAN1 expression in the presence of constant levels of expression of Myc-Smad2 and HA-tagged constitutively activated TGF- β receptor. Immunoblots were performed on cell extracts to detect total Myc-Smad2 and phosphorylated Myc-Smad2. Overexpression of MAN1 induced partial Smad2 dephosphorylation independent of the level of constitutively activated TGF- β receptor (Figure

6C). Similar results were obtained when Myc-Smad3 was expressed (Figure 6D). These experiments demonstrated that MAN1 induced Smad2 and Smad3 dephosphorylation in cells independent of the expression level of constitutively activated TGF- β receptor.

MAN1 binds to the Smad2/3 phosphatase PPM1A

PPM1A catalyzes the dephosphorylation of Smad2 and Smad3, promoting their nuclear export (34). MAN1 binds to Smad2 and Smad3 and its overexpression decreases their phosphorylation. This lead us to hypothesizing that MAN1 could function as a scaffold recruiting PPM1A and Smad2/3 to the inner nuclear membrane to facilitate dephosphorylation. We therefore investigated the binding of MAN1 to PPM1A by producing and purifying the enzyme and examining its interaction with MAN1 using NMR. PPM1A was added to a solution of ^{15}N -labeled N-terminal nucleoplasmic region of MAN1 from amino acid 1 to amino acid 471 (MAN1N in Figure 1) and ^1H - ^{15}N HSQC spectra were recorded. No change was observed during the titration on the NMR spectrum, showing that PPM1A did not bind to this region of MAN1 (Figure 7A). Similarly, we added PPM1A to a solution of ^{15}N -labeled C-terminal nucleoplasmic region of MAN1 from amino acid 658 to amino acid 911 (MAN1C). In this case, we observed a progressive disappearance of the HSQC peaks corresponding to MAN1C (Figure 7B). These results demonstrated that PPM1A bound specifically to the C-terminal region of MAN1. We then labeled PPM1A with ^{15}N and followed its interaction with MAN1 by recording the ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC spectra. Addition of the MAN1 N-terminal fragment did not change the PPM1A spectrum (Figure 7C). However, addition of the C-terminal region caused a disappearance of a large set of weak peaks and a global decrease in intensity of all peaks (Figure 7D). Addition of the smaller Smad2/3 binding region of MAN1 (MAN1Luhm, residues 755 to 911) also provoked a large intensity decrease of the peaks corresponding to PPM1A (Figure 7E). Thus, this region of MAN1 binds to both Smad2/3 and PPM1A.

DISCUSSION

Our results provide evidence for a novel model of inactivation of TGF- β signaling at the nuclear envelope. In this model, MAN1 has a dual function in repressing Smad-mediated transcriptional activation. First, MAN1 competes with transcription factors for Smad binding. Second, it binds to the Smad2/3 phosphatase PPM1A, thus providing a mechanism for enhancing dephosphorylation of Smad2/3 by recruiting both the activated, phosphorylated R-Smad and the enzyme catalyzing its dephosphorylation (inactivation) to the same location at the inner nuclear membrane. The model is consistent with previous observations that manipulating MAN1 expression in cultured cells as well as model organisms alters signaling by TGF- β (8, 12, 17, 20). In humans, it may be particularly critical in bone and skin, as heterozygous loss-of-function mutation in the gene encoding MAN1 causes osteopoikilosis and Buschke-Ollendorff syndrome (10).

Our experimental data obtained *in vitro* and in cells show that MAN1 competes with the Smad interaction motif of FAST1 for binding to Smad2. As members of the FAST and Mix families of transcription factors interact with the MH2 domains of Smad2 and Smad3 through a similar and conserved interaction motif (26, 32), MAN1 likely competes with most of these transcription factors for binding. SARA, a Smad-binding protein anchored at the plasma membrane, also competes with these transcription factors for Smad2 and Smad3 binding (26). It uses a proline-rich rigid coil sequence similar to the Smad interaction motif of the transcription factors (26). Moreover, resolution of the 3D structure has shown that SARA interacts with a shallow hydrophobic pocket in the MH2 domain of Smad2 and Smad3, comprising Y366 and W368 (24). We have shown that MAN1 similarly binds to Smad2 through residues Y366 from helix α 2 and W368 from the loop joining α 2 and β 8. This result suggests structural similarities between the recognition properties of the membrane proteins SARA and MAN1. Just like SARA competes with SIM-containing transcription factors for R-Smad binding at the plasma membrane, MAN1 competes with these same transcription factors for R-Smad binding at the inner nuclear membrane. SARA recruits R-Smads for phosphorylation, which leads to their dissociation from SARA (35). We have shown that MAN1 recruits R-Smads for dephosphorylation; however, the event triggering R-Smad dissociation from MAN1 remains unclear.

We observed that MAN1 overexpression leads to decreased phosphorylation of Smad2 and Smad3 in cells. Consistently, the level of Smad1 phosphorylation is lower after MAN1

overexpression (12). We have also shown that there is less Smad4 bound to either Smad2 or Smad3 after MAN1 overexpression, consistent with previous results showing that Smad3 bound to MAN1 does not bind to Smad4 (12). These results strongly suggest that in cells MAN1 facilitates dephosphorylation of the C-terminus of R-Smads and their release from Smad4.

PPM1A has been identified as the phosphatase that catalyzes dephosphorylation of Smad2 and Smad3 (34). We showed that only the C-terminal region of MAN1 interacts with PPM1A. More precisely, amino acids 755 to 911 of MAN1, which are sufficient to bind Smad2/3, also interact with PPM1A. The affinity of PPM1A for this region of MAN1 is between 10 μ M and 500 nM because the PPM1A-MAN1 complex is not observed during gel filtration but is detected in the intermediate to slow exchange regime by NMR. From our results, we propose a model in which PPM1A interacts with the region of MAN1 from amino acid 755 to amino acid 911 and is thus present at the inner nuclear membrane together with Smad2/3, which binds to the same region of MAN1. Phosphorylated Smad2/3 thus would become a preferential target for PPM1A. The affinity of PPM1A for MAN1 is weaker than that of Smad2/3 for MAN1. Therefore, if they compete for binding, at equal concentrations, Smad2/3 would displace PPM1A from MAN1. However, additional interactions exist between Smad2/3 and PPM1A (34). After PPM1A catalyzes the dephosphorylation Smad2/3, it then recruits RanBP3 to stimulate Smad2/3 nuclear export (36). This chronology of interactions is supported by the fact that RanBP3 preferentially binds to dephosphorylated Smad2/3 to facilitate its nuclear export (37). Release of the unphosphorylated R-Smad from MAN1 could result from competition between MAN1 and RanBP3 for Smad2/3 binding. PPM1A also dephosphorylates RanBP3, which increases its nuclear exporter activity (36). It remains to be tested if interacting with the inner nuclear membrane similarly promotes RanBP3 dephosphorylation by PPM1A.

In conclusion, we have obtained evidence for a novel mechanism for inactivation of TGF- β signaling. The inactivation mechanism results from MAN1 competing for transcription factor binding to Smad2 and Smad3 and also from MAN1 facilitating their coming together with their inactivating phosphatase. This mechanism is similar to that recently shown for inhibition of BAF activity by LEM4, another LEM domain-containing protein, that interacts with both the BAF-activating kinase and PP2A, which catalyzes its dephosphorylation (22). The region of MAN1 responsible for the recruitment of both Smad2/3 and PPM1A is

conserved through all coelomates (38), suggesting that this novel mechanism of TGF- β signaling inactivation is shared by animals from flat worms to humans.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

Expression constructs for fragments of human MAN1 from amino acid 658 to amino acid 911 (MAN1C) and from amino acid 755 to amino acid 911 (MAN1Luhm) have been previously described (13). MAN1C was expressed as a 6His-ZZ-fusion protein, with a TEV site present between the ZZ and MAN1 region, and MAN1Luhm was expressed as a 6Histagged protein. A construct coding for the MAN1Luhm double mutant W765A-Q766A was generated using the QuickChange Kit (Stratagen). An expression construct for the fragment of MAN1 from amino acid 1 to amino acid 471 (MAN1N) was generated by synthesis of an optimized His-tagged MAN1 cDNA (Genscript) and insertion of this cDNA into pETM13-LIC vector (pETM13 expression vector modified in the laboratory for LIC cloning system). We also generated cDNA expression constructs in pETM10-LIC for fragments from amino acid 186 to amino acid 467 of human Smad2 (S2LMH2EEE) and from amino acid 167 to amino acid 425 of human Smad3 (S3LMH2EEE) containing the linker and the MH2 domains of the proteins. A nucleotide sequence changing SSMS to EEME was present in the primers used for cloning. Constructs coding for the Smad2 double mutants Y268A-W448A and Y366A-W368A were generated using the QuickChange Kit (Stratagen). We also generated a cDNA expression construct expressing the region human Smad4 from amino acid 273 to amino acid 552 (S4LMH2) in pETM10-LIC. An expression construct for human PPM1A was generated by synthesis of an optimized PPM1A cDNA (Genscript) and insertion into pETM13-LIC. Plasmid constructs expressing Myc-FAST1, Flag-Smad2, Myc-Smad2, Myc-Smad3, HA-Smad4, HA-TGFbRI for expression in 293T cells were provided by Celine Prunier (INSERM, Hopital Saint-Antoine) (39). The construct expressing Flagepitope tagged full-length MAN1 has been reported previously (5). For yeast two-hybrid assays, DNAs were generated by polymerase chain reactions and cloned into pGBKT7 and pACT2 (11, 13). Mutants were obtained using modified primers for PCR and after ligation in the pGBKT7 vector. All plasmid constructs were confirmed by DNA sequencing. Yeast two-hybrid assays were performed according to the instructions of the manufacturer (Clontech).

Protein expression and purification

Expression and purification of proteins used in previous studies were as described (13). The fragment of MAN1 from amino acid 1 to amino acid 471 (MAN1N), the Smad4 linker and MH2 domain construct (S4LMH2) and PPM1A were purified using a His trap column (GE Healthcare) and a gel filtration column (Superdex 200, Hi-Load, 120 mL, GE

Healthcare). Protein concentrations were estimated from their absorbance at 280 nm, assuming that the ϵ at 280 nm was equal to the theoretical ϵ value.

Size-exclusion chromatography

Size-exclusion chromatography was performed using a Superdex 200 HR column on an Akta Explore 10 FPLC (Pharmacia Biotech). The column was equilibrated at 4 °C with 100 mM Na₂HPO₄ (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 1 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine. Sample injection, elution and data analysis were performed using the UNICORN software (Pharmacia Biotech). The column was calibrated with molecular weight standards blue dextran (2,000 kDa), ferritin (440 kDa), albumin (67 kDa), chymotrypsin (25 kDa), ribonuclease (13 kDa) and vitamin B12 (1.36 kDa). The flow rate was 0.8 ml. min⁻¹ and the fraction volume was 0.6 ml.

ITC

Calorimetric titration experiments were performed as previously described (13). Purified FAST1 peptide was purchased from Genecust and dissolved in a buffer composed of 100 mM Na₂HPO₄ (pH 8.0), 150 mM NaCl and 1 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine. All experiments were performed at 20°C.

SAXS

SAXS samples were prepared in 100 mM Na₂HPO₄ (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 1 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine buffer. Synchrotron radiation X-ray scattering data were collected at 17°C on the SWING line at Synchrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette, France). We recorded SAXS data on S2LMH2EEE and the MAN1Luhm-S2LMH2EEE complex at 100 μ M, 50 μ M and 25 μ M concentrations for each sample. Models for the trimeric Smad2 region from amino acid 186 to amino acid 467 were calculated using CNS, based on the Xray structure of the MH2 domain of Smad2 (PDB code: 1KHX). We obtained 6,000 models in which the N-terminal region was in a random conformation. The theoretical SAXS curve was calculated for each of these models using CRY SOL (<http://www.emblhamburg.de/biosaxs/crysol.html>). Models for the Smad2-MAN1 complexes were similarly calculated, the structure of MAN1Luhm being consistent with previously described SAXS and NMR data (13). We obtained 12,000 models in which the N-terminal region of Smad2 was in a random conformation. The theoretical SAXS curve was calculated for each of these models using CRY SOL.

Immunoprecipitation and immunoblotting

293T cells were transfected with expression vectors by the Lipofectamine method and 48 h post-transfection were lysed at 4 °C in a 50 mM HEPES (pH 7.8), 500 mM NaCl, 5mM ethylenediaminetetraacetic acid, 3 mM dithiothreitol, 1% Nonidet P-40, 0.5 mM phenylmethanesulfonylfluoride buffer. In each experiment, a vector coding for β -galactosidase was systematically transfected, β -galactosidase activity was measured using the Galacto-StarTMSsystem kit (Applied BioSystems), and cell lysate aliquots containing identical β -galactosidase activities were analysed. For coimmunoprecipitation, these lysates were subjected to immunoprecipitation with the appropriate antibody followed by adsorption to Sepharose-coupled protein G over-night at 4°C. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting. For determination of total protein levels, aliquots of cell lysates were separated by SDS-PAGE and subjected to direct immunoblotting. Proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes and probed with the indicated primary antibody. Bands were visualized by an enhanced chemiluminescence detection system according to the manufacturer's instructions (ECL; Amersham Biosciences). Quantifications of western blots were carried out using the Image- J software.

NMR

¹⁵N-labeled samples of MAN1N, MAN1C, MAN1Luhm and PPM1A were obtained by cultivating E. coli BL21 (DE3) star (Invitrogen) in a minimal medium containing 0.5 g/l of ¹⁵NH₄Cl as the sole nitrogen source. Purification was carried out as described for unlabelled proteins, and the last gel filtration step was carried out in 50 mM Tris (pH 6.7), 150 mM NaCl, 1 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid. Proteins were concentrated to 400 mM in 100 ml using AMICON ULTRA-15 3KDa (Fisher) and were diluted in either 100 ml of buffer or 100 ml of buffer containing the unlabelled partner concentrated at 400 mM. Finally, 20 ml of D₂O was added to the samples so that the final sample volumes were 220 ml. ¹H-¹⁵N HSQC and TROSY NMR spectra were recorded at 20 °C on a 700 MHz Bruker spectrometer equipped with a TCI cryoProbe. They were analyzed using Topspin (Bruker) and Sparky (USCF) programs.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Schematic representation of all MAN1, Smad2, Smad3 and Smad4 constructs used in this study. MAN1 exhibits an N-terminal LEM motif (red), two transmembrane segments (gray), a WH domain (blue) and an UHM domain (yellow). Smad2 protein contains a MH1 domain (orange) and a MH2 domain (green). In the two-hybrid assays, binding of the MAN1 fragment from amino acid 731 to amino acid 910 to Smad2 was measured. Five Smad2 single mutants, four Smad2 double mutants (each pair of amino acid substitutions represented by the same color) and a single Smad2 triple-mutant (SSMS to EEME) were tested. In gel filtration, ITC, NMR and SAXS experiments, three different MAN1 fragments (MAN1N, MAN1C and MAN1Luhm), one mutant Smad2 fragment (S2LMH2EEE), one mutant Smad3 fragment and one Smad4 fragment (S4LMH2) were used.

Fig 2. Smad2 MH2 domain residues W366 and Y368 are involved in MAN1 binding. (A) Yeast two-hybrid assay results for binding of the MAN1 fragment from amino acid 730 to amino acid 910 to full-length Smad2 variants. In the top panel, protein-coding or empty vectors were used to transform yeast for the indicated control experiments. In the bottom panel, results for interactions between the MAN1 fragment and the indicated wild type and mutant Smad2 constructs are shown. In both panels, cells containing the different plasmids were spotted four times using 10-fold serial dilutions onto SD2A plates containing 10 mM 3-aminotriazole and incubated at 30 °C for 3 days. Physical interaction between a Smad2 variant and the Man1 fragment activated expression of HIS3 gene allowing yeast cell growth (light gray on black background). Only Smad2 with the amino acid substitutions Y366A-W368A showed hindered cell growth. (B) Chromatography elution profiles of the two Smad2 fragments S2LMH2EEE (light gray) and S2LMH2EEE W366A-Y368A (dark gray). (C) Binding curves obtained by ITC for MAN1 from amino acid 755 to amino acid 911 (MAN1Luhm) added to a phosphomimetic mutant of the MH2 domain of Smad2 (S2LMH2EEE, upper left), its Y268A-W448A mutant (upper right), and its Y366AW388A mutant (lower view). Concentrations of the MAN1 fragments in the 280 ml syringe were 350, 950 and 850 mM, respectively. Concentrations of the Smad2 fragments in the 2 ml sample cell were 35, 90 and 80 mM, respectively. Fitting these curves yielded K_d values of 1.4 +/- 0.1 μM, 1.4 +/- 0.1 μM and 33.4 +/- 0.8 μM, respectively (Table 1).

Fig. 3. Models of the phosphomimetic Smad2 fragment from amino acid 186 to amino acid 467 (S2LMH2EEE) either (A) free or (B) in complex with the MAN1 fragment from amino

acid 755 to amino acid 911 (MAN1Luhm) obtained from SAXS data. In each panel, 20 models of the trimeric Smad2 fragment are superimposed (each monomer is colored in the same shade of blue). In panel B, a MAN1 fragment is bound to each Smad2 fragment (each MAN1 fragment is yellow, orange and red, respectively). Under the 3D models are curves showing the corresponding fit between the calculated SAXS intensity averaged on the 20 models (red) and the experimental SAXS intensity (blue). The difference between these two intensities divided by the error on the experimental intensity is also plotted as a function of the diffusion vector amplitude. In both panels, this difference is regularly 25 distributed around 0 on the whole q interval, as expected for a random noise-like signal. The mean chi score is 1.78 for free Smad2 and 1.23 for the Smad2-MAN1 complex, showing that the deviations between calculated and experimental intensities are close to the experimental error.

Fig. 4. Overexpression of MAN1 leads to partial Smad2-FAST1 complex dissociation. (A) Binding curve obtained by ITC when 280 μ l of MAN1Luhm at 970 μ M was added to 2 μ l of S2LMH2EEE at 50 μ M bound to the Smad interacting motif peptide of FAST1 at 140 μ M. Fitting this curve yielded a K_d value of 9.5 \pm 0.4 μ M. This apparent K_d value strongly depends on the protein and peptide concentrations. It can be explained by the seven-times lower affinity of the FAST1 peptide for S2LMH2EEE, as compared to the affinity of MAN1Luhm for this same S2LMH2EEE fragment (Suppl. Figure 3). (B) Immunoblot showing the amount of FAST1-bound Smad2 in 293T cells transfected with plasmids expressing Flag-Smad2, Myc-FAST1, Flag-MAN1 and HA-tagged constitutively active receptor TGF- β RI as indicated above the blot. Smad2 that associated with FAST1 was isolated by immunoprecipitation (IP: Myc) with anti-Myc antibodies and detected by immunoblotting with anti-Flag antibodies (IB: Flag; top panel). The levels of epitopetagged MAN1, Smad2, FAST1 and TGF- β RI proteins in cell lysates were analyzed by immunoblotting using the appropriate antibodies (IB: Myc; IB: Flag; IB: HA) as indicated (bottom four panels). The histograms show the amounts of FAST1-bound Smad2 detected by immunoblot in cells overexpressing neither MAN1 nor TGF- β RI (MAN1FL-R-), only TGF- β RI (MAN1FL-R+), only MAN1 (MAN1FL+R-) and both MAN1 and TGF- β RI (MAN1FL+R+).

Fig. 5. MAN1 fragment from amino acid 755 to amino acid 911 (MAN1Luhm) interacts with active phosphomimetic Smad2 or Smad3 fragments (S2LMH2EEE and S3LMH2EEE) complexed to a homologous Smad4 fragment (S4LMH2). (A) Size exclusion chromatography analysis of the interaction between MAN1Luhm and/or a phosphomimetic triple mutant of

the Smad2 MH2 domain (S2LMH2EEE) and/or the Smad 4 MH2 domain (S4LMH2). Samples were mixed at equal molar ratios and the mixtures were loaded on the size exclusion column. The eluted fractions were then separated on a denaturing gel and stained with Coomassie blue. The top gel shows result for the S2LMH2EEE, S4LMH2 and MAN1Luhm mixture, the second for S2LMH2EEE and MAN1Luhm, the third for S2LMH2EEE and S4LMH2 and the fourth for S4LMH2 and MAN1Luhm. The bottom three gels show results for to S4LMH2, MAN1Luhm and S2LMH2EEE alone, respectively. (B) Binding curves obtained by ITC when 280 ml of MAN1Luhm at 800 mM was added to 2 ml of S2LMH2EEE at 65 mM, alone or in complex with S4LMH2, at 130 mM. Fitting these curves yielded Kd values of 1.4 +/- 0.1 μ M and 1.3 +/- 0.1 μ M, respectively (Table 1). (C) Size exclusion chromatography analysis of the interaction between MAN1Luhm and/or a phosphomimetic triple mutant of the Smad3 MH2 domain (S3LMH2EEE) and/or the MH2 of Smad4 (S4LMH2). Eluted fractions were separated on a denaturing gel and stained with Coomassie blue. The top gel shows results for the S3LMH2EEE, S4LMH2 and MAN1Luhm mixture, the second for S3LMH2EEE and MAN1Luhm and the third for S3LMH2EEE and S4LMH2. The bottom three gels show results for S3LMH2EEE, S4LMH2 and MAN1Luhm alone, respectively. (D) Binding curves obtained by ITC when 280 ml of MAN1Luhm at 800 mM was added to 2 ml of S3LMH2EEE at 85 mM, alone or in complex with S4LMH2 at 170 mM. Fitting these curves yielded Kd values of 1.7 +/- 0.1 μ M and 1.8 +/- 0.1 μ M, respectively (Table 1).

Fig. 6. Overexpression of MAN1 leads to partial dissociation of Smad2/Smad4 and Smad3/Smad4 complexes and to Smad2/3 dephosphorylation. (A-B) Detection of the amount of Smad2/3-bound Smad4 in 293T cells transfected with plasmids expressing HASmad2 or HA-Smad3, Myc-Smad4, FLAG-MAN1 and HA-tagged constitutively active receptor TGF- β RI as indicated above the blot. HA-Smad4 associated with Myc-Smad2 or Myc-Smad3 was isolated by immunoprecipitation (IP: Myc) with anti-Myc antibodies and detected by immunoblotting with anti-HA antibodies (IB: HA; top panel). The amount of immunoprecipitated Myc-Smad2 or Myc-Smad3 (IP: Myc) was detected using anti-Myc antibodies and is displayed in the second panel. The levels of MAN1, Myc-Smad2 or Myc-Smad3, HA-Smad4 and HA-TGF- β RI proteins in cell lysates were analyzed by immunoblotting using the appropriate antibodies (IB: Myc; IB: Flag; IB: HA) as indicated (bottom four panels). The histograms show the amounts of detected Myc-Smad2-bound HA-Smad4 and Myc-Smad3-bound HA-Smad4, normalized using the amount of

immunoprecipitated Myc-Smad2 or Myc-Smad3, in cells overexpressing neither MAN1 nor TGF- β RI (MAN1FL-R-), only TGF- β RI (MAN1FL-R+), only MAN1 (MAN1FL+R-) and both MAN1 and TGF- β RI (MAN1FL+R+). In panel A, endogenous MAN1 is detected together with Flag-MAN1 using a specific anti-MAN1 antibody. In panel B, the high transfection yield allowed unique detection of Flag-MAN1FL using a specific anti-Flag antibody. (C-D) Detection of the amount of phosphorylated Myc-Smad2 or Myc-Smad3 in 293T cells transfected with plasmids expressing Myc-Smad2 or Myc-Smad3 in the presence of increasing concentration of FLAG-MAN1 (+ and ++) with or without the constitutively active receptor HA-TGF- β RI. The levels of total Myc-Smad2 or Myc-Smad3, phosphorylated Myc-Smad2 or Myc-Smad3 (the detected phosphorylations are located at Smad C-termini), Flag-MAN1 and HA-TGF- β RI proteins in cell lysates were analyzed by immunoblotting using the appropriate antibodies as indicated (bottom three panels). The histograms recapitulate the amount of detected phosphorylated Myc-Smad2 and Myc-Smad3, normalized using the amount of immunoprecipitated Myc-Smad2 or Myc-Smad3, in cells overexpressing neither MAN1 nor TGF- β RI (MAN1FL-R-), only TGF- β RI (MAN1FL-R+), only MAN1 (MAN1FL+R- and MAN1FL++R-) and both MAN1 and TGF- β RI (MAN1FL+R+ and MAN1FL++R+). In the case of Smad2, when HA-TGF- β RI is overexpressed, the level of phosphorylated Smad2 is so high that it is not regulated by MAN1 (bars indicated by stars). However, without HA-TGF- β RI overexpression in the case of Smad2 and with HA-TGF- β RI overexpression in the case of Smad3, the level of phosphorylated Smad decreases when MAN1 is overexpressed.

Fig. 7. PPM1A binds to the C-terminal domain of MAN1. 1H-15N 2D NMR spectra were recorded on 1:0 and 1:1 ratio samples of a 15N-labeled protein and its unlabelled partner. (A) HSQC spectrum of 15N-labeled fragment of MAN1 from amino acid 1 to amino acid 471 (MAN1N) with (red) or without (blue) added PPM1A. (B) HSQC spectrum of 15N-labeled fragment of MAN1 from amino acid 658 to amino acid 911 (MAN1C) with (red) or without (blue) added PPM1A. (C) TROSY spectrum of 15N-labeled PPM1A with (red) or without (blue) addition of the MAN1 fragment from amino acid 1 to amino acid 471 (MAN1N). (D) TROSY spectrum of 15N-labeled PPM1A with (red) or without (blue) addition of the MAN1 fragment from amino acid 658 to amino acid 911 (MAN1C). (E) TROSY spectrum of 15N-labeled PPM1A with (red) or without (blue) addition of the MAN1 fragment from amino acid 755 to amino acid 911 (MAN1Luhm).

Figure 1: Schematic representation of all MAN1, Smad2, Smad3 and Smad4 constructs used in this study.

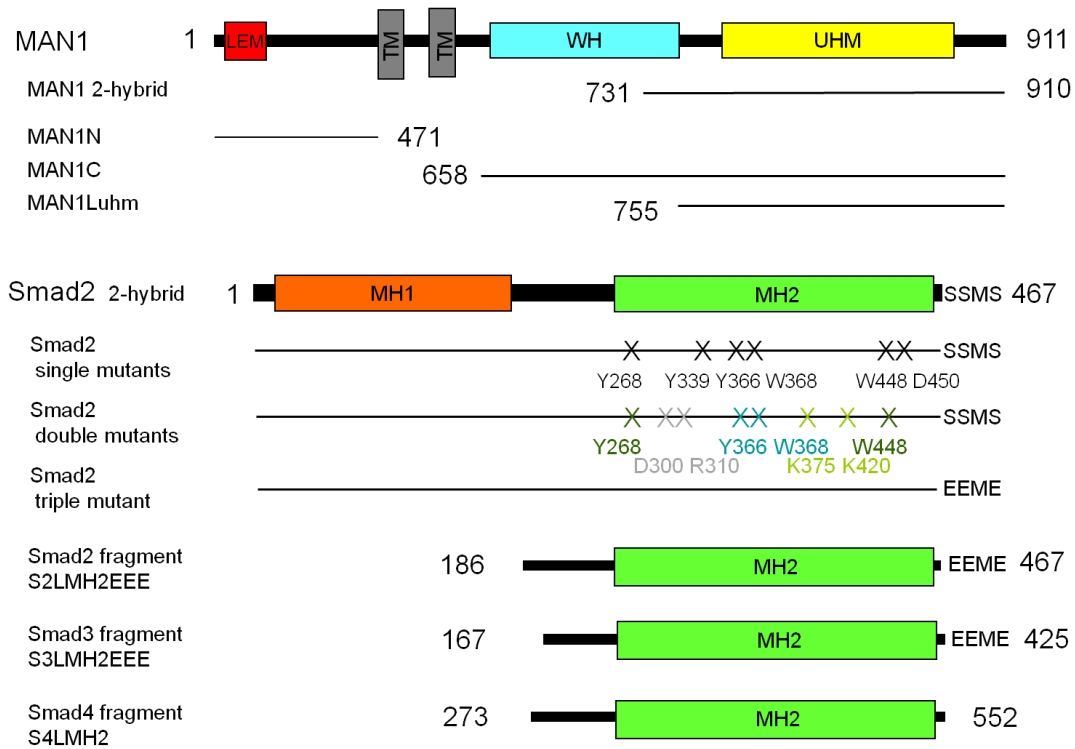


Figure2: Smad2 MH2 domain residues W366 and Y368 are involved in MAN1 binding.

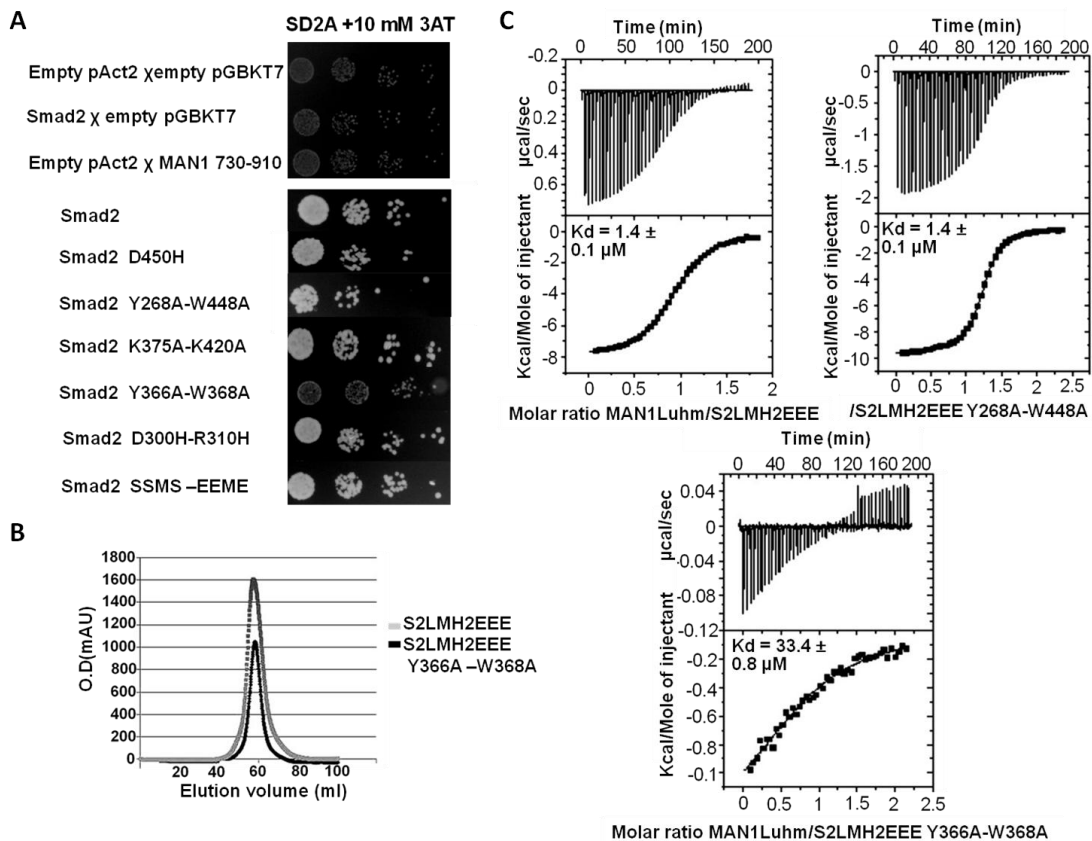


Figure 3: Models of the phosphomimetic Smad2 fragment from amino acid 186 to amino acid 467 (S2LMH2EEE) either (A) free or (B) in complex with the MAN1 fragment from amino acid 755 to amino acid 911 (MAN1Luhm) obtained from SAXS data.

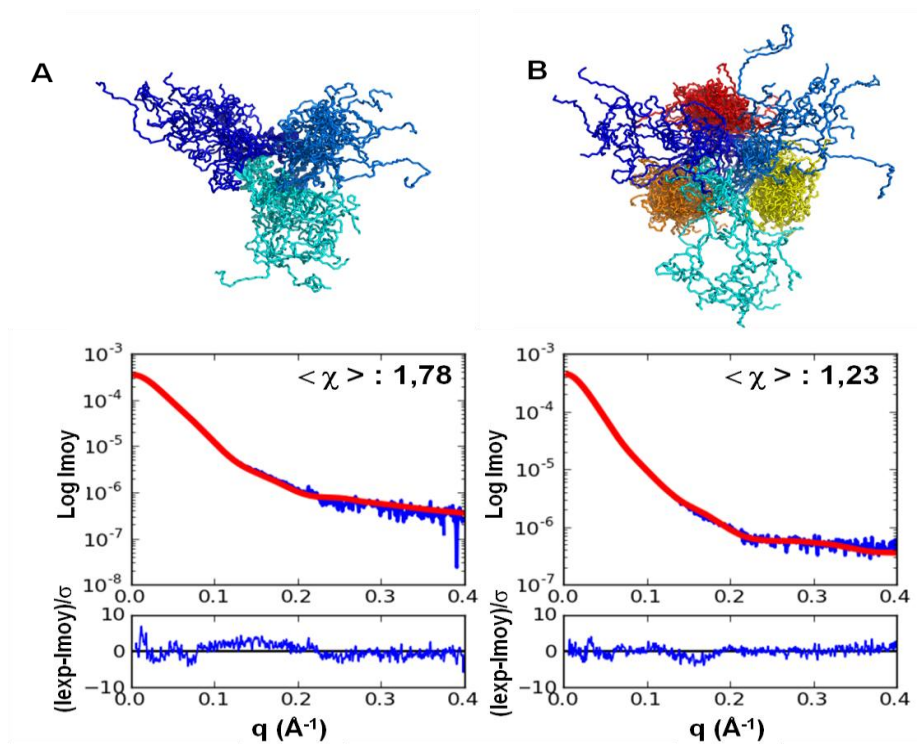


Figure 4: Overexpression of MAN1 leads to partial Smad2-FAST1 complex dissociation

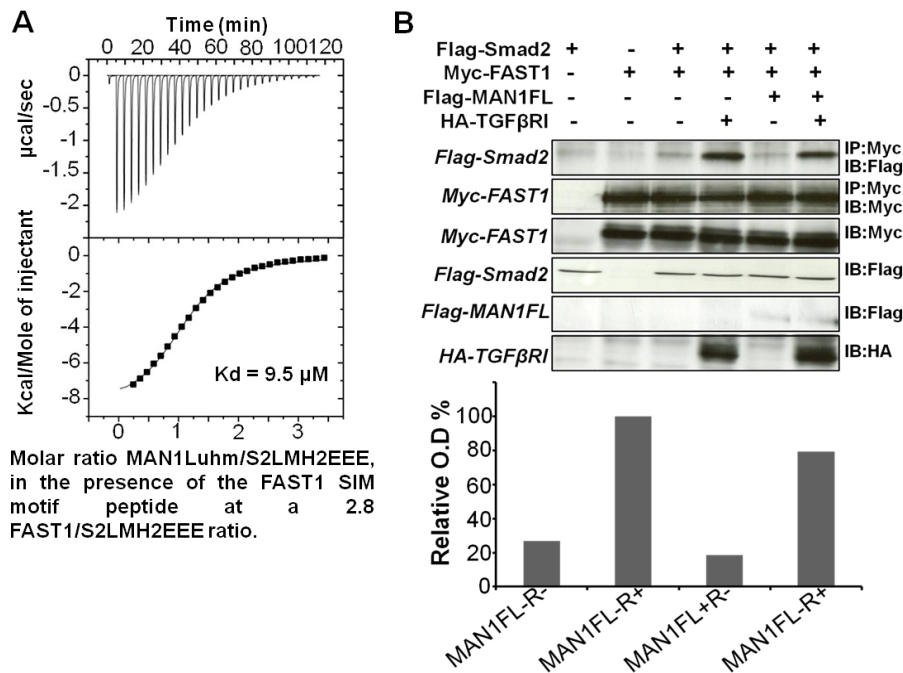


Figure 5: MAN1 fragment from amino acid 755 to amino acid 911 (MANLuhm) interacts with active phosphomimetic Smad2 or Smad3 fragments (S2LMH2EEE and S3LMH2EEE) complexed to a homologous Smad4 fragment (S4LMH2).

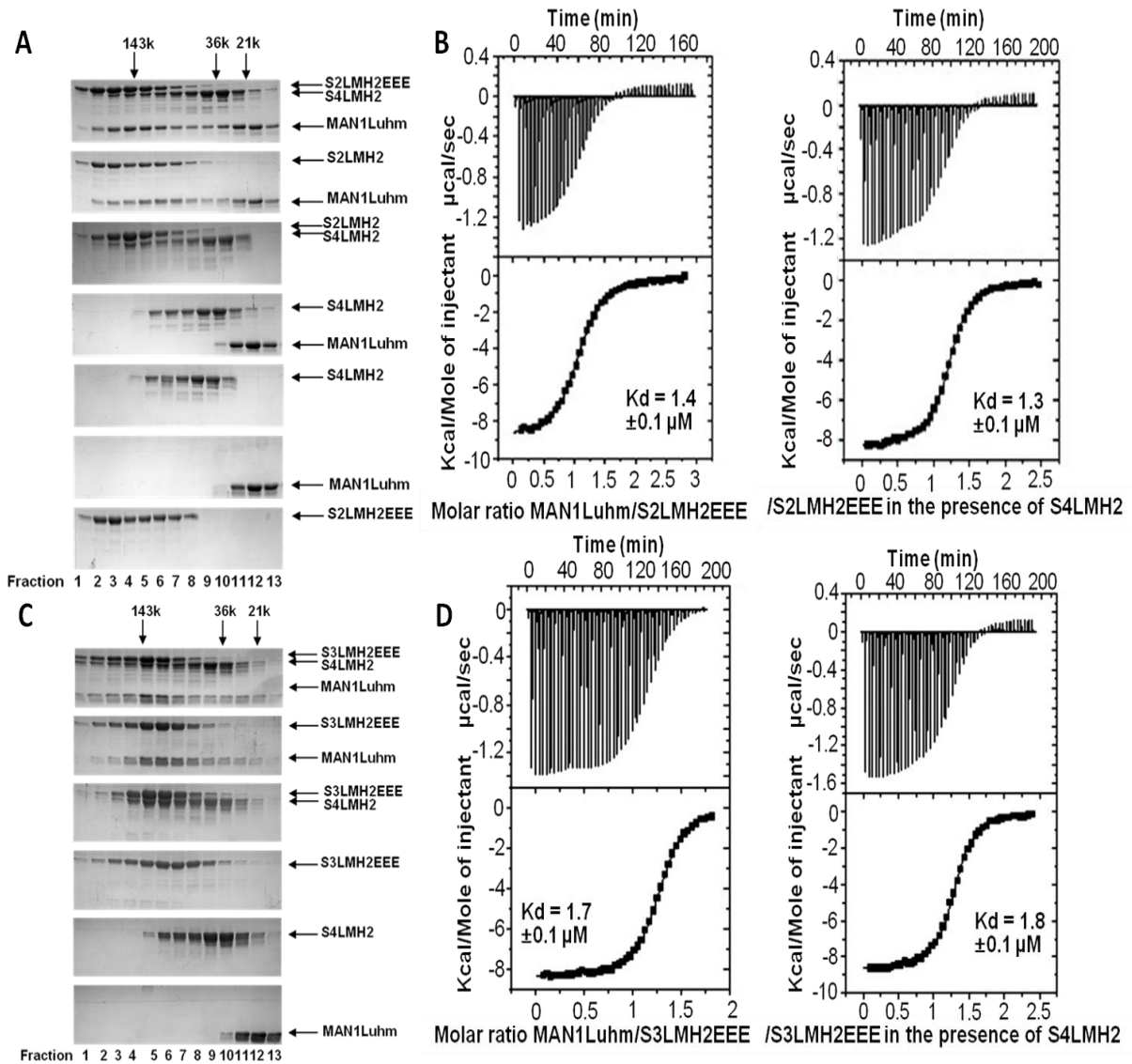


Figure 6: overexpression of MAN1 leads to partial dissociation of Smad2/Smad4 and Smad3/Smad4 complexes and to Smad2/3 dephosphorylation.

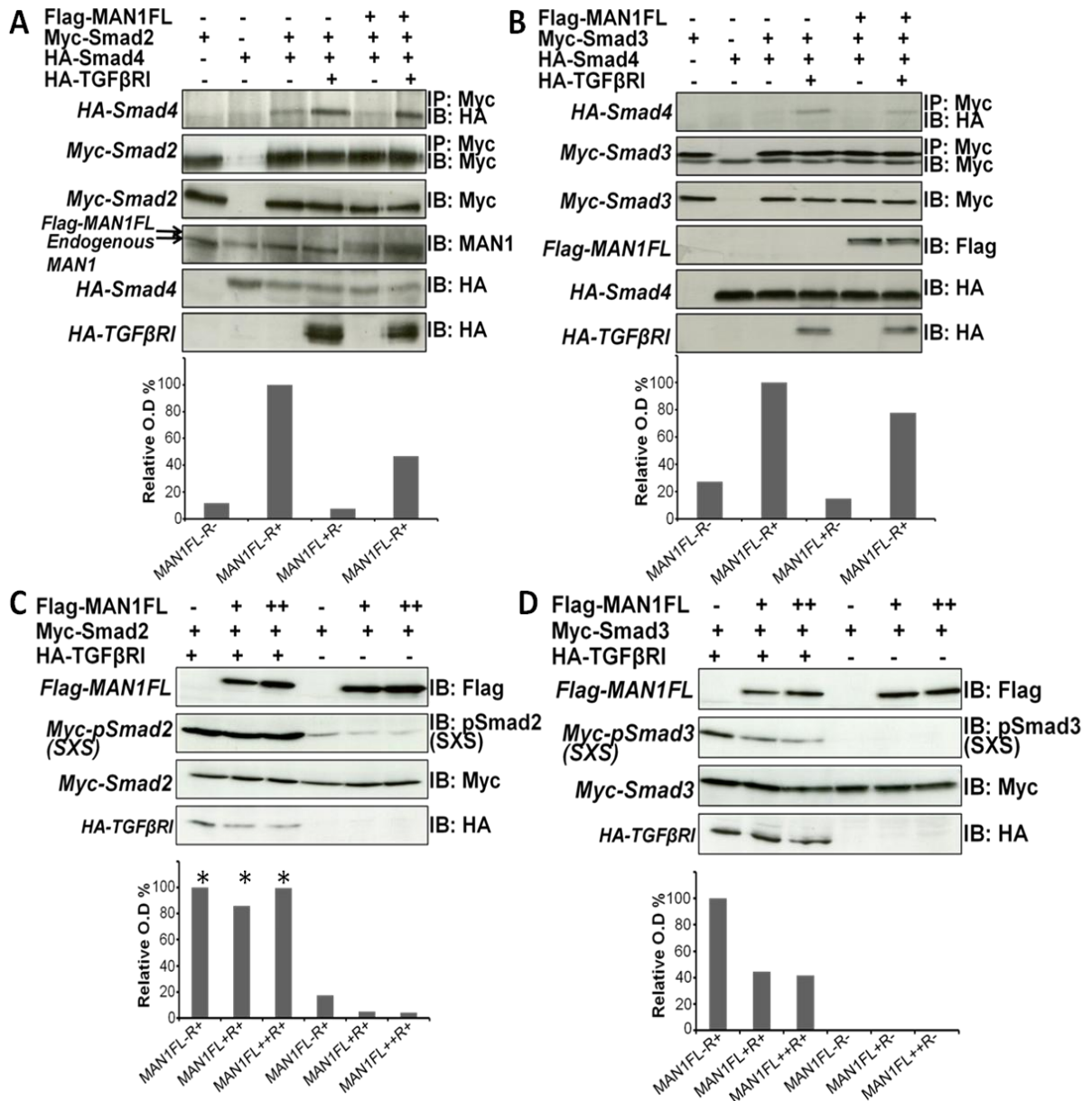


Figure 7: PPM1A binds to the C-terminal domain of MAN1.

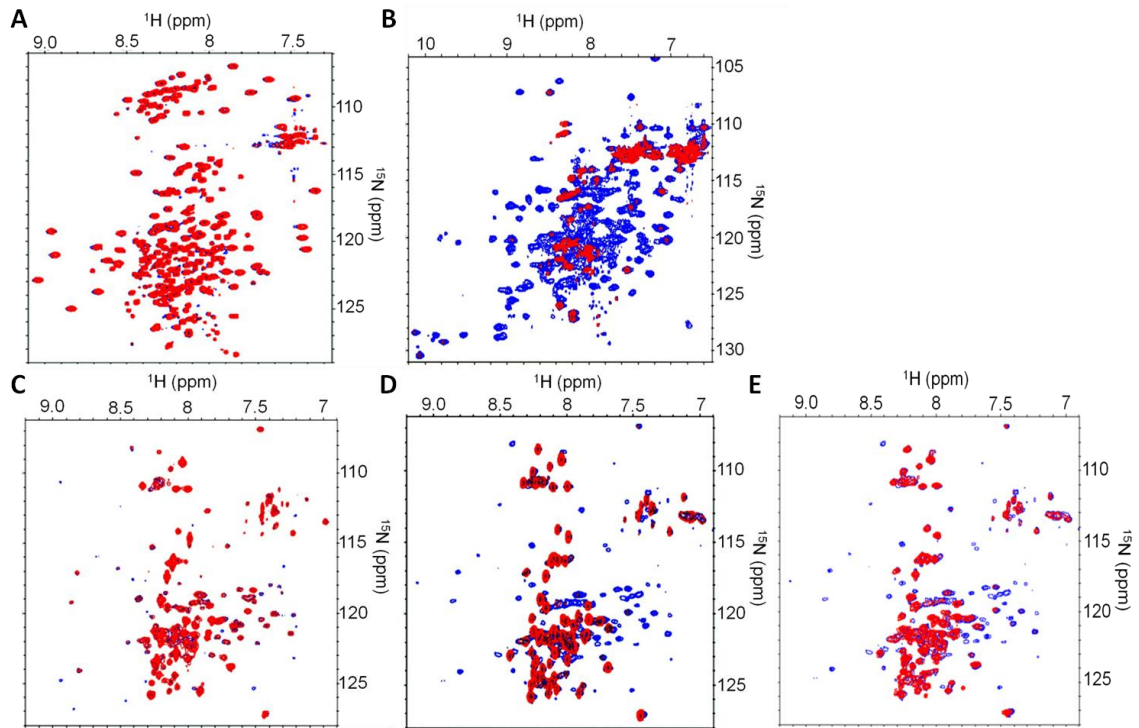


Figure 1S: Yeast two-hybrid assay results for the interactions between Smad2 mutants and MAN1 730-910.

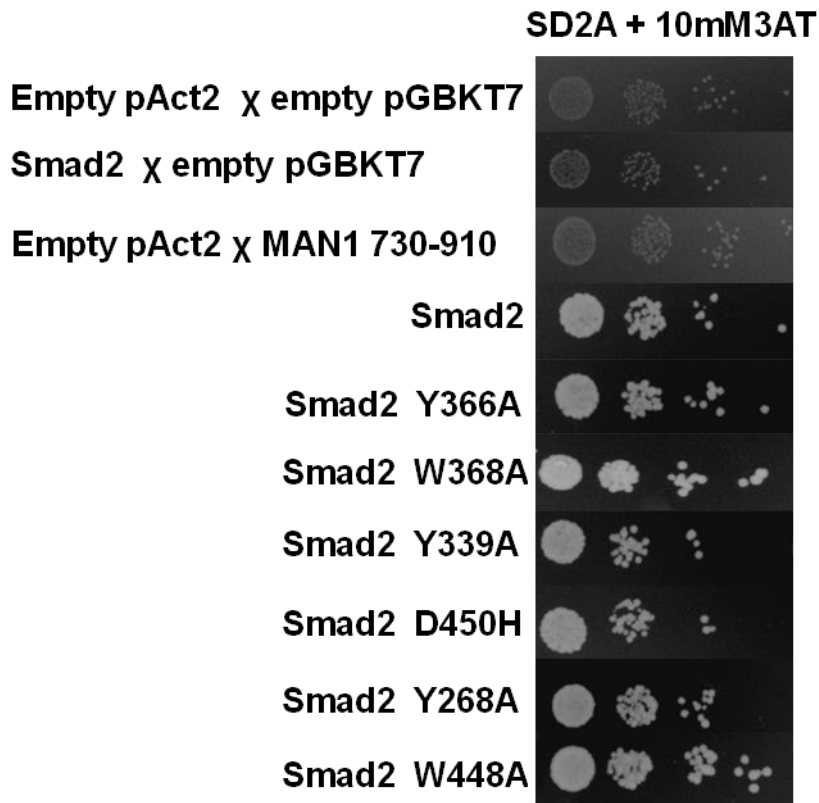


Figure 2S: Binding curve obtained by ITC for MAN1 from amino acid 755 to amino acid 911 (MAN1Luhm) with mutations W765-Q766A added to a phosphomimetic mutant of the MH2 domain of Smad (S2LMH2EEE).

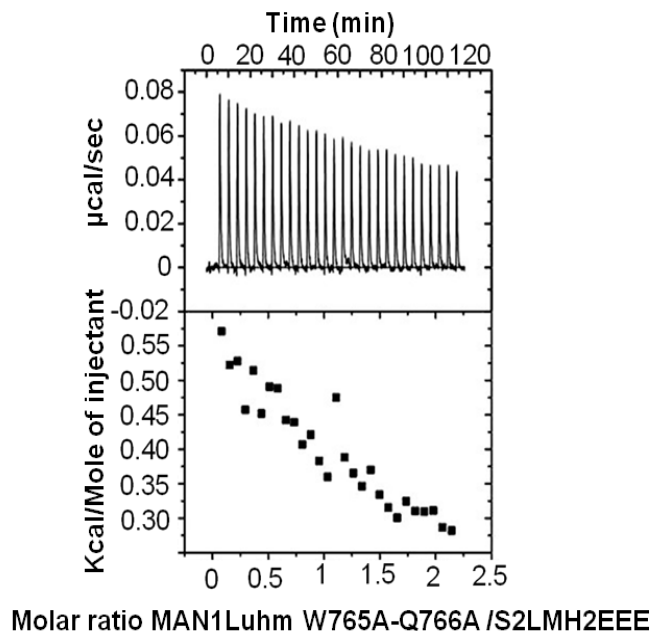
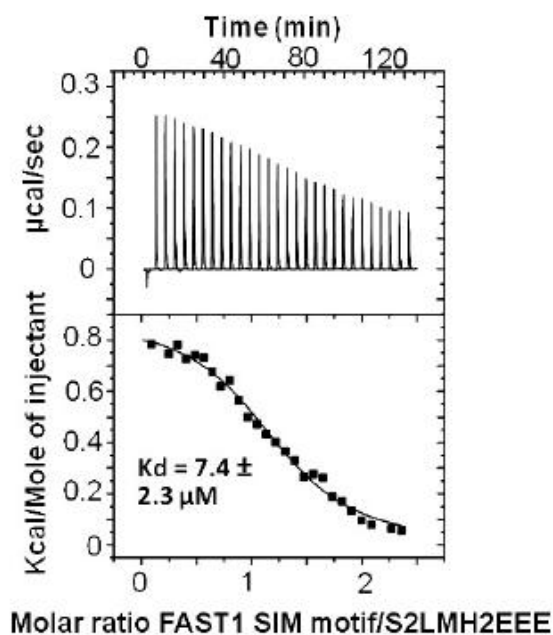


Figure 3S: Binding curve obtained by ITC for FAST1 peptide LDALFQGVPPNKSIVVWVSHPRDL added to a phosphomimetic mutant of the MH2 domain of Smad2 (S2LMH2EEE).



REFERENCES AND NOTES

1. W. T. Dauer and H. J. Worman. The nuclear envelope as a signaling node in development and disease. *Dev Cell* 17: 626-38 (2009).
2. H. J. Worman and G. Bonne. "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res* 313: 2121-33 (2007).
3. V. Andres and J. M. Gonzalez. Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J Cell Biol* 187: 945-57 (2009).
4. A. Barascu, C. Le Chalony, G. Pennarun, D. Genet, N. Imam, B. Lopez, and P. Bertrand. Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *Embo J* 31: 1080-94 (2012).
5. F. Lin, D. L. Blake, I. Callebaut, I. S. Skerjanc, L. Holmer, M. W. McBurney, M. Paulin-Levasseur, and H. J. Worman. MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem* 275: 4840-7 (2000).
6. C. Laguri, B. Gilquin, N. Wolff, R. Romi-Lebrun, K. Courchay, I. Callebaut, H. J. Worman, and S. Zinn-Justin. Structural characterization of the LEM motif common to three human inner nuclear membrane proteins. *Structure* 9: 503-11 (2001).
7. M. Cai, Y. Huang, R. Ghirlando, K. L. Wilson, R. Craigie, and G. M. Clore. Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *Embo J* 20: 4399-407 (2001).
8. G. P. Raju, N. Dimova, P. S. Klein, and H. C. Huang. SANE, a novel LEM domain protein, regulates bone morphogenetic protein signaling through interaction with Smad1. *J Biol Chem* 278: 428-37 (2003).
9. S. Osada, S. Y. Ohmori, and M. Taira. XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in *Xenopus* embryos. *Development* 130: 1783-94 (2003).
10. J. Hellemans, O. Preobrazhenska, A. Willaert, P. Debeer, P. C. Verdonk, T. Costa, K. Janssens, B. Menten, N. Van Roy, S. J. Vermeulen, R. Savarirayan, W. Van Hul, F. Vanhoenacker, D. Huylebroeck, A. De Paepe, J. M. Naeyaert, J. Vandesompele, F. Speleman, K. Verschueren, P. J. Coucke, and G. R. Mortier. Loss-of-function mutations in LEMD3

result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nat Genet* 36: 1213-8 (2004).

11. F. Lin, J. M. Morrison, W. Wu, and H. J. Worman. MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Hum Mol Genet* 14: 437-45 (2005).

12. D. Pan, L. D. Estevez-Salmeron, S. L. Stroschein, X. Zhu, J. He, S. Zhou, and K. Luo. The integral inner nuclear membrane protein MAN1 physically interacts with the R-Smad proteins to repress signaling by the transforming growth factor- β superfamily of cytokines. *J Biol Chem* 280: 15992-6001 (2005).

13. E. Konde, B. Bourgeois, C. Tellier-Lebegue, W. Wu, J. Perez, S. Caputo, W. Attanda, S. Gasparini, J. B. Charbonnier, B. Gilquin, H. J. Worman, and S. Zinn-Justin. Structural analysis of the Smad2-MAN1 interaction that regulates transforming growth factor-beta signaling at the inner nuclear membrane. *Biochemistry* 49: 8020-32 (2010).

14. J. Massague, J. Seoane, and D. Wotton. Smad transcription factors. *Genes Dev* 19: 2783-810 (2005).

15. A. Nakao, M. Afrakhte, A. Moren, T. Nakayama, J. L. Christian, R. Heuchel, S. Itoh, M. Kawabata, N. E. Heldin, C. H. Heldin, and P. ten Dijke. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signaling. *Nature* 389: 631-5 (1997).

16. T. Imamura, M. Takase, A. Nishihara, E. Oeda, J. Hanai, M. Kawabata, and K. Miyazono. Smad6 inhibits signaling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389: 622-6 (1997).

17. A. Ishimura, J. K. Ng, M. Taira, S. G. Young, and S. Osada. Man1, an inner nuclear membrane protein, regulates vascular remodeling by modulating transforming growth factor beta signaling. *Development* 133: 3919-28 (2006).

18. T. V. Cohen, O. Kosti, and C. L. Stewart. The nuclear envelope protein MAN1 regulates TGFbeta signaling and vasculogenesis in the embryonic yolk sac. *Development* 134: 1385-95 (2007).

19. A. Ishimura, S. Chida, and S. Osada. Man1, an inner nuclear membrane protein, regulates left-right axis formation by controlling nodal signaling in a nodeindependent manner. *Dev Dyn* 237: 3565-76 (2008).

20. B. S. Pinto, S. R. Wilmington, E. E. Hornick, L. L. Wallrath, and P. K. Geyer. Tissue-specific defects are caused by loss of the *Drosophila* MAN1 LEM domain protein. *Genetics* 180: 133-45 (2008).
21. M. D. Huber, T. Guan, and L. Gerace. Overlapping functions of nuclear envelope proteins NET25 (Lem2) and emerin in regulation of extracellular signal-regulated kinase signaling in myoblast differentiation. *Mol Cell Biol* 29: 5718-28 (2009).
22. C. Asencio, I. F. Davidson, R. Santarella-Mellwig, T. B. Nga Ly-Hartig, M. Mall, M. R. Wallenfang, I. W. Mattaj, and M. Gorjanacz. Coordination of Kinase and Phosphatase Activities by Lem4 Enables Nuclear Envelope Reassembly during Mitosis. *Cell* 150: 122-135 (2012).
23. J. W. Wu, M. Hu, J. Chai, J. Seoane, M. Huse, C. Li, D. J. Rigotti, S. Kyin, T. W. Muir, R. Fairman, J. Massague, and Y. Shi. Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol Cell* 8: 1277-89 (2001).
24. G. Wu, Y. G. Chen, B. Ozdamar, C. A. Gyuricza, P. A. Chong, J. L. Wrana, J. Massague, and Y. Shi. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* 287: 92-7 (2000).
25. R. A. Randall, M. Howell, C. S. Page, A. Daly, P. A. Bates, and C. S. Hill. Recognition of phosphorylated-Smad2-containing complexes by a novel Smad interaction motif. *Mol Cell Biol* 24: 1106-21 (2004).
26. R. A. Randall, S. Germain, G. J. Inman, P. A. Bates, and C. S. Hill. Different Smad2 partners bind a common hydrophobic pocket in Smad2 via a defined prolinerich motif. *Embo J* 21: 145-56 (2002).
27. B. M. Chacko, B. Qin, J. J. Correia, S. S. Lam, M. P. de Caestecker, and K. Lin. The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nat Struct Biol* 8: 248-53 (2001).
28. D. I. Svergun, C. Barberato, and M. H. J. Koch. CRYSOLE - a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *J Appl Cryst* 28: 768-773 (1995).

29. X. Chen, M. J. Rubock, and M. Whitman. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signaling. *Nature* 383: 691-6 (1996).
30. L. Attisano, C. Silvestri, L. Izzi, and E. Labbe. The transcriptional role of Smads and FAST (FoxH1) in TGFbeta and activin signaling. *Mol Cell Endocrinol* 180: 3-11 (2001).
31. Y. G. Chen, A. Hata, R. S. Lo, D. Wotton, Y. Shi, N. Pavletich, and J. Massague. Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* 12: 2144- 52 (1998).
32. S. Germain, M. Howell, G. M. Esslemont, and C. S. Hill. Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes Dev* 14: 435-51 (2000).
33. B. M. Chacko, B. Y. Qin, A. Tiwari, G. Shi, S. Lam, L. J. Hayward, M. De Caestecker, and K. Lin. Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Mol Cell* 15: 813-23 (2004).
34. X. Lin, X. Duan, Y. Y. Liang, Y. Su, K. H. Wrighton, J. Long, M. Hu, C. M. Davis, J. Wang, F. C. Brunicardi, Y. Shi, Y. G. Chen, A. Meng, and X. H. Feng. PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* 125: 915-28 (2006).
35. B. Y. Qin, S. S. Lam, J. J. Correia, and K. Lin. Smad3 allostery links TGF-beta receptor kinase activation to transcriptional control. *Genes Dev* 16: 1950-63(2002).

BIBLIOGRAPHIE

Aarhus M, Bruland O, Bredholt G, Lybaek H, Husebye ES, Krossnes BK *et al* (2008). Microarray analysis reveals down-regulation of the tumour suppressor gene WWOX and up-regulation of the oncogene TYMS in intracranial sporadic meningiomas. *J Neurooncol* **88**: 251-259.

Adachi S, Jigami T, Yasui T, Nakano T, Ohwada S, Omori Y *et al* (2004). Role of a BCL9-related beta-catenin-binding protein, B9L, in tumorigenesis induced by aberrant activation of Wnt signaling. *Cancer research* **64**: 8496-8501.

Aderca I, Moser CD, Veerasamy M, Bani-Hani AH, Bonilla-Guerrero R, Ahmed K *et al* (2008). The JNK inhibitor SP600129 enhances apoptosis of HCC cells induced by the tumor suppressor WWOX. *J Hepatol* **49**: 373-383.

Aldaz CM, Chen T, Sahin A, Cunningham J, Bondy M (1995). Comparative allelotype of in situ and invasive human breast cancer: high frequency of microsatellite instability in lobular breast carcinomas. *Cancer research* **55**: 3976-3981.

Aldaz CM, Liao QY, Paladugu A, Rehm S, Wang H (1996). Allelotypic and cytogenetic characterization of chemically induced mouse mammary tumors: high frequency of chromosome 4 loss of heterozygosity at advanced stages of progression. *Mol Carcinog* **17**: 126-133.

Alexander CM, Goel S, Fakhraldeen SA, Kim S (2012). Wnt Signaling in Mammary Glands: Plastic Cell Fates and Combinatorial Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.

Andres V, Gonzalez JM (2009). Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *The Journal of cell biology* **187**: 945-957.

Aqeilan RI, Kuroki T, Pekarsky Y, Albagha O, Trapasso F, Baffa R *et al* (2004a). Loss of WWOX expression in gastric carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 3053-3058.

Aqeilan RI, Palamarchuk A, Weigel RJ, Herrero JJ, Pekarsky Y, Croce CM (2004b). Physical and functional interactions between the Wwox tumor suppressor protein and the AP-2gamma transcription factor. *Cancer research* **64**: 8256-8261.

Aqeilan RI, Pekarsky Y, Herrero JJ, Palamarchuk A, Letofsky J, Druck T *et al* (2004c). Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 4401-4406.

Aqeilan RI, Donati V, Palamarchuk A, Trapasso F, Kaou M, Pekarsky Y *et al* (2005). WW domain-containing proteins, WWOX and YAP, compete for interaction with ErbB-4 and modulate its transcriptional function. *Cancer research* **65**: 6764-6772.

Aqeilan RI, Croce CM (2007). WWOX in biological control and tumorigenesis. *Journal of cellular physiology* **212**: 307-310.

Aqeilan RI, Donati V, Gaudio E, Nicoloso MS, Sundvall M, Korhonen A *et al* (2007a). Association of Wwox with ErbB4 in breast cancer. *Cancer research* **67**: 9330-9336.

Aqeilan RI, Trapasso F, Hussain S, Costinean S, Marshall D, Pekarsky Y *et al* (2007b). Targeted deletion of Wwox reveals a tumor suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 3949-3954.

Aqeilan RI, Hassan MQ, de Bruin A, Hagan JP, Volinia S, Palumbo T *et al* (2008). The WWOX tumor suppressor is essential for postnatal survival and normal bone metabolism. *The Journal of biological chemistry* **283**: 21629-21639.

Attisano L, Silvestri C, Izzi L, Labbe E (2001). The transcriptional role of Smads and FAST (FoxH1) in TGFbeta and activin signalling. *Molecular and cellular endocrinology* **180**: 3-11.

Barascu A, Le Chalony C, Pennarun G, Genet D, Imam N, Lopez B *et al* (2012). Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J* **31**: 1080-1094.

Bedford MT, Reed R, Leder P (1998). WW domain-mediated interactions reveal a spliceosome-associated protein that binds a third class of proline-rich motif: the proline glycine and methionine-rich motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 10602-10607.

Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM (2000). WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer research* **60**: 2140-2145.

Bednarek AK, Keck-Waggoner CL, Daniel RL, Laflin KJ, Bergsagel PL, Kiguchi K *et al* (2001). WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer research* **61**: 8068-8073.

Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R *et al* (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**: 638-642.

Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, MacKinnon RN, Roche A, Flint TJ *et al* (1991). Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell* **64**: 861-866.

Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J *et al* (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**: 899-905.

Billin AN, Thirlwell H, Ayer DE (2000). Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator. *Molecular and cellular biology* **20**: 6882-6890.

Bloomston M, Kneile J, Butterfield M, Dillhoff M, Muscarella P, Ellison EC *et al* (2009). Coordinate loss of fragile gene expression in pancreatobiliary cancers: correlations among markers and clinical features. *Ann Surg Oncol* **16**: 2331-2338.

Boldog F, Gemmill RM, West J, Robinson M, Robinson L, Li E *et al* (1997). Chromosome 3p14 homozygous deletions and sequence analysis of FRA3B. *Hum Mol Genet* **6**: 193-203.

Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA *et al* (2002). High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *The New England journal of medicine* **346**: 1513-1521.

Brack AS, Murphy-Seiler F, Hanifi J, Deka J, Eyckerman S, Keller C *et al* (2009). BCL9 is an essential component of canonical Wnt signaling that mediates the differentiation of myogenic progenitors during muscle regeneration. *Developmental biology* **335**: 93-105.

Brantjes H, Roose J, van De Wetering M, Clevers H (2001). All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic acids research* **29**: 1410-1419.

Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W (2004). Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* **18**: 2225-2230.

Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Current opinion in genetics & development* **16**: 51-59.

Brembeck FH, Wiese M, Zatula N, Grigoryan T, Dai Y, Fritzmann J *et al* (2011). BCL9-2 promotes early stages of intestinal tumor progression. *Gastroenterology* **141**: 1359-1370, 1370 e1351-1353.

Brinton LA, Schairer C, Hoover RN, Fraumeni JF, Jr. (1988). Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer investigation* **6**: 245-254.

Brown AM (2001). Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle? *Breast cancer research : BCR* **3**: 351-355.

Cantor JP, Iliopoulos D, Rao AS, Druck T, Semba S, Han SY *et al* (2007). Epigenetic modulation of endogenous tumor suppressor expression in lung cancer xenografts suppresses tumorigenicity. *Int J Cancer* **120**: 24-31.

Carter BS, Ewing CM, Ward WS, Treiger BF, Aalders TW, Schalken JA *et al* (1990). Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 8751-8755.

Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H *et al* (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* **395**: 604-608.

Chan DC, Bedford MT, Leder P (1996). Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *EMBO J* **15**: 1045-1054.

Chang NS, Pratt N, Heath J, Schultz L, Slevin D, Carey GB *et al* (2001). Hyaluronidase induction of a WW domain-containing oxidoreductase that enhances tumor necrosis factor cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry* **276**: 3361-3370.

Chang NS (2002). A potential role of p53 and WOX1 in mitochondrial apoptosis (review). *Int J Mol Med* **9**: 19-24.

Chang NS, Doherty J, Ensign A, Lewis J, Heath J, Schultz L *et al* (2003). Molecular mechanisms underlying WOX1 activation during apoptotic and stress responses. *Biochem Pharmacol* **66**: 1347-1354.

Chang NS, Schultz L, Hsu LJ, Lewis J, Su M, Sze CI (2005). 17beta-Estradiol upregulates and activates WOX1/WWOXv1 and WOX2/WWOXv2 in vitro: potential role in cancerous progression of breast and prostate to a premetastatic state in vivo. *Oncogene* **24**: 714-723.

Chang NS, Hsu LJ, Lin YS, Lai FJ, Sheu HM (2007). WW domain-containing oxidoreductase: a candidate tumor suppressor. *Trends Mol Med* **13**: 12-22.

Chen G, Fernandez J, Mische S, Courey AJ (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development. *Genes & development* **13**: 2218-2230.

Chen X, Rubock MJ, Whitman M (1996). A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature* **383**: 691-696.

Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO, Martelli ML, Brents LA, Chen T *et al* (1998). Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* **91**: 4457-4463.

Clevers H (2005). Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nature genetics* **37**: 1027-1028.

Clevers H (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**: 469-480.

Cong F, Schweizer L, Varmus H (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* **131**: 5103-5115.

Daniels DL, Weis WI (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature structural & molecular biology* **12**: 364-371.

Dauer WT, Worman HJ (2009). The nuclear envelope as a signaling node in development and disease. *Developmental cell* **17**: 626-638.

Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stannek P *et al* (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **438**: 867-872.

Deka J, Wiedemann N, Anderle P, Murphy-Seiler F, Bultinck J, Eyckerman S *et al* (2010). Bcl9/Bcl9l are critical for Wnt-mediated regulation of stem cell traits in colon epithelium and adenocarcinomas. *Cancer research* **70**: 6619-6628.

Dias EP, Pimenta FJ, Sarquis MS, Dias Filho MA, Aldaz CM, Fujii JB *et al* (2007). Association between decreased WWOX protein expression and thyroid cancer development. *Thyroid* **17**: 1055-1059.

Dincer N, Tezel GG, Sungur A, Himmetoglu C, Huebner K, Guler G (2010). Study of FHIT and WWOX expression in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of salivary gland. *Oral Oncol* **46**: 195-199.

Driouch K, Briffod M, Bieche I, Champeme MH, Lidereau R (1998). Location of several putative genes possibly involved in human breast cancer progression. *Cancer research* **58**: 2081-2086.

Driouch K, Prydz H, Monese R, Johansen H, Lidereau R, Frengen E (2002). Alternative transcripts of the candidate tumor suppressor gene, WWOX, are expressed at high levels in human breast tumors. *Oncogene* **21**: 1832-1840.

Egeli U, Karadag M, Tunca B, Ozyardimci N (1997). The expression of common fragile sites and genetic predisposition to squamous cell lung cancers. *Cancer genetics and cytogenetics* **95**: 153-158.

Elliott BE, Meens JA, SenGupta SK, Louvard D, Arpin M (2005). The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. *Breast cancer research : BCR* **7**: R365-373.

Fabbri M, Iliopoulos D, Trapasso F, Aqeilan RI, Cimmino A, Zanesi N *et al* (2005). WWOX gene restoration prevents lung cancer growth in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 15611-15616.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**: 2893-2917.

Folkman J (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med* **57**: 1-18.

Fu J, Yan P, Li S, Qu Z, Xiao G (2010). Molecular determinants of PDLIM2 in suppressing HTLV-I Tax-mediated tumorigenesis. *Oncogene* **29**: 6499-6507.

Gan XQ, Wang JY, Xi Y, Wu ZL, Li YP, Li L (2008). Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction. *The Journal of cell biology* **180**: 1087-1100.

Gao C, Chen YG (2010). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cellular signalling* **22**: 717-727.

Gaudio E, Palamarchuk A, Palumbo T, Trapasso F, Pekarsky Y, Croce CM *et al* (2006). Physical association with WWOX suppresses c-Jun transcriptional activity. *Cancer research* **66**: 11585-11589.

Geyer FC, Lacroix-Triki M, Savage K, Arnedos M, Lambros MB, MacKay A *et al* (2011). beta-Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **24**: 209-231.

Ghazani AA, Arneson N, Warren K, Pintilie M, Bayani J, Squire JA *et al* (2007). Genomic alterations in sporadic synchronous primary breast cancer using array and metaphase comparative genomic hybridization. *Neoplasia* **9**: 511-520.

Giarnieri E, Zanesi N, Bottoni A, Alderisio M, Lukic A, Vecchione A *et al* (2010). Oncosuppressor proteins of fragile sites are reduced in cervical cancer. *Cancer Lett* **289**: 40-45.

Glover S (1988). Recombinant DNA. Dos and don'ts of genetic release. *Nature* **333**: 297-298.

Glover TW, Berger C, Coyle J, Echo B (1984). DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet* **67**: 136-142.

Glover TW, Stein CK (1988). Chromosome breakage and recombination at fragile sites. *Am J Hum Genet* **43**: 265-273.

Glover TW (2006). Common fragile sites. *Cancer Lett* **232**: 4-12.

Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM *et al* (2001). LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* **107**: 513-523.

Gourley C, Paige AJ, Taylor KJ, Ward C, Kuske B, Zhang J *et al* (2009). WWOX gene expression abolishes ovarian cancer tumorigenicity in vivo and decreases attachment to fibronectin via integrin alpha3. *Cancer research* **69**: 4835-4842.

Gregorieff A, Clevers H (2005). Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes & development* **19**: 877-890.

Guler G, Uner A, Guler N, Han SY, Iliopoulos D, Hauck WW *et al* (2004). The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma. *Cancer* **100**: 1605-1614.

Guler G, Huebner K, Himmetoglu C, Jimenez RE, Costinean S, Volinia S *et al* (2009). Fragile histidine triad protein, WW domain-containing oxidoreductase protein Wwox, and activator protein 2gamma expression levels correlate with basal phenotype in breast cancer. *Cancer* **115**: 899-908.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674.

He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* **131**: 1663-1677.

Hellman A, Zlotorynski E, Scherer SW, Cheung J, Vincent JB, Smith DI *et al* (2002). A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. *Cancer Cell* **1**: 89-97.

Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R (2000). Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* **260**: 1-12.

Hino S, Kishida S, Michiue T, Fukui A, Sakamoto I, Takada S *et al* (2001). Inhibition of the Wnt signaling pathway by Idax, a novel Dvl-binding protein. *Molecular and cellular biology* **21**: 330-342.

Hino S, Michiue T, Asashima M, Kikuchi A (2003). Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *The Journal of biological chemistry* **278**: 14066-14073.

Hoffmans R, Stadeli R, Basler K (2005). Pygopus and legless provide essential transcriptional coactivator functions to armadillo/beta-catenin. *Current biology : CB* **15**: 1207-1211.

Hoffmans R, Basler K (2007). BCL9-2 binds Arm/beta-catenin in a Tyr142-independent manner and requires Pygopus for its function in Wg/Wnt signaling. *Mech Dev* **124**: 59-67.

Hollmen M, Liu P, Kurppa K, Wildiers H, Reinvall I, Vandorpe T *et al* (2012). Proteolytic processing of ErbB4 in breast cancer. *PloS one* **7**: e39413.

Hsu LJ, Hong Q, Schultz L, Kuo E, Lin SR, Lee MH *et al* (2008). Zfra is an inhibitor of Bcl-2 expression and cytochrome c release from the mitochondria. *Cellular signalling* **20**: 1303-1312.

Hsu LJ, Schultz L, Hong Q, Van Moer K, Heath J, Li MY *et al* (2009). Transforming growth factor beta1 signaling via interaction with cell surface Hyal-2 and recruitment of WWOX/WOX1. *The Journal of biological chemistry* **284**: 16049-16059.

Huang H, He X (2008). Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Current opinion in cell biology* **20**: 119-125.

Iliopoulos D, Guler G, Han SY, Johnston D, Druck T, McCorkell KA *et al* (2005). Fragile genes as biomarkers: epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer. *Oncogene* **24**: 1625-1633.

Iliopoulos D, Fabbri M, Druck T, Qin HR, Han SY, Huebner K (2007). Inhibition of breast cancer cell growth in vitro and in vivo: effect of restoration of Wwox expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**: 268-274.

Inoue H, Ishii H, Alder H, Snyder E, Druck T, Huebner K *et al* (1997). Sequence of the FRA3B common fragile region: implications for the mechanism of FHIT deletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 14584-14589.

Ishimura A, Ng JK, Taira M, Young SG, Osada S (2006). Man1, an inner nuclear membrane protein, regulates vascular remodeling by modulating transforming growth factor beta signaling. *Development* **133**: 3919-3928.

Itoh K, Brott BK, Bae GU, Ratcliffe MJ, Sokol SY (2005). Nuclear localization is required for Dishevelled function in Wnt/beta-catenin signaling. *Journal of biology* **4**: 3.

Jenner MW, Leone PE, Walker BA, Ross FM, Johnson DC, Gonzalez D *et al* (2007). Gene mapping and expression analysis of 16q loss of heterozygosity identifies WWOX and CYLD as being important in determining clinical outcome in multiple myeloma. *Blood* **110**: 3291-3300.

Jin C, Ge L, Ding X, Chen Y, Zhu H, Ward T *et al* (2006). PKA-mediated protein phosphorylation regulates ezrin-WWOX interaction. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 784-791.

Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H (2006). Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Experimental & molecular medicine* **38**: 1-10.

Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A (2009). Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends in cell biology* **19**: 119-129.

Kim HJ, Bae SC (2011). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American journal of translational research* **3**: 166-179.

Kimelman D, Xu W (2006). beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* **25**: 7482-7491.

Kinzler KW, Vogelstein B (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159-170.

Kishida M, Hino S, Michiue T, Yamamoto H, Kishida S, Fukui A *et al* (2001). Synergistic activation of the Wnt signaling pathway by Dvl and casein kinase Iepsilon. *The Journal of biological chemistry* **276**: 33147-33155.

Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, Chatterjee S *et al* (2002). Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* **109**: 47-60.

Krummel KA, Denison SR, Calhoun E, Phillips LA, Smith DI (2002). The common fragile site FRA16D and its associated gene WWOX are highly conserved in the mouse at Fra8E1. *Genes, chromosomes & cancer* **34**: 154-167.

Kurek KC, Del Mare S, Salah Z, Abdeen S, Sadiq H, Lee SH *et al* (2010). Frequent attenuation of the WWOX tumor suppressor in osteosarcoma is associated with increased tumorigenicity and aberrant RUNX2 expression. *Cancer research* **70**: 5577-5586.

Kuroki T, Trapasso F, Shiraishi T, Alder H, Mimori K, Mori M *et al* (2002). Genetic alterations of the tumor suppressor gene WWOX in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer research* **62**: 2258-2260.

Kuroki T, Yendamuri S, Trapasso F, Matsuyama A, Aqeilan RI, Alder H *et al* (2004). The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 2459-2465.

Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I *et al* (2004). Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet* **74**: 1043-1050.

Lerebours F, Lidereau R (2002). Molecular alterations in sporadic breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* **44**: 121-141.

Levanon D, Goldstein RE, Bernstein Y, Tang H, Goldenberg D, Stifani S *et al* (1998). Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 11590-11595.

Li MY, Lai FJ, Hsu LJ, Lo CP, Cheng CL, Lin SR *et al* (2009). Dramatic co-activation of WWOX/WOX1 with CREB and NF-kappaB in delayed loss of small dorsal root ganglion neurons upon sciatic nerve transection in rats. *PloS one* **4**: e7820.

Li Y, Welm B, Podsypanina K, Huang S, Chamorro M, Zhang X *et al* (2003). Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 15853-15858.

Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y *et al* (2000). Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 4262-4266.

Lindblom A, Skoog L, Rotstein S, Werelius B, Larsson C, Nordenskjold M (1993). Loss of heterozygosity in familial breast carcinomas. *Cancer research* **53**: 4356-4361.

Lindvall C, Evans NC, Zylstra CR, Li Y, Alexander CM, Williams BO (2006). The Wnt signaling receptor Lrp5 is required for mammary ductal stem cell activity and Wnt1-induced tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry* **281**: 35081-35087.

Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT *et al* (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **19**: 264-271.

Logan CY, Nusse R (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* **20**: 781-810.

Lu PJ, Zhou XZ, Shen M, Lu KP (1999). Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* **283**: 1325-1328.

Ludes-Meyers JH, Bednarek AK, Popescu NC, Bedford M, Aldaz CM (2003). WWOX, the common chromosomal fragile site, FRA16D, cancer gene. *Cytogenet Genome Res* **100**: 101-110.

Ludes-Meyers JH, Kil H, Bednarek AK, Drake J, Bedford MT, Aldaz CM (2004). WWOX binds the specific proline-rich ligand PPXY: identification of candidate interacting proteins. *Oncogene* **23**: 5049-5055.

Ludes-Meyers JH, Kil H, Nunez MI, Conti CJ, Parker-Thornburg J, Bedford MT *et al* (2007). WWOX hypomorphic mice display a higher incidence of B-cell lymphomas and develop testicular atrophy. *Genes, chromosomes & cancer* **46**: 1129-1136.

Luis TC, Naber BA, Fibbe WE, van Dongen JJ, Staal FJ (2010). Wnt3a nonredundantly controls hematopoietic stem cell function and its deficiency results in complete absence of canonical Wnt signaling. *Blood* **116**: 496-497.

Luo W, Peterson A, Garcia BA, Coombs G, Kofahl B, Heinrich R *et al* (2007). Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex. *EMBO J* **26**: 1511-1521.

MacDonald BT, Yokota C, Tamai K, Zeng X, He X (2008). Wnt signal amplification via activity, cooperativity, and regulation of multiple intracellular PPPSP motifs in the Wnt co-receptor LRP6. *The Journal of biological chemistry* **283**: 16115-16123.

MacDonald BT, Tamai K, He X (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell* **17**: 9-26.

MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B *et al* (1970). Age at first birth and breast cancer risk. *Bulletin of the World Health Organization* **43**: 209-221.

Mahajan NP, Whang YE, Mohler JL, Earp HS (2005). Activated tyrosine kinase Ack1 promotes prostate tumorigenesis: role of Ack1 in polyubiquitination of tumor suppressor Wwox. *Cancer research* **65**: 10514-10523.

Makridakis NM, Reichardt JK (2012). Translesion DNA polymerases and cancer. *Frontiers in genetics* **3**: 174.

Mallon E, Osin P, Nasiri N, Blain I, Howard B, Gusterson B (2000). The basic pathology of human breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **5**: 139-163.

Mangelsdorf M, Ried K, Woollatt E, Dayan S, Eyre H, Finnis M *et al* (2000). Chromosomal fragile site FRA16D and DNA instability in cancer. *Cancer research* **60**: 1683-1689.

Mani M, Carrasco DE, Zhang Y, Takada K, Gatt ME, Dutta-Simmons J *et al* (2009). BCL9 promotes tumor progression by conferring enhanced proliferative, metastatic, and angiogenic properties to cancer cells. *Cancer research* **69**: 7577-7586.

Massague J, Seoane J, Wotton D (2005). Smad transcription factors. *Genes & development* **19**: 2783-2810.

Matovina M, Sabol I, Grubisic G, Gasperov NM, Grce M (2009). Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol* **113**: 120-127.

Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nature reviews Genetics* **5**: 691-701.

Morrell NT, Leucht P, Zhao L, Kim JB, ten Berge D, Ponnusamy K *et al* (2008). Liposomal packaging generates Wnt protein with in vivo biological activity. *PloS one* **3**: e2930.

Nakayama S, Semba S, Maeda N, Aqeilan RI, Huebner K, Yokozaki H (2008). Role of the WWOX gene, encompassing fragile region FRA16D, in suppression of pancreatic carcinoma cells. *Cancer science* **99**: 1370-1376.

Nancarrow JK, Holman K, Mangelsdorf M, Hori T, Denton M, Sutherland GR *et al* (1995). Molecular basis of p(CCG)n repeat instability at the FRA16A fragile site locus. *Hum Mol Genet* **4**: 367-372.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z *et al* (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 5367-5374.

Nishida N, Fukuda Y, Kokuryu H, Sadamoto T, Isowa G, Honda K *et al* (1992). Accumulation of allelic loss on arms of chromosomes 13q, 16q and 17p in the advanced stages of human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **51**: 862-868.

Nusse R, Varmus HE (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* **31**: 99-109.

Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J *et al* (1996). The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* **84**: 587-597.

Oppermann UC, Filling C, Jornvall H (2001). Forms and functions of human SDR enzymes. *Chem Biol Interact* **130-132**: 699-705.

Paige AJ, Taylor KJ, Stewart A, Sgouros JG, Gabra H, Sellar GC *et al* (2000). A 700-kb physical map of a region of 16q23.2 homozygously deleted in multiple cancers and spanning the common fragile site FRA16D. *Cancer research* **60**: 1690-1697.

Paige AJ, Taylor KJ, Taylor C, Hillier SG, Farrington S, Scott D *et al* (2001). WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 11417-11422.

Pan D, Estevez-Salmeron LD, Stroschein SL, Zhu X, He J, Zhou S *et al* (2005). The integral inner nuclear membrane protein MAN1 physically interacts with the R-Smad proteins to repress signaling by the transforming growth factor- β superfamily of cytokines. *The Journal of biological chemistry* **280**: 15992-16001.

Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T *et al* (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 1160-1167.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA *et al* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**: 747-752.

Pluciennik E, Kusinska R, Potemski P, Kubiak R, Kordek R, Bednarek AK (2006). WWOX--the FRA16D cancer gene: expression correlation with breast cancer progression and prognosis. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* **32**: 153-157.

Polakis P (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes & development* **14**: 1837-1851.

Polyak K, Kalluri R (2010). The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**: a003244.

Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL (2003). One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100 Suppl 1**: 11917-11923.

Punchihewa C, Ferreira AM, Cassell R, Rodrigues P, Fujii N (2009). Sequence requirement and subtype specificity in the high-affinity interaction between human frizzled and dishevelled proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society* **18**: 994-1002.

Qin HR, Iliopoulos D, Semba S, Fabbri M, Druck T, Volinia S *et al* (2006). A role for the WWOX gene in prostate cancer. *Cancer research* **66**: 6477-6481.

Radtke C, Akiyama Y, Lankford KL, Vogt PM, Krause DS, Kocsis JD (2005). Integration of engrafted Schwann cells into injured peripheral nerve: axonal association and nodal formation on regenerated axons. *Neuroscience letters* **387**: 85-89.

Raju GP, Dimova N, Klein PS, Huang HC (2003). SANE, a novel LEM domain protein, regulates bone morphogenetic protein signaling through interaction with Smad1. *The Journal of biological chemistry* **278**: 428-437.

Ramos D, Abba M, Lopez-Guerrero JA, Rubio J, Solsona E, Almenar S *et al* (2008). Low levels of WWOX protein immunoeexpression correlate with tumour grade and a less favourable outcome in patients with urinary bladder tumours. *Histopathology* **52**: 831-839.

Randall RA, Germain S, Inman GJ, Bates PA, Hill CS (2002). Different Smad2 partners bind a common hydrophobic pocket in Smad2 via a defined proline-rich motif. *EMBO J* **21**: 145-156.

Reya T, Clevers H (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**: 843-850.

Ried K, Finnis M, Hobson L, Mangelsdorf M, Dayan S, Nancarrow JK *et al* (2000). Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells. *Hum Mol Genet* **9**: 1651-1663.

Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**: 364-368.

Sakamoto Y, Sano T, Shimada K, Esaki M, Saka M, Fukagawa T *et al* (2007). Favorable indications for hepatectomy in patients with liver metastasis from gastric cancer. *Journal of surgical oncology* **95**: 534-539.

Salah Z, Aqeilan R, Huebner K (2010). WWOX gene and gene product: tumor suppression through specific protein interactions. *Future Oncol* **6**: 249-259.

Saxena AK (2012). Are fragile sites "hot-spots": a causative factor in tumor biology. *Journal of experimental therapeutics & oncology* **10**: 19-29.

Schroeder TM, Kahler RA, Li X, Westendorf JJ (2004). Histone deacetylase 3 interacts with runx2 to repress the osteocalcin promoter and regulate osteoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry* **279**: 41998-42007.

Semenov MV, Snyder M (1997). Human dishevelled genes constitute a DHR-containing multigene family. *Genomics* **42**: 302-310.

Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML *et al* (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* **439**: 84-88.

Smalley MJ, Signoret N, Robertson D, Tilley A, Hann A, Ewan K *et al* (2005). Dishevelled (Dvl-2) activates canonical Wnt signalling in the absence of cytoplasmic puncta. *Journal of cell science* **118**: 5279-5289.

Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG *et al* (2008). Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer research* **68**: 3108-3114.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A *et al* (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 8418-8423.

Su Y, Fu C, Ishikawa S, Stella A, Kojima M, Shitoh K *et al* (2008). APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Molecular cell* **32**: 652-661.

Sudol M, Chen HI, Bougeret C, Einbond A, Bork P (1995). Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Lett* **369**: 67-71.

Sustmann C, Flach H, Ebert H, Eastman Q, Grosschedl R (2008). Cell-type-specific function of BCL9 involves a transcriptional activation domain that synergizes with beta-catenin. *Molecular and cellular biology* **28**: 3526-3537.

Sutherland GR, Jacky PB, Baker EG (1984). Heritable fragile sites on human chromosomes. XI. Factors affecting expression of fragile sites at 10q25, 16q22, and 17p12. *Am J Hum Genet* **36**: 110-122.

Sutherland GR, Baker E, Richards RI (1998). Fragile sites still breaking. *Trends Genet* **14**: 501-506.

Sze CI, Su M, Pugazhenth S, Jambal P, Hsu LJ, Heath J *et al* (2004). Down-regulation of WW domain-containing oxidoreductase induces Tau phosphorylation in vitro. A potential role in Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry* **279**: 30498-30506.

Tada M, Concha ML, Heisenberg CP (2002). Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin Cell Dev Biol* **13**: 251-260.

Takada K, Zhu D, Bird GH, Sukhdeo K, Zhao JJ, Mani M *et al* (2012a). Targeted Disruption of the BCL9/beta-Catenin Complex Inhibits Oncogenic Wnt Signaling. *Science translational medicine* **4**: 148ra117.

Takada M, Sugimoto M, Ohno S, Kuroi K, Sato N, Bando H *et al* (2012b). Predictions of the pathological response to neoadjuvant chemotherapy in patients with primary breast cancer using a data mining technique. *Breast cancer research and treatment* **134**: 661-670.

Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H *et al* (2006). Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Developmental cell* **11**: 791-801.

Takeuchi T, Adachi Y, Nagayama T (2012). A WWOX-binding molecule, transmembrane protein 207, is related to the invasiveness of gastric signet-ring cell carcinoma. *Carcinogenesis* **33**: 548-554.

Thompson B, Townsley F, Rosin-Arbesfeld R, Musisi H, Bienz M (2002). A new nuclear component of the Wnt signalling pathway. *Nature cell biology* **4**: 367-373.

Toomes C, Bottomley HM, Jackson RM, Towns KV, Scott S, Mackey DA *et al* (2004). Mutations in LRP5 or FZD4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *Am J Hum Genet* **74**: 721-730.

Torres MA, Nelson WJ (2000). Colocalization and redistribution of dishevelled and actin during Wnt-induced mesenchymal morphogenesis. *The Journal of cell biology* **149**: 1433-1442.

Townsley FM, Cliffe A, Bienz M (2004). Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nature cell biology* **6**: 626-633.

Toya H, Oyama T, Ohwada S, Togo N, Sakamoto I, Horiguchi J *et al* (2007). Immunohistochemical expression of the beta-catenin-interacting protein B9L is associated with histological high nuclear grade and immunohistochemical ErbB2/HER-2 expression in breast cancers. *Cancer science* **98**: 484-490.

Tummala R, Romano RA, Fuchs E, Sinha S (2003). Molecular cloning and characterization of AP-2 epsilon, a fifth member of the AP-2 family. *Gene* **321**: 93-102.

Tunca B, Egeli U, Zorluoglu A, Yilmazlar T, Yerci O, Kizil A (2000). The expression frequency of common fragile sites and genetic predisposition to colon cancer. *Cancer genetics and cytogenetics* **119**: 139-145.

van Amerongen R, Mikels A, Nusse R (2008). Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal* **1**: re9.

Watanabe A, Hippo Y, Taniguchi H, Iwanari H, Yashiro M, Hirakawa K *et al* (2003). An opposing view on WWOX protein function as a tumor suppressor. *Cancer research* **63**: 8629-8633.

Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T *et al* (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**: 448-452.

Willert K, Jones KA (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes & development* **20**: 1394-1404.

Willis TG, Zalcborg IR, Coignet LJ, Wlodarska I, Stul M, Jadayel DM *et al* (1998). Molecular cloning of translocation t(1;14)(q21;q32) defines a novel gene (BCL9) at chromosome 1q21. *Blood* **91**: 1873-1881.

Wong HC, Mao J, Nguyen JT, Srinivas S, Zhang W, Liu B *et al* (2000). Structural basis of the recognition of the dishevelled DEP domain in the Wnt signaling pathway. *Nature structural biology* **7**: 1178-1184.

Yarden Y, Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 127-137.

Yendamuri S, Kuroki T, Trapasso F, Henry AC, Dumon KR, Huebner K *et al* (2003). WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer. *Cancer research* **63**: 878-881.

Yokoyama N, Yin D, Malbon CC (2007). Abundance, complexation, and trafficking of Wnt/beta-catenin signaling elements in response to Wnt3a. *Journal of molecular signaling* **2**: 11.

Yunis JJ, Soreng AL (1984). Constitutive fragile sites and cancer. *Science* **226**: 1199-1204.

Zanesi N, Fidanza V, Fong LY, Mancini R, Druck T, Valtieri M *et al* (2001). The tumor spectrum in FHIT-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 10250-10255.

Zelazowski MJ, Pluciennik E, Pasz-Walczak G, Potemski P, Kordek R, Bednarek AK (2011). WWOX expression in colorectal cancer-a real-time quantitative RT-PCR study. *Tumour Biol.*

Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C *et al* (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* **135**: 367-375.

Zhang F, Shi Y, Wang L, Sriram S (2011). Role of HDAC3 on p53 expression and apoptosis in T cells of patients with multiple sclerosis. *PLoS one* **6**: e16795.

Zhang L, Gao X, Wen J, Ning Y, Chen YG (2006). Dapper 1 antagonizes Wnt signaling by promoting dishevelled degradation. *The Journal of biological chemistry* **281**: 8607-8612.

Résumé : Afin de mieux connaître les mécanismes moléculaires impliqués dans le cancer du sein, nous avons entrepris l'étude de la fonction du gène suppresseur de tumeur *WWOX* comprenant le site fragile FRA16D. Nous avons mis en évidence l'association de *WWOX* avec des composants de la voie de signalisation intracellulaire Wnt/ β -caténine : Dvl-2, BCL9 et BCL9-2, ainsi que, l'histone deacetylase 3 (HDAC3). Nous avons défini, pour la première fois, *WWOX* en tant que nouvel inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine. Nos résultats suggèrent que *WWOX* agit sur cette voie en séquestrant Dvl-2 dans le cytoplasme et en inhibant les activités transcriptionnelles de BCL9 et BCL9-2. En outre, nous avons démontré que HDAC3 est également capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de BCL9-2. HDAC3 agirait en recrutant *WWOX* sur BCL9-2 et cela indépendamment de son activité déacétylase. L'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine par *WWOX* suggère que l'inhibition de l'expression de *WWOX*, souvent observée dans le cancer du sein, pourrait conduire à la suractivation de cette voie et par conséquent à la stimulation de la progression tumorale. En parallèle de ce travail, nous avons étudié l'implication des nouveaux partenaires moléculaires de *WWOX* que nous avons trouvé dans la carcinogenèse mammaire. Nous avons mis en évidence une surexpression de *BCL9*, et non pas de *BCL9-2*, dans les tumeurs du sein, cette surexpression serait due, au moins en partie à des polyploïdies et des amplifications du gène, suggérant un rôle important de BCL9 dans cette pathologie.

Abstract : In our attempt to better understand the molecular mechanisms in breast carcinogenesis, we studied the role of the tumor suppressor gene *WWOX* that encompasses the common fragile site FRD16D. We have identified actors of the Wnt/ β -catenin pathway as new interactors of *WWOX*: Dvl-2, BCL9 and BCL9-2 just as HDAC3. We show, for the first time, that *WWOX* is an inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway. Our results suggest that *WWOX* binds Dvl-2 in the cytoplasm and inhibits BCL9 and BCL9-2's transcriptional activities. Moreover, we have shown that HDAC3 inhibits as well the transcriptional activity of BCL9-2 by recruiting it on *WWOX*. We then demonstrated that HDAC3 acts independently of its deacetylase activity. The inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway by *WWOX* suggests that the down expression of *WWOX*, frequently found in breast tumors, could trigger the over activation of the Wnt/ β -catenin pathway and therefore a tumor progression. In parallel, we have studied the implication of the newly identified molecular partners of *WWOX* in the mammary carcinogenesis. We have identified an overexpression of *BCL9*, but not *BCL9-2*, in a large series of invasive breast tumors, this overexpression is due, at least in part to polyploidy and gene amplification, suggesting BCL9 plays an important role in this pathology.

Mots clés: Gène suppresseur de tumeur, *WWOX*, Cancer du sein, BCL9, Dvl-2.