



HAL
open science

Identification d'une nouvelle isoforme du gène suppresseur de tumeur LKB1 ayant des propriétés oncogéniques

Rajae Dahmani

► **To cite this version:**

Rajae Dahmani. Identification d'une nouvelle isoforme du gène suppresseur de tumeur LKB1 ayant des propriétés oncogéniques. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T053 . tel-01144057

HAL Id: tel-01144057

<https://theses.hal.science/tel-01144057>

Submitted on 20 Apr 2015

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 :
DE CANCÉROLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

ASPECTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

par

Rajae DAHMANI

**Identification d'une nouvelle isoforme du gène
suppresseur de tumeur *LKB1* ayant des propriétés
oncogéniques**

Date de soutenance : 08/10/2014

Composition du jury :

Directeur de thèse :
Rapporteurs :

Christine PERRET
Urszula HIBNER
Bruno CLEMENT
Marc BILLAUD
Christian AUCLAIR

Examineur :
Président :

« *Bismi allahi arrahmani arrahim* »

REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit de nombreuses rencontres avec diverses personnes que je souhaite remercier ici pour toute l'aide, le soutien, les conseils qu'elles m'ont apportés ou tout simplement pour leur bonne humeur et leur joie de vivre qui ont fait de cette expérience une aventure incroyable.

Tout d'abord, je souhaite remercier le Directeur de l'École Doctorale de Cancérologie, le Professeur Christian AUCLAIR, président de ce jury. J'adresse mes profonds remerciements au Docteur Urszula HIBNER, ainsi qu'au Docteur Bruno CLEMENT, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et de bien avoir voulu évaluer ce travail dans les courts délais que nous avons sollicités. Merci également au Docteur Marc BILLAUD d'avoir accepté d'évaluer la qualité de mon travail en tant qu'examinateur.

Ce travail n'existerait pas sans la confiance et l'immense aide et soutien qu'il m'a apporté au cours de ces cinq années, je parle bien évidemment de ma directrice de thèse, et comme elle me le répète très souvent, ma deuxième mère, Christine PERRRET. Mille fois merci car c'est au moins le nombre de fois où je suis venue te déranger pour poser des questions en tout genre dont parfois certaines naïves. Tu as toujours su y répondre avec gentillesse et avec le sourire. Merci pour ton soutien, ta confiance, ta patience et pour tout le temps que tu m'as consacré. Merci d'avoir été présente dans mes moments de doutes, de m'avoir remonté le moral et encouragé à ne pas laisser tomber.

Ce travail a été réalisé au sein de l'Institut Cochin, U1016, Equipe oncogénèse des épithéliums digestifs. Je souhaite remercier tous les membres de mon équipe, les nouveaux comme les anciens. J'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des membres de l'équipe Perret. Je pense particulièrement à Solenne, Cyril, Aurélie, Greg, Marie, Charlotte, Mehdi, Typhène, ... Merci à tous pour votre bonne humeur et pour toutes ces discussions scientifiques.

Ce travail a été effectué en collaboration avec l'équipe de Marc BILLAUD qui nous a apporté la culture LKB1, et sans qui ce travail n'aurait pas eu lieu.

Je tiens à remercier les différentes plateformes de l'Institut Cochin sans oublier les gens de l'animalerie. Je pense plus particulièrement à Carmen, Franck, Nadia.

Merci à tous les membres de l'équipe. Merci à Béatrice, Sabine, Anne-Marie, Jean-Pierre, Pascalette, Chiara, Antoine, Nadia, Alain et bien sûr Massiré. Merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur.

Merci à Catherine, Yannig, Antoine, Patrick et surtout Patricia pour votre disponibilité et votre gentillesse.

Merci à Catherine de m'avoir accompagné tout au début de ma thèse, merci pour tes précieux conseils.

Merci à Angélique pour les manips de culture primaire des hépatocytes.

Merci à Cécile pour ton soutien durant les manips d'immunohistochimie.

John, le seul qui croit que le TEMED sent l'eau de rose, merci pour ta bonne humeur.

Merci à Carina, Catherine et Véronique pour les manips du dosage du flux oxydatif.

Merci à Mireille Lambert et Pierre Sujobert pour la production des lentivirus codant un ShRNA contre LKB1.

Merci à Héléne pour les manips de régénération hépatique et du marquage BrdU. Merci surtout pour ta gentillesse, ton soutien et tes précieux conseils.

Merci à ma petite équipe :

Pax, mon colloc de bureau, merci surtout d'avoir été présent durant ces cinq années. Je te remercie pour l'aide précieuse que tu m'as apporté pour les expériences et pour ta bonne humeur. Je n'oublierai jamais les bons moments qu'on a passé à écouter les chansons de Fayrouz.

Fred, notre musicien et notre spécialiste des lignées pulmonaires, merci pour tes conseils et ta gentillesse.

Valérie, un immense merci pour ton aide en ce qui concerne les souris et les géotypages. Merci pour les nombreuses fois où tu as été là pour me rassurer en présence des « petites bêtes toutes énervées ».

Mes derniers mots je les adresse à ma famille et mes amis :

Un énorme merci à tous mes profs, depuis le primaire.

Fatima, tu es une amie très spéciale, qui m'aura énormément fait rire. Merci pour tes histoires drôles.

Soade, merci pour les bons moments qu'on a passé ensemble depuis le lycée.

Rajaa, merci pour ton soutien et ta complicité.

Abdel, merci pour les moments drôles qu'on a partagé en pièce de culture.

Ali, Merci pour tout.

Marianne, ma nouvelle amie, un énorme merci pour tes encouragements, ton aide et ton énorme soutien.

Rosine, mada akolo ! Mon amie depuis le premier jour à l'université, qui a partagé avec moi les bons et les pires moments de ma vie, merci pour tout. Merci même pour tes informations « Rosiniennes ».

Amine, Armelle, Nizar et Rime, je vous adore.

Ma petite fille chérie, tu es le plus beau cadeau de ma vie.

Finalement, mes parents qui m'auront permis de poursuivre mes études jusqu'à aujourd'hui, et qui sans eux je ne serai jamais arrivée à ce jour. Quoi que je dise, quoi que je fasse, je ne saurais jamais remercier les deux plus chères personnes à mon cœur, ceux à qui ni les mots, ni les gestes, ni rien au monde pourra exprimer mes sentiments envers eux, à ceux qui me donnent la joie de vivre, qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont toujours épaulée. A vous la lumière de ma vie....Papa, Maman "je vous aime".

« Wa ma naylo lmatalibi bittamanni Walakïn toekhado donya ghilaba »

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	6
--------------------------------	----------

LISTE DES TABLEAUX.....	7
--------------------------------	----------

I. INTRODUCTION GENERALE.....	11
--------------------------------------	-----------

A. La protéine kinase LKB1	11
1. Syndrome de Peutz-Jeghers.....	11
1.1 Historique.....	11
1.2 Caractéristiques cliniques du PJS	11
1.3 Clonage du gène <i>LKB1</i> et génétique du PJS.....	12
1.4 Mutations germinales de <i>LKB1</i>	16
1.5 <i>LKB1</i> : gène suppresseur de tumeur	17
2. La protéine LKB1 et son complexe	18
2.1 Profil d'expression de LKB1	18
2.2 Structure de la protéine LKB1	19
2.3 L'isoforme testiculaire S-LKB1	20
3. Activation de LKB1 par le complexe LKB1/STRAD/MO25	21
3.1 STRAD	22
3.2 MO25.....	22
3.3 Formation du complexe et activation de LKB1	23
4. Régulation du complexe LKB1 actif par modifications post-traductionnelles de LKB1	23
4.1 Phosphorylation	24
4.2 Prénylation	25
4.3 Acétylation	25
5. Fonctions cellulaires de LKB1	26
5.1 L'AMPK : principal substrat de LKB1	26
5.1.1. Structure de l'AMPK	27
5.1.2. Distribution tissulaire des complexes.....	28
5.1.3. Localisation intracellulaire.....	29
5.1.4. Régulation allostérique de l'AMPK par l'AMP	30
5.1.5. Activation de l'AMPK par phosphorylation	31
5.1.6. Activateurs pharmacologiques de l'AMPK	32
5.2 Contrôle du métabolisme par LKB1.....	34
5.3 Métabolisme et cancer.....	35
5.4 Polarité cellulaire.....	35
5.4.1. LKB1 et architecture épithéliale	37
5.4.2. Contrôle de la migration cellulaire polarisée	39
5.5 Rôle de LKB1 dans le contrôle de la croissance cellulaire	40
5.5.1. Régulation de la voie mTor par LKB1.....	40
5.5.2. Régulation de la voie p53 par LKB1	41
6. Rôle de LKB1 dans le développement et l'homéostasie tissulaire chez la souris	42
6.1 Rôle de LKB1 dans l'embryogenèse.....	42
6.2 Rôle de LKB1 dans l'angiogenèse	43
6.3 Rôle de LKB1 dans le foie	43
6.4 Rôle de LKB1 dans le muscle	44

7.	Exemples du rôle de LKB1 dans le cancer	45
7.1	Rôle de LKB dans le cancer du sein	45
7.2	Rôle de LKB1 dans le cancer du poumon	46
B.	La voie Wnt/β-caténine	47
1.	Généralités sur la voie canonique Wnt/ β -caténine	47
2.	Principaux partenaires de la voie	48
2.1	La β -caténine	48
2.2	Adenomatous polyposis coli (APC)	49
2.3	Axine	50
3.	Transduction du signal Wnt	52
3.1	Absence de signal Wnt : dégradation constante de la β -caténine cytosolique	52
3.2	Activation de la voie Wnt	53
3.2.1.	Réception du signal Wnt à la membrane	53
3.2.2.	Transduction du signal Wnt dans le cytoplasme	54
3.2.3.	Transduction du signal Wnt au niveau nucléaire	56
4.	La voie Wnt/ β -caténine dans l'homéostasie tissulaire et le cancer	57
4.1	La voie Wnt- β -caténine et l'auto renouvellement tissulaire	57
4.1.1.	Wnt et l'homéostasie intestinale	58
4.1.2.	Wnt et l'homéostasie du follicule pileux	58
4.1.3.	Wnt et la différenciation osseuse	60
4.2	La voie Wnt/ β -caténine et le cancer	61
4.2.1.	Wnt et la carcinogenèse colique	61
4.2.2.	Wnt et les tumeurs du follicule pileux	62
4.3	La voie Wnt/ β -caténine dans les tumeurs hépatiques	63
4.3.1.	L'hépatoblastome	63
4.3.2.	L'adénome hépatocytaire et l'hyperplasie nodulaire focale	64
4.3.3.	Le cholangiocarcinome	64
4.3.4.	Le carcinome hépatocellulaire	65
II.	OBJECTIFS	67
1.	La signalisation Wnt/ β -caténine dans la différenciation et l'oncogenèse du foie	67
2.	Les CHCs avec gain de fonction de <i>CTNNB1</i> constituent un groupe homogène de CHC	68
3.	LKB1, gène candidat pour expliquer le phénotype singulier des CHCs mutés <i>CTNNB1</i>	72
III.	RESULTATS	75
1.	Article	75
2.	Conclusion de l'article	122
IV.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	124
1.	Expression de l'isoforme Δ N-LKB1	124
2.	Fonctions physiologiques de l'isoforme Δ N-LKB1	125
3.	<i>LKB1</i> , gène suppresseur de tumeur ou oncogène?	127
V.	BIBLIOGRAPHIE	129

Liste des Figures

Figure 1: Caractéristiques cliniques du PJS.....	11
Figure 2: Mutations identifiées dans le gène <i>LKB1</i> chez les patients atteints de PJS et de cancers sporadiques et leurs effets sur la structure primaire de la protéine LKB1	15
Figure 3: Profil d'expression de la protéine LKB1 dans les tissus normaux et le pattern des risques relatifs à développer des cancers chez les patients atteints de PJS.....	18
Figure 4: Structure de la protéine LKB1	19
Figure 5: Signalisation dépendante de LKB1.....	20
Figure 6: Structure des isoformes LKB1 classique (FL- LKB1) et testiculaire (S-LKB1).....	21
Figure 7: Structure schématique du complexe hétérotrimérique LKB1:STRAD:MO25.....	22
Figure 8: Modifications post-traductionnelles de LKB1.	24
Figure 9: Schéma global de la régulation de l'AMPK en cas de stress.	27
Figure 10: Les sept gènes codant les trois sous-unités de l'AMPK.....	28
Figure 11: Schéma global de la régulation de l'AMPK par l'AMP et l'ATP.....	31
Figure 12: Structure chimique de l'AICAR, du ZMP et de l'AMP.	32
Figure 13: Structure chimique de la metformine et de la phenformine.	33
Figure 14: Induction de la polarisation des cellules épithéliales intestinale LS174T.	36
Figure 15: Architecture épithéliale	37
Figure 16: Les mécanismes de base du contrôle de la polarité cellulaire apico-basale	38
Figure 17: Représentation schématique de la structure de la β -caténine	49
Figure 18: Représentation schématique de la structure de la protéine APC.....	50
Figure 19: Représentation schématique de la structure de l'Axine	51
Figure 20: Représentation schématique des deux modèles de la voie de signalisation Wnt.	55
Figure 21: Représentation schématique de la signalisation Wnt dans le noyau	56
Figure 22: Schéma représentant les différents sous-groupes de CHC définis par l'analyse transcriptomique	69
Figure 23: Caractéristiques anatomopathologiques des carcinomes hépatocellulaires mutés pour la β -caténine.....	70
Figure 24: Schéma comparatif entre la polarité simple et la polarité hépatocytaire.	71
Figure 25: Expression protéique de l'isoforme « classique » de LKB1 après interférence par différents ARNs dirigés contre la β -caténine.....	73
Figure 26: Expression protéique des formes longue « classique » et courte « nouvelle isoforme » de LKB1 après interférence par trois ARNs dirigés contre la β -caténine, dans la lignée hépatomateuse humaine HuH6.....	74
Figure 27: Schéma récapitulatif du rôle de l'isoforme Δ N-LKB1 sur les trois fonctions majeures de LKB1.....	109

Liste des tableaux

Tableau 1: Distribution chez le rongeur des différentes isoformes des trois sous-unités de l'AMPK dans le muscle squelettique, le cœur, le foie et le cerveau.	29
---	----

Liste des abréviations

Aa: Acide aminé

ACC: Acétyl-CoA Carboxylase

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADP: Adenosine 5'-diphosphate

AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide- β -D-ribofuranoside

Akt/PKB: Protein Kinase B

AMP: Adenosine 5'-monophosphate

AMPK: AMP-activated protein kinase

AMPK-CA: Forme dominante positive de l'AMPK

APC: Adenomatous polyposis coli

aPKC: Atypical protein kinase C

ARK: AMPK-related kinase

ARN: Acide ribonucléique

ATP: Adenosine 5'-triphosphate

BCL2: B-cell lymphoma 2

BRCA1/2: Breast cancer1/2

BWS: Syndrome de Beckwith-Wiedmann

CaMK: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase

CaMKK: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase

CHC : Carcinome hépatocellulaire

CK1: Casein kinase 1

CPB/p300: Cyclic AMP response element binding protein

CPT-1: Carnitine Palmitoyl Transférase-1

CRC: Cancer colorectal

CRD: Cysteine-Rich Domain

CREB: C-AMP Response Element-Binding

Dkk: Dickkopf

Dvl: Dishevelled

eEF2: eukaryotic translation Elongation Factor 2
eEF2k: eukaryotic translation Elongation Factor 2 kinase
eIF4: eukaryotic Initiation Factor 4

FGF2: Fibroblast growth factor 2
FL-LKB1: Isoforme LKB1 pleine longueur "classique"
Fz: Frizzled

GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β
GST : gène suppresseur de tumeur

HBV/HCV: Hepatitis B/C virus
HDAC: Histones desacétylases

IRES: Internal Ribosome Entry Site

KO: Knock Out

Lef: Lymphoid enhancer factor
LIP1: LKB1 interacting protein 1
LKB1: Liver kinase B1
LOH: Loss of heterozygosity

MARK: Microtubule affinity-regulating kinase
MAPK: Mitogen activated protein kinase
MCR: Mutation Clustering Région
Metformine: N,N-dimethylimidodicarbonimidic diamide
MO25: Mouse Protein 25
mTOR: mammalian Target of Rapamycin
mTORC1/2: mTOR Complex 1/2
MMTV: Mousse mammary tumor virus

NLS: Nuclear localization sequence
NSCLC: non small cell lung carcinomas

OCT-1: Organic cation transporter 1

PAF: Polypose Adénomateuse Familiale
PI3-K: Phospho-Inositide 3 Kinase
PJS: Peutz-Jeghers syndrome
PKA: Protein Kinase A
PP2A: Protein Phosphatase 2 A
PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PRAS40: Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa
PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

Raptor: Regulatory Associated Protein of mTOR
RGS: Regulator of G-protein Signaling

S-LKB / T-LKB1: Isoforme LKB1 testiculaire
S6K: ribosomal S6Kinase
SCTAT: Sex cord tumor with annular tubules
sFRP: Secreted Frizzled Related Receptors
siRNA: small interfering RNA
SIRT1: Sirtuin 1
STK11: Sérine/thréonine kinase 11
STRAD: Ste20-related adaptor protein
Swi/SNF: switching-defective/sucrose non fermenting

Tp53: Tumor protein 53
Tcf: T-cell factor
TLR: Toll like receptor

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Wnt : Wingless-type MMTV integration site family member
WRE: Wnt response element

ZMP : 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranosyl monophosphate

4E-BP1: 4E-binding protein 1
 Δ N-LKB1: deltaN-LKB1, la nouvelle isoforme de LKB1

I. Introduction générale

A. La protéine kinase LKB1

Le gène *LKB1*, connu aussi sous le nom du gène *STK11* a été cloné comme le gène de prédisposition au syndrome de Peutz-Jeghers (PJS). Il code une sérine-thréonine kinase qui exerce un rôle crucial dans la coordination entre polarité, prolifération et métabolisme cellulaires.

1. Syndrome de Peutz-Jeghers

1.1 Historique

Le syndrome de Peutz-Jeghers (PJS), dont le nom a été introduit par André J. Bruwer en 1954, a été décrit pour la première fois en 1921 par le Dr. Johannes Peutz dans un journal médical allemand où il a décrit les symptômes d'un jeune patient de 15 ans souffrant de plusieurs polypes intestinaux et d'une hyperpigmentation autour de la bouche (Figure 1) (Jansen, Ten Klooster et al. 2009). D'autres membres de sa famille présentaient les mêmes symptômes, et neuf ans plus tard ce jeune adolescent a déclaré un cancer. Ce syndrome a été par la suite mieux caractérisé par le Dr. Harold Jeghers et ses collaborateurs en 1949, suggérant un seul gène responsable de tous les symptômes observés.

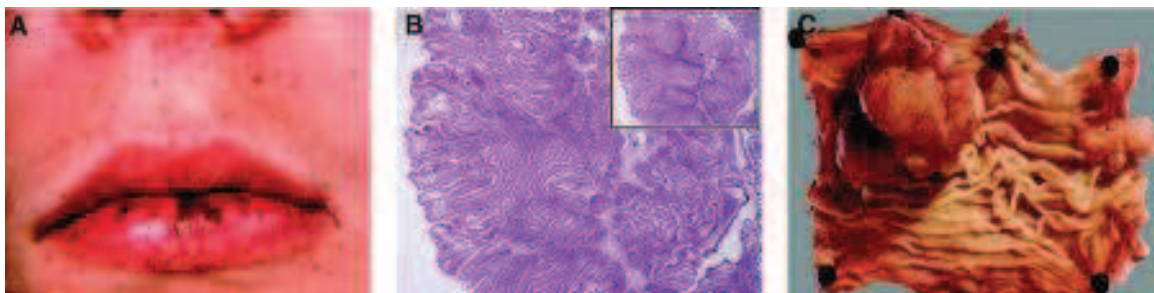


Figure 1: Caractéristiques cliniques du PJS. A: Hyperpigmentation péri-orale. B: Marquage à l'hématoxyline et l'éosine d'un polype mettant en évidence une prolifération des muscles lisses. C: Polype mature (Jansen, Ten Klooster et al. 2009).

1.2 Caractéristiques cliniques du PJS

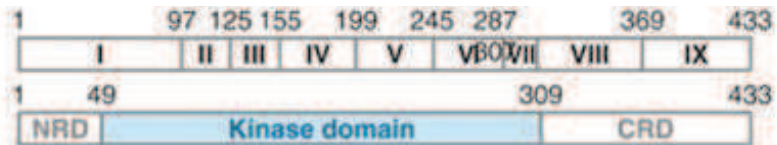
Le PJS est une polypose dont les polypes sont des hamartomes de l'ensemble du tube digestif qui est accompagnée d'une hyperpigmentation de la peau et des muqueuses. Le PJS est une maladie héréditaire à transmission

autosomique dominante rare, avec une incidence de 1/200000 (Eng, Hampel et al. 2001). Les problèmes mécaniques dus au développement de polypes chez les patients atteints de PJS dominant les deux premières décennies de la vie, mais avec l'âge, le développement de cancers devient la préoccupation clinique majeure. Le PJS prédispose à un spectre de tumeurs exceptionnellement large, principalement les cancers gastro-intestinaux mais aussi les cancers du poumon, pancréas, ovaire, col utérin et sein (Figure 2). Le risque de développer un cancer du sein chez les patientes PJS est comparable à celui des femmes porteuses de mutations BRCA1 ou BRCA2 (Hearle, Schumacher et al. 2006). Les patients atteints de PJS ont un risque accru de développer des tumeurs bénignes du tractus génital comme les tumeurs des cordons sexuels avec tubules annulaires (SCTATs) qui sont souvent bilatérales, multifocales, et bénignes (Young 2005). Les SCTATs chez les patients non affectés par le PJS sont généralement unilatérales et affichent souvent une évolution clinique maligne, contrairement à son caractère bénin chez les patients du PJS.

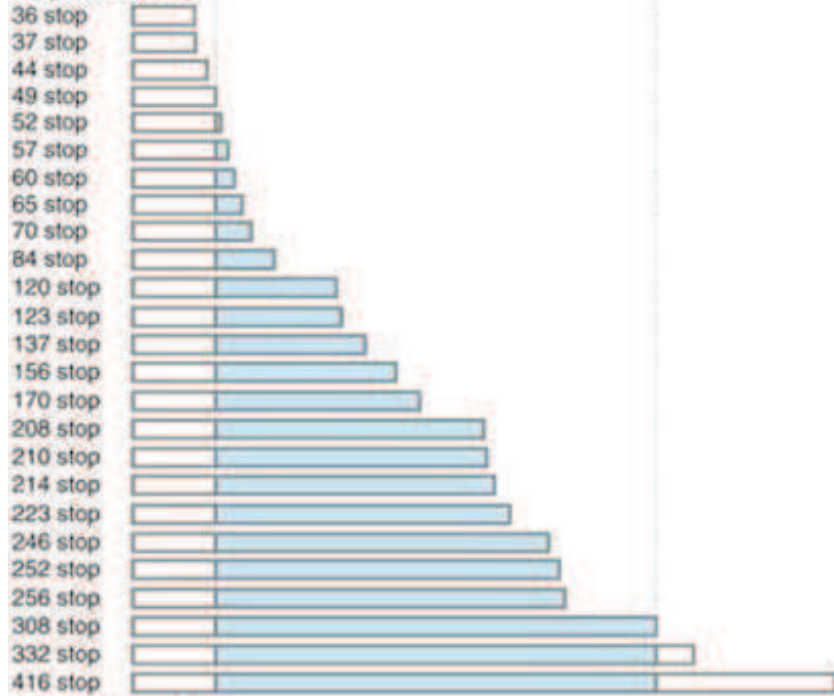
Cette prédisposition accrue aux cancers et la large gamme d'organes concernés nécessitent un dépistage régulier chez les personnes atteintes de ce syndrome.

1.3 Clonage du gène *LKB1* et génétique du PJS

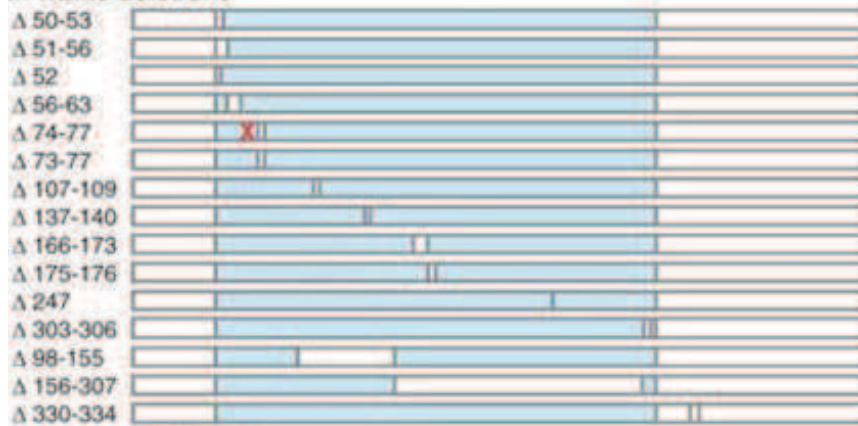
L'analyse par hybridation génomique comparative sur une cohorte de polypes de patients atteints de PJS a montré une délétion du chromosome 19p13 (Hemminki, Tomlinson et al. 1997). Cette analyse a été suivie par une recherche de mutations des gènes situés dans cette région génomique. Elle a conduit à l'identification de mutations du gène *LKB1* (Hemminki, Markie et al. 1998) (Jenne, Reimann et al. 1998). Le gène *LKB1* est situé dans la région 19p13.3, sa taille est de 23 kb, il est composé de 10 exons dont 9 sont codants et code un ARNm de 2.4 kbp.



Stop mutations



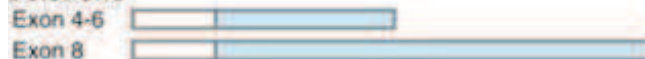
In-frame deletions



Splicing mutations



Deletions



1	97	125	155	199	245	287	307	369	433
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
1	49						309		433
	NRD	Kinase domain						CRD	

Point mutations

Y49D	X								
Y60X	X								
L67P	X								
Q100X		X							
K108R		X							
Y118X			X						
C132X			X						
G135R			X						
F157S				X					
D162N				X					
G163D				X					
L164M				X					
Q170P				X					
G171S				X					
D176N				X					
I177N				X					
N181Y				X					
N181E				X					
L182P				X					
D194N				X					
D194V				X					
D194Y				X					
E199K				X					
D208N				X					
G215D				X					
T230P					X				
S232P					X				
W239C					X				
G242W					X				
G242V					X				
L245R					X				
G251S					X				
E256S						X			
H272Y						X			
P281L						X			
R297K							X		
R297S							X		
R304W							X		
W308C							X		
P314H							X		
G315S							X		
P324L								X	
F354L									X
T367M									X

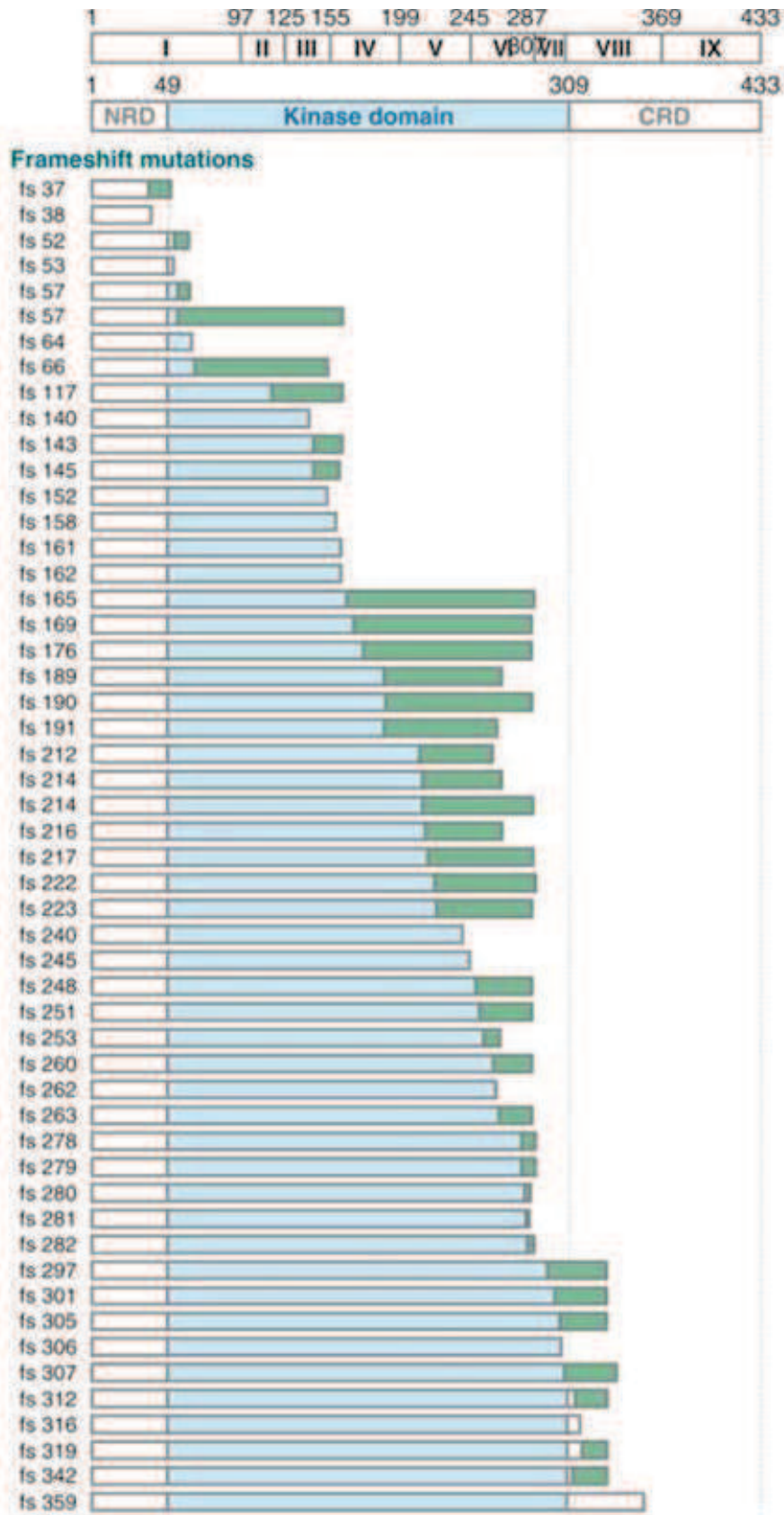


Figure 2: Mutations identifiées dans le gène *LKB1* chez les patients atteints de PJS et de cancers sporadiques et leurs effets sur la structure primaire de la protéine LKB1 (Alessi, Sakamoto et al. 2006).

Les différentes études réalisées sur des patients atteints de PJS ont d'abord montré que seulement la moitié de ces patients possède des mutations germinales du gène *LKB1*, suggérant une hétérogénéité génétique et donc l'implication d'autres gènes suppresseur de tumeur (Buchet-Poyau, Mehenni et al. 2002) (Hearle, Lucassen et al. 2004). Différentes régions génomiques ont été soupçonnées de contenir le locus responsable du PJS, telle que la région 19q, qui contient quatre gènes candidats impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire ou la pathophysiologie des cancers, mais aucune mutation de ces gènes n'a été retrouvée dans les patients PJS (Buchet-Poyau, Mehenni et al. 2002). Cependant, des analyses utilisant la technique MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) ont permis de mettre en évidence un plus large spectre de mutations du gène *LKB1* augmentant le pourcentage de patients atteints de PJS possédant une mutation du gène *LKB1* à 80% (Pan, Li et al. 2013) (Volikos, Robinson et al. 2006). Ainsi, ces résultats suggèrent que le gène *LKB1* est le principal gène responsable du PJS, réduisant la probabilité de l'existence d'autre locus PJS.

1.4 Mutations germinales de *LKB1*

Plus de 150 mutations germinales ont été caractérisées dans les familles atteintes de PJS. La plupart de ces mutations aboutissent à une protéine LKB1 tronquée d'une partie de son domaine catalytique, responsable de la perte de son activité kinase. Des protéines ayant des mutations ponctuelles dans le domaine kinase ainsi que dans la région C-terminale ont aussi été décrites. Les mutations sont des mutations de substitution de nucléotides créant des mutations non-sens et faux-sens, des délétions ou insertions qui créent des décalages du cadre de lecture, ainsi que des mutations de splicing. Des combinaisons de mutations, incluant délétion/insertion, délétion/inversion, duplications et réarrangements génomiques ont aussi été décrites. Enfin, la délétion du gène entier a même été identifiée (Alessi, Sakamoto et al. 2006).

La presque totalité des mutations est localisée dans le domaine kinase de la protéine LKB1 (Figure 2).

1.5 *LKB1*: gène suppresseur de tumeur

L'inactivation du gène *LKB1* chez les patients atteints de PJS augmente leur risque relatif de développer un cancer par un facteur 18 comparé à la population générale. Ces données suggèrent que *LKB1* est un gène suppresseur de tumeur (GST). Plusieurs études sont en accord avec cette hypothèse. La surexpression de *LKB1* dans des cellules Hela et G361, qui n'expriment pas *LKB1* endogène, conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Luukko, Ylikorkala et al. 1999), alors que la surexpression de mutants catalytiquement inactifs (dont certains ont été isolés de patients atteints de PJS) n'a pas la capacité d'arrêter le cycle cellulaire, démontrant que l'activité kinase intrinsèque de *LKB1* est requise pour bloquer le cycle cellulaire. De plus, des souris hétérozygotes pour le gène *LKB1* (*Lkb1*^{+/-}) sont viables et ne montrent aucun phénotype particulier à la naissance. Cependant, elles développent des polypes tout au long du tractus gastro-intestinal dès l'âge de 45 semaines (Jishage, Nezu et al. 2002) (Bardeesy, Sinha et al. 2002). Afin de comprendre le mécanisme du développement tumoral, plusieurs études ont été réalisées cherchant à analyser le niveau d'expression de *Lkb1* dans ces polypes. Une partie de ces études a montré que l'expression de *Lkb1* est réduite de moitié par rapport aux souris contrôles, suggérant que la formation de tumeurs résulte d'une haplo-insuffisance du gène *Lkb1* (Jishage, Nezu et al. 2002) (Rossi, Ylikorkala et al. 2002). D'autres études ont révélé la perte d'expression de *Lkb1* dans les polypes, principalement par un mécanisme de perte du deuxième allèle (LOH), mais aussi par des mécanismes épigénétiques (Bardeesy, Sinha et al. 2002). Les mêmes observations ont été réalisées chez des patients PJS (Alessi, Sakamoto et al. 2006). Ainsi, une perte totale de l'expression de *LKB1* n'est pas forcément requise pour le développement de polypes de PJS, ceux-ci peuvent aussi se développer suite à une haplo-insuffisance du gène *LKB1*. En revanche, les souris *Lkb1*^{+/-} développent plus tard (à l'âge de 50 semaines) des carcinomes hépatocellulaires qui résultent tous d'une LOH, aucune de ces tumeurs hépatiques n'expriment la protéine *LKB1* (Nakau, Miyoshi et al. 2002).

A côté de ces mutations germinales, des mutations somatiques de *LKB1* ont été décrites dans des cancers sporadiques, bien que celles-ci soient assez rares. Ces mutations sont fréquentes dans un type de cancer du poumon, les tumeurs non à petites cellules (NSCLC, non small cell lung carcinomas) où *LKB1* est muté dans

plus de 30% des cas (Sanchez-Cespedes 2007) ainsi que dans plus de 20% des cancers du col de l'utérus (Wingo, Gallardo et al. 2009).

2. La protéine LKB1 et son complexe

2.1 Profil d'expression de LKB1

LKB1 est largement exprimée dans les tissus embryonnaires et adultes. Au stade embryonnaire précoce, chez la souris, Lkb1 est fortement exprimée, de manière ubiquitaire.

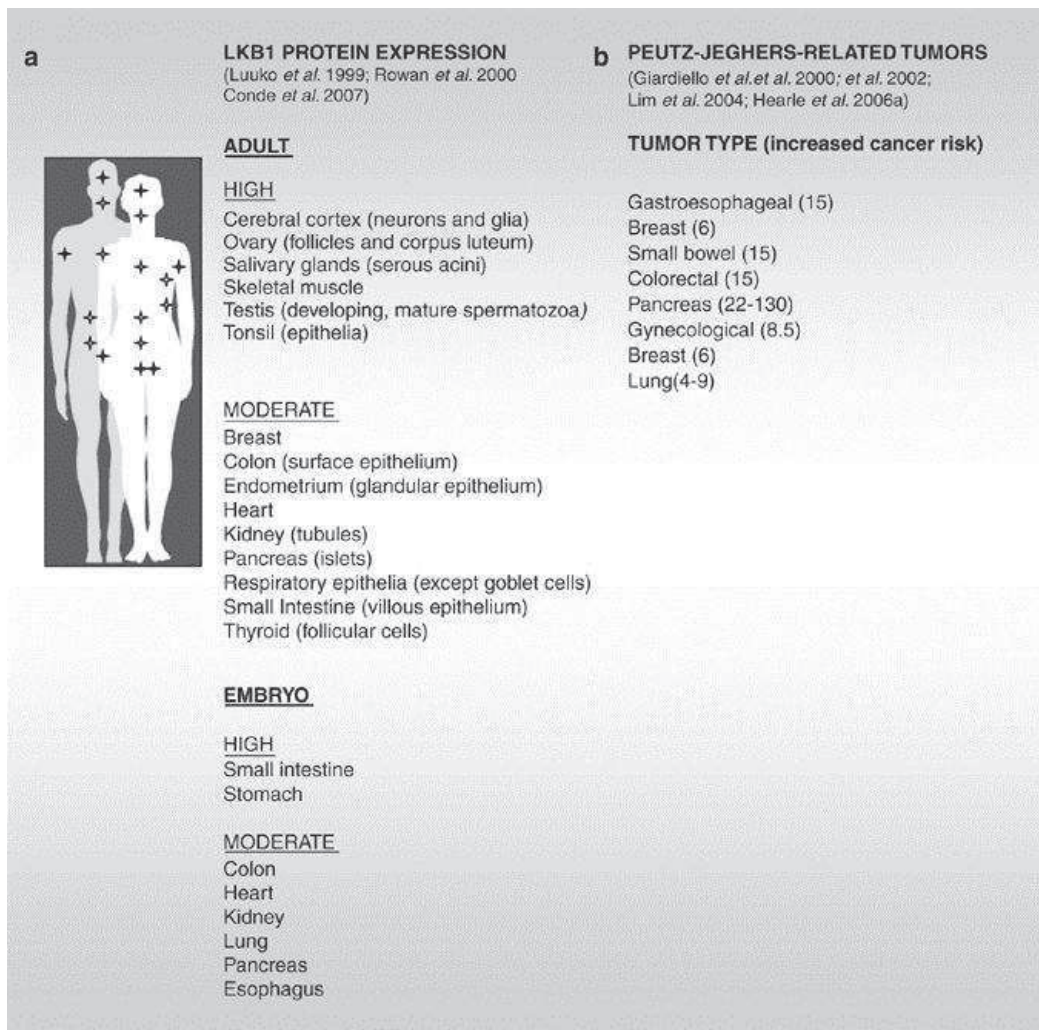


Figure 3: Profil d'expression de la protéine LKB1 dans les tissus normaux et le pattern des risques relatifs à développer des cancers chez les patients atteints de PJS.

a: Niveau d'expression de LKB1 estimé par immunomarquage dans les tissus normaux embryonnaires et adultes. b: Spectre tumoral chez les patients PJS avec les risques relatifs pour chaque cancer (Sanchez-Cespedes 2007).

Au cours du développement, l'expression de LKB1 devient spécifique et révèle une forte expression dans le cœur, l'œsophage, le pancréas, le rein, le côlon, le poumon, l'intestin grêle et l'estomac (Luukko, Ylikorkala et al. 1999) (Rowan, Churchman et al. 2000). Dans les tissus adultes, la protéine LKB1 est fortement exprimée dans la plupart des épithéliums, les follicules et corps jaune de l'ovaire, les tubes séminifères du testicule ainsi que les myocytes du muscle squelettique et les cellules gliales (Rowan, Churchman et al. 2000) (Conde, Suarez-Gauthier et al. 2007) (Figure3).

2.2 Structure de la protéine LKB1

La protéine LKB1 est une sérine-thréonine kinase constituée de 433 acides aminés chez l'homme (436 chez la souris) d'environ 50 kDa. Elle possède un domaine catalytique très conservé compris entre les résidus 49-309 (Alessi, Sakamoto et al. 2006). La fonction des régions non catalytiques localisées en N et C terminales n'est pas encore connue. Deux séquences de localisation nucléaire (NLS) sont localisées dans le domaine N-terminal entre les résidus 38-43 et 81-84 (Timm, Li et al. 2003). LKB1 a donc une localisation cellulaire qui peut être nucléaire et cytoplasmique (Figure 4).

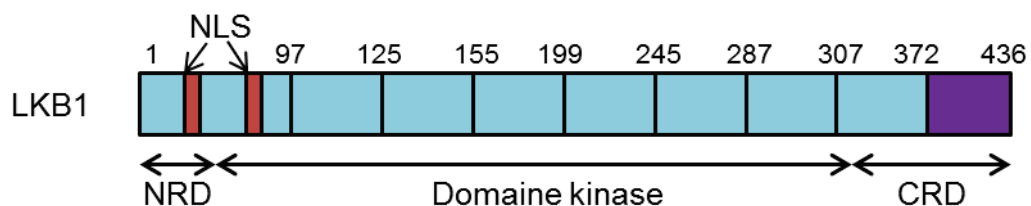


Figure 4: Structure de la protéine LKB1 avec son domaine catalytique compris entre les résidus 49-309 et ses régions N et C terminales.

LKB1 appartient à la famille des « calcium/calmoduline regulated kinase, CAMK », elle exerce ses effets cellulaires via le contrôle de la phosphorylation de 14 kinases cibles qui appartiennent à la famille des protéines kinases apparentées à l'AMPK (ARK : AMPK-related kinase) (Figure 5). Pour que la fonction kinase de LKB1 soit active, il faut que LKB1 soit présent dans un complexe tertiaire incluant la

protéine adaptatrice MO25 α et la pseudokinase STRAD α . Ces protéines sont requises pour sa translocation du noyau vers le cytoplasme et potentialisent l'activité kinase de LKB1 (Boudeau, Baas et al. 2003).

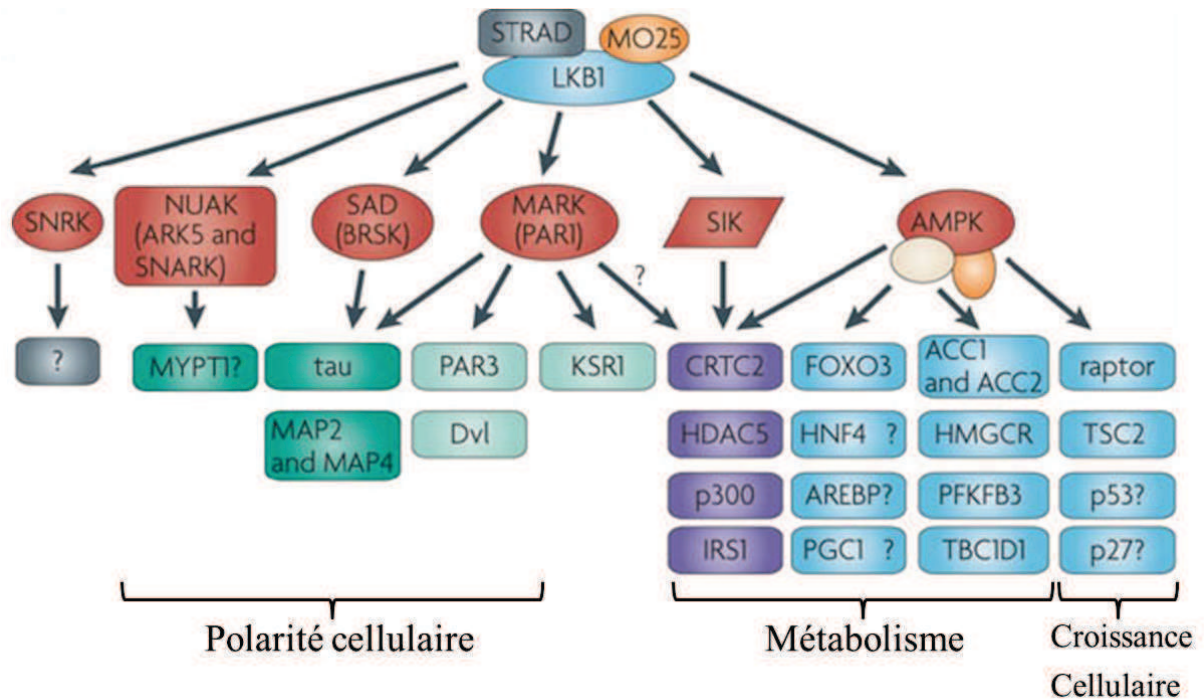


Figure 5: Signalisation dépendante de LKB1. LKB1, au sein de son complexe d'activation avec STRAD et MO25, phosphoryle et active directement 14 kinases de la famille de l'AMPK. Ces kinases à leur tour phosphorylent plusieurs substrats en aval afin de contrôler la polarité cellulaire, le métabolisme et la croissance cellulaire (Shackelford and Shaw 2009).

2.3 L'isoforme testiculaire S-LKB1

Une autre isoforme de LKB1 a été récemment caractérisée qui a été nommée « S-LKB1 ». Cette isoforme possède un domaine C-terminal modifié suite à un épissage alternatif de l'ARNm qui code la protéine classique pleine longueur (FL-LKB1, LKB1 full-length). L'isoforme S-LKB1 humaine est composée de 404 acides aminés (412 chez la souris) et code une protéine de 48 kDa (Figure 6).

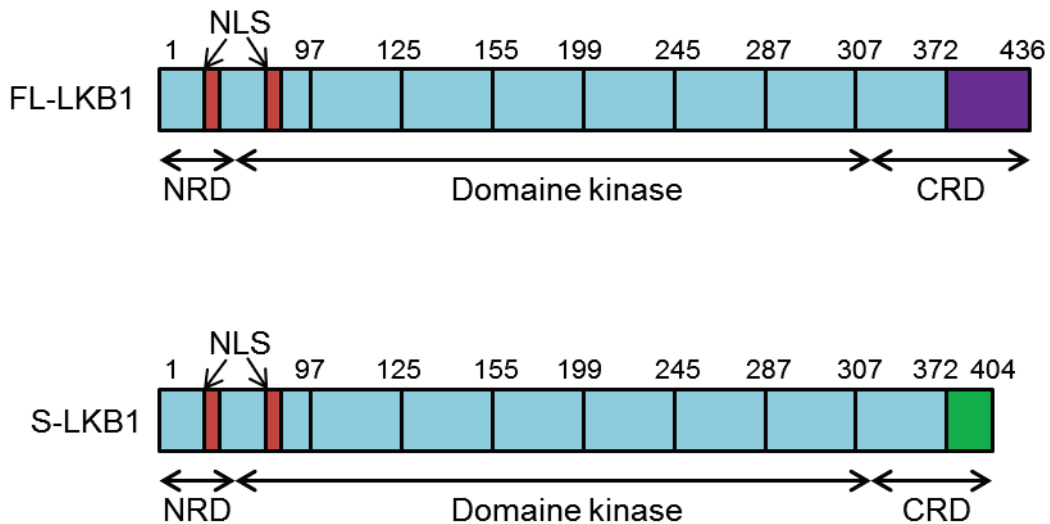


Figure 6: Structure des isoformes classique (FL-LKB1) et testiculaire (S-LKB1) de LKB1.

Contrairement à la protéine LKB1 classique (FL-LKB1) qui est exprimée de manière ubiquitaire, S-LKB1 a une distribution beaucoup plus restreinte avec une très grande prédominance dans le testicule, plus précisément au niveau des spermatozoïdes haploïdes. S-LKB1 joue un rôle crucial dans la spermatogenèse et son absence est associée à une infertilité masculine. L'activité catalytique de cette isoforme est identique à celle de FL-LKB1, elle est capable d'interagir avec le complexe d'activation contenant MO25 α et STRAD α afin de phosphoryler et d'activer les mêmes protéines kinases cibles de LKB1 (Towler, Fogarty et al. 2008) (Denison, Hiscock et al. 2009).

3. Activation de LKB1 par le complexe LKB1/STRAD/MO25

Chez les mammifères, LKB1 est associée à deux autres protéines : Ste20-related adaptor protein (STRAD) (Cao, Maeda et al. 2006) et mouse protein 25 (MO25) (Boudeau, Baas et al. 2003). Ces protéines forment un complexe hétérotrimérique impliqué dans l'activation de LKB1 (Figure 7). L'utilisation de protéines recombinantes a montré qu'en absence de ces deux protéines accessoires, l'activité kinase de LKB1 est extrêmement réduite (Hawley, Boudeau et al. 2003). La plupart des études suggèrent que LKB1 est constitutivement active une fois liée aux protéines MO25 et STRAD.

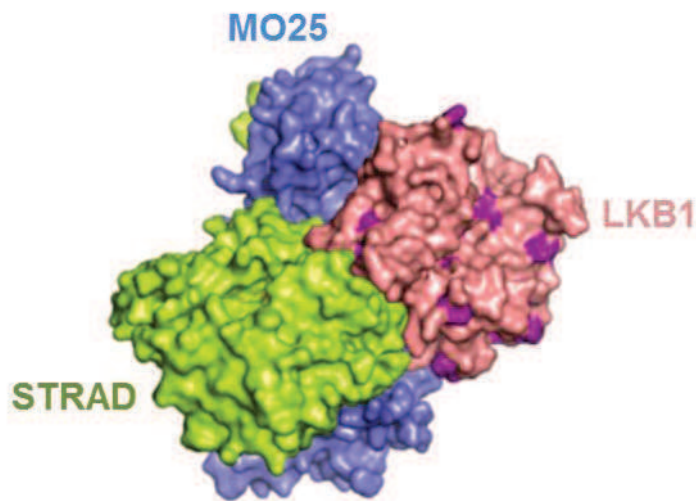


Figure 7: Structure schématique du complexe hétérotrimérique LKB1:STRAD:MO25

3.1 STRAD

La protéine STRAD (Ste-20 Related ADaptator) est un partenaire de LKB1 (Baas, Boudeau et al. 2003). Le gène *STRAD* est localisé sur le chromosome 17 humain, il est constitué de 13 exons et produit un ADNc de 2.1 kb qui code une protéine d'environ 50 kDa. Il existe deux isoformes STRAD α et STRAD β . Ces protéines sont identifiées comme des « pseudokinases » car il leur manque plusieurs résidus catalytiques clés pour la fonction kinase (Baas, Boudeau et al. 2003). En effet, bien que les protéines STRAD possèdent plusieurs motifs conservés, retrouvés dans les protéines kinases actives, liant l'ATP et l'ADP avec une grande affinité (Boudeau, Scott et al. 2004), une analyse structurale a montré que STRAD α porte de nombreuses mutations dans le domaine catalytique (Milburn, Boudeau et al. 2004).

3.2 MO25

L'interaction entre LKB1 et STRAD est stabilisée par une troisième protéine : MO25 (MOuse protein 25) dont plusieurs isoformes ont été décrites : MO25 α et MO25 β . Les isoformes de MO25 interagissent directement avec LKB1 et avec le motif peptidique W-E-F «WEF motif» présent en C-terminal de STRAD et stabilise l'interaction LKB1/STRAD (Boudeau, Baas et al. 2003) (Zeqiraj, Filippi et al. 2009).

3.3 Formation du complexe et activation de LKB1

La structure tridimensionnelle du complexe LKB1/STRAD/MO25 a montré que l'activation de la kinase LKB1 résulte d'une modification allostérique induite par STRAD qui, en adoptant une conformation proche d'une kinase active, s'associe à LKB1 mimant ainsi un de ces substrats. L'interaction entre LKB1 et STRAD entraîne une augmentation de l'activité de LKB1 de l'ordre de 100 fois (Alessi, Sakamoto et al. 2006). MO25, qui est une protéine d'échafaudage, joue un rôle crucial pour la stabilisation de la conformation de la boucle d'activation de LKB1 requise pour l'activité kinase (Zeqiraj, Filippi et al. 2009).

Bien que de nombreuses isoformes de STRAD et MO25 aient été décrites, l'ensemble des études réalisées sur LKB1 concerne les formes α de STRAD et MO25. La fonction des autres isoformes dans le complexe activant LKB1 reste à étudier. LKB1 active doit être donc considéré comme un complexe hétérotrimérique formé de LKB1/STRAD/MO25 (1 :1 :1).

4. Régulation du complexe LKB1 actif par modifications post-traductionnelles de LKB1

L'activation de LKB1 passe d'abord par son interaction avec STRAD et MO25. Toutefois, des modifications post-traductionnelles ainsi que sa localisation cellulaire sont aussi des modulateurs des différentes fonctions cellulaires de LKB1.

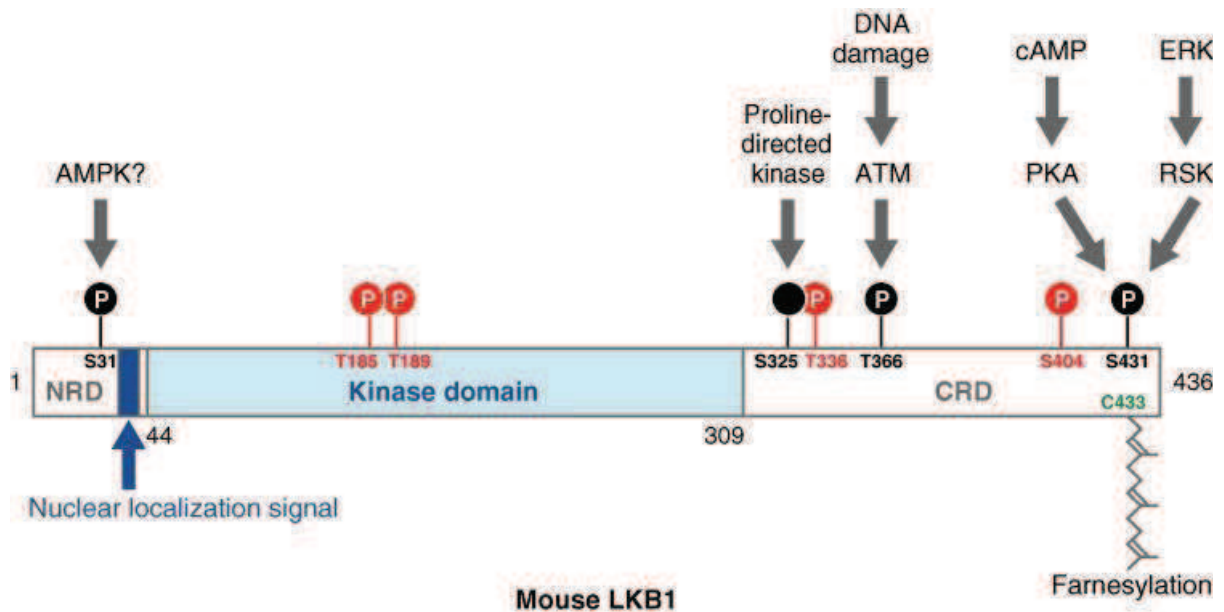


Figure 8: Modifications post-traductionnelles de LKB1. Les sites d'autophosphorylation sont représentés en rouge, les sites phosphorylés par d'autres kinases sont représentés en noir, et le site de prénylation est représenté en vert. Les résidus Thr366, Ser404, Ser431 et Cys433 chez la souris correspondent respectivement aux résidus Thr363, Thr402, Ser428 et Cys430 (Alessi et al. 2006).

4.1 Phosphorylation

La protéine LKB1 est phosphorylée sur au moins 8 résidus. Elle est phosphorylée sur les sites Ser31, Ser325, Thr363 (Thr366 chez la souris) et Ser428 (Ser431 chez la souris) par des kinases fonctionnant en amont, et s'auto-phosphoryle sur les sites Thr185, Thr189, Thr336 et Ser404 (Figure 8). Les sites de phosphorylation Thr336, Thr366 et Ser431 sont hautement conservés entre la drosophile, le xénope et les mammifères, mais pas chez le nématode (Sapkota, Boudeau et al. 2002). L'introduction de mutations de ces sites en Ala (afin d'empêcher leur phosphorylation) ou en Glu (afin de mimer une phosphorylation), n'a pas d'effet significatif sur l'activité catalytique de LKB1 *in vitro* ainsi que sur sa localisation cellulaire (Sapkota, Boudeau et al. 2002) (Boudeau, Baas et al. 2003). Cependant, la mutation du site Ser431 en Ala, avant sa surexpression dans les cellules G361 qui n'expriment pas la protéine LKB1 endogène, ne permet pas d'inhiber la croissance des cellules, suggérant que la phosphorylation du résidu Ser431 est essentielle à LKB1 pour inhiber la croissance cellulaire (Sapkota, Kieloch et al. 2001). La mutation du site Thr336, qui est le site majeur d'autophosphorylation,

en Glu (pas en Ala) empêche l'inhibition de la croissance cellulaire des cellules G361, suggérant que la phosphorylation du résidu Thr336 est importante pour inhiber la croissance cellulaire et donc pour assurer la fonction suppresseur de tumeur de LKB1 (Sapkota, Boudeau et al. 2002). Par contre, la mutation des résidus Ser31, Ser325 ou Thr366 n'a pas d'effet majeur sur la capacité de LKB1 à inhiber la croissance cellulaire dans les cellules G361 (Sapkota, Boudeau et al. 2002).

4.2 Prénylation

LKB1 possède un site consensus de prénylation CKQQ à l'extrémité C-terminale. La prénylation est la modification qui ajoute un groupement prényl hydrophobe sur une cystéine permettant ainsi la localisation membranaire de la protéine LKB1. La mutation de la Cys443 abolit cette modification (Sapkota, Kieloch et al. 2001) (Collins, Reoma et al. 2000). L'utilisation de mutants C443A a montré que même en absence de prénylation, l'activité catalytique ainsi que la capacité à inhiber la croissance cellulaire de LKB1 restent intactes, posant la question de la relevance fonctionnelle de cette modification post-traductionnelle (Sapkota, Kieloch et al. 2001). L'importance fonctionnelle de cette modification post-traductionnelle est aussi remise en cause par l'isoforme testiculaire S-LKB1 qui ne contient pas cette région protéique bien qu'elle soit capable d'activer les mêmes substrats que la forme classique LKB1 (Towler, Fogarty et al. 2008) (Denison, Hiscock et al. 2009).

4.3 Acétylation

LKB1 est acétylé sur différentes lysines. Cette modification post-traductionnelle module l'activité kinase du complexe actif de LKB1. En effet, l'acétylation de la K48 réduit son affinité pour STRAD et donc diminue l'activité du complexe. L'acétyl-transférase responsable de cette modification n'est pas encore clairement définie, mais SIRT1 pourrait être cette enzyme (Lan, Cacicedo et al. 2008).

5. Fonctions cellulaires de LKB1

La génération de modèles murins invalidés pour le gène *Lkb1* a permis de mieux comprendre les fonctions cellulaires de LKB1. Le modèle *Lkb1*^{-/-} est létal embryonnaire car les souris meurent au jour 10.5 de développement embryonnaire. Leur mort est lié principalement à des défauts de fermeture du tube neural et d'anomalies vasculaires attribuées au contrôle du niveau d'expression de VEGF (Ylikorkala et al. 2001). Ainsi que déjà décrit précédemment, les souris hétérozygotes *Lkb1*^{+/-} sont viables, elles ne montrent aucun phénotype particulier à la naissance mais développent des polypes tout au long du tractus gastro-intestinal suivis par l'apparition de carcinomes hépatocellulaires (Nakau, Miyoshi et al. 2002). Les modèles d'inactivation conditionnelle de *Lkb1* dans différents tissus, chez la souris, ont confirmé son rôle onco-suppresseur notamment dans le sein (McCarthy, Lord et al. 2009), le pancréas (Hezel, Gurumurthy et al. 2008), la prostate (Pearson, McCarthy et al. 2008), et la peau (Gurumurthy, Hezel et al. 2008).

Au niveau cellulaire, LKB1 possède des effets pléiotropes. Cette protéine est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire (Tainen, Ylikorkala et al. 1999) (Tainen, Vaahtomeri et al. 2002), l'apoptose (Cheng, Liu et al. 2009) (Karuman, Gozani et al. 2001), la régulation du métabolisme énergétique (Shackelford and Shaw 2009), la polarité cellulaire (Baas, Kuipers et al. 2004), la migration cellulaire, l'autophagie (Liang, Shao et al. 2007) et la réparation des dommages de l'ADN (Sanli, Steinberg et al. 2014). LKB1 complexée à STRAD et MO25 contrôle l'activité de 14 kinases de la famille de l'AMPK (ARK). Ces kinases cibles de LKB1 contrôlent à leurs tours plusieurs fonctions cellulaires qui jouent un rôle important dans le développement tumoral, la polarité cellulaire, l'adaptation métabolique au stress ainsi que la croissance cellulaire (Figure 5) (Shackelford and Shaw 2009).

5.1 L'AMPK : principal substrat de LKB1

L'AMPK (AMP-activated Protein Kinase, kinase activée par l'AMP), est un senseur du statut énergétique cellulaire qui est très conservé au cours de l'évolution. Ce complexe protéique contribue de façon essentielle au maintien de la balance énergétique au sein de la cellule (Carling 2004) (Hardie 2004). L'AMPK est activée par l'AMP et est inhibée par l'ATP et détecte les variations du rapport AMP/ADP et

ADP/ATP, et est ainsi activée en situation de déplétion énergétique. Son rôle principal est alors d'inhiber les voies consommatrices d'ATP et d'activer les voies productrices d'ATP. L'AMPK contribue ainsi à rétablir la balance énergétique de la cellule (Figure 9).

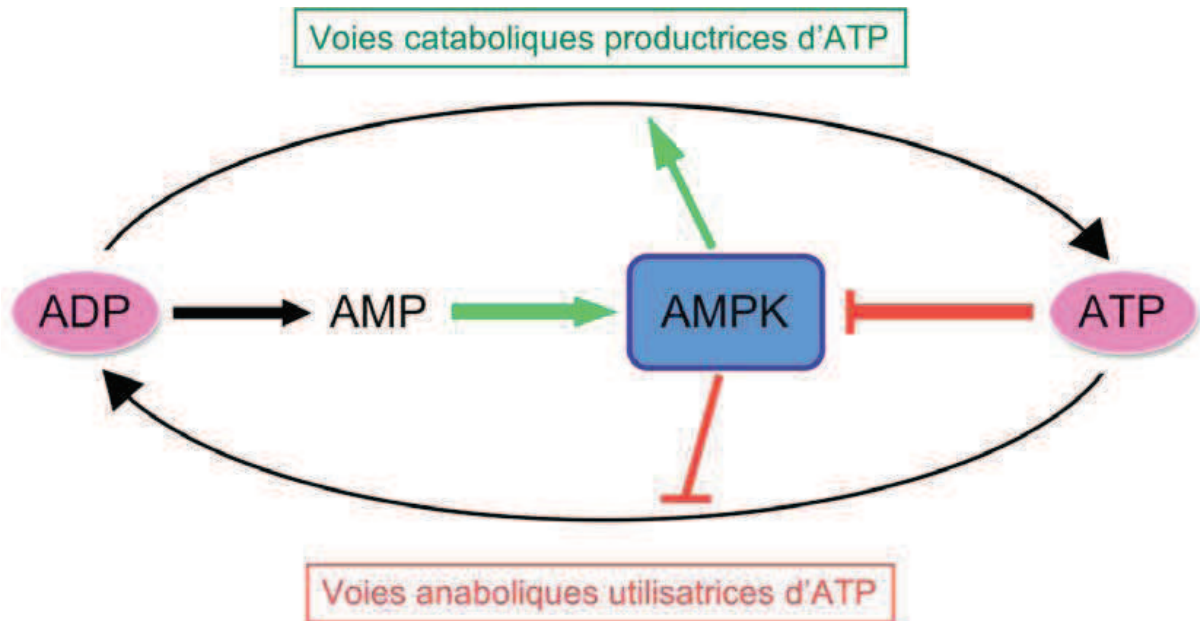


Figure 9: Schéma global de la régulation de l'AMPK en cas de stress. En situation de carence énergétique, le niveau d'AMP intracellulaire augmente et l'AMPK est activée. Afin de restaurer la balance énergétique, elle va inhiber les voies consommatrices d'ATP et activer les voies productrices d'ATP.

5.1.1. Structure de l'AMPK

L'AMPK est une sérine/thréonine kinase hétérotrimérique. Le complexe est formé d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ . Il existe deux isoformes pour la sous-unité α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$), deux isoformes pour la sous-unité β ($\beta 1$ et $\beta 2$) et trois isoformes pour la sous-unité γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$). Chacune de ces isoformes est codée par un gène différent (Viollet, Athea et al. 2009) (Figure 10), et présente une expression qui diffère selon les tissus. La sous-unité α comprend le domaine kinase en N-terminal, suivi d'une séquence auto-inhibitrice AID (Auto-Inhibitory Domain) et d'un domaine d'interaction avec la sous-unité β (Crute, Seefeld et al. 1998) (Iseli, Oakhill et al. 2008). La sous-unité β est constituée de deux éléments importants : un domaine de liaison au glycogène et un domaine d'interaction avec les sous-unités α et γ localisé en C-terminal (Iseli, Walter et al.

2005). La sous-unité γ porte quatre motifs répétés en tandem appelés motifs CBS (Bateman domain), ainsi nommés car ils ont été décrits dans la cystathionine synthase par Alex Bateman (Bateman 1997). Ces motifs confèrent à l'AMPK sa capacité à être régulée positivement par l'AMP et négativement par l'ATP (Figure 10) (Hardie, Ross et al. 2012).

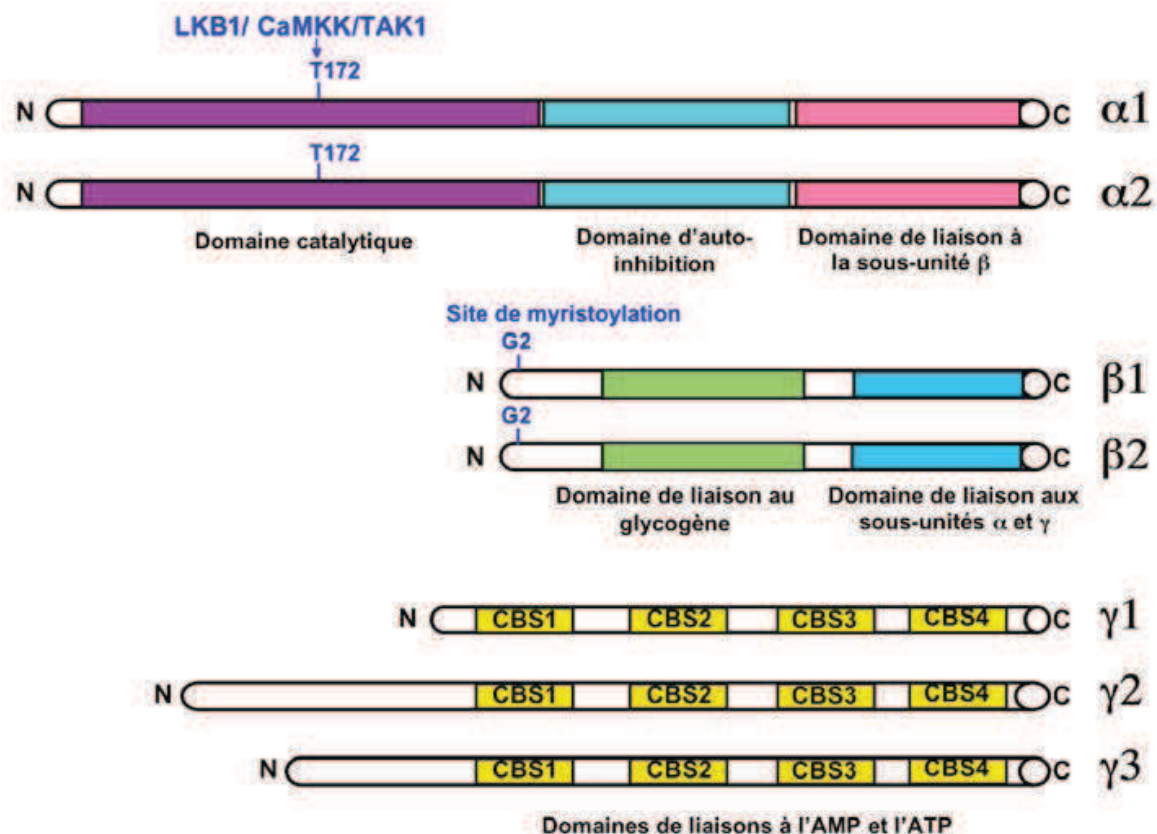


Figure 10: Les sept gènes codant les trois sous-unités de l'AMPK.

- La sous-unité α porte le domaine catalytique, un domaine d'auto-inhibition et un domaine de liaison à la sous-unité β .
- La sous-unité β porte un domaine de liaison au glycogène et un domaine de liaison aux sous-unités α et γ .
- La sous-unité γ porte quatre motifs CBS de liaison à l'AMP ou à l'ATP (Viollet, Athea et al. 2009).

5.1.2. Distribution tissulaire des complexes

L'expression de la sous-unité AMPK α 1 est ubiquitaire alors que celle de l'AMPK α 2 est majoritaire dans le cœur et le muscle squelettique (Cheung, Salt et al. 2000) (tableau 1). La distribution tissulaire des différentes sous-unités a été analysée

chez les rongeurs, montrant que l'expression de l'isoforme $\beta 1$ est restreinte au cœur, au foie et au cerveau. L'isoforme $\beta 2$ est fortement exprimée dans le muscle squelettique (Thornton, Snowden et al. 1998) (tableau 1). Les isoformes $\gamma 1$ et $\gamma 2$ sont exprimées dans la plupart des tissus tandis que $\gamma 3$ est exclusivement exprimée dans le muscle squelettique (Cheung, Salt et al. 2000) (Mahlapuu, Johansson et al. 2004) (tableau 1).

	Muscle squelettique	Cœur	Foie	Cerveau
$\alpha 1$	-	-	+	+
$\alpha 2$	+	+	-	-
$\beta 1$	-	+	+	+
$\beta 2$	+	-	-	-
$\gamma 1$	-	+	+	+
$\gamma 2$	-	+	+	+
$\gamma 3$	+	--	--	--

Tableau 1: Distribution chez le rongeur des différentes isoformes des trois sous-unités de l'AMPK dans le muscle squelettique, le cœur, le foie et le cerveau.
 -- : isoforme très peu exprimée ; - : isoforme minoritaire ; + : isoforme majoritaire.

5.1.3. Localisation intracellulaire

La distribution au sein de la cellule des différentes isoformes n'est pas homogène. Les deux sous-unités catalytiques $\alpha 1$ et $\alpha 2$ ont ainsi un profil de localisation qui diffère dans les cellules de mammifères. La sous-unité $\alpha 1$ est localisée dans la fraction non-nucléaire, tandis que la sous-unité $\alpha 2$ se retrouve dans les fractions nucléaires et non-nucléaires (Salt, Celler et al. 1998). Les isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$ ont été détectées dans les fractions nucléaires ainsi que non nucléaires d'extraits cellulaires (Warden, Richardson et al. 2001). En ce qui concerne la sous-unité γ , l'isoforme $\gamma 1$ présente une localisation préférentielle dans le noyau comparé aux deux autres isoformes (Turnley, Stapleton et al. 1999).

Les localisations intracellulaires des différents complexes AMPK suggèrent que certaines des trois isoformes, en particulier $\alpha 2$, $\beta 2$ et $\gamma 1$, pourraient être

majoritairement impliquées dans la régulation de l'expression de gènes, tandis que les autres isoformes seraient impliquées dans la régulation cytosolique ou les fonctions membranaires de LKB1. En accord avec cette idée, McGee et ses collaborateurs ont montré dans le muscle squelettique que l'AMPK α 2 migre dans le noyau après 60 minutes d'exercice intense (McGee, Howlett et al. 2003), ce qui suggère un rôle accru de l'AMPK α 2 dans la régulation de l'expression de gènes dans le muscle squelettique.

5.1.4. Régulation allostérique de l'AMPK par l'AMP

L'AMPK est activée quand les taux d'AMP augmentent de façon concomitante avec une diminution des taux d'ATP. En effet, l'AMP est un activateur allostérique de l'AMPK, il se lie de façon réversible à la sous-unité γ . A l'inverse, l'ATP est un inhibiteur de l'AMPK, à forte concentration, il entre en compétition avec l'AMP pour se fixer sur la sous-unité γ . Les études structurales ont montré que la sous-unité γ contient quatre sites de liaison aux adényls, correspondants aux quatre domaines CBS (Xiao, Heath et al. 2007). La structure de la sous-unité γ des mammifères n'est capable de fixer que trois molécules d'AMP, dont deux seulement peuvent s'échanger avec l'ATP (Figure 11) (Xiao, Heath et al. 2007). Le domaine CBS2 n'a pas la capacité de se lier à des adényls. Le domaine CBS4 est toujours occupé par une molécule d'AMP non échangeable dont le rôle n'est pas encore élucidé. En absence de stress énergétique (taux ATP/AMP et ATP/ADP élevés), les sites CBS1 et CBS3 sont liés à une molécule d'ATP. Lors d'un stress énergétique modéré, le remplacement de l'ATP par l'ADP ou l'AMP sur le site CBS3 de la sous-unité γ , provoque la phosphorylation de la Thr-172 de la sous-unité α et l'augmentation de l'activité de l'AMPK de 100 fois. En réponse à un stress énergétique plus important, le remplacement de l'ATP par l'AMP sur le site CBS1 active allostériquement l'AMPK de 10 fois plus que la première activation (Figure 11) (Xiao, Heath et al. 2007).

Des études *in vitro* ont montré que le rôle principal de l'AMP serait de protéger la Thr-172 de la déphosphorylation, et non de stimuler sa phosphorylation (Sanders, Grondin et al. 2007) (Suter, Riek et al. 2006). Ainsi, l'AMP, suite à sa liaison sur les sites CBS, active l'AMPK par au moins deux mécanismes distincts et complémentaires, une activation allostérique et une protection de la

déphosphorylation de la Thr-172 (Figure 11), lui conférant un fort pouvoir activateur et régulateur de la kinase (Hardie, Ross et al. 2012).

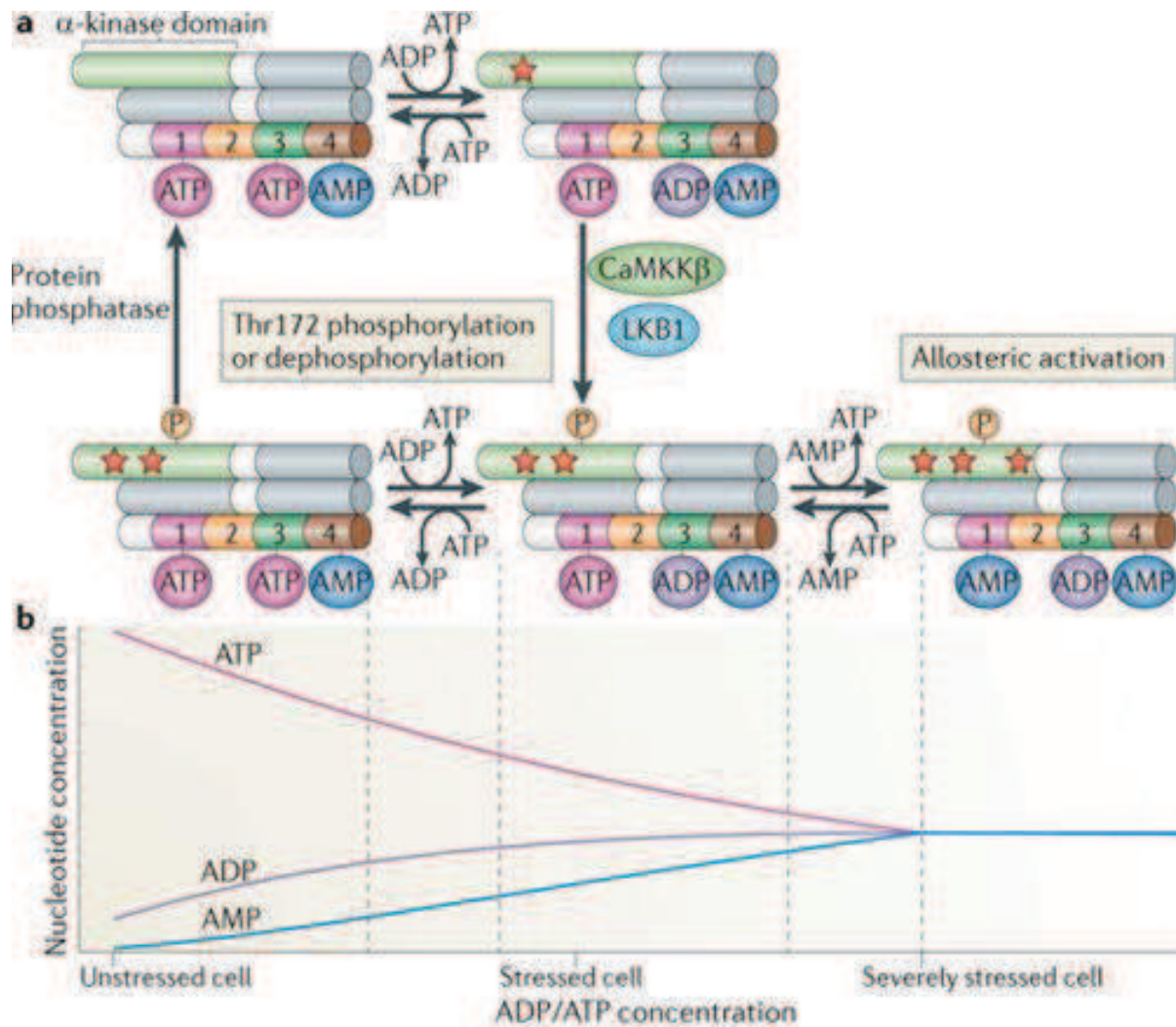


Figure 11: Schéma global de la régulation de l'AMPK par l'AMP et l'ATP (Hardie, Ross et al. 2012).

5.1.5. Activation de l'AMPK par phosphorylation

Comme bon nombre de kinases, l'AMPK requiert une phosphorylation par une kinase amont pour être active. Ainsi, l'activité catalytique de la sous-unité α est augmentée de façon très importante par la phosphorylation réversible du résidu Thr-172 (Hawley, Davison et al. 1996). Les protéines kinases sont régularées par de multiples mécanismes. En ce qui concerne la branche CAMK du kinome, branche à laquelle appartient l'AMPK, les kinases portent toutes une séquence auto-régulatrice en C-terminal de leur domaine catalytique, qui bloque leur activité catalytique (Kobe

and Kemp 1999). Ainsi, la sous-unité $\alpha 1$ tronquée (délétion des résidus 1-312) est active en l'absence des sous-unités β ou γ , tandis que la forme pleine longueur de $\alpha 1$ (1-392) est inactive, suggérant la présence d'une séquence auto-régulatrice entre les acides aminés 312 et 392 (Crute, Seefeld et al. 1998). Une étude précise a montré que la séquence auto-inhibitrice est une séquence de 23 résidus entre les acides aminés 313 et 335 (Pang, Xiong et al. 2007).

LKB1 n'est pas la seule kinase amont qui phosphoryle l'AMPK, CAMMK et TAK1 sont aussi des kinases activatrices de l'AMPK (Figure 10).

5.1.6. Activateurs pharmacologiques de l'AMPK

- **L'AICAR**

L'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide- β -D-ribofuranoside) est le composé pharmacologique qui a été le plus utilisé pour comprendre le rôle de l'AMPK. L'AICAR entre dans la cellule par le transporteur de l'adénosine, puis il est métabolisé par l'adénosine kinase en ZMP (5-aminoimidazole-4-carboxamide- β -D-ribofuranosyl monophosphate), un analogue de l'AMP (Corton, Gillespie et al. 1995) (Gadalla, Pearson et al. 2004) (Figure 12). Le ZMP agit alors exactement comme l'AMP endogène, se liant aux domaines CBS de la sous-unité γ de l'AMPK et activant allostériquement la kinase (Sabina, Patterson et al. 1985).

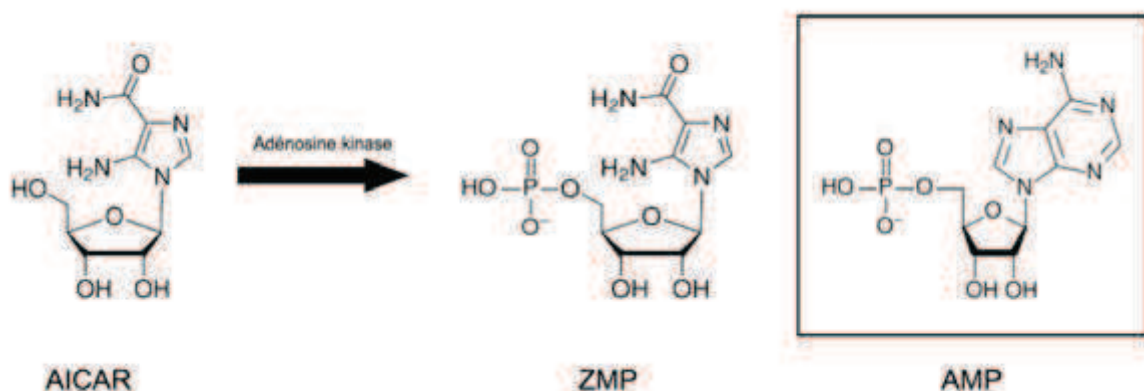


Figure 12: Structure chimique de l'AICAR, du ZMP et de l'AMP.

Dans le muscle squelettique isolé, l'AICAR augmente la phosphorylation de l'AMPK (Fujii, Hirshman et al. 2005) (Hayashi, Hirshman et al. 1998). Une étude

exhaustive des mécanismes d'action de nombreux activateurs de l'AMPK a été réalisée dans des cellules HEK293 exprimant de façon stable le mutant $\gamma 2$ R531G, qui est insensible à l'AMP (Hawley, Ross et al. 2010). Celle-ci a permis de montrer que l'AICAR est incapable d'activer la forme mutante de l'AMPK. Il est également important de noter que l'AICAR n'affecte pas la consommation d'oxygène des cellules et ne modifie pas les niveaux endogènes d'AMP ou d'ATP (Hawley, Ross et al. 2010) (Hayashi, Hirshman et al. 2000). Il semble donc que l'AICAR n'affecte pas la fonction mitochondriale de la cellule mais agit uniquement de façon allostérique, par liaison à la sous-unité γ de l'AMPK.

- **La metformine**

La metformine (N,N-diméthylimidodicarbonimidic diamide) est une molécule anti-diabétique très largement prescrite pour le traitement du diabète de type 2 (Figure 13).

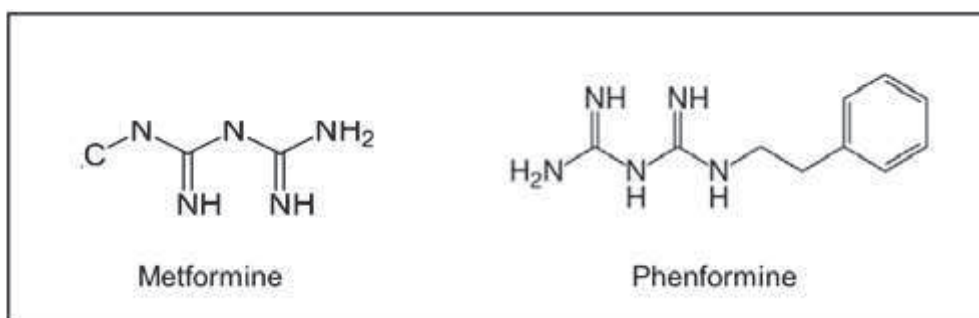


Figure 13: Structure chimique de la metformine et de la phenformine.

Elle permet notamment de diminuer la glycémie et d'améliorer la sensibilité à l'insuline chez les patients, mais le mécanisme mis en jeu n'est pas clair. Plusieurs études montrent que la metformine est capable d'activer l'AMPK dans le muscle squelettique et dans le foie (Musi, Hirshman et al. 2002) (Zhou, Myers et al. 2001), mais le fait que l'AMPK soit le médiateur de tous les effets bénéfiques de la metformine reste controversé. L'action de la metformine est dépendante de son entrée dans les cellules qui est relayée par le transporteur OCT1 (organic cation transporter 1) (Shu, Sheardown et al. 2007). Ce transporteur étant majoritairement exprimé dans le foie, et peu exprimé dans le muscle (Lee, Wolff et al. 2009), les effets systémiques de la metformine seraient plutôt relayés par ses effets hépatiques.

Le mécanisme par lequel la metformine active l'AMPK n'est pas encore compris. Plusieurs études ont montré que la metformine est un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire (El-Mir, Nogueira et al. 2000) (Owen, Doran et al. 2000) et diminue fortement la consommation d'oxygène des cellules (Hawley, Ross et al. 2010). Le complexe I de la chaîne respiratoire est un complexe clé dans la régulation de la respiration cellulaire et la synthèse d'ATP. Ainsi, il est supposé que la metformine activerait l'AMPK via l'augmentation du rapport AMP/ATP.

- **Autres activateurs indirects**

De nombreuses autres molécules sont capables d'activer l'AMPK de façon indirecte, comme bon nombre de toxines mitochondriales (oligomycine, roténone, dinitrophénol (Fujii, Hirshman et al. 2005) (Hawley, Ross et al. 2010) (Hayashi, Hirshman et al. 2000). Un certain nombre de composés végétaux naturels sont également capables d'activer l'AMPK, vraisemblablement en interférant avec la chaîne respiratoire (Hawley, Ross et al. 2010) (resveratrol, berbérine, quercétine, génystéine, capsaïcine et épigallocatechine gallate).

5.2 Contrôle du métabolisme par LKB1

LKB1 contrôle le métabolisme glucidique et lipidique de plusieurs tissus jouant un rôle clé dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, comme le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique. Son activité est requise pour l'inhibition de la néoglucogenèse et de la lipogenèse hépatique induite par l'activation de l'AMPK. Ce contrôle implique à la fois un contrôle de l'activité de différentes enzymes clé de ces processus, ainsi qu'un contrôle de la transcription de différents gènes métaboliques (Hardie, Ross et al. 2012). Le contrôle du métabolisme lipidique par LKB1 implique en partie l'AMPK qui phosphoryle et inactive l'acétyl-CoA Carboxylase (ACC). L'ACC catalyse la réaction qui permet d'obtenir le malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA dans le tissu adipeux et dans le foie. Cette transformation de l'acétyl-CoA constitue la première étape de la biosynthèse des acides gras. Ainsi, l'AMPK inhibe la synthèse des acides gras via l'inactivation de l'ACC. L'AMPK régule également à long terme la transcription des gènes de la lipogenèse en inhibant l'expression et l'activité des facteurs de transcription SREBP1 et ChREBP (Foretz, Ancellin et al. 2005). Dans le

foie et dans le muscle strié, le malonyl-CoA produit par l'ACC est un régulateur qui inhibe la carnitine-palmitoyl-transférase-1(CPT-1) qui transporte les acides gras du cytosol vers la mitochondrie. Ainsi, une fois activée, l'AMPK entraîne une déplétion du taux du malonyl-CoA cytosolique afin que les acides gras puissent pénétrer dans la mitochondrie et être oxydés pour permettre la production d'ATP. De plus, l'AMPK active le facteur de transcription PGC-1 α , qui active la biogenèse mitochondriale musculaire optimisant ainsi l'oxydation des substrats (Zong, Ren et al. 2002).

5.3 Métabolisme et cancer

La stimulation de l'AMPK par des agents pharmacologiques exerce un rôle anti-tumoral. En effet, une étude épidémiologique, réalisée sur des patients atteints de diabète de type II et traités à la metformine, a mis en évidence une diminution du risque de développer des cancers chez ces patients (Evans, Donnelly et al. 2005). Ce phénomène conférerait un rôle anti-cancéreux à l'AMPK et l'utilisation des agents pharmacologiques activateurs de l'AMPK aurait un intérêt clinique dans la prévention et ou le traitement des cancers (Billaud and Viollet 2010). Etant donné que LKB1/AMPK inhibe la voie mTor, hyperactivée dans de nombreux cancers, les activateurs de l'AMPK seraient très bénéfiques. Cependant, l'AMPK est activée dans le microenvironnement des cellules cancéreuses naissantes et en métastases qui se trouvent en condition de stress énergétique ou d'hypoxie et est requise pour la survie cellulaire (Shaw, Kosmatka et al. 2004). L'activité catalytique de l'AMPK est importante pour promouvoir la croissance de xénogreffes de tumeurs issus de fibroblastes embryonnaires transformés par Ras (Laderoute, Amin et al. 2006). Ainsi, le rôle de l'AMPK diffère lors des différentes étapes du processus tumorigénique et les traitements activateurs de l'AMPK pourraient exercer des effets soit pro-tumoraux, soit anti-tumoraux.

5.4 Polarité cellulaire

Le contrôle de la polarité cellulaire est une propriété importante des épithéliums, qui se manifeste par la formation de deux domaines membranaires distincts dont les fonctions sont spécialisées. La formation, le maintien et la fonction des tissus épithéliaux sont assurés par un canevas de protéines membranaires connectés à des réseaux intracellulaires de molécules de structure et de signalisation

qui organise la polarité spécialisée du tissu et contrôlent ses relations avec le milieu extérieur. Cette organisation moléculaire est très conservée au cours de l'évolution.

LKB1 et ses orthologues jouent un rôle critique dans la régulation de la polarité cellulaire. Chez la drosophile, LKB1 régule l'axe antéro-postérieur de l'ovocyte de drosophile, LKB1 a été identifié suite au criblage de mutants défectueux dans la formation de cet axe (Martin and St Johnston 2003). Chez le nématode, PAR4, l'orthologue de LKB1, joue un rôle important pendant les étapes précoces du développement embryonnaire puisqu'il régule la première division cellulaire asymétrique du zygote (Kemphues, Priess et al. 1988). Chez les mammifères, LKB1 est capable d'induire une polarisation cellulaire dans des cellules ne présentant aucune polarité cellulaire initiale. En effet, l'activation de LKB1 dans des cellules intestinales isolées induit un remodelage du cytosquelette d'actine aboutissant à la formation d'une bordure en brosse qui ressemble à celle présente au pôle apical d'une cellule épithéliale polarisée (Baas, Kuipers et al. 2004) (Figure 14).

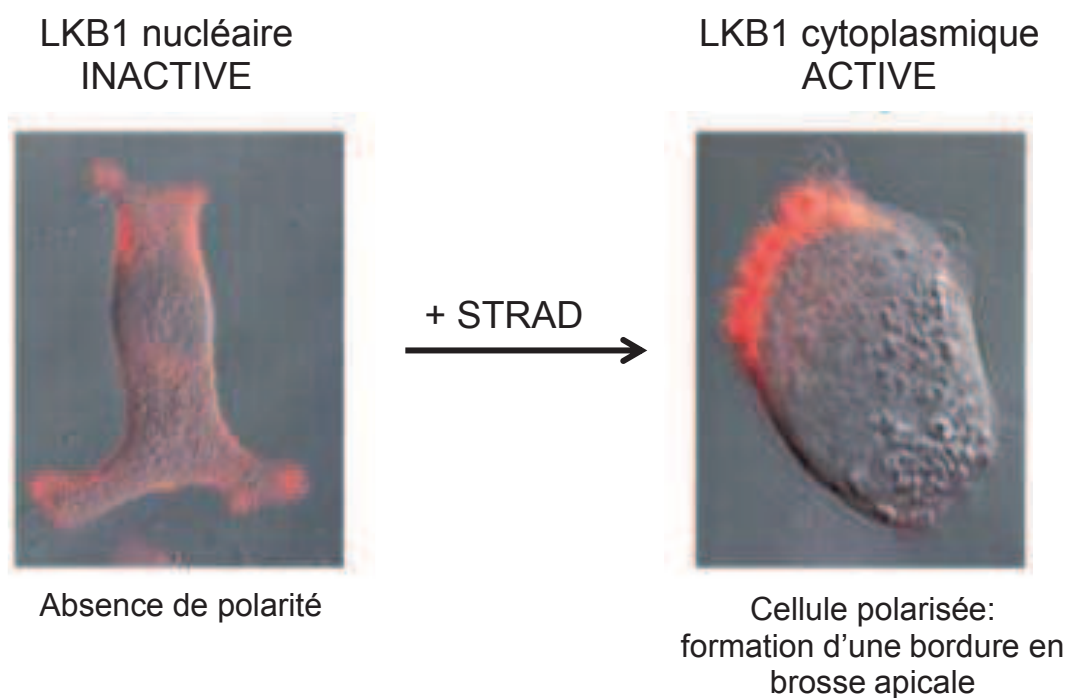


Figure 14: Induction de la polarisation des cellules épithéliales intestinales LS174T (surexprimant LKB1 exogène) suite à la surexpression de STRAD et donc l'activation de LKB1 (Baas, Kuipers et al. 2004).

LKB1 joue aussi un rôle important dans le maintien de l'intégrité des structures épithéliales. Des expériences réalisées à l'aide de culture tridimensionnelle de cellules de cancer mammaire ont montré que l'inactivation de LKB1 désorganisait la structure arrondie des acinis (Partanen, Tervonen et al. 2012). Enfin, LKB1 est aussi impliquée dans les phénomènes de migration cellulaire qu'ils soient physiologiques, comme la migration neuronale (Winckler 2007) (Chen, Wang et al. 2006), ou pathologiques observées lors des phénomènes d'invasion tumorale (Huang and Muthuswamy 2010).

De par la conservation évolutive de ces mécanismes, les mêmes complexes protéiques d'échafaudage sont retrouvés que ce soit pour assurer la polarité apico-basale d'un épithélium monocouche ou permettre une migration cellulaire polarisée.

5.4.1. LKB1 et architecture épithéliale

Pour assurer leur fonction barrière et d'échange, les cellules épithéliales sont organisées en deux compartiments membranaires, de composition protéiques et lipidiques distinctes qui sont la membrane apicale et la membrane baso-latérale, délimités par les jonctions serrées ainsi que les jonctions adhérentes composées de E-cadhérine et du complexe intracellulaire impliquant la β -caténine (Figure 15).

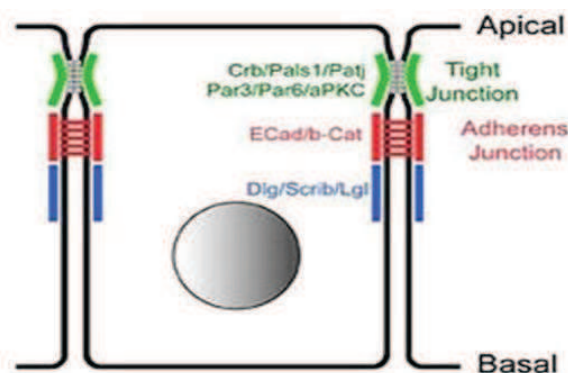


Figure 15: Architecture épithéliale

Le pôle apical, en contact avec le milieu extérieur est spécialisé dans les échanges d'ions et de nutriments, alors que le pôle basolatéral assure l'adhérence

cellulaire et la communication entre les cellules et la matrice extracellulaire. Trois complexes de protéines agissent ensemble et de manière coordonnée pour générer et maintenir une polarité apico-basale. Il s'agit de deux complexes qui sont situés au pôle apical, le complexe « Par3/Par6 » et complexe « Crumbs » qui confèrent à la membrane son identité apicale. Le complexe « Scrib » formé par les protéines Dlg, Scrib, Lgl ainsi que les protéines Par1 localisées au pôle basal de la cellule épithéliale confère à la membrane son identité baso-latérale. La polarisation des cellules épithéliales résulte d'interactions antagonistes qui sont en équilibre dynamique entre les complexes protéiques apicaux et baso-latéraux. Ces interactions établissent une identité distincte et mutuellement exclusive de ces différents domaines membranaires (Lee and Vasioukhin 2008) (Figure 16).

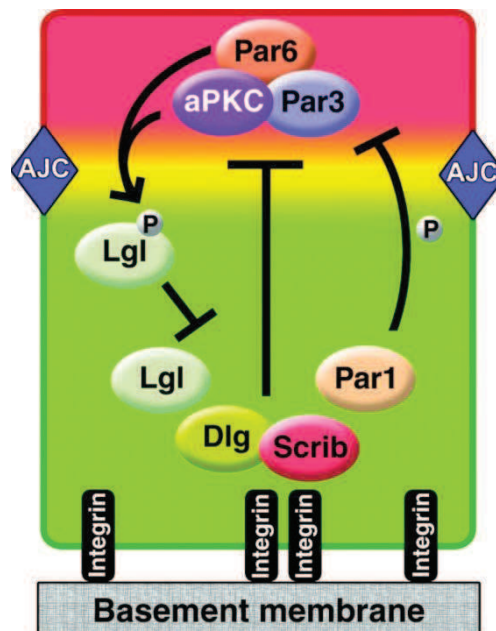


Figure 16: Les mécanismes de base du contrôle de la polarité cellulaire apico-basale : le complexe protéique Par3-PAR6 se localise au niveau de la membrane apicale afin de promouvoir une identité de la membrane apicale. La fonction de ce complexe Par3-PAR6-aPKC est contrecarrée par les protéines Dlg, Scrib, LGL et Par1 qui se localisent au niveau de la membrane basale afin de promouvoir une identité membranaire. aPKC neutralise l'activité des protéines de polarité basale par l'intermédiaire d'une phosphorylation directe inactivant Lgl (Lee and Vasioukhin 2008).

Chez l'homme, il existe quatre isoformes du gène correspondant à PAR-1, qui sont des kinases régulant l'état de polymérisation des microtubules, ces kinases sont MARK1, MARK2, MARK3 et MARK4 (microtubule affinity-regulating kinase). LKB1

contrôle la polarité cellulaire en phosphorylant et activant les MARKs (Lizcano, Goransson et al. 2004) (Spicer, Rayter et al. 2003) ainsi que d'autres kinases contrôlant la polymérisation du cytosquelette d'actine et des microtubules.

Plus récemment, l'AMPK a aussi été impliquée dans le contrôle de la polarité épithéliale (Lee, Koh et al. 2007) (Zheng and Cantley 2007). Dans ce cas, un remaniement du cytosquelette d'actine est l'effecteur cellulaire principal suite à l'activation de l'AMPK. LKB1 est associée à la formation des jonctions adhérentes dépendantes de l'E-caderine (Sebbagh, Santoni et al. 2009). L'AMPK est nécessaire pour la formation des jonctions serrées et l'assemblage des cellules épithéliales rénales MDCK (Zhang, Li et al. 2006) (Zheng and Cantley 2007). Il a été montré dans ce modèle que le changement de la concentration calcique entraîne l'activation de l'AMPK qui serait nécessaire et suffisante à l'assemblage des jonctions serrées indiquant que ce phénomène serait probablement indépendant de LKB1. Dans le foie, LKB1 et l'AMPK régulent à la fois la formation des canalicules biliaires, la formation des jonctions serrées et le maintien de la polarité des hépatocytes (Tang, Chen et al. 2010) (Fu, Wakabayashi et al. 2010). Ainsi, l'AMPK qui avait été décrit comme un acteur important du contrôle énergétique, se retrouve être aussi un acteur de la polarité épithéliale (Mirouse and Billaud 2011).

5.4.2. Contrôle de la migration cellulaire polarisée

L'étude des conséquences fonctionnelles des mutations identifiées dans le domaine C-terminal de LKB1, dans le cas du PJS et de tumeurs sporadiques, a montré que des mutations dans le domaine catalytique de la kinase ou dans le domaine C-terminal empêchent la migration polarisée des astrocytes (Forcet, Etienne-Manneville et al. 2005). De même, LKB1 est impliqué dans les phénomènes de migration neuronale et de maturation des neurones. LKB1 est d'ailleurs exprimé fortement dans le néocortex en développement. Un effecteur cellulaire important dans ces processus, est le contrôle de la position et du mouvement du centrosome par LKB1 (Asada, Sanada et al. 2007).

LKB1 est donc un régulateur clé de la polarité, et les changements résultants de défauts de la polarité cellulaire, comme les défauts du fuseau mitotique, de l'intégrité des cellules, ou de la transition épithélio-mésenchymateuse responsable

d'une augmentation de la motilité des cellules, sont associés à l'initiation ainsi qu'à la progression des cancers (Huang and Muthuswamy 2010). Ces données contribuent à confirmer le rôle suppresseur de tumeur de LKB1.

5.5 Rôle de LKB1 dans le contrôle de la croissance cellulaire

Chez les patients atteints de PJS, la formation des hamartomes intestinaux pourrait être due à une hyperprolifération et / ou une diminution de la mort cellulaire par apoptose, conséquences de l'altération des fonctions de LKB1 dans ce syndrome (Katajisto, Vallenius et al. 2007). LKB1 contrôle à la fois la prolifération cellulaire et l'apoptose via deux voies de signalisation majeures, la voie mTOR et la voie p53.

5.5.1. Régulation de la voie mTor par LKB1

La kinase mTOR est présente dans deux complexes. A ce jour, seul le complexe mTORC1 est décrit comme étant régulé négativement par LKB1. Le complexe mTORC1 est formé de la kinase mTOR associée à d'autres protéines dont la protéine Raptor. Il intègre des signaux extracellulaires provenant de facteurs de croissance et des signaux intracellulaires renseignant sur le niveau énergétique et la disponibilité en nutriments. L'activation du complexe mTORC1, lorsque tous ces indicateurs sont positifs, conduit à une activation de la biosynthèse protéique, de l'anabolisme lipidique, de la production en nucléotides et ainsi à la croissance et prolifération cellulaire. A l'inverse, des défauts d'activation de la voie mTORC1 conduisent à une activation de l'autophagie (Wullschleger, Loewith et al. 2006).

LKB1 contrôle négativement mTORC1, ces effets sont relayés suite à l'activation de l'AMPK par LKB1 et impliquent deux mécanismes (Shaw 2009) (revue R shaw). Le premier implique le contrôle du complexe TSC1/TSC2 qui est un répresseur de mTORC1. Le complexe TSC1/TSC2 a une activité GAP et contrôle négativement l'activité de la protéine Rheb qui lorsqu'elle est sous une forme liée au GTP va permettre l'activation directe du complexe mTORC1. L'activation de l'AMPK stimule l'activité GAP du complexe TSC1/TSC2, inhibant ainsi mTORC1. Le

deuxième implique une phosphorylation directe de Raptor par l'AMPK entraînant la déstabilisation du complexe mTORC1 (Gwinn, Shackelford et al. 2008).

Parmi les substrats de mTORC1, deux effecteurs sont phosphorylés et sont des activateurs de la synthèse protéique, les kinases p70S6K (S6K) et les protéines 4E-BP (4E-binding protein).

Plusieurs études soulignent le rôle inhibiteur de LKB1 dans le contrôle de la prolifération cellulaire. L'étude des polypes développés chez les souris LKB1^{-/+} qui ont perdu l'expression de LKB1 a mis en évidence une hyperphosphorylation de 4E-BP1 et p70/S6K indiquant un état activé de mTORC1 qui est associée à une hyperprolifération montrée par un marquage au Ki-67 (Shaw, Bardeesy et al. 2004). Dans les cellules du cancer du sein, MCF-7, la metformine, un activateur de l'AMPK, entraîne une diminution de 30% du niveau de synthèse protéique et de la prolifération cellulaire. Cette diminution de la traduction des protéines est due à l'inhibition de mTORC1. Or, dans la lignée MDA-MB-231 qui n'exprime pas LKB1, le traitement à la metformine n'exerce aucun effet. Les conséquences de l'activation de l'AMPK induite par la metformine pourraient constituer un mécanisme d'action de ce médicament dans l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses (Dowling, Zakikhani et al. 2007).

5.5.2. Régulation de la voie p53 par LKB1

La surexpression de LKB1 dans des lignées cellulaires cancéreuses n'exprimant pas de LKB1 endogène, issues soit d'un mélanome (G361), soit d'un adénocarcinome de poumon (A549), soit d'un cancer du col utérin (HeLa), inhibe la prolifération cellulaire. Dans ces modèles cellulaires, l'inhibition de la prolifération est spécifique du blocage en phase G1 du cycle cellulaire et n'est pas due à une augmentation de l'apoptose (Tiainen, Ylikorkala et al. 1999). Dans ce modèle, l'arrêt du cycle cellulaire provient de l'augmentation de l'inhibiteur du cycle cellulaire, p21WAF1/CIP1. Cette induction de p21 est consécutive à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 induite suite à sa phosphorylation par LKB1. (Zeng and Berger 2006).

Cependant, l'activation de p53 par LKB1 n'a pas seulement des conséquences dans le contrôle du cycle cellulaire, un rôle pro-apoptotique dépendant de p53 a aussi été décrit. Ceci a été décrit dans l'intestin. Des expériences d'immunohistochimie, réalisées sur des coupes d'intestin de souris, ont montré que LKB1 est surexprimée dans les cellules épithéliales de l'intestin qui sont en apoptose au sommet des microvillosités intestinales. Les polypes provenant des patients atteints de PJS dépourvus de marquage LKB1 présentent moins de cellules apoptotiques. Ainsi, la diminution de l'apoptose serait un facteur clé dans la formation des polypes intestinaux (Karuman, Gozani et al. 2001). Cependant, les souris p53^{-/-}, bien qu'elles présentent un défaut d'apoptose dans les cellules épithéliales intestinales, ne développent pas d'hamartomes (Merritt, Potten et al. 1994). D'autres travaux indiquent que l'apoptose induite par LKB1 ne passerait pas obligatoirement par p53. Dans la lignée cellulaire issue d'un carcinome pancréatique, AsPC1, dépourvue de LKB1 et de p53, la réintroduction de LKB1 active la voie mitochondriale de l'apoptose (Qanungo, Haldar et al. 2003). Chez la drosophile, l'apoptose régulée par LKB1 est dépendante des caspases, elle dépend de la voie JNK et est indépendante de p53, cette mort cellulaire pouvant être supprimée par des inhibiteurs des caspases mais pas par un dominant négatif de p53 (Lee, Koh et al. 2006).

6. Rôle de LKB1 dans le développement et l'homéostasie tissulaire chez la souris

Bien que *LKB1* soit un gène suppresseur de tumeur, son inactivation ciblée dans différents tissus ne conduit pas toujours à l'apparition de tumeurs et révèle des phénotypes qui diffèrent entre les organes, soulignant la spécificité tissulaire des fonctions de LKB1. La délétion de LKB1 a été réalisée dans différents tissus, je ne présenterai que les tissus qui ont fait l'objet de mon travail, c'est-à-dire, le foie et le muscle.

6.1 Rôle de LKB1 dans l'embryogenèse

LKB1 est essentiel pour l'embryogenèse car son inactivation par recombinaison homologue chez la souris est létal embryonnaire au stade E11.

L'analyse des embryons au stade E8.5-E9.5 révèle des anomalies graves de développement, y compris une anomalie de la fermeture du tube neural et de la formation des somites ainsi qu'une vascularisation défectueuse. Les tissus extra-embryonnaires (sac vitellin et le placenta) présentent également des anomalies (Ylikorkala, Rossi et al. 2001).

6.2 Rôle de LKB1 dans l'angiogenèse

Le rôle de LKB1 dans l'endothélium a été étudié par Londesborough et al. en 2008 (Londesborough, Vaahtomeri et al. 2008) en invalidant *LKB1* spécifiquement dans les cellules endothéliales vasculaires de souris. Ce modèle murin est létal embryonnaire à E12.5. Les animaux présentent des vaisseaux embryonnaires dilatés et un gonflement péricardique. Les vaisseaux sanguins sont irréguliers et déformés. Dans ce modèle murin, la signalisation TGF β est réduite et l'analyse du phénotype suggère que la perte de LKB1 entraîne une modification des cellules musculaires lisses vasculaires requises pour la formation et la maturation des vaisseaux. Une augmentation de la signalisation VEGF a été observée suggérant un rôle anti-angiogénique de LKB1 (Ylikorkala, Rossi et al. 2001). Ceci est aussi observé dans les polypes des patients atteints de PJS, où la perte de LKB1 entraîne une augmentation de la vascularisation et du facteur HIF1 α (Shackelford, Vasquez et al. 2009). De plus, l'utilisation de cultures cellulaires en système 3D dans lesquels les cellules endothéliales sont cultivées dans du Matrigel montre qu'à la fois la surexpression (Xie, Dong et al. 2009) et l'invalidation (Ohashi, Ouchi et al. 2010) de LKB1 inhibent la formation du réseau vasculaire. L'ensemble de ces résultats suggère qu'une expression correcte de LKB1 est essentielle pour l'angiogenèse.

6.3 Rôle de LKB1 dans le foie

Le foie est un organe important dans le contrôle de nombreuses voies métaboliques, notamment celles du glucose et des lipides dont la glycogénèse, la glycogénolyse, la néoglucogénèse, la lipogénèse, et la synthèse du cholestérol. L'inactivation de LKB1 dans les hépatocytes de souris adultes est responsable d'une hyperglycémie à jeun due à une absence de suppression de la néoglucogénèse (Shaw, Lamia et al. 2005). Ce phénotype n'est pas corrigé par l'administration de la metformine, indiquant que LKB1 est nécessaire pour les effets de la metformine *in*

vivo. L'inactivation de *LKB1* dans le foie embryonnaire entraîne des défauts de formation des canaux biliaires responsable du développement d'une cholestase avec une accumulation de la bile dans le foie et le sérum. Ce phénotype serait dû à une altération de la polarité hépatocytaire, avec un défaut dans la formation des canalicules biliaires associé à un mauvais adressage des protéines apicales (Woods, Heslegrave et al. 2011).

6.4 Rôle de LKB1 dans le muscle

Les muscles sont des tissus très consommateurs d'énergie jouant un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie du glucose. Sakamoto et al. (2005) ont fourni la première preuve génétique que *LKB1* est nécessaire pour l'activation de l'AMPK *in vivo* dans le muscle squelettique. Ils ont généré des souris invalidées pour *LKB1* spécifiquement dans le muscle. Dans ce modèle murin, aucune activation de l'AMPK α 2 (l'une des deux sous-unités catalytiques alternatives de l'AMPK) par l'AICAR ou la contraction musculaire n'est possible (Sakamoto, McCarthy et al. 2005). Ce résultat a été confirmé par une autre étude qui a aussi étudié les conséquences de la perte de *LKB1* dans le muscle sur l'homéostasie glucidique (Koh, Arnolds et al. 2006). De manière intéressante, le métabolisme du glucose semble être accru chez ces souris, ce qui se traduit par une diminution de la glycémie à jeun et de la concentration sérique d'insuline, une amélioration de la tolérance au glucose et une augmentation de l'absorption du glucose dans le muscle. Ce phénotype indique que *LKB1* joue le rôle d'un régulateur négatif du métabolisme du glucose dans le muscle, il est associé à une amélioration de l'absorption du glucose dans le muscle, médiée par une augmentation de la phosphorylation d'Akt et réduction de l'expression de son inhibiteur TRB3. La perte de *LKB1* affecte l'activité de l'AMPK α 2, mais pas celle de l'AMPK α 1 dans les cellules musculaires. Ces travaux montrent que les effets métaboliques médiés par *LKB1* dans le muscle sont inversés par rapport à ceux obtenus dans le foie, pour le métabolisme du glucose (Koh, Arnolds et al. 2006).

7. Exemples du rôle de LKB1 dans le cancer

7.1 Rôle de LKB dans le cancer du sein

LKB1 exerce un rôle suppresseur de tumeur dans le cas du cancer du sein. En effet, les patients PJS ont un risque augmenté de développer un cancer du sein comparé à la population générale. LKB1 montre aussi des mutations somatiques dans les formes sporadiques de cancers du sein (Shen, Wen et al. 2002). La perte d'expression de LKB1 est liée à différents sous-type de cancer tels le carcinome papillaire et le sous ensemble des tumeurs contenant les carcinomes invasifs et les carcinomes *in situ* de haut grade (Fenton, Carlile et al. 2006). De plus, un faible taux d'expression de LKB1 est corrélé à une tumeur de haut grade et de grande taille, la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques et une baisse de la survie. De nombreuses études ont été réalisées afin de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués. Des auteurs ont recherché le rôle de la mutation de LKB1 dans la tumorigenèse mammaire en inactivant le gène *LKB1* spécifiquement dans la glande mammaire. Des tumeurs de la glande mammaire se développent au bout de 46 à 85 semaines. La tumeur se caractérise par un carcinome invasif canalaire de grade 2 ou un carcinome papillaire solide avec des caractéristiques histologiques proches de celles décrites dans le cancer de sein développé chez les patientes atteintes de PJS (McCarthy, Lord et al. 2009).

La surexpression de LKB1 a également été décrite comme inhibant la migration et l'invasion cellulaires et induisant une diminution des métastases pulmonaires. Le mécanisme impliqué serait l'inhibition des métalloprotéinases de la matrice MMP-2 et MMP-9. Cette surexpression entraîne également une diminution de la densité des micro-vaisseaux et la régulation négative de VEGF et bFGF (Zhuang, Di et al. 2006) associé au rôle positif de LKB dans l'angiogénèse.

LKB semble jouer un rôle dans la signalisation du récepteur aux œstrogènes. Une équipe a montré que LKB1 est un co-activateur en se liant directement à ER α et en transactivant l'expression des gènes cibles du récepteur de l'ER (Nath-Sain and Marignani 2009). Cependant, le rôle de co-activateur semble paradoxal pour une fonction de suppresseur de tumeur, car l'augmentation de l'expression de ER α est associée à une augmentation du risque de développer un cancer du sein. Dans la lignée cellulaire MCF-7, le traitement par l'oestradiol entraîne une diminution du taux

du transcrit et de la protéine LKB1 de façon dose dépendante, ainsi qu'une diminution du taux du transcrit et de la protéine LKB1 de façon ligand indépendante et cette interaction est diminuée en présence d'œstradiol. L'activité du promoteur de LKB1 est diminuée en présence d'E2 (Brown, McInnes et al. 2011). Plus récemment une étude visant à déterminer si LKB1 est régulée transcriptionnellement par ER α dans des lignées cellulaires mammaires a été menée. ER α semble être un répresseur du niveau de transcription de LKB1 et du taux de la protéine LKB1. Une analyse *in silico* révèle la présence de plusieurs éléments de réponse des œstrogènes putatifs (ERE) dans la région promotrice de *LKB1* (Linher-Melville, Zantinge et al. 2012).

La voie de signalisation LKB1/AMPK pourrait servir de cible thérapeutique dans le cancer du sein. L'adiponectine inhibe l'adhésion cellulaire, l'invasion et la migration, suite à la stimulation de LKB1, l'activation de l'AMPK et la suppression de mTOR (Taliaferro-Smith, Nagalingam et al. 2009). De plus, la metformine en activant l'AMPK grâce à LKB1, inhibe l'expression de l'aromatase ce qui conduit à une diminution du taux d'œstrogènes (Brown, Hunger et al. 2010). L'adiponectine et les activateurs du complexe LKB1/AMPK pourraient donc être efficaces dans le traitement du cancer du sein.

7.2 Rôle de LKB1 dans le cancer du poumon

Le rôle de LKB1 dans le cancer du poumon a également été étudié. Lorsque LKB1 est délétée et K-ras activée chez la souris, des tumeurs du poumon associées à un envahissement ganglionnaire et des métastases se développent. L'étude des profils protéomiques ont permis d'identifier des signatures de gènes et des phosphoprotéines associées à la perte de LKB1 et à la progression de la tumeur invasive et métastatique. Cette étude a mis en évidence que Src est activée dans les tumeurs primaires et métastatiques déficientes en LKB1. Ainsi, l'inhibition contrôlée de Src, PI3K et MEK1/2 entraîne une régression de la tumeur (Carretero, Shimamura et al. 2010).

B. La voie Wnt/ β -caténine

La β -caténine a été identifiée initialement dans la cellule épithéliale comme interagissant avec le domaine cytoplasmique de la E-cadhérine. Elle joue ainsi un rôle structural dans l'adhésion cellulaire en faisant le lien entre les E-cadhérines et le cytosquelette d'actine au niveau des jonctions adhérentes (Barth, Nathke et al. 1997). L'homologie entre la β -caténine et la protéine Armadillo (Arm) chez la drosophile (relais du signal Wingless (Wg)), a permis d'impliquer cette protéine dans une fonction de signalisation, celle de la voie Wnt.

Cette voie de signalisation, très conservée au cours de l'évolution, joue un rôle majeur dans la prolifération et la spécification cellulaires (Miller 2002). L'implication de la voie Wnt dans la carcinogenèse humaine a été mise en évidence pour la première fois dans le cancer colorectal (Korinek, Barker et al. 1997) (Morin, Sparks et al. 1997). Par la suite, des altérations de la voie Wnt ont été décrites dans nombreux cancers, y compris dans le carcinome hépatocellulaire (Giles, van Es et al. 2003).

Outre la voie canonique, il existe deux voies non canoniques qui jouent un rôle dans la polarité cellulaire (voie Wnt/JNK) et dans les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation (voie Wnt Ca^{2+}). Ces deux voies sont indépendantes de la β -caténine mais passent aussi par l'interaction d'un ligand Wnt avec un récepteur frizzled (Fz). Ces deux voies ne faisant pas l'objet du travail qui suit, ne seront pas détaillées.

1. Généralités sur la voie canonique Wnt/ β -caténine

Dans une cellule épithéliale non soumise à un signal Wnt, la β -caténine est essentiellement localisée au niveau de la membrane où elle est associée aux cadhérines. Elle est pratiquement indétectable dans le cytoplasme car elle est en permanence dégradée. En effet, elle est phosphorylée par les kinases CKI (Casein Kinase I) et GSK3 β (Glycogène Synthase Kinase 3 beta) au sein d'un complexe multiprotéique impliquant différents constituants dont les produits de deux gènes suppresseurs de tumeur, *APC* et *AXINE*. Elle est alors prise en charge par le β -TrCP, qui permet son ubiquitination puis sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome.

Dans une cellule soumise à un signal Wnt, la liaison de Wnt à son récepteur Frizzled va recruter un corécepteur de la famille LRP5/6 permettant alors la transduction du signal. L'association de Wnt au complexe Fz/LRP entraîne une succession d'événements qui permettront le recrutement de l'Axine au niveau de la membrane empêchant la dégradation de la β -caténine. La β -caténine non phosphorylée s'accumule alors dans le cytosol, subit une translocation dans le noyau, où, en coopération avec des facteurs de transcription de la famille LEF/TCF, elle va activer l'expression de gènes cibles de cette voie, qui sont ses effecteurs moléculaires.

Dans une cellule transformée où les gènes codant pour β -caténine ou APC sont mutés, le complexe de phosphorylation-dégradation de la β -caténine n'est pas fonctionnel. Il en résulte une activation constitutive de la voie Wnt/ β -caténine. Ainsi, de la même façon qu'en présence d'un signal Wnt, la β -caténine va émettre un signal de prolifération qui est cette fois-ci continu et oncogénique.

2. Principaux partenaires de la voie

2.1 La β -caténine

La β -caténine est une protéine multifonctionnelle de 92 kDa qui présente 3 principales régions (Figure 17):

- Une région N-terminale contenant un domaine de phosphorylation pour les kinases CK1 et GSK3 β (permettant le contrôle de son taux intracytoplasmique (Yost, Torres et al. 1996)) et un domaine de liaison à la β -caténine nécessaire à l'adhésion cellulaire.
- Une région centrale composée de 12 répétitions d'un motif de 42 acides aminés (motif Armadillo), permettant l'interaction avec tous ses partenaires, impliqués à la fois dans l'adhésion et dans la signalisation.
- Une région C-terminale contenant un domaine de transactivation (Miller and Moon 1996).

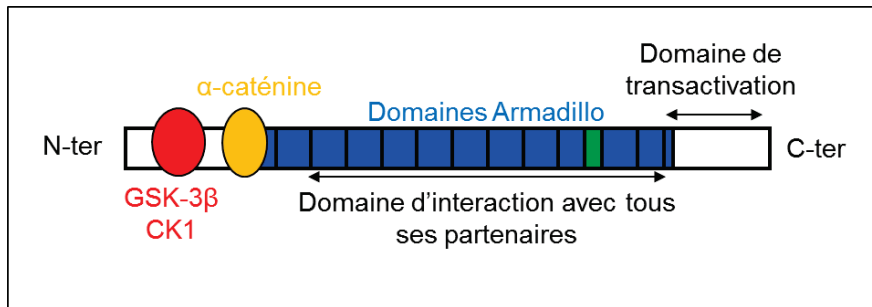


Figure 17: Représentation schématique de la structure de la β -caténine avec les 12 domaines armadillo en bleu, le site d'interaction à CK1 et GSK3 β en rouge et le site d'interaction à α -caténine en orange.

Il est important de noter que la β -caténine, effecteur majeur de la voie de signalisation Wnt, est impliquée dans le contrôle de la transcription de nombreux gènes, bien qu'elle ne possède ni site de liaison à l'ADN, ni signal d'import nucléaire.

2.2 Adenomatous polyposis coli (APC)

Le gène *APC* est situé sur le chromosome 5 au locus q21-22 et il est constitué de 15 exons dont le dernier est de très grande taille. Il existe deux isoformes d'ARNm par épissage alternatif au niveau de l'exon 9. Ce gène code une protéine d'environ 310 kDa.

C'est tout d'abord un régulateur négatif du signal Wnt, partenaire du complexe de dégradation de la β -caténine, qui agit en facilitant la phosphorylation le β -caténine par la GSK3 β . La β -caténine se lie au niveau de deux régions d'APC situées dans la partie centrale de la protéine, cette partie centrale est constituée de 3 domaines répétés de 15 acides aminés et de 7 domaines de 20 acides aminés (Figure 18). Trois de ces derniers domaines forment la région appelée MCR (Mutation Clustering Région) où beaucoup de mutations sont retrouvées.

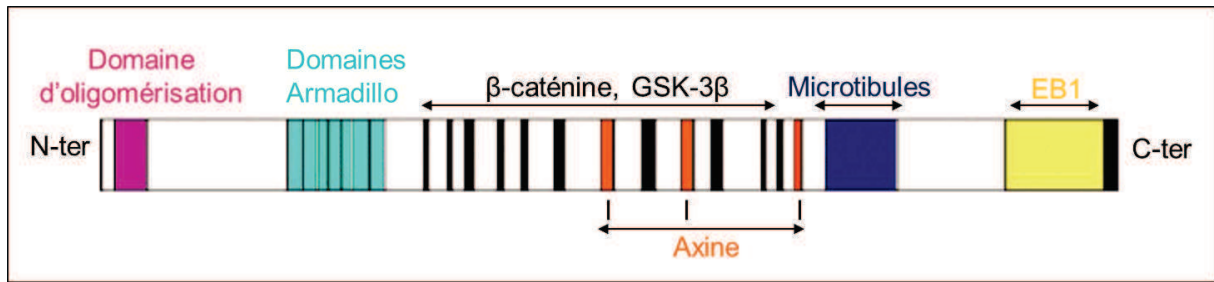


Figure 18: Représentation schématique de la structure de la protéine APC : sont représentés les principaux domaines structuraux, le site des principales mutations (MCR) et les sites d'interaction avec les différents partenaires.

Les mutations d'*APC* conduisent pratiquement toujours à la genèse d'une protéine tronquée qui est privée de ces domaines d'interaction avec la β -caténine et avec l'*Axine*. Dans les cancers colorectaux, la présence de mutation du gène *APC* est corrélée avec un taux élevé de β -caténine et un complexe TCF/ β -caténine transcriptionnellement actif (Korinek, Barker et al. 1997) (Morin, Sparks et al. 1997). Dans des cellules issues de cancers coliques, la réexpression d'une forme sauvage d'*APC* entraîne à l'inverse une réduction de taux de β -caténine (Munemitsu, Albert et al. 1995). *APC* joue par ailleurs un rôle dans l'export de la β -caténine du noyau vers le cytoplasme, grâce à différents signaux d'export nucléaires (Nuclear export signal, NES) (Figure 18) (Bienz 2002).

APC joue aussi un rôle dans la migration cellulaire. Il est impliqué dans le contrôle de la dynamique des microtubules de la migration polarisée des cellules épithéliales.

Enfin *APC* est impliqué dans le contrôle de la stabilité chromosomique. Il interviendrait pendant la mitose au cours de ségrégation chromosomique en stabilisant l'interaction entre les microtubules du fuseau et les kinétochores (Fodde, Kuipers et al. 2001).

2.3 Axine

L'*AXINE* a été identifié au départ comme le gène murin appelé « *Fused* » et dont l'inactivation homozygote conduisait à une duplication de l'axe dorso-ventral au cours de l'embryogenèse. La voie Wnt déterminant la formation de l'axe dorso-

ventral, l'Axine a alors été proposé comme régulateur négatif de cette voie (Zeng, Fagotto et al. 1997).

Chez les mammifères, cette protéine est codée par 2 gènes différents, l'*AXINE1* et l'*AXINE2* (ou axil ou conductine), qui codent pour 2 protéines de structure et de fonction similaires, homologues à 44% (Chia and Costantini 2005). L'Axine1 est exprimée de manière relativement ubiquitaire et représente un composant essentiel du complexe de dégradation de la β -caténine, alors que l'Axine2 est exprimée en réponse au signal Wnt et servirait de facteur limitant de la durée et de l'intensité du signal Wnt, impliquant ainsi l'Axine2 dans le rétrocontrôle négatif de la voie (Salahshor and Woodgett 2005). Quel que soit l'Axine considérée, on retrouve 2 domaines conservés; un domaine en N-terminal RGS (Regulator of G-protein Signaling) contenant le site de liaison à APC, et en C-terminal le domaine DIX impliqué dans l'homodimérisation et l'interaction avec Dvl. Le domaine central contient les sites de liaison à β -caténine, GSK3 β , APC, la phosphatase PP2A (Protein Phosphatase 2 A) et CK1 (casein kinase 1). Des partenaires supplémentaires ont été identifiés, MEKK1 et SMAD3, HIPK2 et P53. (Figure 19).

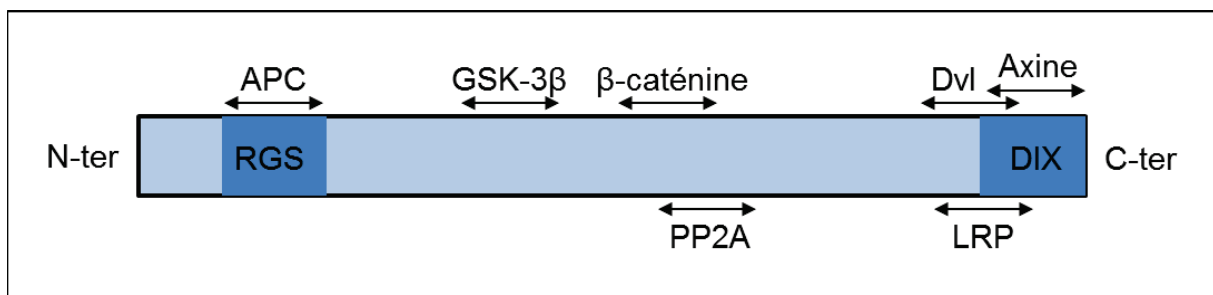


Figure 19: Représentation schématique de la structure de l'Axine : sont représentés les principaux domaines structuraux et les sites d'interaction avec les différents partenaires.

L'Axine est un acteur majeur de la voie Wnt qui sert de plateforme moléculaire permettant de structurer le complexe macromoléculaire de dégradation de la β -caténine (APC, GSK3 β , CK1, β -caténine, PP2A, Dvl et Frat). Dans ce complexe, l'Axine elle-même est phosphorylée par GSK3 β afin d'augmenter sa stabilité et son affinité pour la β -caténine (yamamoto 1999). L'Axine1 est essentielle à la phosphorylation de β -caténine par CK1 et GSK3 β dont l'activité kinase est plus importante au sein du complexe formé autour de l'Axine1 (Hinoi, Yamamoto et al. 2000) .

L'importance de l'Axine comme régulateur négatif de cette voie a été mise en évidence dans une étude montrant que la concentration intracellulaire de l'Axine est approximativement 1000 fois moindre que celle des autres composants du complexe de dégradation, suggérant que l'Axine est le facteur limitant de la signalisation Wnt/ β -caténine (Lee, Salic et al. 2003). Enfin, l'Axine participe à l'export nucléaire de la β -caténine déterminant ainsi un niveau de régulation négative supplémentaire de la β -caténine (Cong and Varmus 2004) (Wiechens, Heinle et al. 2004).

3. Transduction du signal Wnt

3.1 Absence de signal Wnt : dégradation constante de la β -caténine cytosolique

La dégradation de β -caténine fait suite à sa phosphorylation au sein d'un complexe formé autour de l'Axine qui sert de protéine d'échafaudage permettant la liaison d'APC et des kinases CK1 α et GSK3 β (van Es, Barker et al. 2003). La phosphorylation de β -caténine est séquentielle, elle a lieu d'abord sur la sérine S45 par CK1 α , puis sur les sérines S33 et S37 et la thréonine T41 par GSK3 β (Polakis 2002). Cette phosphorylation de β -caténine permet son ciblage vers la dégradation par le protéasome après ubiquitination par la protéine E3 ligase β TRCP (Aberle, Bauer et al. 1997) (Orford, Crockett et al. 1997).

Outre cette voie de dégradation dépendante de la phosphorylation, la β -caténine peut également être dégradée d'une manière indépendante de la phosphorylation. Cette autre voie implique un autre complexe de ciblage vers le protéasome qui implique APC et la protéine Siah qui est induite par p53 (Liu, Stevens et al. 2001) (Matsuzawa and Reed 2001). Ce complexe est capable de dégrader une protéine β -caténine mutée sur ses sites de phosphorylation. Cette information suggère que p53 devrait être capable d'exercer son rôle de gène suppresseur de tumeur en présence d'activation aberrante de la voie Wnt résultant de mutations de la β -caténine.

3.2 Activation de la voie Wnt

3.2.1. Réception du signal Wnt à la membrane

Les facteurs Wnt représentent une famille de glycoprotéines secrétées dont 19 membres sont actuellement identifiés chez l'homme et la souris. L'expression des gènes de cette famille est régulée au cours du développement et ils exercent un rôle important dans l'embryogenèse précoce et dans l'organogenèse.

L'activation du signal Wnt fait suite à la liaison d'un ligand Wnt à un récepteur hétérodimérique. Wnt se lie initialement à un récepteur appartenant à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires appelés Frizzled (Fz) qui contient un large domaine extracellulaire CRD (Cysteine-Rich Domain) (Bhanot, Brink et al. 1996) constituant une première plateforme de liaison à Wnt (Dann, Hsieh et al. 2001) (Janda, Waghray et al. 2012). Il y a ensuite recrutement d'un corécepteur de la famille des low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP), LRP-5 ou LRP-6 (Wehrli, Dougan et al. 2000). Ces corécepteurs possèdent un seul domaine transmembranaire. Il existe 10 gènes Frizzled et 2 gènes LRP-5-6 dans le génome humain et murin, et la spécificité de l'interaction entre ligand et récepteur n'est que partiellement connue. La transduction du signal canonique Wnt/ β -caténine nécessite le co-recrutement du récepteur Fz et de LRP (Wehrli, Dougan et al. 2000) (Tamai, Semenov et al. 2000).

Il est important de noter qu'il existe dans le domaine extracellulaire différentes protéines capables de moduler l'accessibilité du facteur Wnt à son complexe de récepteurs. Ainsi, des formes solubles de Fz (FrzBs ou sFRP pour Secreted Frizzled Related Receptors) sont capables de lier les facteurs Wnt et jouent alors un rôle d'antagoniste (Leyns, Bouwmeester et al. 1997). De même, les protéines Dickkopf (Dkk) sont des inhibiteurs secrétés qui agissent comme inhibiteurs spécifiques du signal Wnt canonique (Glinka, Wu et al. 1998). Ces protéines bloquent le signal Wnt en se liant à LRP5/6, induisant alors leur internalisation. Ce phénomène implique la protéine transmembranaire Kremen, il y a alors formation d'un complexe ternaire avec Dkk et LRP5/6 suivi par l'endocytose de ce complexe, éliminant ainsi la protéine LRP de la membrane (Mao, Wu et al. 2002).

3.2.2. Transduction du signal Wnt dans le cytoplasme

La liaison de Wnt à son récepteur hétérodimérique Fz/LRP entraîne la phosphorylation du domaine intracellulaire de LRP5/6 par l'action combinée des kinases CK1 γ et de GSK3 β (Davidson, Wu et al. 2005) (Zeng, Tamai et al. 2005) entraînant le recrutement de l'Axine à la membrane (Mao, Wang et al. 2001). Le domaine cytoplasmique de Fz interagit avec Dishevelled (Dvl) (Chen, ten Berge et al. 2003) facilitant ainsi l'interaction entre LRP et l'Axine. En effet, Dvl contient un domaine DIX qui est similaire à celui de l'Axine, et ces deux domaines DIX interagissent directement l'un avec l'autre (Fiedler, Mendoza-Topaz et al. 2011) (Schwarz-Romond, Fiedler et al. 2007).

Deux modèles d'activation de la voie Wnt/ β -caténine ont été décrits :

- Modèle classique (Figure 20 A) : En absence de signalisation Wnt, le complexe de dégradation de la β -caténine, localisé dans le cytoplasme, phosphoryle la β -caténine conduisant à son ubiquitination et donc sa dégradation par le protéasome. En revanche, en présence du signal Wnt, l'Axine est recruté vers la membrane provoquant la dissociation du complexe de dégradation qui n'est plus fonctionnel. La β -caténine n'étant plus dégradée, elle va s'accumuler dans le cytoplasme

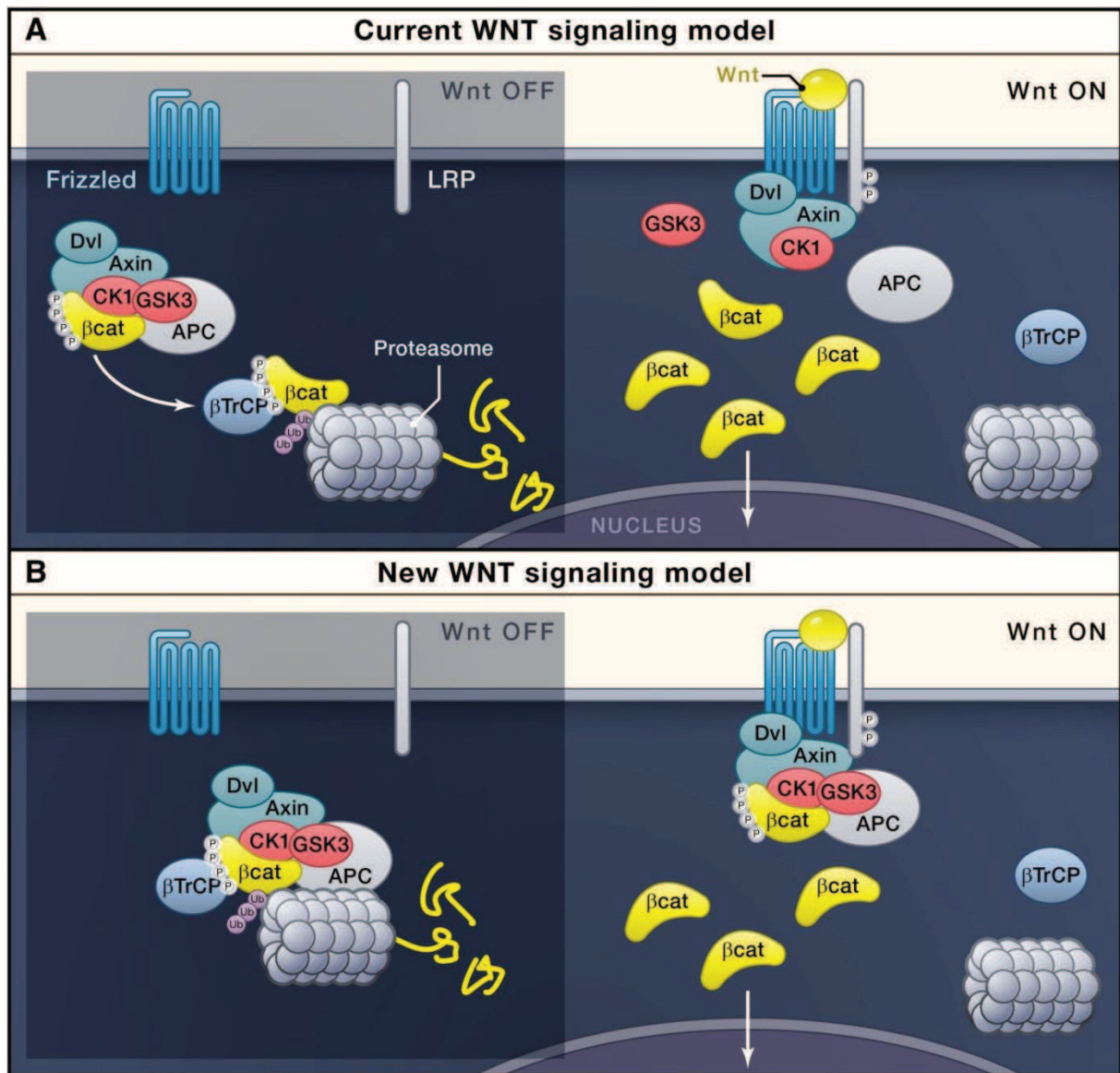


Figure 20: Représentation schématique des deux modèles de la voie de signalisation Wnt. A: Modèle classique. B: Nouveau modèle (Clevers and Nusse 2012)

- Nouveau modèle (Figure 20 B):

En absence de signal Wnt, la β -caténine est non seulement phosphorylée à l'intérieur du complexe de dégradation formé autour de l'Axine1, mais elle est également ubiquitinilée et dégradée par le protéasome au sein du même complexe. En désaccord avec l'ancien modèle, il n'y a pas de démontage du complexe, et le protéasome en dégradant la β -caténine, recycle chaque fois le complexe de dégradation en le maintenant fonctionnel. En revanche, en présence de signalisation Wnt, l'ensemble du complexe de dégradation est recruté à la membrane, et continue de capturer et phosphoryler la β -caténine, qui

ne pouvant plus être dégradée par le protéasome, conduit à la saturation du complexe par accumulation de phospho- β -caténine. Par la suite, la β -caténine nouvellement synthétisée peut s'accumuler dans le cytoplasme (Li, Ng et al. 2012).

3.2.3. Transduction du signal Wnt au niveau nucléaire

La β -caténine, ne contenant pas de site de liaison à l'ADN, agit comme cofacteur des facteurs de transcription de la famille Lef/Tcf pour induire la transcription des gènes cibles (Figure 21).

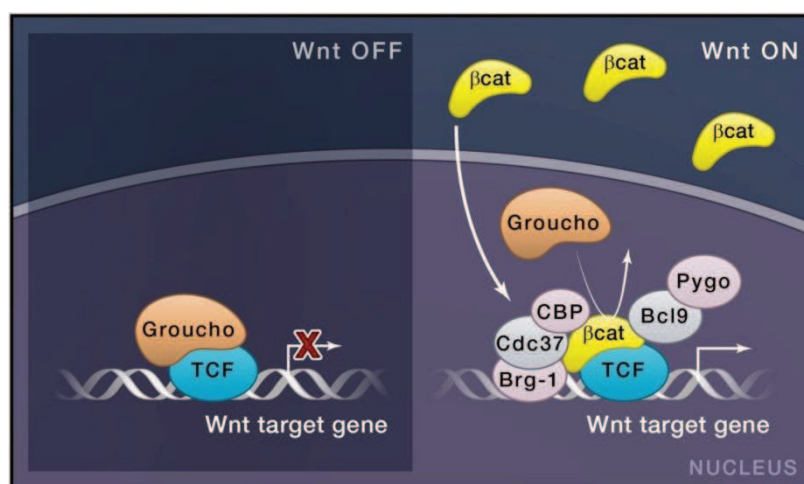


Figure 21: Représentation schématique de la signalisation Wnt dans le noyau (Clevers and Nusse 2012).

La famille Lef/Tcf est composée de 4 membres chez les vertébrés : Tcf1, Lef1, Tcf 3 et Tcf4, caractérisés par un domaine HMG (High Mobility Group) qui se lie à des séquences spécifiques de l'ADN qui sont les WRE (Wnt Response Element : C/T-C-T-T-T-G-A/T-A/T). En l'absence d'un signal Wnt, les protéines Lef/Tcf sont associées aux protéines Groucho et CtBP et forment un complexe répressif sur les sites WRE des gènes cibles de Wnt (Giles, van Es et al. 2003) (Logan and Nusse 2004) (Willert and Jones 2006). En effet, Groucho recrute des histones désacétylases (HDAC) qui induisent localement une condensation de la chromatine, réduisant ainsi l'accessibilité de ces régions à la machinerie transcriptionnelle. Suite à l'activation de Wnt, la β -caténine importée vers le noyau se lie aux facteurs de

Lef/Tcf via son domaine Armadillo, site chevauchant les sites de fixation à l'APC et E-cadhérine. Cette fixation conduit au déplacement du complexe activateur comprenant la β -caténine, les Lef/Tcf, Bcl-9, Pygopus et des complexes de remodelage de la chromatine. En particulier, la β -caténine recrute l'histone acétylase CPB/p300 (Cyclic AMP response element binding protein) et Brg-1, un élément du complexe de remodelage de la chromatine Swi/SNF (switching-defective/sucrose non fermenting), qui ensemble induisent une ouverture de la chromatine favorable à la transcription.

4. La voie Wnt/ β -caténine dans l'homéostasie tissulaire et le cancer

Ces dernières années, de nombreuses études ont rapporté l'importance de la signalisation Wnt/ β -caténine dans de nombreux processus développementaux, mais aussi chez l'adulte, principalement en assurant l'auto-renouvellement tissulaire. Une signalisation Wnt/ β -caténine anormale est associée à des maladies humaines, essentiellement le cancer (Clevers 2006) (Moon, Kohn et al. 2004) (Reya and Clevers 2005).

4.1 La voie Wnt- β caténine et l'auto renouvellement tissulaire

Les cellules souches sont les seules cellules qui ont la capacité de s'auto-renouveler et de générer des progéniteurs différenciés. La cellule souche la plus primitive est la cellule souche embryonnaire pluripotente, capable de générer tous les tissus de l'organisme. A des travaux pionniers sur les cellules souches hématopoïétiques, une multitude d'études récentes propose l'existence de cellules souches dans la plupart des tissus. Ces cellules souches « adultes » sont impliquées dans les processus d'homéostasie, mais peuvent également être recrutées pour la réparation après lésion. Dans l'étude de la biologie des cellules souches, des rôles récurrents d'un nombre limité de cascades de signalisation ont été mis en évidence, dont la signalisation Wnt/ β -caténine.

4.1.1. Wnt et l'homéostasie intestinale

L'épithélium absorptif de l'intestin grêle est le tissu dont l'auto-renouvellement est le plus rapide chez les mammifères (chez les souris, l'épithélium intestinal se renouvelle tous les 3-5 jours) et est organisé en deux compartiments; les cryptes où résident principalement les cellules progénitrices non différenciées et les villosités où se trouvent les différents types cellulaires différenciés. Les cellules souches résident dans le bas-fond des cryptes où elles se divisent lentement et vont générer des cellules progénitrices, dites de transit, qui seront capables de donner les quatre lignages différenciés intestinaux. Les progéniteurs engagés arrêtent leur cycle et se différencient lorsqu'ils atteignent la jonction crypto-villositaire.

De nombreuses études montrent que la cascade Wnt est fortement impliquée dans le contrôle du destin cellulaire le long de l'axe crypto-villositaire. En effet, chez les souris invalidées pour Tcf4, la villosité ne semble pas affectée, alors que les progéniteurs cryptiques sont complètement absents (Korinek, Barker et al. 1998). Ces résultats suggèrent que la signalisation Wnt physiologique est requise dans l'établissement et le maintien du compartiment progéniteur. Ces données ont été confirmées par l'expression transgénique de l'inhibiteur Dkk1 qui induit une perte totale des cryptes intestinales, identifiant Wnt comme le mitogène dominant des cellules progénitrices cryptiques (Andreu, Colnot et al. 2005) (Kuhnert, Davis et al. 2004). Les facteurs Wnt semblent être exprimés par les cellules épithéliales de la crypte plutôt que par les cellules mésenchymateuses (Gregorieff, Pinto et al. 2005). Enfin, il a été montré que ces facteurs Wnt non seulement stimulent la prolifération des progéniteurs, mais jouent aussi un rôle essentiel dans l'engagement vers la différenciation en cellules de Paneth, cellules qui résident dans le bas fond des cryptes (Andreu, Colnot et al. 2005).

4.1.2. Wnt et l'homéostasie du follicule pileux

Le follicule pileux et les glandes sébacées associées sont les appendices de l'épiderme interfolliculaire de la peau. La morphogenèse des follicules pileux se fait au cours de l'embryogenèse chez les mammifères. Tout au long de la vie adulte, de nouveaux poils sont régénérés en suivant des cycles de croissance, régression et

quiescence. Des cellules souches multipotentes épidermiques résident au niveau du renflement du follicule pileux situé sous les glandes sébacées. Ces cellules souches sont capables de donner tous les lignages qui constituent le follicule pileux mais aussi les sébocytes et les cellules souches de l'épiderme interfolliculaire (Alonso and Fuchs 2003). Pour former un poil, les cellules migrent vers le bas, en dessous du renflement à travers la gaine épithéliale. Une fois à la base du poil, les cellules entrent dans la matrice germinative où elles vont constituer un compartiment de transit-amplification avant de subir une différenciation terminale dans le précortex pileux.

De nombreuses études ont montré que la signalisation Wnt est requise pour la formation du follicule pileux. Les souris déficientes de Lef1 ont très peu de poils. A l'inverse, la surexpression de Lef1 chez des souris conduit à la formation *de novo* de follicules pileux dans l'épiderme. De même, la surexpression d'une forme active (oncogénique) de la β -caténine induit des follicules pileux supplémentaires (Alonso and Fuchs 2003). De plus, la délétion conditionnelle du gène de la β -caténine ou l'expression transgénique d'un dominant négatif de Lef1 au niveau de follicules pileux déjà formés conduit à l'absence de précurseurs du lignage pileux et les cellules mutantes sont orientées vers un destin épidermique ou sébocytaire (Huelsken, Vogel et al. 2001). Il a été montré également que le signal Wnt joue un rôle essentiel dans la mobilisation et la prolifération des cellules souches au niveau du renflement et ce signal est relayé par la β -caténine et Tcf3, alors qu'un signal relayé par la β -caténine et Lef1 serait responsable de la différenciation et la morphogenèse du poil (Lowry, Blanpain et al. 2005).

L'ensemble de ces résultats démontre l'importance de la voie Wnt/ β -caténine dans la formation et le maintien du follicule pileux, où le signal Wnt est nécessaire à l'expansion des cellules souches du renflement, à la différenciation vers le lignage pileux, et enfin dans le recrutement des cellules dans le compartiment de transit-amplification.

4.1.3. Wnt et la différenciation osseuse

La matrice osseuse est le résultat d'un équilibre entre sa production par les ostéoblastes et sa destruction par les ostéoclastes. La densité osseuse est alors déterminée par les activités relatives de ces deux types cellulaires. Des mutations « gain de fonction » au niveau du gène LRP5 ont été retrouvées dans des maladies humaines touchant les os, suggérant un rôle de la voie Wnt canonique dans la régulation de la masse osseuse. Cette observation a été confirmée par des études génétiques dans des modèles murins, montrant ainsi l'importance de la signalisation Wnt comme régulateur positif du lignage ostéoblastique dans l'homéostasie osseuse. En effet, les souris transgéniques surexprimant une forme mutée « gain de fonction » du gène LRP5 dans les ostéoblastes, présentent une densité osseuse augmentée et un nombre élevé d'ostéoblastes activés (Hartmann 2006). A l'inverse, les souris invalidées pour le gène LRP5 présentent une réduction de masse osseuse et un défaut de prolifération et de maturation des ostéoblastes (Kato, Patel et al. 2002).

Enfin, des études récentes ont mis en évidence l'implication d'un inhibiteur des facteurs Wnt, SOST/sclerostin retrouvé délété dans une maladie humaine caractérisée par une masse osseuse élevée, la sclérostéose. Cet inhibiteur agit comme un inhibiteur de LRP5/6 (Li, Zhang et al. 2005) (Semenov, Tamai et al. 2005). Enfin, les souris invalidées pour l'Axine2 présentent une craniosynostose, c'est-à-dire une suture prématurée des os du crâne chez le nouveau-né due à une augmentation de la prolifération des progéniteurs ostéoblastiques au niveau des structures crâniennes (Yu, Jerchow et al. 2005). L'ensemble de ces données démontre le rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans la maturation et l'activité des ostéoblastes, et donc dans l'homéostasie osseuse.

L'implication de la signalisation Wnt dans l'établissement et le maintien de l'homéostasie de nombreux autres tissus et maintenant bien démontrée : dans la maintenance de la détermination des cellules souches hématopoïétiques (Reya and Clevers 2005) et des cellules souches de la glande mammaire (Woodward, Chen et al. 2005), dans la détermination du destin cellulaire comme l'inhibition de la différenciation adipocytaire (Ross, Hemati et al. 2000), la différenciation neuronale de la rétine (Kubo, Takeichi et al. 2003) ou la spécification des neurones de l'épine dorsale (Muroyama, Fujihara et al. 2002). Ainsi, ces différentes données indiquent

que la voie Wnt/ β -caténine joue un rôle essentiel dans la prolifération des progéniteurs mais aussi dans la différenciation en cellules spécialisées au sein d'un tissu. Il ne semble pas surprenant qu'une activation constitutive du signal β -caténine soit retrouvée dans un grand nombre de tumeurs (Reya and Clevers 2005) (Fodde and Brabletz 2007).

4.2 La voie Wnt/ β -caténine et le cancer

L'oncogénicité du ligand Wnt a été révélée il y a plus de vingt ans dans une série d'expériences qui ont permis d'identifier le gène Wnt1 comme site majeur d'intégration du virus MMTV (mousse mammary tumor virus), responsable du développement de tumeurs mammaires chez les souris (Nusse, Theunissen et al. 1990). Depuis, le rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement de cancer a été largement établi par l'identification de mutations chez les différents partenaires de la voie, tel que β -caténine, APC et Axine dans de nombreux cancers. Deux exemples sont présentés ici.

4.2.1. Wnt et la carcinogenèse colique

Le gène APC a été l'un des premiers gènes suppresseurs de tumeurs identifiés. Les mutations perte de fonction sur le gène APC ont été identifiées comme la base de la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF), un syndrome héréditaire de prédisposition au cancer colorectal (CRC), caractérisé par l'émergence dès l'adolescence de centaines d'adénomes dans le gros intestin (Kinzler, Nilbert et al. 1991). Suite à l'identification des mutations APC dans les PAF, des mutations somatiques d'APC ont été retrouvées dans la majorité des formes sporadiques du CRC (Fearon and Vogelstein 1990). Ces mutations apparaissent comme un événement génétique précoce de la tumorigenèse colique, puisqu'elles sont présentes dès l'initiation tumorale au stade des foyers de cryptes aberrantes (Powell, Zilz et al. 1992) Dans certains cas de CRC où le gène APC n'est pas muté, des mutations sur le gène de la β -caténine qui abrogent sa régulation par APC (Kinzler and Vogelstein 1996), ou sur le gène de l'Axine2 (Liu, Dong et al. 2000) représentent des voies alternatives de la carcinogenèse colique, soulignant l'importance d'une

activation constitutive de la signalisation Wnt/ β -caténine dans ce processus de transformation.

4.2.2. Wnt et les tumeurs du follicule pileux

Le compartiment de « transit-amplification » de la matrice germinative apparaît être la cible de la transformation maligne par activation constitutive de la cascade Wnt. En effet, la plupart des pilomatricomes spontanés chez l'homme portent des mutations activatrices gain de fonction du gène de la β -caténine et accumulent fortement la protéine Lef1 dans leur noyau (Chan, Gat et al. 1999). Une étude a montré chez la souris que l'expression d'une forme active de β -caténine sous le contrôle d'un promoteur épidermique induit des lésions de type pilomatricomes. De même, dans une autre étude, l'expression inductible par le tamoxifène d'une forme oncogénique de β -caténine dans l'épiderme conduit à un autre type de tumeur dit trichofolliculome (Lo Celso, Prowse et al. 2004). Ainsi comme les polypes/adénomes de l'intestin, ces pilomatricomes ou trichofolliculomes détournent le processus par lequel le signal Wnt contrôle l'expansion physiologique des précurseurs pileux dans les régions de la matrice et du précotex du follicule pileux.

Enfin de façon intéressante, l'équipe de F. Watt a décrit les premières mutations inactivatrices de la cascade Wnt dans des tumeurs humaines. En effet, dans cette étude, il a été rapporté qu'un tiers des tumeurs des glandes sébacées portent des mutations inactivatrices de Lef1 empêchant sa liaison à la β -caténine et donc la détermination des progéniteurs vers le phénotype pileux sous la dépendance de la signalisation Wnt relayée par β -caténine et donc la transactivation de gènes cibles. Cette observation est en accord avec le modèle de la détermination des progéniteurs vers le phénotype pileux sous la dépendance de la signalisation Wnt relayée par β -caténine et Lef1. En absence de cette signalisation, les progéniteurs sont redirigés de façon erronée vers un destin sébocytaire (Takeda, Lyle et al. 2006).

Des résultats comparables ont été retrouvés dans d'autres types tissulaires. En effet, des données récentes montrent que l'activation du signal β -caténine est capable d'augmenter la prolifération des progéniteurs neuronaux alors que son inactivation réduit fortement le compartiment des progéniteurs. Ainsi, une activation

normale de la signalisation Wnt pourrait promouvoir l'auto-renouvellement des cellules souches neuronales, et une activation aberrante serait tumorigénique (Dahmen, Koch et al. 2001). Ceci est supporté par le fait que les médulloblastomes, tumeurs du cervelet chez l'enfant, portent des mutations sur les gènes de la β -caténine et l'Axine, suggérant que certains médulloblastomes pourraient provenir d'un progéniteur primitif transformé en réponse à une signalisation Wnt non contrôlée (Zurawel, Chiappa et al. 1998) (Zechner, Fujita et al. 2003). De façon parallèle, des études supportent un rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans le maintien du pool de cellules souches progénitrices de la glande mammaire au cours de développement et chez l'adulte. Cette idée est d'autant plus renforcée par le fait que les souris transgéniques surexprimant Wnt1 dans la glande mammaire développent des tumeurs mammaires dans lesquelles on retrouve une grande proportion de cellules avec propriétés de cellules souches/progénitrices (Liu, McDermott et al. 2004).

L'ensemble de ces résultats indique que le processus de transformation tumorale relayée par la signalisation Wnt/ β -caténine exploite la dépendance physiologique de ces différents tissus dans le développement ou le maintien de leur homéostasie, comme l'auto-renouvellement des cellules souches/progénitrices, n'excluant pas un autre processus d'homéostasie régulé par le signal β -caténine en fonction du contexte tissulaire.

4.3 La voie Wnt/ β -caténine dans les tumeurs hépatiques

4.3.1. L'hépatoblastome

L'hépatoblastome est une tumeur rare d'origine embryonnaire (une naissance sur un million), mais représente la tumeur la plus fréquente chez l'enfant de moins de 3 ans (Weinberg and Finegold 1983). Ces tumeurs sont histologiquement constituées de cellules épithéliales et mésenchymateuses immatures. La plupart des hépatoblastomes sont sporadiques, mais ils surviennent aussi dans deux syndromes de prédispositions au cancer, le syndrome de Beckwith-Wiedmann (BWS), et la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF). Les analyses immunohistochimiques de la β -caténine ont démontré une accumulation cytoplasmique et nucléaire dans plus de 90% des hépatoblastomes. Et les analyses de séquence de la β -caténine ont révélé

des mutations activatrices dans 48-67% des hépatoblastomes sporadiques (Buendia 2002) (Koch, Denkhaus et al. 1999) (Wei, Fabre et al. 2000). Dans de très rares cas, l'activation du signal β -caténine peut être reliée à des mutations sur APC, Axine1 ou Axine2 (Koch, Weber et al. 2004) (Oda, Imai et al. 1996) (Taniguchi, Roberts et al. 2002).

4.3.2. L'adénome hépatocytaire et l'hyperplasie nodulaire focale

La voie Wnt/ β -caténine a été évaluée dans de nombreuses néoplasies bénignes du foie. Bien qu'aucune activation aberrante de la β -caténine n'ait été mise en évidence dans les hyperplasies nodulaires focales, des études montrent une localisation anormale cytoplasmique et nucléaire de la β -caténine dans 30% des adénomes hépatocytaires (Chen, Jeng et al. 2002). Une analyse plus récente décrit des mutations de la β -caténine dans seulement 12% des adénomes, mais 46% de ces adénomes progressent en carcinome hépatocellulaire (CHC) (Zucman-Rossi et al., 2006). Ces résultats suggèrent que la présence d'une activation de la voie augmente le risque de dégénérescence carcinomateuse de ces tumeurs (Zucman-rossi et al., 2006).

4.3.3. Le cholangiocarcinome

Le cholangiocarcinome est une tumeur épithéliale impliquant les cellules biliaires intra-hépatiques, les cholangiocytes. Plusieurs études ont impliqué une signalisation β -caténine aberrante dans ce type de carcinogenèse (Rashid 2002) (Sugimachi, Taguchi et al. 2001) (Ashida, Terada et al. 1998). L'analyse immunohistochimique de la β -caténine montre une réduction importante de la β -caténine membranaire dans près de 85% des cholangiocarcinomes analysés, cette réduction est associée à un faible pronostic, suggérant que la réduction de la β -caténine membranaire conduit à la perte de l'adhésion cellulaire, un événement qui pourrait contribuer au caractère invasif de ces tumeurs. Dans cette même étude, une expression nucléaire de la β -caténine est observée dans 15% des cas, témoignant d'une activation de la signalisation β -caténine dans le processus de la

cholangiocarcinogenèse, indépendamment des fonctions d'adhésion de la β -caténine (Sugimachi, Taguchi et al. 2001). Cependant aucune mutation du gène de la β -caténine n'a été identifiée, bien que des pertes d'hétérozygotie du gène APC ont été rapportées (Kang, Kim et al. 1999) (Rashid 2002). Des analyses supplémentaires restent toutefois nécessaires pour comprendre le rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans la transformation tumorale des cholangiocytes, d'autant qu'un rôle de β -caténine dans la différenciation biliaire semble maintenant bien établi (Decaens, Godard et al. 2008) (Hussain, Sneddon et al. 2004).

4.3.4. Le carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la principale tumeur maligne primitive du foie. Elle survient dans 95% des cas sur un foie cirrhotique dans les pays occidentaux ou sur fond d'hépatite chronique B ou C ou de forte exposition à l'Aflatoxine B1. Ce cancer est le 5^{ème} cancer mondial avec une incidence estimée à 560000 nouveaux cas dans le monde par an et provoque 550000 morts par an. Le pronostic est très sombre avec une survie médiane de 5 à 7 mois.

Selon les études, des mutations du gène de la β -caténine sont retrouvées dans 13 à 43% des cas (de La Coste et al., 1998 ; Huang et al., 1999 ; Laurent-Puig et al., 2001). De même, la présence d'une inactivation bi-allélique de l'Axine1 par mutation et perte d'hétérozygotie ou par double mutation est retrouvée dans 5 à 8% des CHC (Laurent-Puig et al., 2001 ; Satoh et al., 2000). Enfin, alors que la perte d'APC est la principale voie d'activation de la β -caténine dans la carcinogenèse colique, aucune mutation d'APC n'a été retrouvée dans les CHCs, en dehors de quelques rares cas rapportés d'hépatoblastome survenant sur un terrain de PAF, et d'encore plus rares cas de CHC (Su et al., 2001).

Dans la tumorigenèse hépatique, une activation aberrante de la voie Wnt/ β -caténine représente une des voies préférentielles dans le processus de transformation. Cet événement peut être initiateur puisque chez la souris, l'inactivation hépato-spécifique d'APC induit une stabilisation de la β -caténine et le développement de CHC (Colnot et al., 2004). De façon similaire, Dans le modèle de Zebrafish hétérozygote pour APC, on retrouve des néoplasies hépatiques secondaires à l'activation du signal β -caténine (Haramis et al., 2006). De plus dans des modèles de souris transgéniques surexprimant les oncogènes c-myc ou TGF α ,

des mutations et/ou une translocation nucléaire de β -caténine sont retrouvées dans la majorité des tumeurs développées (Calvisi et al., 2001 ; de La Coste et al., 1998). Enfin, l'activation de la β -caténine apporte un avantage prolifératif dans un modèle de faible dysplasie induite par l'oncogène H-ras, conduisant à 100% d'incidence de CHC dans ces souris (Harada et al., 2004).

L'ensemble de ces données implique fortement l'activation constitutive de β -caténine comme facteur initiateur ou contributeur au développement de CHC.

II. Objectifs

Mon travail de thèse s'inscrit dans la thématique générale de l'équipe dont l'objectif concerne l'étude des mécanismes de l'oncogenèse digestive avec un accent particulier mis sur le rôle de la signalisation Wnt/ β -caténine dans le développement du carcinome hépatocellulaire. Il m'a amené à identifier une nouvelle isoforme de LKB1.

1. La signalisation Wnt/ β -caténine dans la différenciation et l'oncogenèse du foie

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la principale tumeur maligne hépatique. Elle survient dans plus de 80% des cas sur un foie cirrhotique dans les pays occidentaux mais sur des hépatopathies chroniques non cirrhotiques dans les pays à forte endémie d'hépatite virale B ou à forte exposition à l'Aflatoxine B1. Cette tumeur est très hétérogène, et présente une répartition géographique assez caractéristique liée aux facteurs d'étiologie. Ceux-ci sont principalement les infections chroniques par les virus de l'hépatite B et C, l'abus de consommation d'alcool et des intoxications par des hépatotoxiques alimentaires ou médicamenteux mais aussi des maladies métaboliques telles que l'hémochromatose et la stéato-hépatite non alcoolique (NASH). Ce dernier facteur de risque est en augmentation constante car associée à l'augmentation du syndrome métabolique lié aux modifications de nos conditions de vie (sédentarité et nourriture riche en lipides et glucides) (Laurent-Puig and Zucman-Rossi 2006) (Amarapurkar, Dharod et al. 2013). Tous stades confondus, le pronostic de cette tumeur reste sombre avec un taux de survie à 5 ans n'excédant pas 10%.

Les données de génomique à large échelle ont permis d'identifier deux principaux sous-groupes de CHC qui peuvent être distingués par leur pronostic, leur instabilité génomique et leur index de prolifération. Parmi les altérations génétiques décrites dans le CHC, deux altérations sont prédominantes, les mutations affectant le gène *TP53* ainsi que celles impliquant une dérégulation de la signalisation Wnt (Boyault, Rickman et al. 2007) (Lee, Chu et al. 2004).

La signalisation Wnt, très conservée dans le règne animal, est une voie majeure du développement embryonnaire qui en contrôlant la prolifération, la différenciation ainsi que la polarité cellulaire, joue un rôle important dans la spécification cellulaire et la morphogenèse. Chez l'adulte, elle contrôle l'homéostasie des cellules souches affectant ainsi la fonction de nombreux tissus.

Les résultats de l'équipe ainsi que d'autres laboratoires ont permis de montrer que la signalisation Wnt/ β -caténine jouait un rôle crucial dans le développement et la physiologie ainsi que l'oncogenèse du foie (Dahmani, Just et al. 2011). Chez l'adulte, elle est un signal majeur pour l'établissement de la zonation hépatique, essentiel pour les fonctions métaboliques du foie (Torre, Perret et al. 2010). De plus, une activation aberrante de la voie Wnt est un événement majeur de la carcinogenèse bénigne et maligne du foie. Pour le CHC, la mutation la plus fréquente est la mutation gain de fonction du gène *CTNNB1* (de La Coste, Romagnolo et al. 1998) (Huang, Fujii et al. 1999).

2. Les CHCs avec gain de fonction de *CTNNB1* constituent un groupe homogène de CHC

Alors que le CHC est connu pour être une tumeur très hétérogène, les données de l'équipe couplées aux données génomiques (Figure 22) ont permis de définir que les CHCs avec mutations activatrices de *CTNNB1* constituaient un groupe de tumeurs morphologiquement très homogènes appartenant au groupe de tumeurs de meilleur pronostic avec un faible indice de prolifération (Boyault, Rickman et al. 2007) (Audard, Grimber et al. 2007).

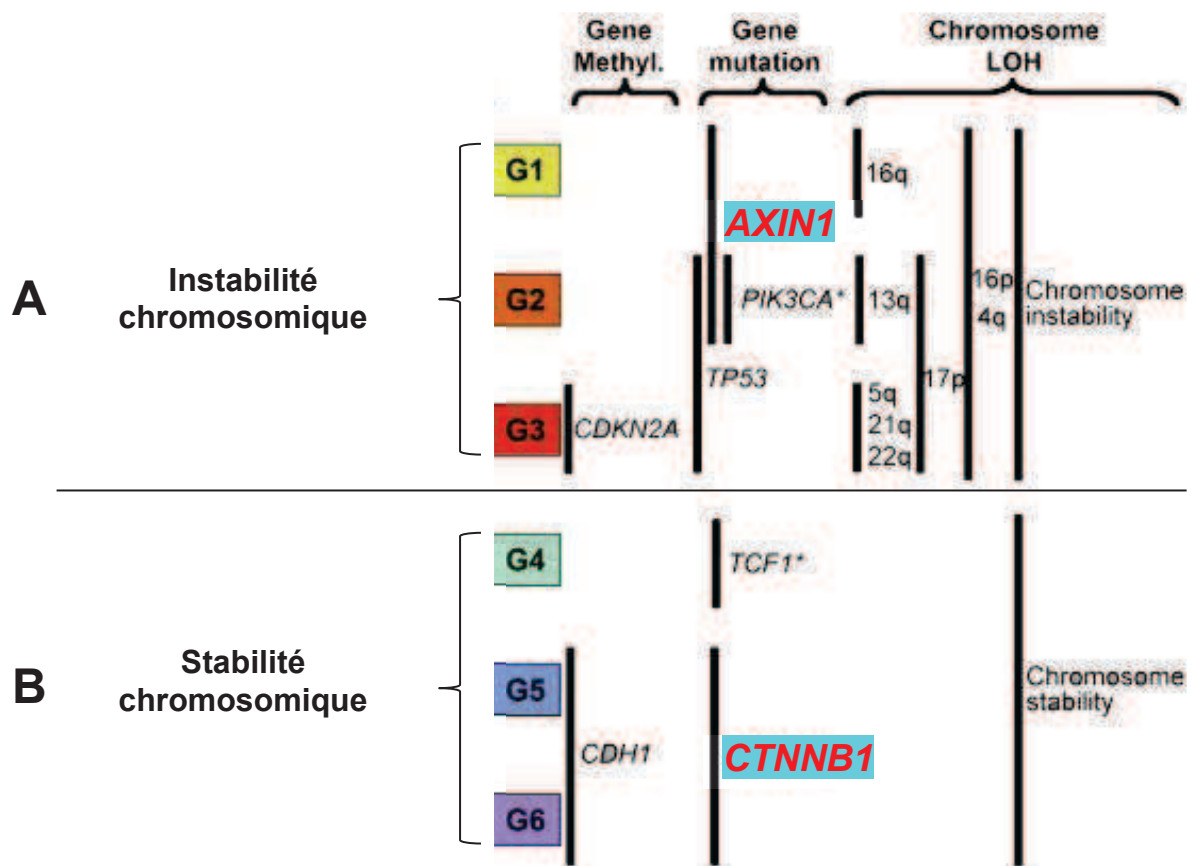


Figure 22: Schéma représentant les différents sous-groupes de CHC définis par l'analyse transcriptomique. G1 à G6 sont les sous-groupes de CHC définis par l'analyse transcriptomique. Les lignes verticales indiquent les caractéristiques significativement associées. Les sous-groupes G1-G3 appartiennent au premier groupe de CHC caractérisé par une instabilité chromosomique et des mutations du gène Axine1 (A). Les sous-groupes G4-G6 appartiennent au deuxième groupe de CHC caractérisé par une stabilité chromosomique et des mutations du gène de la β -caténine (B). LOH, perte d'hétérozygotie. (Boyault, Rickman et al. 2007)

En effet, la grande majorité de ces tumeurs présente plusieurs critères histologiques et métaboliques distinctifs qui les différencient des autres CHCs. Il s'agit principalement d'une architecture acineuse ou microtrabéculaire, d'une importante cholestase leur conférant un aspect vert et une absence de stéatose (Figure 23).

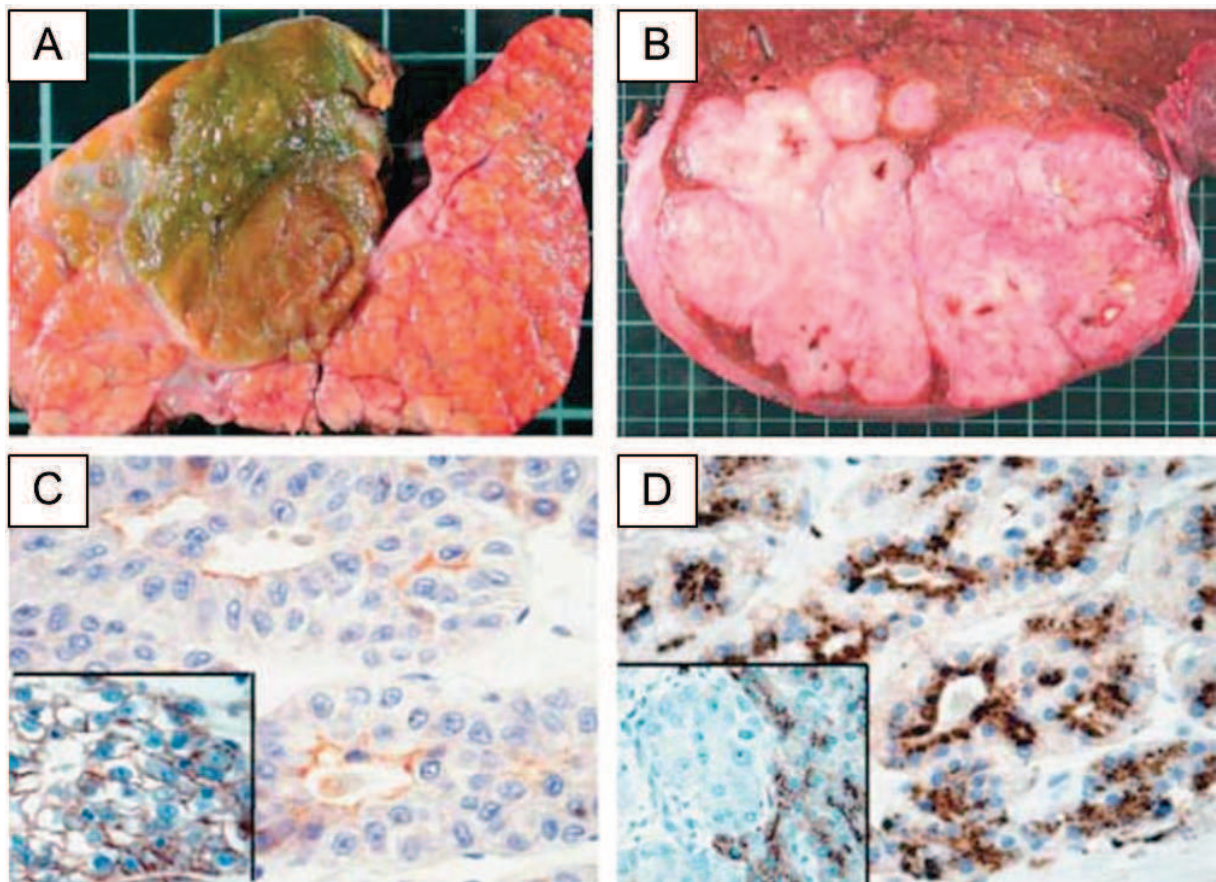


Figure 23: Caractéristiques anatomopathologiques des carcinomes hépatocellulaires mutés pour la β -caténine.

- A. Aspect macroscopique d'un carcinome hépatocellulaire muté pour la β -caténine. La couleur verte de la tumeur témoigne d'une cholestase.
- B. Aspect macroscopique d'un carcinome hépatocellulaire non muté pour la β -caténine qui a une couleur blanche contrairement à celui muté pour la β -caténine.
- C. Immunohistochimie dirigée contre le transporteur apical ABCG2/BCRP montrant une ségrégation de ce transporteur dans le compartiment apical dans les carcinomes hépatocellulaires mutés pour la β -caténine. Ces tumeurs présentent une architecture acineuse.

Insert: les carcinomes non mutés présentent un marquage membranaire diffus.

D. Immunohistochimie dirigée contre la protéine des jonctions serrées Claudine 2 montrant un marquage dans la région apico-latérale des cellules tumorales mutées pour la β -caténine.

Insert: les cellules tumorales non mutées pour la β -caténine ne présentent pas de marquage. (Audard, Grimber et al. 2007)

Dans un foie adulte, les hépatocytes se disposent en travées de deux cellules d'épaisseur et sont en contact d'une part avec les capillaires sinusoides et d'autre part avec les hépatocytes adjacents. Ces cellules ont un pôle apical restreint en taille, cerné de jonctions serrées et situé à l'interface entre deux hépatocytes. Ce

pôle apical délimite les canalicules biliaires qui vont drainer la bile synthétisée par les hépatocytes vers les canaux biliaires des espaces porte et les voies biliaires extra-hépatiques (Figure 24) (Stamatoglou and Hughes 1994) (Decaens, Durand et al. 2008).

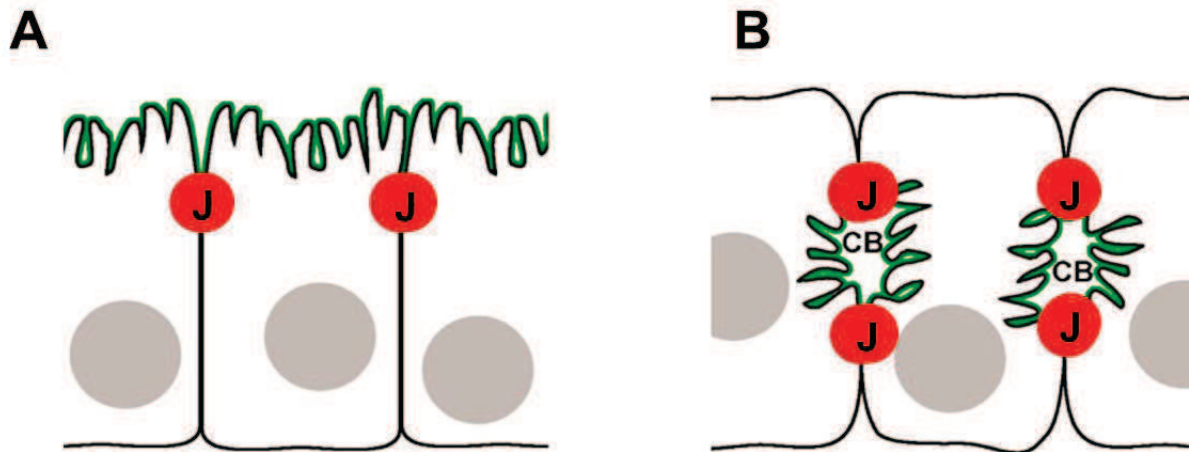


Figure 24: Schéma comparatif entre la polarité simple (A) et la polarité hépatocytaire (B).

- A. Polarité simple: Les cellules, comme par exemple les entérocytes qui se disposent en épithélium de type simple, possèdent un domaine apical unique, étendu et bordant la lumière intestinale.
- B. Polarité hépatocytaire: les hépatocytes se disposent en travées et possèdent un domaine apical de petite taille, situé à l'interface entre deux hépatocytes et délimitant les canalicules biliaires. (Benedicto, Molina-Jimenez et al. 2012)

CB: canalicule biliaire, J: Le système jonctionnel (rouge) qui sépare le domaine apical (vert) du domaine basolatéral et qui est le même dans les deux polarités

La mise en place et le contrôle de la polarité hépatocytaire sont actuellement peu connus (Wang and Boyer 2004). Dans les CHCs avec mutations activatrice de β -caténine, les jonctions serrées sont préservées mais délimitent un pôle apical beaucoup plus étendu que dans l'hépatocyte normal (Audard, Grimber et al. 2007), à l'image de ce qui est observé dans les épithéliums cylindriques traditionnels comme l'épithélium intestinal. Cette polarité de type intestinal qui est observée dans les cellules tumorales des CHCs mutés pour la β -caténine est très différente de la polarité hépatocytaire responsable de la formation des canalicules biliaires assurant l'élimination de la bile. Nous avons émis l'hypothèse que la cholestase observée dans les CHC mutés *CTNNB1* serait associée à ce défaut de polarité responsable de la structure acineuse qui ne permettrait pas un drainage efficace de la bile. De plus,

les CHCs mutés *CTNNB1* présentent un métabolisme singulier, avec une absence de stéatose.

3. LKB1, gène candidat pour expliquer le phénotype singulier des CHCs mutés CTNNB1.

Afin de comprendre les bases moléculaires expliquant le phénotype des CHCs mutés *CTNNB1*, nous nous sommes intéressés au gène suppresseur de tumeur LKB1. Ce gène conservé entre les espèces, code une sérine-thréonine kinase qui joue le rôle de chef d'orchestre de l'activité de 14 kinases impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique, de la polarité et de la prolifération cellulaire. LKB1 semblait le candidat idéal pour expliquer les caractères distinctifs propres des CHCs mutés pour *CTNNB1*. En effet, LKB1 induit une polarité de façon cellule-autonome qui pourrait rendre compte de la polarité particulière de ces tumeurs et de leur cholestase. En tant que senseur énergétique, LKB1 active les voies productrices d'énergie et inhibe les voies métaboliques consommatrices d'énergie comme la synthèse des lipides, ce qui pourrait rendre compte de l'absence de stéatose présente dans ces tumeurs. Enfin, en tant que gène suppresseur de tumeur, il inhibe la voie mTOR qui est connue pour stimuler la prolifération cellulaire, expliquant potentiellement le meilleur pronostic et la faible prolifération observée dans ces tumeurs. Afin de vérifier l'hypothèse d'un contrôle de LKB1 par la signalisation relayée par β -caténine, nous avons étudié le rôle d'une inhibition de ce signal, par des expériences d'interférence à l'ARN, sur l'expression de LKB1, dans deux lignées cellulaires hépatomateuses humaines porteuses de mutations gain de fonction de *CTNNB1*, la lignée HuH6 possédant une mutation ponctuelle (G32V) et la lignée HepG2 possédant une large délétion (Δ 25-140) qui élimine totalement le site de dégradation de β -caténine (Figure 25 A). L'utilisation d'un siRNA incapable d'inactiver l'allèle muté de la lignée HepG2 (siRNA2) nous a permis de confirmer un rôle direct du signal β -caténine dans le contrôle de l'accumulation de LKB1 (Figure 25 B).

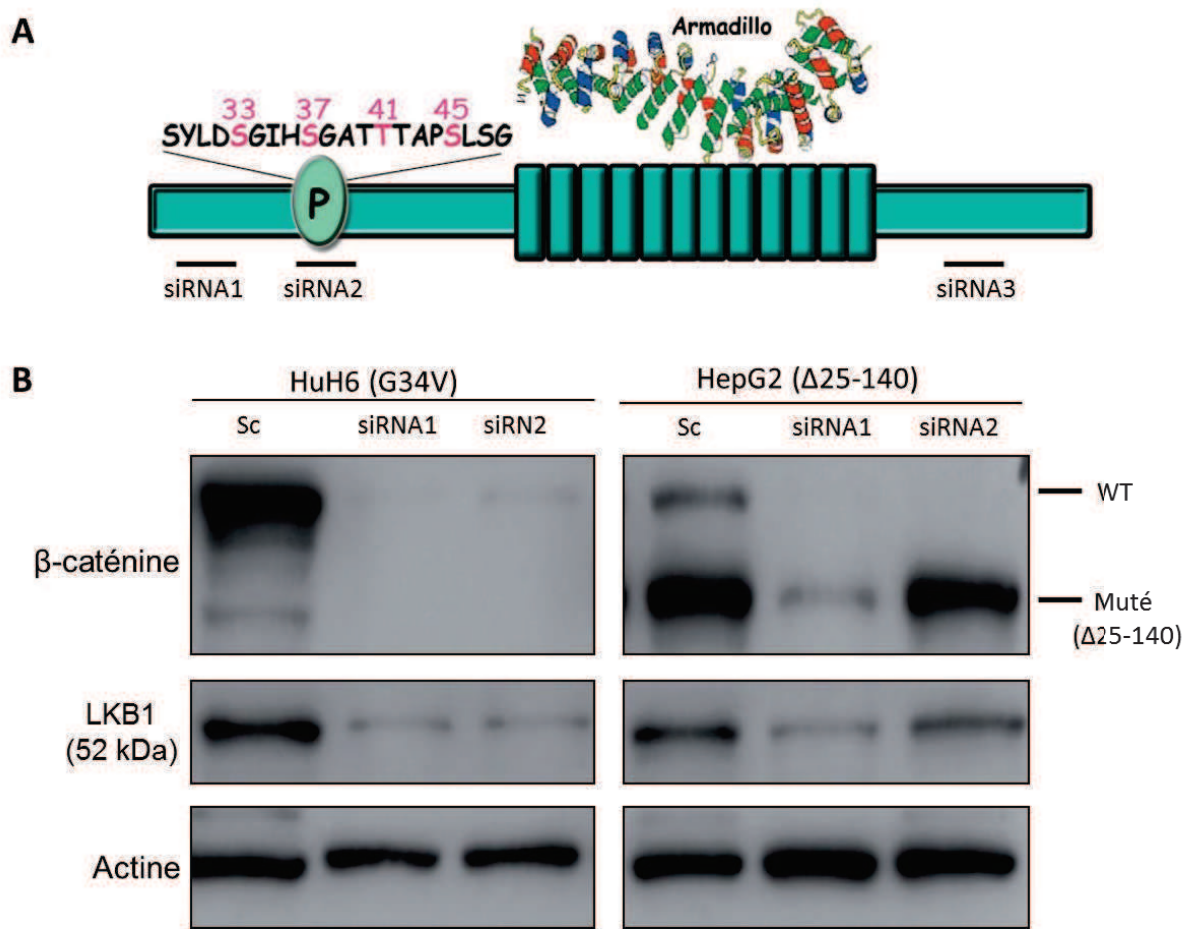


Figure 25: Expression protéique de l'isoforme « classique » de LKB1 après interférence par différents ARNs dirigés contre la β -caténine.

A. Schéma représentant l'ARNm de la β -caténine ainsi que les sites de fixation des différents siRNA.

B. Expression protéique de l'isoforme longue « classique » de LKB1 après interférence par deux ARNs dirigés contre la β -caténine, dans deux lignées hépatomateuses humaines porteuses de mutations gain de fonction de CTNNB1; HuH6 (mutation ponctuelle G32V) et HepG2 (délétion Δ 25-140 qui élimine totalement le site de dégradation de β -caténine). Le contrôle négatif est constitué d'un ARN interférant « scramble ». Les protéines ont été extraites 72 heures après la transfection et un western blot a été réalisé. La qualité de l'interférence a été attestée par un effondrement de l'expression de la β -caténine.

L'inactivation de β -caténine par trois différents siRNAs est responsable d'une inhibition de l'expression de la protéine LKB1 en accord avec l'hypothèse d'un contrôle positif de LKB1 par le signal β -caténine. L'utilisation d'un deuxième anticorps anti-LKB1 (Ley 37D/G6) a confirmé le contrôle positif de LKB1 par le signal β -caténine, et nous a permis de mettre en évidence une protéine de poids moléculaire plus faible qui est contrôlée négativement par le signal β -caténine (Figure 26). Ces résultats suggéraient l'existence d'une nouvelle isoforme de LKB1 dont l'expression est inhibée par le signal β -caténine. Au cours de ma thèse, j'ai

caractérisé cette nouvelle isoforme. Ce travail a fait l'objet d'une publication acceptée à Oncogene.

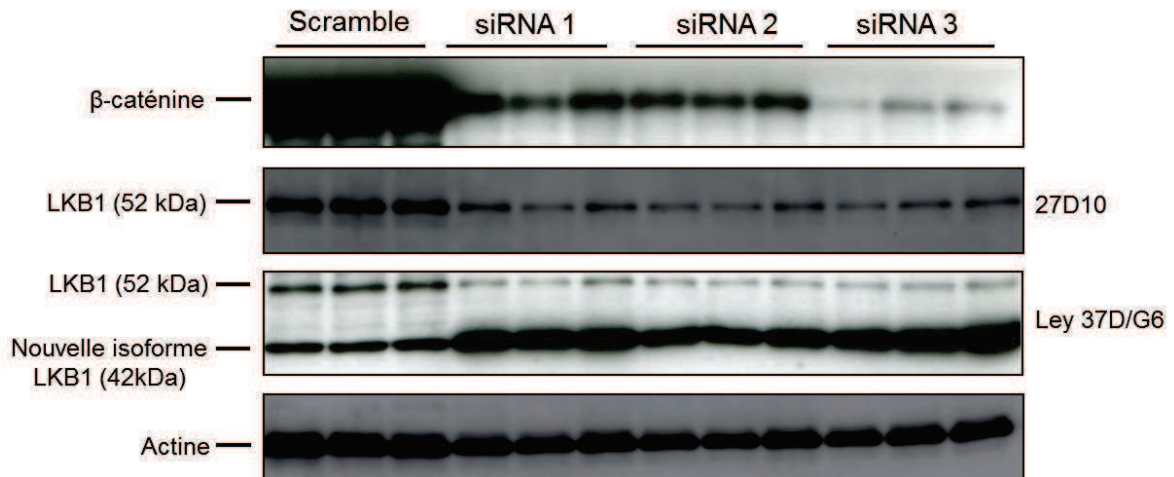


Figure 26: Expression protéique des formes longue « classique » et courte « nouvelle isoforme » de LKB1 après interférence par trois ARNs dirigés contre la β -caténine, dans la lignée hépatomateuse humaine HuH6. Le contrôle négatif est constitué de l'agent de transfection seul et un ARN interférant « scramble ». Les protéines ont été extraites 72 heures après la transfection et un western blot a été réalisé. La qualité de l'interférence a été attestée par un effondrement de l'expression de la β -caténine. En utilisant deux anticorps anti-LKB1 différents, nous avons observé une diminution de l'expression de la forme longue « classique » de LKB1. Par ailleurs, l'anticorps anti-LKB1 Lay37D/G6 révèle une forte induction d'une bande protéique plus courte (42 kDa).

III. RESULTATS

1. Article

Dans ce travail de thèse, j'ai caractérisé une nouvelle isoforme de LKB1 qui avait été identifiée à l'aide de l'anticorps LKB1 Ley3D/G6. J'ai analysé son expression et montré que contrairement à la forme classique de LKB1 (FL-LKB1) qui est ubiquitaire, cette isoforme présente une expression tissu-spécifique.

J'ai recherché *in silico* les mécanismes moléculaires qui pouvaient rendre compte de l'expression de cette isoforme. L'utilisation de RNA interférents spécifiques de ces isoformes m'a permis de confirmer expérimentalement la présence de cette isoforme.

J'ai ensuite cloné cette isoforme et montré qu'elle était catalytiquement inactive mais jouait un rôle dual sur les trois fonctions connues de LKB1, en utilisant des approches *in vitro* et *in vivo*.

Enfin, l'utilisation d'une lignée de cancer du poumon, exprimant seulement cette isoforme, m'a permis de montrer que cette isoforme avait des propriétés oncogéniques intrinsèques.

***A novel LKB1 isoform enhances AMPK metabolic activity
and displays oncogenic properties***

Rajae DAHMANI^{§1-4}, Pierre-Alexandre JUST^{§1-4}, Agnès DELAY⁵, Frédéric CANAL¹⁻⁴,
Laetitia FINZI¹⁻⁴, Carina PRIP-BUUS¹⁻³, Mireille LAMBERT¹⁻³, Pierre SUJOBERT¹⁻³, Karine
Buchet-Poyau⁵, Edward MILLER⁶, Catherine CAVARD¹⁻⁴, Solenne MARMIER¹⁻⁴,
Benoit TERRIS^{1-4,7}, Marc BILLAUD^{*5}, Christine PERRET^{*1-4}

¹Inserm, U1016, Institut Cochin, 75014 Paris, France

²Cnrs, UMR8104, 75014 Paris, France

³Université Paris Descartes, 75014 Paris, France

⁴Equipe labellisée LNCC

⁵ Institut Albert Bonniot, CRI INSERM/UJF U823, Rond-Point de la Chantourne, 38706 La
Tronche Cedex, France

⁶ Section of Cardiology Boston University School of Medicine, Boston USA

⁷ Pathology Unit, Hôpital Cochin, 75014 Paris, France

[§]These authors contributed equally to this work.

***Corresponding authors.**

*Christine Perret, Inserm U1016, Institut Cochin, 24 rue du Faubourg Saint-Jacques,
75014 PARIS, FRANCE.

Fax : 33 1 44 41 24 21 ; E-mail: christine.perret@inserm.fr

Phone : 33 1 44 41 25 64

*Marc Billaud Institut Albert Bonniot, CRI INSERM/UJF U823, Rond-Point de la
Chantourne, 38706 La Tronche Cedex, France.

E-mail : Marc.Billaud@ujf-grenoble.fr

Running title: Functional characterization of a novel LKB1 isoform

ABSTRACT

The *LKB1* tumor suppressor gene encodes a master kinase that coordinates the regulation of energetic metabolism and cell polarity. We now report the identification of a novel isoform of LKB1 named Δ N-LKB1 that is generated through alternative transcription and internal initiation of translation of the LKB1 mRNA. The Δ N-LKB1 protein lacks the N-terminal region and a portion of the kinase domain. Although Δ N-LKB1 is catalytically inactive, it potentiates the stimulating effect of LKB1 on the AMP-activated protein kinase (AMPK) metabolic sensor through a direct interaction with the regulatory auto-inhibitory domain of AMPK. Contrasting, Δ N-LKB1 negatively interferes with the LKB1 polarizing activity. Finally, combining *in vitro* and *in vivo* approaches, we showed that Δ N-LKB1 has an intrinsic oncogenic property. Δ N-LKB1 is expressed solely in the lung cancer cell line, NCI-H460. Silencing of Δ N-LKB1 decreased survival of NCI-H460 cells and inhibited their tumorigenicity when engrafted in nude mice. In conclusion, we have identified a novel LKB1 isoform that enhances the LKB1-controlled AMPK metabolic activity but inhibits LKB1-induced polarizing activity. Both, the LKB1 tumor suppressor and the oncogene, Δ N-LKB1, are expressed from the same locus and this may account for some of the paradoxical effects of LKB1 during tumorigenesis.

Keywords: LKB1, AMPK, cellular energy, cell polarity, skeletal and heart muscles

INTRODUCTION

LKB1 (also known as *STK11*) is a tumor suppressor gene whose germline mutations are responsible for an inherited cancer disorder called the Peutz-Jeghers syndrome (1) (2) (3). Somatic mutations of *LKB1* are prevalently found in Non-Small-Cell (NSCLC) lung carcinomas and uterine cervical neoplasms(4) (5) (6). *LKB1* has two prominent functions, the control of cell polarity and the coordination of cell division with the regulation of cellular energy metabolism (3) (7). The control of metabolism by *LKB1* is mainly relayed by a master sensor of cellular energy, AMP-activated protein kinase (AMPK) (8) (9) (10). In response to various cellular stresses, AMPK activates catabolic pathways and inhibits energy-consuming biosynthetic pathways (11) (12). The active form of *LKB1* is part of an heterotrimeric complex encompassing two accessory proteins, the pseudokinase STe20-Related ADaptor protein (STRAD) and the scaffolding protein mouse protein 25 (MO25) (1). Formation of this complex regulates the stability, the subcellular localization and the kinase activity of *LKB1* (13). However, the mechanism by which *LKB1* activates its different substrates (AMPK and AMPK-related kinases, ARK) appears context specific and cell-type dependent (2) (3) (14).

Although *LKB1* was defined as a tumor suppressor gene, the role of the *LKB1*/AMPK pathway during carcinogenesis is complex and both tumor suppressor and oncogenic roles have been described (15) (16) (17). *LKB1*-mediated tumor suppression can partly be explained by the positive role of *LKB1* on the control of cell polarity and the negative role of the *LKB1*/AMPK axis on mTOR signaling (18) (3). The *LKB1*/AMPK pathway is also required for tumor cell survival in condition of energy stress, conditions to which tumor cells are frequently subjected, and thus may exert pro-oncogenic function (19) (20).

Two *LKB1* isoforms have been described previously, the classical full length *LKB1* isoform (named FL-*LKB1* in the text), and a 3' alternative spliced isoform that produces a shorter protein, mostly expressed in the testis (21) (22). Here, we report the identification of a novel isoform of *LKB1* (Δ N-*LKB1*), deleted of its N-terminal domain. This isoform is mainly expressed in heart and skeletal muscle and enhances AMPK metabolic activity. But, we showed that this novel *LKB1* isoform exerts a dual role regarding *LKB1* function with a dominant negative effect on the *LKB1* polarizing activity. In addition, our results showed that Δ N-*LKB1* has oncogenic properties. The novel Δ N-

LKB1 isoform may account for some of the paradoxical effects of LKB1 during tumorigenesis.

RESULTS

- **Identification and characterization of a novel LKB1 isoform.**

Western blot using the Ley37D/G6 LKB1 antibody detected the classical full-length Lkb1 isoform (FL-LKB1) at 50 kDa in various mouse tissues, the 48kDa isoform in the testis(21) (22) and an abundant fast migrating band around 42 kDa in skeletal muscle and heart (Figure 1A). Silencing of *LKB1* expression in a human cell line with an inducible shRNA led to the disappearance of the 42 kDa band (Figure 1B) showing that the 42kDa was encoded by the *LKB1* gene. Specific deletion of *Lkb1* gene in the heart using a conditional *Lkb1* mouse model (23) resulted in a strong decrease in Δ N-LKB1 protein expression (Figure 3A). Expression studies of LKB1 in human tissues also revealed a prominent expression of the 42kDa isoform in human skeletal muscle and in colon (Figure 1C).

We then used *in silico* analyses to search for a potential open reading frame (ORF) in the mouse and human *LKB1* genes that could encode for a 42kDa-protein. Using Genomatix tools, we found two mouse *Lkb1* transcripts: transcript (GXT_21812449) results from a 5' alternative splicing event in mouse *Lkb1* exon 1 leading to the use of downstream in frame translation initiation codons (ATG) located in exon 3 (Figure 2A and Figure 4); transcript (GXT_12975809) is generated by an alternative promoter in intron 2 (Figure 2C and Figure 4). The alternative promoter was not found in human *LKB1* gene. The two alternative transcripts would generate an N-terminally truncated LKB1 protein which we named Δ N-LKB1 which is deleted of 125 amino acids (Figure 3C and Figure4). We confirmed the existence of the human 5' alternative splicing *LKB1* transcript using two inducible LKB1 shRNAs targeting either both isoforms (FL-LKB1 and Δ N-LKB1) or specifically FL-LKB1 and not Δ N-LKB1 (Figure 1B). Using primers specific for each mouse *Lkb1* transcripts, we confirmed by RT-PCR the expression of these different mRNAs species in mouse tissues (Figure 5A). However, we did not observe any accumulation of the two mouse alternative *Lkb1* transcripts in mouse skeletal muscle and heart (Figure 1A and Figure 5A) indicating that the strong expression of the Δ N-Lkb1 protein is also probably regulated at the translational level. The presence of several in frame ATG start site codons (Figure 2A, Figure 2B and Figure 4) suggest that Δ N-LKB1 is produced following internal initiation of translation. Accordingly, cloned human and mouse FL-LKB1 cDNAs expressed in Hela cells (which do not express LKB1) produced both the full-length isoform and a faster migrating

protein that co-migrated with Δ N-LKB1 protein expressed from the cloned untagged Δ N-LKB1 cDNAs (Figure 5B). In addition, Δ N-Lkb1 from heart and skeletal muscle co-migrated with untagged protein expressed in HeLa cells (Figure 3B) and Δ N-LKB1 protein in skeletal muscle resolved into a doublet indicating that two start codons were used for translation initiation (Figure 5C). These various results indicate that Δ N-LKB1 protein is not a degradation product of the FL-LKB1, but is produced by the initiation of translation at downstream ATG start site codons either by leaky scanning or by the initiation of internal translation.

The predicted protein encoded by Δ N-LKB1 lacks the N-terminal regulated domain (NRD), the nuclear localization signal (NLS) and part of the kinase domain (Figure 3C). Human FL-LKB1 and Δ N-LKB1 vectors were constructed with addition of a FLAG epitope tag fused at the N termini and expressed in HeLa cells. The products (flagged and unflagged) were probed with anti-LKB1 antibodies specific for either the C-terminal or the N-terminal LKB1 domains and confirmed that Δ N-LKB1 was truncated from its N-terminal domain (Figure 6A). We then analyzed the interaction of Δ N-LKB1 with the binding partners of the holoenzyme complex by co-immunoprecipitation. We found that Δ N-LKB1 was not able to bind either STRAD α or MO-25 (Figure 6B). It was thus anticipated that Δ N-LKB1 was cytosolic and catalytically inactive. Accordingly, we observed that, in contrast to FL-LKB1 and the testis LKB1 isoform that relocated from the nucleus to the cytosol when overexpressed with STRAD α , Δ N-LKB1 remained cytosolic (Figure 6C). Immunokinase assay measuring LKB1 activity revealed that Δ N-LKB1 was catalytically inactive (Figure 7A).

- **Δ N LKB1 has a dominant positive effect on LKB1-induced AMPK activity**

Δ N-LKB1 is catalytically inactive but may affect one or more of FL-LKB1 functions, namely, the control of energetic metabolism, cell polarity and cell growth. We used an immunokinase assay to test, *in vitro*, the effect of the LKB1 isoforms on induction of AMPK activity by LKB1. Surprisingly, the LKB1-induced activity of the recombinant AMPK heterotrimer (comprising the α , β and γ subunits) was increased by Δ N-LKB1 (Figure 7A). Consistently, the Δ N-LKB1 isoform enhanced, in a dose-dependent manner, the basal and metformin-induced AMPK activity of HeLa cells expressing FL-LKB1 (Figure 7B and Figure 8). Co-transfection experiment showed that Δ N-LKB1 potentiated

AMPK activity induced by FL-LKB1 (Figure 7C and Figure 8). No AMPK activation was observed when Δ N-LKB1 was co-expressed with a kinase-dead LKB1 mutant (KD-LKB1) (Figure 7D), demonstrating that the stimulation of AMPK activity by Δ N-LKB1 required a functional LKB1 catalytic activity. We next tested whether the positive effect of Δ N-LKB1 on LKB1-induced AMPK activation was also observed for other LKB1 substrates. We assayed the endogenous kinase activity of AMPK α and several ARKs in immune complexes isolated from HeLa cell extracts transfected with the different LKB1 constructs. The dominant-positive effect of Δ N-LKB1 was specific to AMPK and was not observed for other ARKs, such as NUA1, NUA2 and MARK4 (Figure 9).

We then investigated the mechanisms underlying the positive effect of Δ N-LKB1 on AMPK activation. AMPK is a heterotrimeric complex comprising a catalytic α -subunit and two regulatory β and γ -subunits (Figure 10A). The γ -subunit carries the regulatory nucleotide-binding sites. AMPK activation results from conformational changes in the AMPK heterotrimeric complex induced by an increase in AMP and/or ADP levels that, depending of the level of energy stress, affect the extent of AMPK α phosphorylation in its T loop (12). Deletion of the regulatory region following the kinase domain, results in an AMPK α subunit that is constitutively active (CA-AMPK α) (Figure 10A). To investigate how Δ N-LKB1 affects AMPK activation, we analyzed the binding of Δ N-LKB1 to the catalytic AMPK α subunit. Δ N-LKB1 interacted more strongly with AMPK α 2 than FL-LKB1 or KD LKB1 (Figure 10B1). To determine which domain of AMPK α interacts with Δ N-LKB1, we used two AMPK α mutants deleted from part of the regulatory domain (Figure 10A). Our results showed that Δ N-LKB1 did not bind the AMPK α kinase domain but bound instead to the regulatory auto-inhibitory domain (AID) (Figure 10B2). Considering findings of different studies (24) (25) (12), these results suggest that the binding of Δ N-LKB1 to the AID of AMPK α induces a conformational change in the heterotrimeric AMPK complex, resulting in an increased phosphorylation at Thr 172 that enhances AMPK activity. This mechanism reveals a non-canonical mechanism for AMPK activation mediated by Δ N-LKB1.

- **Δ N-LKB1 is expressed in oxidative and glycolytic muscle and increases liver fatty acid oxidation in fasted mice**

Δ N-Lkb1 is abundant in mouse heart and skeletal muscle, two tissues with high oxidative metabolism that uses lipid as a major fuel for energy metabolism. Skeletal

muscle is a well-established physiological site of AMPK activation (26). AMPK controls both glucose transport and fatty acid oxidation in skeletal muscle (26). However, the precise role of the LKB1/AMPK pathways in the regulation of the muscle physiology is still unclear (27) (28). We examined the distribution of Δ N-Lkb1 protein expression in the different muscle types. Skeletal muscles are composed of a heterogeneous population of fiber types with different contractile and metabolic properties. Basal AMPK activity, as reflected by AMPK phosphorylation, was higher in red oxidative muscles than white glycolytic muscles (Figure 11A). However, Δ N-Lkb1 was more abundant in mouse quadriceps and gastrocnemius (predominantly fast-twitch glycolytic muscle) which have a weaker basal AMPK activity than the soleus and diaphragm (predominantly slow-twitch oxidative muscle) (Figure 11A).

The skeletal muscle distribution of Δ N-Lkb1 suggested that it may impact both the glycolytic and oxidative capacity of this tissue. To analyze the Δ N-Lkb1 function, *in vivo*, we studied its effect on fatty acid oxidation in the liver where Δ N-Lkb1 is not found (Figure 1A and Figure 12A). We used an adenovirus to produce Δ N-Lkb1 in the liver of C57Bl6 mice. Seven days after adenovirus injection, the concentration of Δ N-Lkb1 protein in the liver dramatically increased to levels similar to values observed physiologically in the heart and skeletal muscle (Figure 11B1). The oleate oxidation capacity in the liver of fasted mice was significantly higher following injection with Ad- Δ N-Lkb1 than with Ad-GFP (controls) (Figure 11B2) leading to decreased liver triglyceride content (Figure 11B3). This increased fatty acid oxidation rate was also associated with an increase in AMPK phosphorylation (Figure 11B1).

- **Δ N-LKB1 exerts a dominant negative effect on LKB1-induced apico-basal polarization**

To analyze the role of Δ N-LKB1 in cell polarity, we used a model previously described in which cellular polarization of the colorectal LS174T TR1-6 cancer cell line is induced through the co-expression of LKB1 with a doxycycline-inducible STRAD α (7). Induction of STRAD α expression promotes activation of LKB1 and leads to full-cell polarization with formation of brush border-like structures and apical actin caps.

We transfected LS174T TR1-6 cells with vectors expressing GFP-tagged LKB1 isoforms; 24 hours later, the cells were treated or not with doxycycline to induce STRAD α expression. As expected, activation of GFP-FL-LKB1 by STRAD α induced actin

cytoskeleton reorganization with the formation of an actin cap, visualized by staining with TRITC-conjugated phalloidin (Figure 13A). The polarizing activity of the different LKB1 isoforms was quantified by counting the GFP-expressing cells that developed an actin cap at one pole of the cell. FL-LKB1 increased by four-fold the polarizing activity, whereas neither Δ N-LKB1 nor KD-LKB1 exhibited any polarizing activity (Figure 13A and Figure 13B). More importantly, when Δ N-LKB1 was co-transfected with FL-LKB1, we observed a significant reduction of the number of polarized cells showing that Δ N-LKB1 exerts a dominant negative effect on LKB1 polarizing activity (Figure 13C).

- **Δ N-LKB1 inhibits LKB1-induced cell growth inhibition and has intrinsic oncogenic properties**

We used two *in vitro* approaches to examine the role of Δ N-LKB1 on LKB1-mediated cell growth control: the clonogenic assay and the anchorage-independent cell growth assay. HeLa cells were transfected with the vectors expressing the different LKB1 isoforms, seeded at low density and subjected to G418 selection for at least 15 days (Figure 14A). As expected, in the clonogenic assay, the number of colonies following transfection with FL-LKB1 was reduced by half compared to controls (vector alone or KD LKB1) (Figure 14B). The effect was even more dramatic when tested in anchorage-independent growth assay (Figure 14C). The co-expression of FL-LKB1 and Δ N-LKB1 almost completely reversed the FL-LKB1-induced inhibition of cell proliferation in the clonogenic assay, and partially reduced the FL-LKB1 effect in the anchorage-independent growth assay. These results revealed that Δ N-LKB1 interferes negatively with the growth suppressive function of FL-LKB1 (Figure 14B and figure 14C). Surprisingly, Δ N-LKB1 enhanced the formation of cell colonies in the clonogenic assay and potentiated anchorage-independent cell growth when solely expressed in HeLa cells indicating that Δ N-LKB1 has intrinsic transforming property (Figure 14B and Figure 14C).

The intrinsic oncogenic property of Δ N-LKB1 was studied in lung tumors in which several somatic *LKB1* mutations have been described (29). Western blotting revealed that the lung cancer cell line NCI-H460 carrying a homozygous *LKB1* Q37X mutation (5) produced only Δ N-LKB1 and not FL-LKB1, whereas the wild-type *LKB1* NCI-H358 lung cancer cell line expressed both FL-LKB1 and Δ N-LKB1 (Figure 15A and Figure 15C). RT-PCR was performed to analyze the sequence of the mutated RNA in NCI-H460 cells. The

mutation c.109C>T (p.Q37X) was found in the transcript showing that, in this cell line, the nonsense mutation located in the first exon did not lead to the degradation of the mRNA by nonsense-mediated decay (NMD) (Figure 15B). The mechanism of escape from NMD may be linked to the ability to reinitiate translation at downstream start codon, such a mechanism has already been described for the β -globin gene (30) . In accordance with our *in vitro* studies using HeLa cells, we observed that the growth of NCI- H460 cells expressing solely Δ N-LKB1 was faster than those of NCI-H358 cells that expressed both FL-LKB1 and Δ N-LKB1 (Figure 15D). Using siRNAs that knock-down both FL-LKB1 and Δ N-LKB1, we observed a strong decrease in the survival of NCI-H460 cells after Δ N-LKB1 depletion supporting the intrinsic pro-growth property of Δ N-LKB1 (Figure 16A and Figure 16B).

We then investigated whether extinction of Δ N-LKB1 expression affected tumor growth *in vivo*. NCI-H460 cells were transduced with either doxycycline-inducible sh-LKB1 or an empty vector (control). As expected, we observed a strong decrease in the survival of sh-LKB1-transduced NCI-H460 cells that was obvious at day 4 after doxycycline treatment, when compared to control cells (Figure 17A). Transduced cells were subcutaneously implanted into doxycycline-treated nude mice, and tumor growth was monitored. Mice grafted with control NCI-H460 cells showed a rapid tumor growth whereas mice grafted with LKB1-knockdown NCI-H460 cells showed slow or no tumor growth (Figure 17B). Therefore, Δ N-LKB1 conferred tumorigenicity, *in vivo*, to the lung cancer cell line NCI-H460.

DISCUSSION

In this report we describe, a novel isoform of LKB1 (named Δ N-LKB1) with an N-terminal truncation of LKB1 that deletes from part of the kinase domain. As expected, Δ N-LKB1 is catalytically inactive, but it exerts a dual effect on the LKB1 functions. It potentiates the stimulating impact of LKB1 on AMPK activity and exerts a dominant-negative effect on LKB1 polarizing activity. Our results suggest that the dominant positive effect of Δ N-LKB1 on AMPK activity involves a “non-canonical” mechanism independent of energy stress or Ca^{2+} signals (12). Δ N-LKB1 binds to the AMPK α regulatory region and may thereby induce a conformational change of the AMPK complex resulting in increased AMPK phosphorylation and subsequent AMPK activation.

The positive role of Δ N-LKB1 on AMPK activation required FL-LKB1 and was not observed with a LKB1 KD mutant. Furthermore, Δ N-LKB1 was immunoprecipitated with FL-LKB1 when co-expressed in HeLa cells, indicating that these proteins interact (Figure 18B). Furthermore, we provide evidence that Δ N-LKB1 specifically increases the activity of AMPK but not of other ARKs, implying that Δ N-LKB1 does not modify the constitutive LKB1 activity. The dominant positive role of Δ N-LKB1 on AMPK activity may be linked to the structure of the LKB1 substrates. Indeed, AMPK is the only substrate of LKB1 that is active in a hetero-trimeric complex, the other ARKs being monomeric (1). In favor of this hypothesis there was no significant difference in the binding between Δ N-LKB1 and FL-LKB1 with two monomeric ARK substrates (SIK2 and MARK2/3), in contrast to the results we obtained for AMPK α (Figure 18A). Although it remains to be tested, the dominant negative effect we observed for the LKB1-induced polarizing activity may be due to the titration of substrates by Δ N-LKB1.

During our study of the physiological functions of Δ N-LKB1, we found that this isoform stimulates the hepatic fatty acid oxidation capacity in fasted mice (Figure 11B). However, in liver of refed mice, Δ N-LKB1 did not increase oleate oxidation (Figure 12A), suggesting that the role of Δ N-LKB1 was mostly revealed under energy stress conditions. Δ N-LKB1 is abundant in skeletal muscle and heart, both of which are oxidative tissues. However, Δ N-LKB1 is not expressed in all oxidative tissues. Δ N-LKB1 expression was not detected in brown-adipose tissue (Figure 1A) and was not even induced by fasting in mouse liver (Figure 12B), thus suggesting that the role of Δ N-LKB1

is not solely related to the tissue oxidative capacity. Interestingly, one of the best studied physiological process that activates AMPK, *in vivo*, is exercise in skeletal muscle, where AMPK stimulates glucose uptake and fatty acid oxidation (26). Skeletal muscle is composed of myofibers that differ in their metabolic and contractile properties. Oxidative slow-twitch myofibers preferentially express enzymes that oxidize fatty-acids. Fast-twitch glycolytic fibers preferentially metabolize glucose. Δ N-LKB1 expression in oxidative skeletal muscles may be involved in maintaining their high basal AMPK activity. However, Δ N-LKB1 is more abundant in glycolytic than in oxidative muscle suggesting an involvement of Δ N-LKB1 also during an acute exercise. Thus, Δ N-LKB1 may exert metabolic function in skeletal muscle, both at rest and during exercise. Δ N-LKB1 activates AMPK in a non-canonical way and is highly expressed in heart and skeletal muscle, these observations suggests that Δ N-LKB1 enhances AMPK activity in tissues with high energy demand to promote tolerance of metabolic stress.

We found that Δ N-LKB1 solely expressed, has oncogenic properties. This is, to our knowledge, the first demonstration that an oncogene can originate from a tumor suppressor gene. The mechanism by which Δ N-LKB1 has intrinsic oncogenic property required further experiments. Nevertheless, our findings indicate that Δ N-LKB1 acts independently of the LKB1 pathway because all the *in vitro* and *in vivo* studies, were done in LKB1-deficient cells (31). In addition to the intrinsic oncogenic property of Δ N-LKB1, the novel LKB1 isoform may impact the tumor suppressor function of LKB1. Indeed, by exerting a dominant positive role on LKB1-controlled AMPK activity and a dominant negative role on LKB1-induced polarizing activity, Δ N-LKB1 is expected to have a supporting role during tumorigenesis, specifically during the initiation stage of tumorigenesis. The LKB1/AMPK axis has a tumor suppressor role, but, in some contexts, it has been documented that LKB1/AMPK axis may exert an effect favouring tumor development (15) (16) (17). Indeed, activation of LKB1/AMPK pathway in glucose-deprived tumor cells contributes to the survival of these cells by restoring ATP level and by inhibiting fatty acid synthesis, thereby sparing NADPH which is required for protection against oxidative stress (20). It would be thus of interest to determine the molecular pathways that regulates Δ N-LKB1 expression to identify tumors in which this novel LKB1 isoform may contribute to the paradoxical positive role of LKB1 during tumorigenesis. Δ N-LKB1 has oncogenic property whose mechanism differs depending

on the presence or not of the full-length LKB1 isoform in LKB1-wildtype or LKB1-mutated cancers, respectively.

In conclusion, we have identified a novel LKB1 isoform that impacts in a dual manner the LKB1 function on AMPK metabolic and cell polarity. We also provide strong evidence that this novel isoform has oncogenic property, these findings may explain some of the paradoxical role of LKB1 during tumorigenesis.

FIGURES

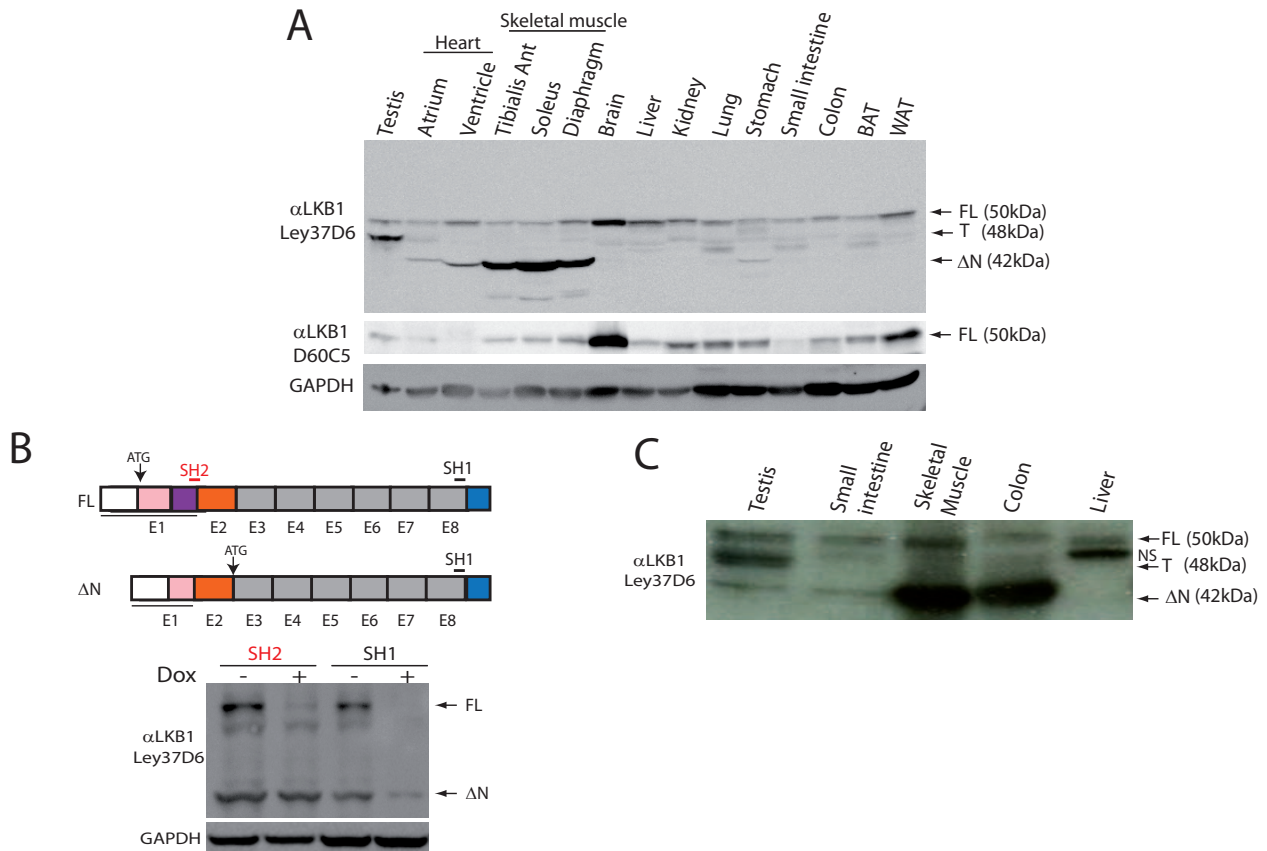


Figure 1. Identification of a novel LKB1 isoform strongly expressed in heart and skeletal muscle

A. Tissue distribution of LKB1 isoforms in mouse tissues. Various mouse tissues were extracted for western blot analysis with anti-LKB1 antibodies (Ley37D/G6 and D60CS) revealing the FL-LKB1 50 kDa isoform (FL), the 48 kDa testis isoform (T) and a 42 kDa isoform (Δ N). BAT: brown adipose tissue, WAT: white adipose tissue.

B. Evidence for Δ N-LKB1 using LKB1 shRNAs. Right part: location of the different LKB1 sh-RNAs used. SH1 located in exon 8 of human LKB1 gene targeted both FL-LKB1 and Δ N-LKB1; SH2 located in the part of LKB1 exon 1 deleted after the 5' alternative splicing event, targeted only FL-LKB1. Left part : Huh6 cells were transduced with inducible lentiviruses encoding either SH1 or SH2 and selected for puromycin resistance. The selected cells were then induced or not by doxycycline for five days before analysis by western blotting.

FL: FL-LKB1, Δ N: Δ N-LKB1.

C. Δ N-LKB1 expression studies with human samples. Various human tissues were extracted for western blot analysis with the Ley37D/G6 anti-LKB1 antibody.

A Transcript GXT_21812449 *Mus musculus*

```

1 ttgctttttt ttttttcatt cttattttca ttttttttct ccttgagcac ctagaagaaa Exon 1
61 aggggaaaat caaaagtgaa gaattggcgc ccaggaagcg gacgtggacc cggttgtggg
121 gaccgggaga gttgtggagg tcgttcctgt ttttccccgt tccttttttc cccttcttgg
181 aacatttggga agaagcgggt gggggggggg gaattcgaac ttgaaaagaa ttggcgctcc
241 cgaaggggac gaggacaaag agtgggcccag gatggacgtg gcggaccccg agccgttggg
301 cctttttctcc gagggcgagc tgatgtcggg gggcatggac accttcatcc accgcatcga
361 ctccaccgag ggagatccag ctgctgcggc ggctgcggca tcggaatgtg atccagcttg Exon 2
421 tggacgtgct gtacaatgag gagaagcaga agATGTATAT GGTGATGGAG TACTGCGTAT Exon 3
481 GTGGCATGCA GGAGATGCTG GACAGTGTGC CGGAGAAGCG CTTCCCTGTG TGCCAAGCTC
541 ATGGTACTT CCGCCAGCTG ATTGACGGCC TGGAAATACCT ACACAGCCAG GGCATTGTTC Exon 4
601 ACAAGGACAT CAAGCCGGGC AACCTGCTAC TCACCACCAA TGGCACACTC AAGATCTCCG
661 ACCTCGGTGT TGCCGAGGCC CTGCACCCTT TCGCTGTGGA TGACACCTGC CGGACAAGCC Exon 5
721 AGGGCTCCCC GGCCTTCCAG CCTCCTGAGA TTGCCAATGG ACTGGACACC TTTTCAGGTT
781 TCAAGGTGGA CATCTGGTCA GCTGGGGTCA CACTTTACAA CATCACCACG GGCCTGTACC Exon 6
841 CATTGAGGG GGACAATATC TACAAGCTCT TTGAGAACAT TGGGAGAGGA GACTTCACCA
901 TCCCTTGTGA CTGCGGCCCA CCACTCTCTG ACCTACTCCG AGGGATGTTG GAGTATGAGC Exon 7
961 CGCCAAGAG GTTCTCCATC CGACAGATTA GGCAGCACAG CTGGTTCCGG AAGAAACACC Exon 8
1021 CTCTGGCTGA GCGGCTCGTA CCTATCCCAC CAAGCCCAGA CACTAAGGAC CGCTGGCGCA
1081 GTATGACTGT AGTGCCCTAC CTGGAGGACC TGCATGGCCG TCGCGAGGAG GAGGAGGAGG
1141 AAGACTTGTG TGACATTGAG GATGGCATTG TCTACACCCA GGACTTCACA GTGCCTGGAC Exon 9
1201 AGGTCCTGGA AGAGGAAGTG GGTCAGAATG GACAGAGCCA CAGTTTGCCC AAGGCTGTTT
1261 GTGTGAATGG CACAGAGCCC CAGCTCAGCA GCAAGGTGAA GCCAGAAGGC CGACCTGGCA
1321 CCGCCAACCC TGC GCGCAAG GTGTGCTCCA GCAACAAGAT CCGCCGGCTC TCGGCCTGCA
1381 AGCAGCAGTG Actgaggcct acagtgtgtc atcaggatct ctgggcaggt gtccctgcaa Exon 10
1441 ggctgggttt tccaggcctg cctgtccact cacttcggga cgttggagcc gagggcgagc
1501 ctgctgcccc agaagcactt tatgtcgaga cactggccg gccttgccct catgccgcc
1561 tgcgagcctc gctgtctttg gttgggttc ttttttttta ataaaacagg tggatttg

```

Predicted protein ΔN-LKB1

```

1 MYMMEYCVC GMQEMLDVSP EKRFVPCQAH GYFRQLIDGL EYLHSQGIHV KDIKPGNLLL
61 TTNGLTKISD LGVAEALHPF AVDDTCRTSQ GSPAFQPPEI ANGLDTFSGF KVDIWSAGVT
121 LYNITGLYLP FEGDNIYKLF ENIGRGDFTI PCDCGPPLSD LLRGMLEYEP AKRFSIRQIR
181 QHSWFRKKHP LAEALVPIPP SPDTKDRWRS MTVPYLEDL HGRAEEEEEE DLFDIEDGII
241 YTQDFTVPGQ VLEEEVGQNG QSHSLPKAVC VNGTEPQLSS KVKPEGRPGT ANPARKVCSS
301 NKIRRLSACK QQ

```

B Sequence of FL-LKB1 transcript (exon1 to 3)

```

tttttttttt ttcattctta ttttcatttt ttttctccct gagcacctag aagaaaaggg Exon 1
gaaaatcaaa agtgaagaat tggcgcccag gaagcggacg tggacccggt tgtggggacc
gggagagttg tggaggtcgt tcctgttttt ccccgttcct tttttcccct tcttggaaaca
tttgaagaa gcgggtgggg gggggggaat tcgaacttga aaagaattgg cgctcccga
ggggacgagg acaaagagtg ggccaggATG GACGTGGCGG ACCCCGAGCC GTTGGGCCTT
TTCTCCGAGG GCGAGCTGAT GTCGGTGGGC ATGGACACCT TCATCCACCG CATCGACTCC
ACCGAGGTAA TCTACCAGCC GCGCCGCAA CGCGCCAAGC TCATCGGCAA GTACCTGATG
GGGACCTGC TCGGGGAGGG CTCGTACGGC AAGGTGAAGG AGGTGCTGGA CTCCGAGACC
TTATGCCGCA GGGCGGTCAA GATCCTCAAG AAGAAAAGC TGCGCAGGAT CCCCAATGGA
GAGCCAACG TCAAGAAAGG GATCCAGCTG CTGCGGCGGC TCGGCATCG GAATGTGATC Exon 2
CAGCTTGTGG ACGTGCTGTA CAATGAGGAG AAGCAGAAGA TGTATATGGT GATGGAGTAC Exon 3
TGCATATGTG GCATGCAGGA GATGCTGGAC AGTGTGCCGG AGAAGCGCTT CCCTGTGTGC

```

C Transcript GXT_12975809 *Mus musculus*

```

1 gcggggcccct ccagaccact gttgctagga gcagggctcc tgggcttggT Exon 1
51 gtgctgcttt ccttagcgcc ctacgtatAT GGTGATGGAG TACTGCGTAT
101 GTGGCATGCA GGAGATGCTG GACAGTGTGC CGGAGAAGCG CTTCCTGTG
151 TGCCAAGCTC ATGGGTACTT CCGCCAGCTG ATTGACGGCC TGGAATACCT Exon 2
201 ACACAGCCAG GGCATTGTT ACAAGGACAT CAAGCCGGGC AACCTGCTAC
251 TCACCACCAA TGGCACACTC AAGATCTCCG ACCTCGGTGT TGCCGAGGCC Exon 3
301 CTGCACCCTT TCGCTGTGGA TGACACCTGC CGGACAAGCC AGGGCTCCCC
351 GGCCTTCCAG CCTCCTGAGA TTGCCAATGG ACTGGACACC TTTTCAGGTT
401 TCAAGGTGGA CATCTGGTCA GCTGGGGTCA CACTTTTACAA CATCACCACG Exon 4
451 GGCCTGTACC CATTTGAGGG GGACAATATC TACAAGCTCT TTGAGAACAT
501 TGGGAGAGGA GACTTCACCA TCCCTTGTGA CTGCGGCCCA CCACTCTCTG
551 ACCTACTCCG AGGGATGTT GAGTATGAGC CGGCCAAGAG GTTCTCCATC Exon 5
601 CGACAGATTA GGCAGCACAG CTGGTTCCGG AAGAAACACC CTCTGGCTGA Exon 6
651 GGCGCTCGTA CCTATCCCAC CAAGCCCAGA CACTAAGGAC CGCTGGCGCA
701 GTATGACTGT AGTGCCCTAC CTGGAGGACC TGCATGGCCG TGCGGAGGAG
751 GAGGAGGAGG AAGACTTGTT TGACATTGAG GACGGGCATT TCTACACCCA
801 GGACTTCACA GTGCCTGGAC AGGTCCTGGA AGAGGAAGTG GGTCAGAATG Exon 7
851 GACAGAGCCA CAGTTTGCCC AAGGCTGTTT GTGTGAATGG CACAGAGCCC
901 CAGCTCAGCA GCAAGGTGAA GCCAGAAGGC CGACCTGGCA CCGCCAACCC
951 TGC GCGCAAG GTGTGCTCCA GCAACAAGAT CCGCCGGCTC TCGGCCTGCA
1001 AGCAGCAGTG Actgaggcct acagtgtgtc atcaggatct ctgggaggt Exon 8
1051 gtccctgcaa ggctggggtt tccaggcctg cctgtccact cacttcggga
1101 cgttggagcc gagggcgagc ctgctgcccc agaagcactt tatgtcgaga
1151 ccactggccg gccttgccctg catgccgccc tgcgagcctc gctgtctttg
1201 ggttggtttc ttttttttta ataaaacagg tggatttgag ctatggctat
1251 gaggggtggtt ggaaatatgg agcagggcgg gcacagggtg gcctgcagag
1301 aaaaccacaga gcaaacaat atgcagagac atztatgatt aaccagacaa
1351 cacgaccaac cacagagggc gcagggcag gagtgggcag gactcacag
1401 cgagtctgcc ctatcttttg gcaataaata aagcttggga aact

```

Predicted protein Δ N-LKB1

```

1 MVMEYCVCGM QEMLDSVPEK RFPVCQAHGY FRQLIDGLEY LHSQGIVHKD
51 IKPGNLLLLT NGTLKISDLG VAEALHPFAV DDTCRTSQGS PAFQPPEIAN
101 GLDTFSGFKV DIWSAGVTLY NITGLYPFE GDNIYKLFEN IGRGDFTIPC
151 DCGPPLSDLL RGMLEYEPAK RFSIRQIRQH SWFRKKHPLA EALVPIPPSP
201 DTKDRWRSMT VVPYLEDLHG RAEEEEEDL FDIEDGIIYT QDFTVPGQVL
251 EEEVGQNGQS HSLPKAVCVN GTEPQLSSKV KPEGRPGTAN PARKVCSSNK
301 IRRLSACKQQ

```

Figure 2. Genomic characterization of the Δ N-KB1 isoform

Figure 2. Genomic characterization of the Δ N-LKB1 isoform

A. Sequence of the mouse LKB1 mRNA transcript encoding the 5' alternative spliced transcript (GXT_21812449) obtained from the Genomatix resource (Eldorado). The alternative 5' splice event was located in exon 1 of the LKB1 gene and generated a premature stop codon that led to the use of ATG start site codons located in *LKB1* exon3. The sequence of the forward primer used to clone mouse Δ N-LKB1 was underlined with a purple arrow. Each exon of the mouse *Lkb1* gene is colored alternately black and red. The different in-frame ATG located in *Lkb1* exon 3 are in bold, only those with Kozak sequence are underlined. The predicted Δ N-LKB1 protein sequence is given below, with the potential-terminal methionines (M in red).

B. Sequence of the exons 1, 2 and 3 of the full-length mouse LKB1 transcript encoding the FL-LKB1 protein containing the canonical ATG start codon in bold and red, the 5' splice donor site (GT) marked in red. The sequence underlined is the part of exon1 that is deleted by the 5' splicing event. The various in-frame ATG start codons located in exon3 are in bold and underlined, only those with Kozak sequence are underlined.

C. Sequence of the mouse LKB1 mRNA transcript encoding the alternative transcript (GXT_12975809) generated by the alternative promoter located in exon2 of the mouse *Lkb1* gene (obtained from the Genomatix resource, Eldorado). This transcript is encoded by 8 exons rather than 10 exons as for FL-LKB1. Each exon is colored black or red alternately. The various in-frame ATG start site codons are in bold and underlined. The predicted Δ N-LKB1 protein sequence with the potential-terminal methionines (M in red) is given below.

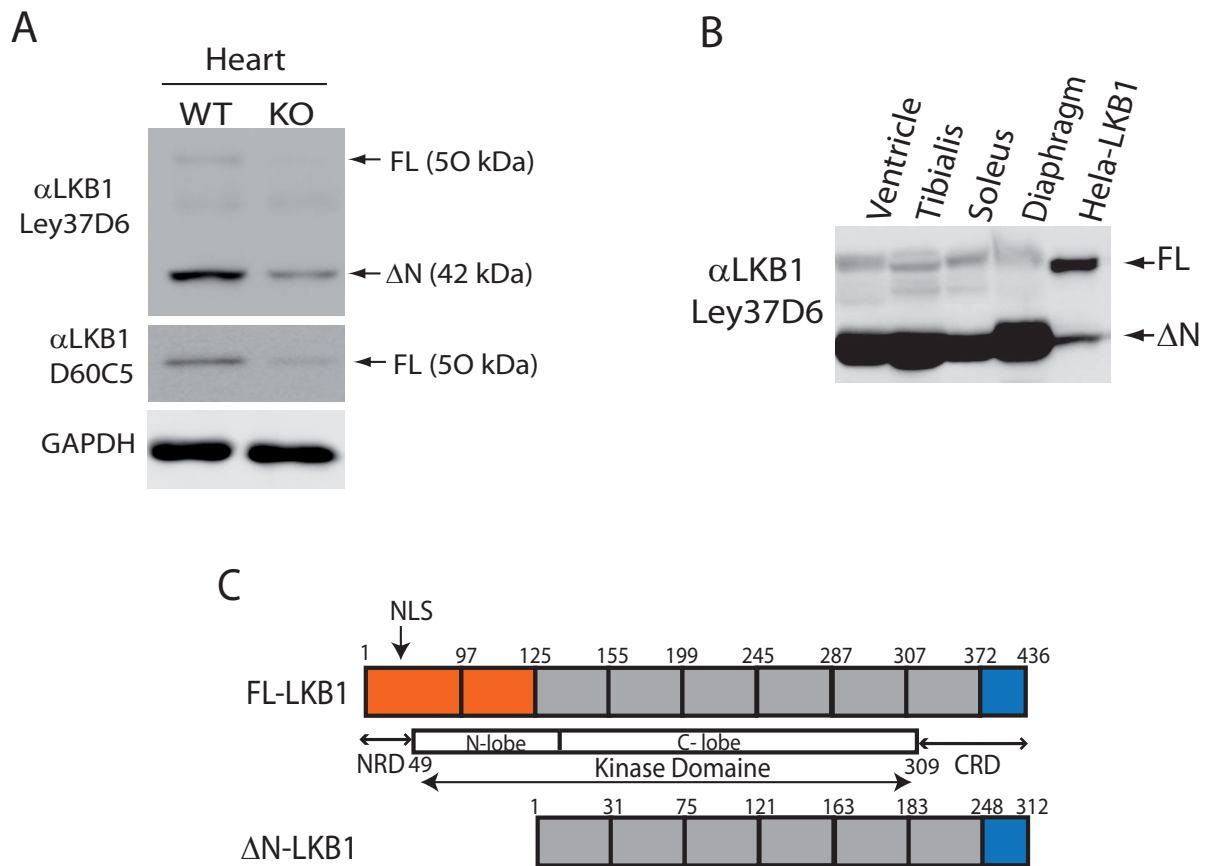


Figure 3. Confirmation that the 48 kDa isoform is encoded by the *LKB1* gene

A. Loss of Δ N-LKB1 expression in the heart of mice bearing a heart-specific deletion of LKB1 (KO) (23) with wild-type (WT) samples for controls (n=4). Heart extracts were subjected to Western blotting with the Ley37D/G6 and D60C5 LKB1 antibodies. The LKB1 gene was deleted in the heart using conditional LKB1 mice that deleted most of the LKB1 gene (33).

B. Co-migration of the Δ N-LKB1 isoform present in heart and skeletal muscle extracts with the cloned Δ N-LKB1 expressed in HeLa cells. Mouse protein extracts and lysate of HeLa cells transfected with vectors encoding the FL-LKB1 and Δ N-LKB1 isoforms (HeLa-LKB1) were analysed by western blotting using the Ley37D/G6 LKB1 antibody.

C. Structure of the human FL-LKB1 and the predicted N-terminally truncated (Δ N-LKB1) proteins, from (1). NRD: N-terminal-regulated domain; CRD: C-terminal-regulated domain; NLS: nuclear localization signal.

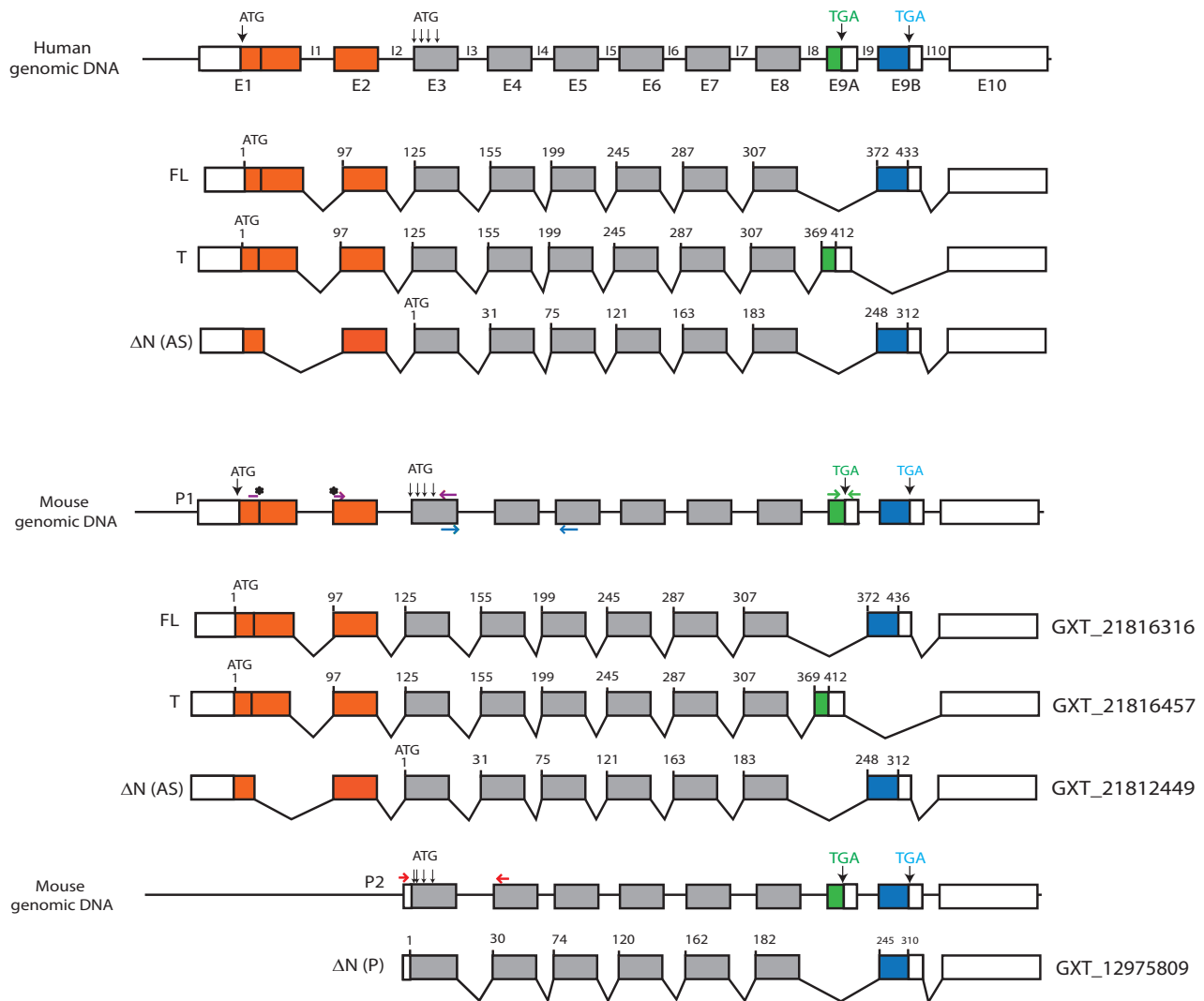


Figure 4. Schematic representation of the structure of the human and mouse *LKB1* genes and the various *LKB1* transcripts. The structure of the human and mouse *LKB1* genes is shown with exons (E1 to E10) represented by boxes and introns by horizontal lines (I1 to I10). The untranslated regions are represented as white boxes, and coding region as coloured boxes, the 5' alternative exons as red boxes, the coding exons shared by all the *LKB1* isoforms as grey boxes, the canonical C-terminal exon of FL-*LKB1* as blue boxes and the 3' spliced exon encoding the testis specific isoform as green boxes. The mouse alternative P2 promoter is also indicated. The different *LKB1* transcripts for human and mouse were depicted: mRNA encoding the canonical full-length 50 kDa isoform (FL), the testis isoform (T) and the Δ N-*LKB1* isoform resulting from a 5' alternative splicing event Δ N (AS). The mouse Δ N-*LKB1* transcript resulting from the use of an alternative promoter located in intron 2, Δ N (P) was also depicted. The various mouse *LKB1* transcripts were found in genomatix database: Testis *LKB1*: GXT_21816457, Δ N-*LKB1* from 5' alternative splicing: GXT_21812449, and Δ N-*LKB1* from alternative promoter: GXT_12975809.

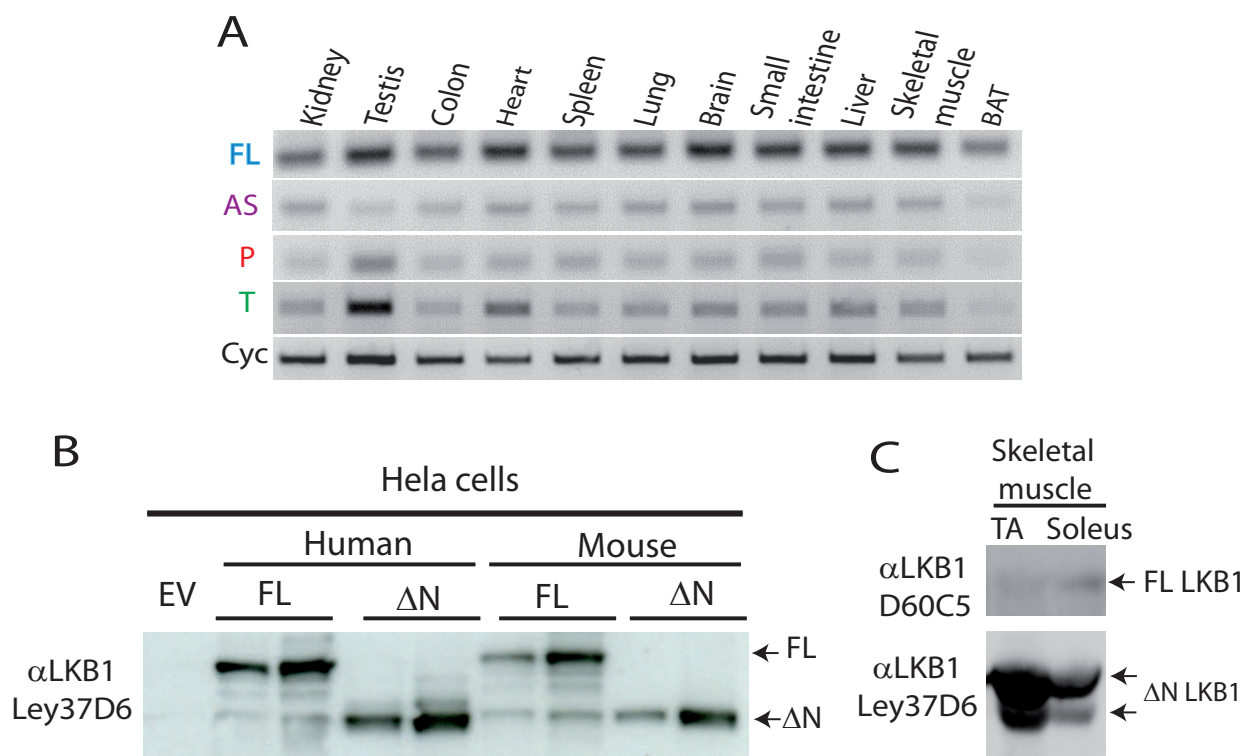


Figure 5. Cloning and characterization of the human and mouse Δ N-LKB1 isoforms

A. Different LKB1 mRNAs encoding for the various LKB1 isoforms in mouse tissues. RNA were isolated from different mouse tissues and analyzed by RT-PCR for the presence of the various LKB1 transcripts using primers depicted on Figure 4 in specific colors: blue, green, purple, and red for the canonical full-length (FL), testis (T), 5' alternative splice (AS) and from the P2 promoter (P), respectively.

B. Expression in HeLa cells of the untagged human and mouse cloned cDNAs encoding for either the full-length LKB1 protein (FL) or the N-terminal truncated LKB1 (Δ N). HeLa cells were transfected with the plasmids indicated and analyzed by western blotting using Ley37D/G6 antibody. In addition to FL-LKB1 protein, a fast migrating isoform was also detected, that co-migrated with extracts transfected with construct encoding either the human or mouse Δ N-LKB1 (Δ N) isoforms.

C. Mouse skeletal muscle, Tibialis anterior (TA) and soleus, were subjected to western blotting analysis using LKB1 antibodies. When SDS-PAGE was run for a long time, two closely migrating Δ N-LKB1 proteins were revealed with the Ley37D/G6 antibody indicating the presence two functional codon start sites.

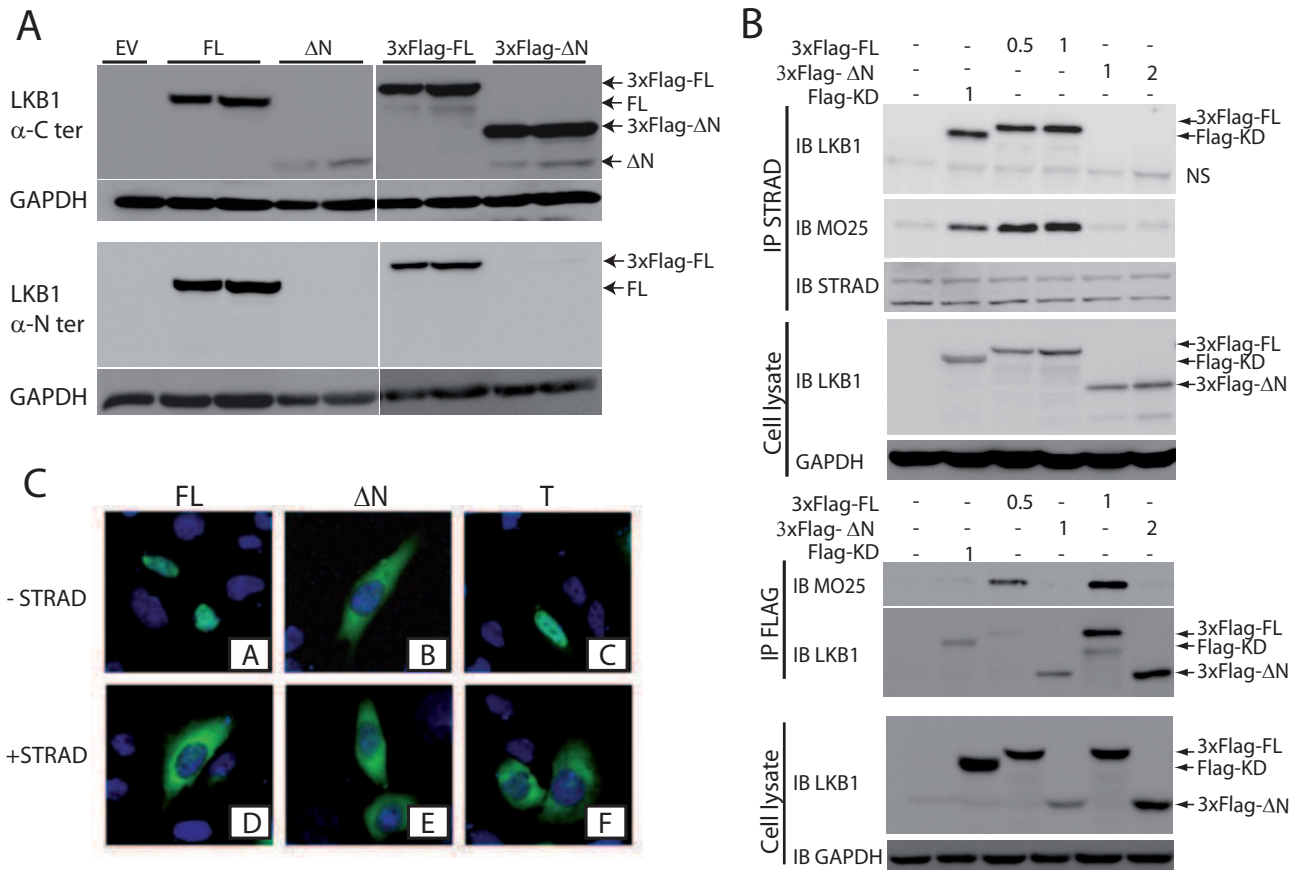


Figure 6. ΔN-LKB1 is N-terminally truncated and does not interact with the partners of the LKB1 complex

A. Expression in HeLa cells of untagged and tagged cDNAs encoding for human FL-LKB1 and ΔN-LKB1. Cells were transfected with the empty vector (EV) and human untagged or Flag-tagged LKB1 isoforms (1, 2 μg). Cell lysates were analyzed by western blotting using antibodies directed against either the N-terminal or the C-terminal parts of LKB1. Blotting with GAPDH showed that equal amount of protein was loaded in each lane.

B. ΔN-LKB1 did not interact with partners of the LKB1 complex. Upper panel: HeLa cells were transfected with STRADα expression vector and plasmids corresponding to the empty vector (EV), the kinase dead vector (KD), the flagged-FL-LKB1 (FL) and flagged-ΔN-LKB1 (ΔN) isoforms for 48h. Cells were then harvested and lysates were immunoprecipitated with an antibody against STRADα and analyzed by western blotting using anti-LKB1 (D60C5 Cell signaling), anti-MO-25, anti-STRADα antibodies. Cell lysates were immunoblotted with anti-LKB1 (D60C5 Cell signaling) and GAPDH antibodies as controls of transfection efficiency. Lower panel: Same experimental design except that cell lysates were immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody and analyzed by western blotting with an anti-MO-25 and anti-LKB1 antibodies.

C. Subcellular localization of ΔN-LKB1. HeLa cells were transfected with vectors encoding the different LKB1 isoforms fused to GFP in the absence (A, B, C) or presence of vector expressing STRADα (D, E, F). Cells were fixed 24h post-transfection, mounted in DAPI-containing Vectashield mounting medium and LKB1 isoforms were visualized with GFP (green) using an epifluorescence (LEICA DMRD) with x400 magnification. FL: FL-LKB1; ΔN: ΔN-LKB1; T: testis isoform.

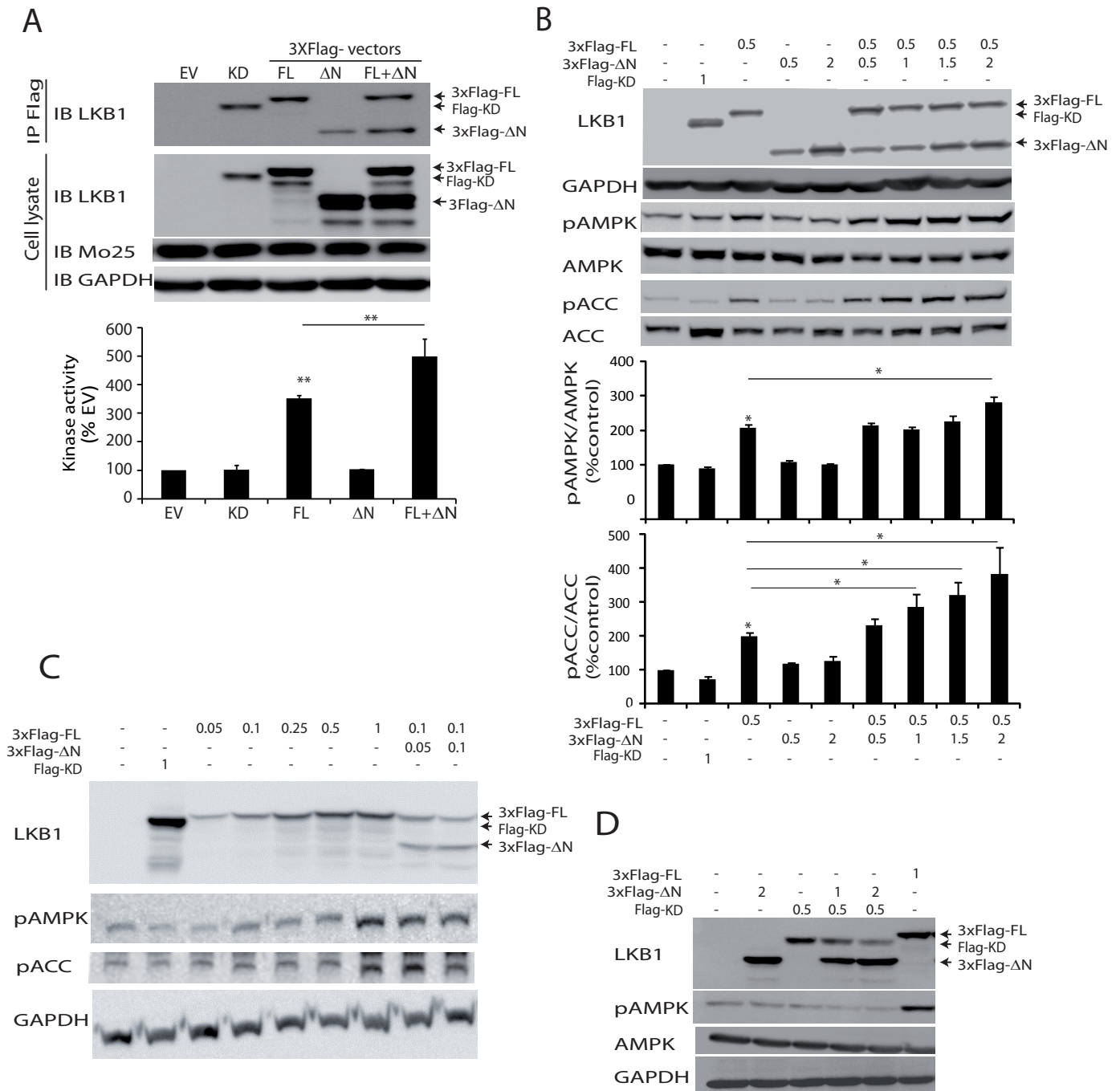


Figure 7. Δ N-LKB1 exerts a dominant positive effect on the LKB1-induced AMPK activity.

Figure 7. Δ N-LKB1 exerts a dominant positive effect on the LKB1-induced AMPK activity

A. Immunokinase assay of AMPK activity upon transfection of HeLa cells with the vectors encoding the various LKB1 isoforms. Cells were transfected with the EV (4 μ g), Flag-KD (1 μ g), Flag-FL (0.5 μ g), Flag- Δ N (1 μ g) and Flag-FL (0.5 μ g) co-transfected with Flag- Δ N (1 μ g). Immunoprecipitation (200 μ g cell lysate) was carried out using an anti-Flag antibody 48 hr post-transfection. LKB1 activity was measured by activation of the recombinant α , β , γ AMPK complex as described in materials and methods. Upper panel: immunoprecipitated proteins and an aliquot of cell lysates were subjected to western blot analysis with LKB1 and MO25 antibodies, and GAPDH as loading controls. Lower panel: results of kinase activity are expressed relative to the value for EV that was settled at 100 (each point in triplicate, n=2, mean \pm SD, ** p< 0.01).

B. Δ N-LKB1 induced a dose-dependent increase in LKB1-controlled basal AMPK activity. Upper panel: HeLa cells were transfected with both STRAD α expression vector and various amounts (μ g) of the different vectors as indicated. AMPK activity was revealed 48h post-transfection by western blot to determine activation of AMPK and acetyl-coA-carboxylase using pAMPK T172 and pACC S79 antibodies. Lower panel: images were recorded using a super CCD camera of 3.2 megapixels and quantification was performed using ImageQuantTM LAS 4000 mini (mean \pm SD, n=3, * p< 0.05).

C. Δ N-LKB1 potentiated LKB1-controlled basal AMPK activity. HeLa cells were transfected with both STRAD α expression vector and various amounts (μ g) of the different vectors as indicated and then analysed by western blotting as in B.

D. The dominant positive effect of Δ N-LKB1 on LKB1-induced AMPK activity required LKB1 as an upstream kinase. Experimental design and western blotting were done as in B but co-transfection in HeLa cells was performed with the kinase-dead LKB1 mutant (KD).

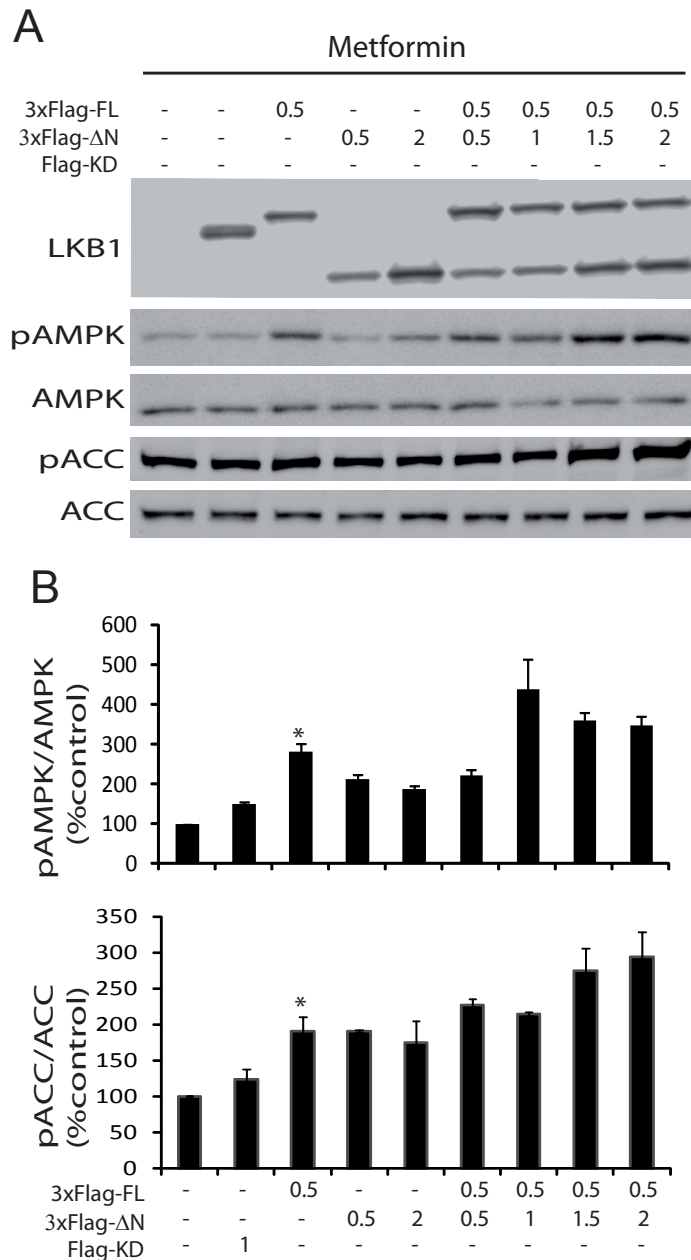


Figure 8. ΔN-LKB1 isoform exerts a dominant positive effect on metformin induced AMPK activity

A. dose_dependent increase of the LKB1_controlled AMPK activity by ΔN-LKB1 following treatment with 1mM metformin. The experimental design was the same as those described in Fig 7B except that cells were treated with metformin. To study AMPK activation by metformin, HeLa cells were serum_starved for 10 hours and then treated for 2_hours with 1mM metformin.

B. images were recorded using a super CCD camera of 3.2 megapixels and quantification was performed using ImageQuant™ LAS 4000 mini (mean ± SD, n=3, * p<0.05).

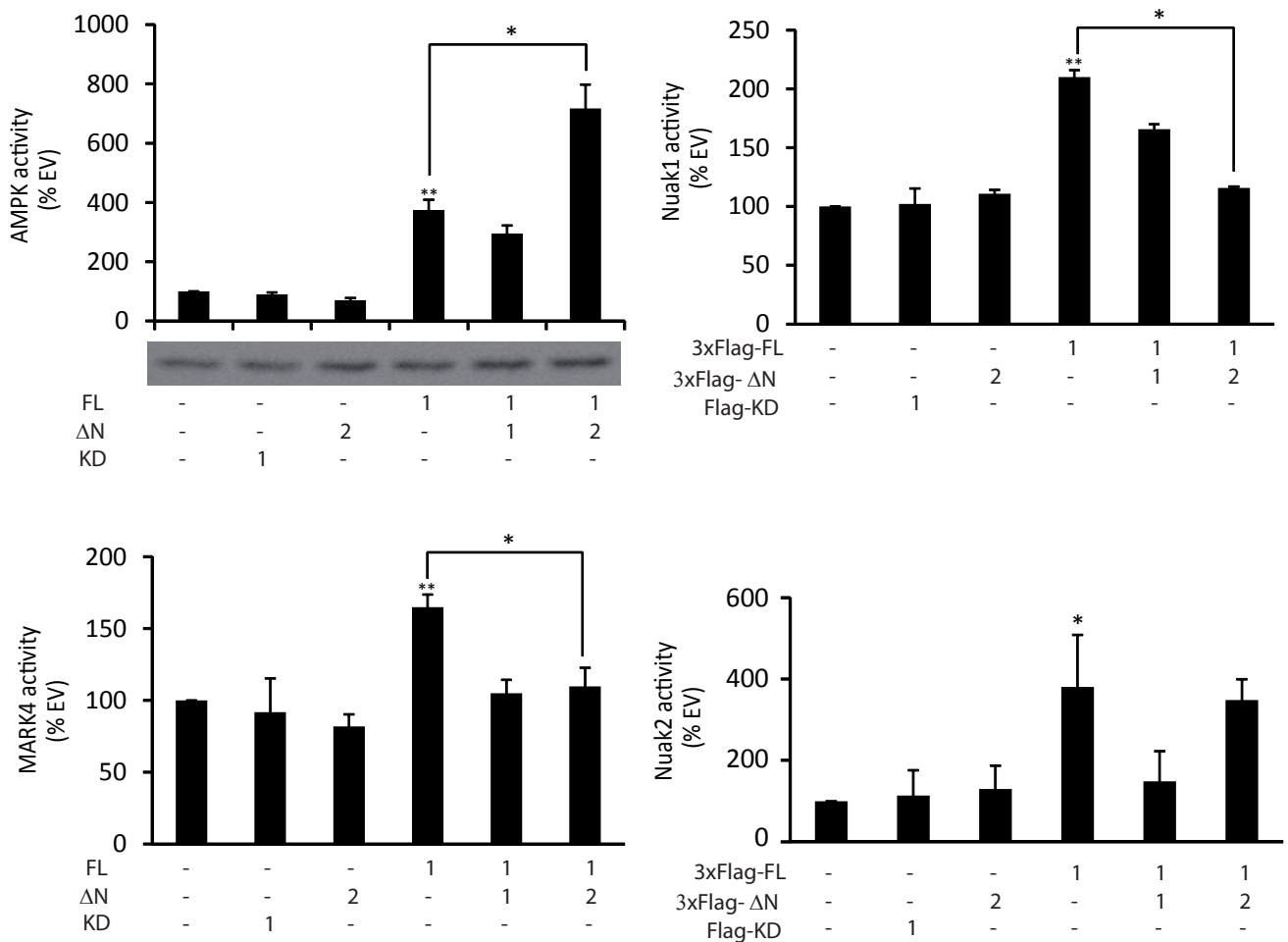


Figure 9. Role of Δ N-LKB1 on AMPK and ARK activities. Kinase activities of AMPK α 2 and other ARK immunoprecipitates obtained from lysate of HeLa cell transfected with STRAD α vectors and the different LKB1 plasmids as indicated. Samples of 500 μ g of cell lysates were immunoprecipitated with antibodies against either AMPK α 2 (Cell Signaling), NUA1, NUA2, MARK4 (a kind gift of G. Hardie and S. Hawley, Dundee). The kinase activity of each immune complex was then assayed using the AMARA peptide as explained in materials and methods and is expressed relative to the value obtained with the EV vector. The kinase activities of NUA1, NUA2 and MARK4, in HeLa cells transfected with FL-LKB1 were significantly higher than the control value (EV, KD and Δ N), no dominant positive activity was observed when Δ N-LKB1 was co-expressed with FL-LKB1, rather a dominant negative effect was observed for MARK4 and NUA1.

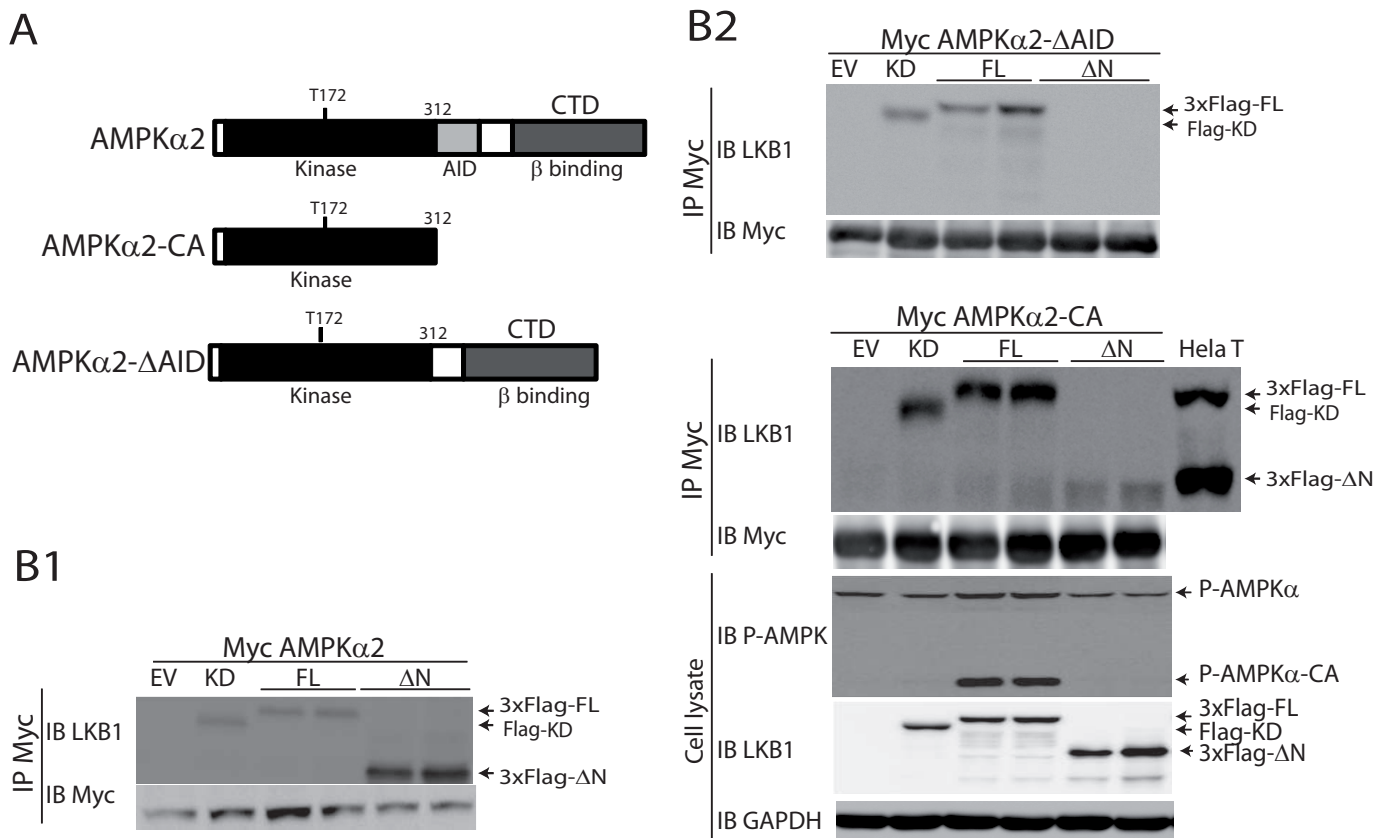


Figure 10 . Δ N-LKB1 affects AMPK activation by binding to the AID of AMPK α

A. AMPK α 2 catalytic subunit structure with a conventional kinase domain at the N terminus, followed by a regulatory region containing an auto-inhibitory domain (AID), an extended linker region and a carboxy-terminal domain (CTD) which binds the β/γ subunits (from (12)). The structures of both AMPK α 2 mutants used to analyze the interaction between Δ N-LKB1 and AMPK α are also represented.

B. Interaction of Δ N-LKB1 with AMPK α . B1: Δ N-LKB1 bound strongly to the whole AMPK α subunit. HeLa cells were transfected with both the STRAD α expression vector and the various vectors as indicated; 48h later, cells were harvested and cell lysates (200 μ g) and immunoprecipitated with anti-c-myc antibody and analyzed by western blotting analysis using anti-LKB1 (D60C5 Cell signaling) and anti-myc antibodies. The quantity of cell lysate for immunoprecipitation of KD and FL-transfected samples was 4-fold greater than that for Δ N-transfected samples. B2: Δ N-LKB1 does not bind to the kinase domain but does bind to the AID domain of AMPK α subunit. HeLa cells were transfected with the indicated vectors together with plasmids encoding STRAD α and two AMPK α mutant (myc-tagged-CA-AMPK α 2 and myc-tagged AMPK α 2 Δ AID); 48h post-transfection, cells were lysed and immunoprecipitated with anti-c-myc antibody and analyzed by western blotting analysis using anti-LKB1 (D60C5 Cell signaling) and anti-myc antibodies.

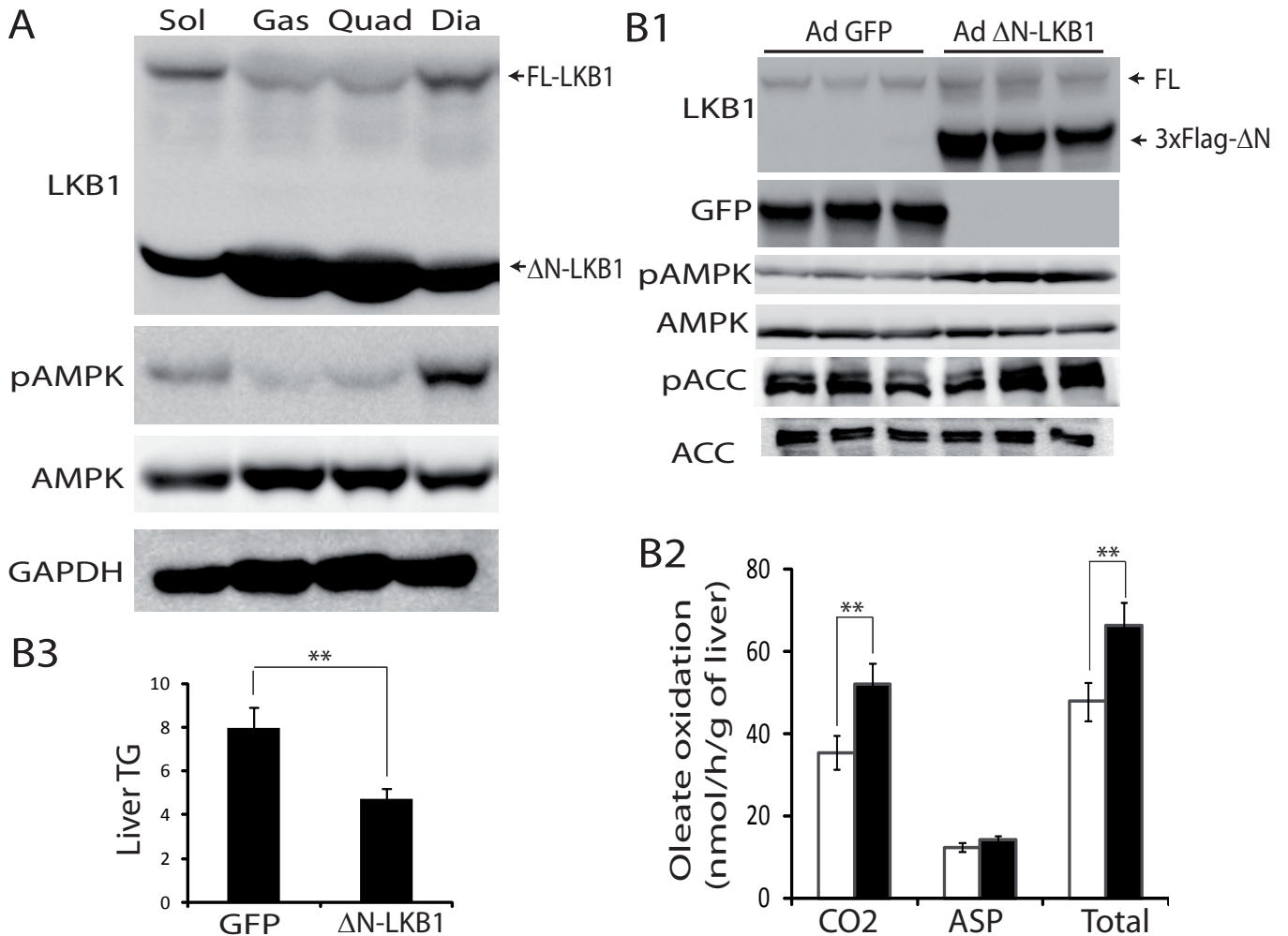


Figure 11: Physiological role of Δ N-LKB1: expression studies in skeletal muscle and control of oleate oxidation in fasted liver

A. Distribution of Δ N-LKB1 in mouse muscle. Extracts from different skeletal muscle as indicated were analyzed by western blotting using LKB1 (Ley37D/G6) and AMPK antibodies (pAMPK T172 and total AMPK). Sol: Soleus; Gas: gastrocnemius; Quad: quadriceps, Dia: diaphragm.

B. Δ N-LKB1 increases oleate oxidation in the liver of fasted mice. B1: Adenovirus-mediated expression of Δ N-LKB1 in the liver. Mice were infected with adenoviruses encoding either Δ N-LKB1 (Ad- Δ N-LKB1) or control GFP (Ad-GFP). Seven days later, liver from fasted mice were analyzed by western blotting using an anti-LKB1 (D60C5, Cell signalling), anti-GFP, anti p-172-AMPK, anti-p79-ACC, anti-AMPK and anti-ACC antibodies. B2: Oleate oxidation into CO₂, acid-soluble products (ASP) and their sum (Total). The oleate oxidation rate was measured in the livers of Ad-GFP (white bars), Ad- Δ N-LKB1 (black bars) infected animals (see materials and methods). (mean \pm SD, n=6, ** p<0.01 versus Ad-GFP). B3: liver triglyceride content in Ad-GFP and Ad- Δ N-LKB1 infected livers (see materials and methods). (Mean \pm SD ** p<0.01 versus Ad-GFP).

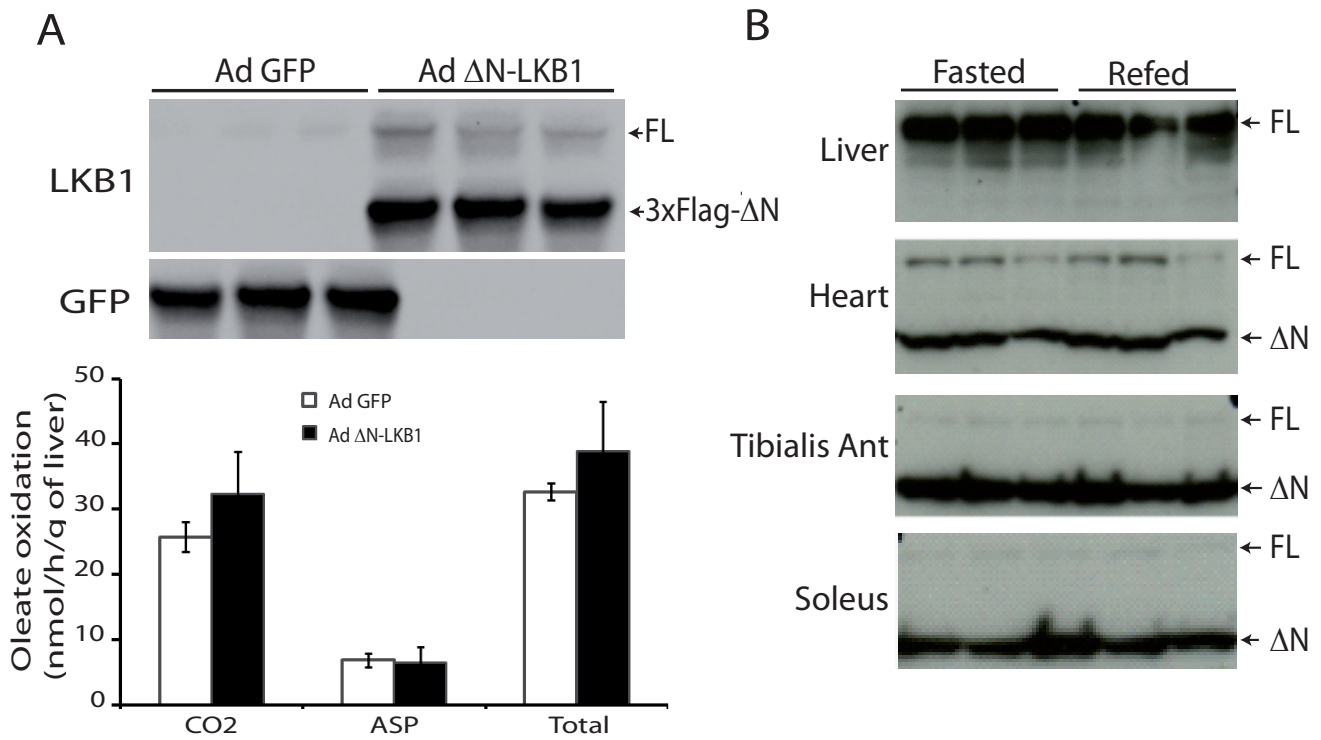


Figure 12. Role of the diet on Δ N-LKB1-induced fatty acid oxidation and on expression level of Δ N-LKB1

A. Adenovirus-mediated expression of Δ N-LKB1 did not change hepatic fatty acid oxidation in refed mice. Mice were infected with adenoviruses encoding either Δ N-LKB1 (Ad- Δ N-LKB1) or control GFP (Ad-GFP). Seven days later, liver of refed mice were analyzed by western blotting using an anti-LKB1 (D60C5, Cell signalling). Oleate oxidation rate into CO₂, acid_soluble products (ASP) and their sum (Total) was measured in the livers of Ad-GFP (white bars), Ad- Δ N-LKB1 (black bars) infected animals.

B. Control of mouse Δ N-LKB1 expression by diet Mice were under fasted (16-18 hr) or maintained on refed normal diet, different tissues were removed for analysis by western blotting using the Ley37D/G6 LKB1 antibody. FL: FL-LKB1, Δ N: Δ N-LKB1.

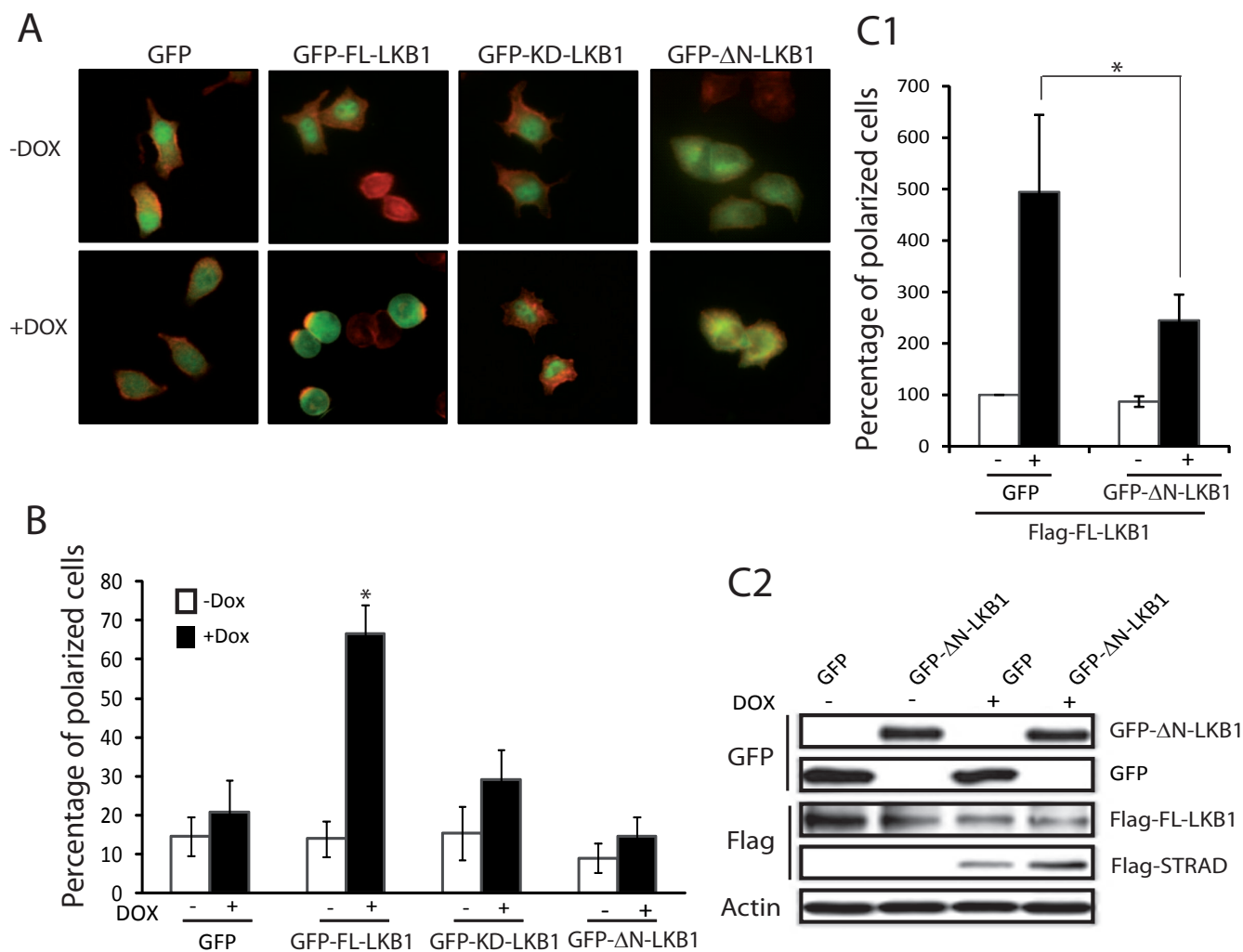


Figure 13. Δ N-LKB1 exerts a dominant negative effect on the LKB1-induced cell polarisation

A. Fluorescent micro-photograph of the LS174TR1-6 cells transfected with the different GFP-fused LKB1 isoforms. Cells were transfected with the vectors as indicated. Actin cytoskeleton reorganization (formation of an actin cap) was only observed upon induction of STRAD α expression by doxycycline (+Dox) in cells transfected with FL-LKB1 (GFP-FL-LKB1). The actin cytoskeleton was visualized by phalloidin-TRITC staining (red) and LKB1 expression by GFP fluorescence.

B. Polarizing activity of the various LKB1 isoforms. Bar diagram of the percentage of GFP-expressing cells showing an actin cap (see material and methods) measured in the presence or absence of doxycycline. Mean \pm SD, n=9, *p<0.05.

C. Δ N-LKB1 effect on LKB1-induced polarizing activity. C1: Cells were co-transfected together with FL-LKB1 and either GFP, or Δ N-LKB1, and polarisation was evaluated (see supplementary methods). C2: Western blot analysis indicating the protein quantities.

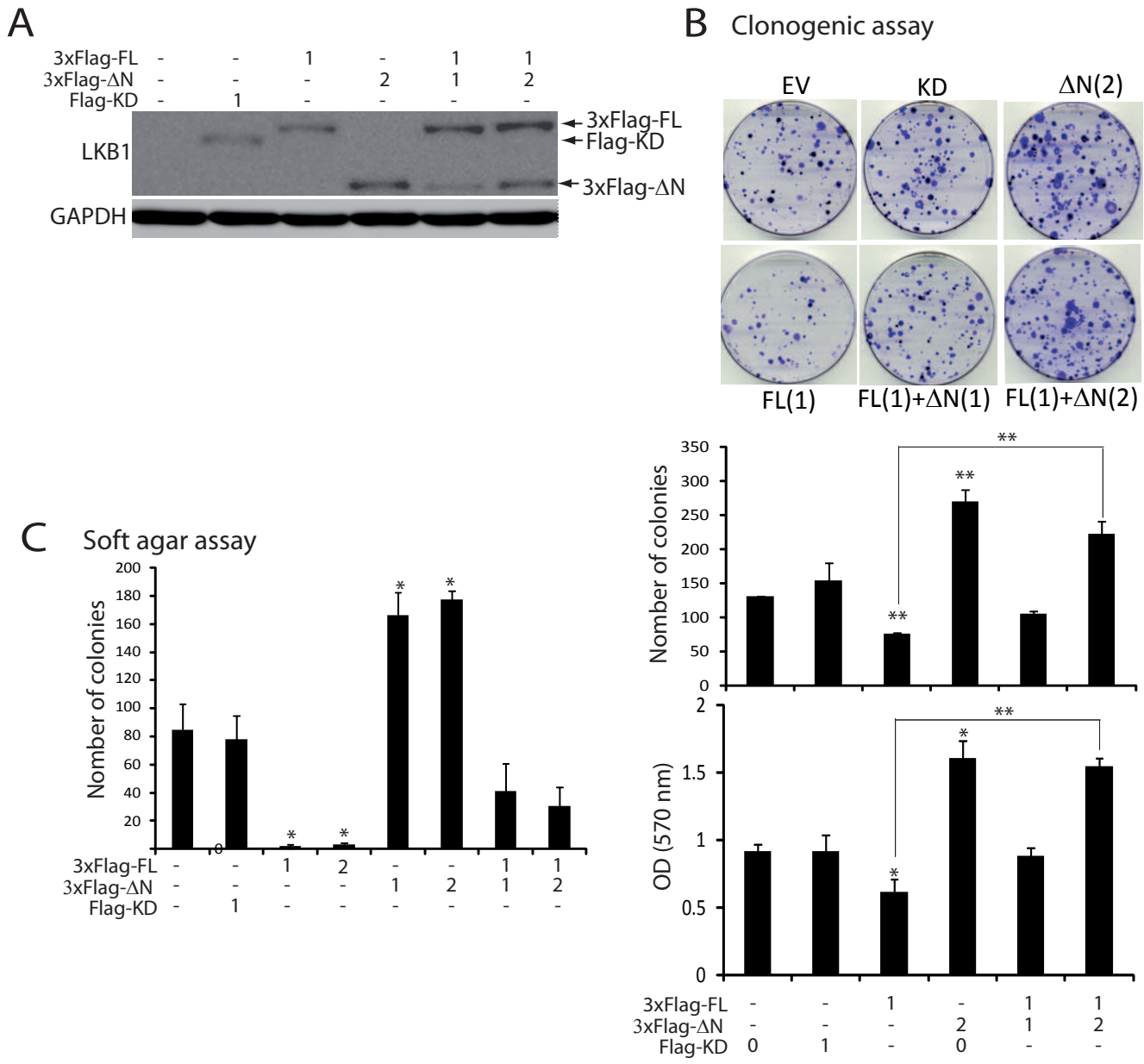


Figure 14. ΔN-LKB1 exerts a dominant negative effect on the LKB1-induced cell growth inhibition

A. Western blot analysis illustrating the abundance of the various LKB1 isoforms in each transfected sample.

B. Clonogenic assay. HeLa cells were seeded at 30% confluence and treated with G418 for 15 days. Cells were then fixed and stained with 0.5% crystal violet for colony scoring and the absorbance of the extracted dye was determined. Results are the mean \pm SD, $n=3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

C. Soft agar assay. Seventy-two hours post-transfection with the indicated vectors, HeLa cells were proceeded as explained in material and methods. Results are the mean \pm SD, $n=2$. * $p < 0.05$.

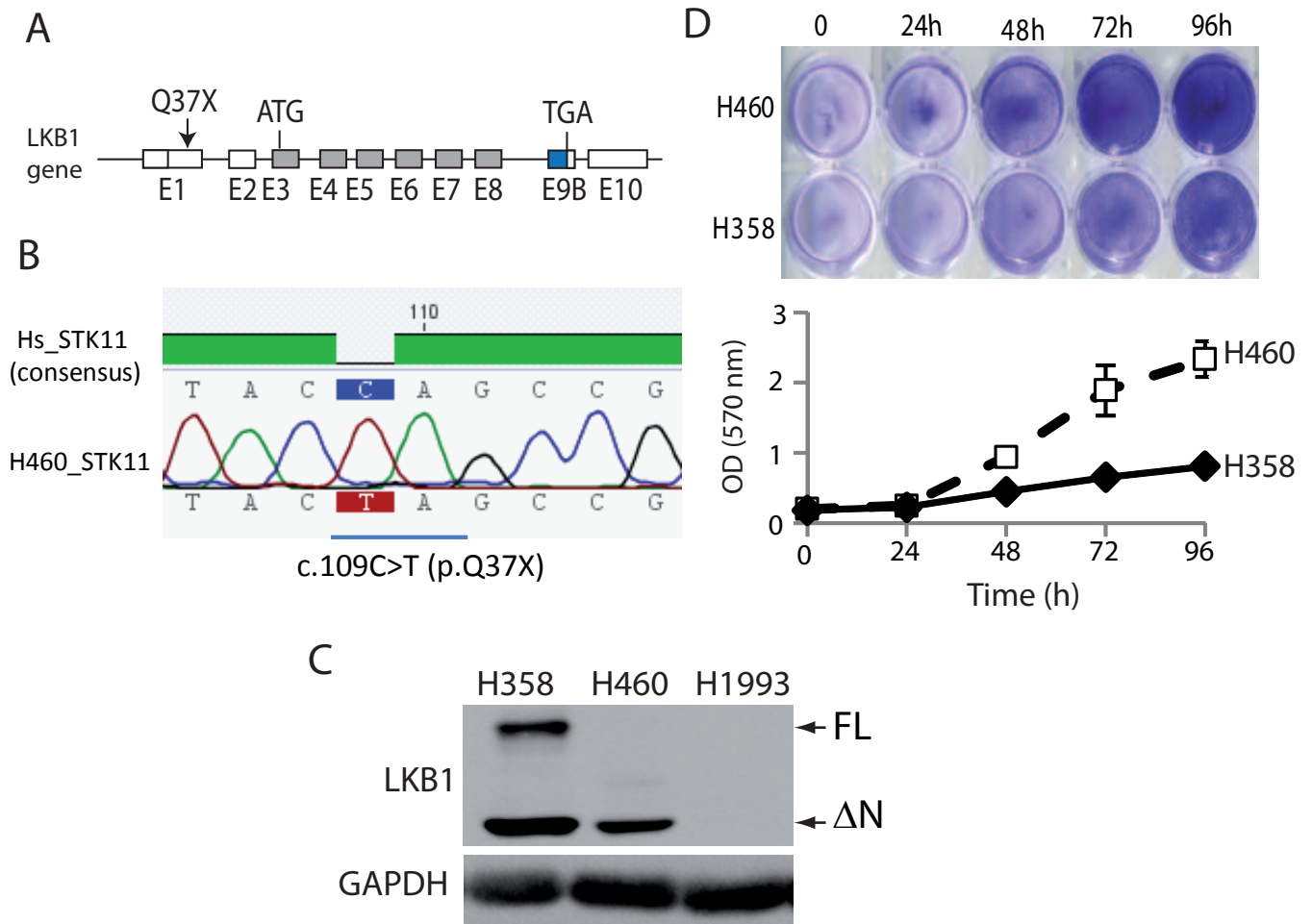


Figure 15. ΔN-LKB1 isoform expression in lung cancer cell lines

A. Structure of the human LKB1 gene showing the position of LKB1 mutation (Q37X) found in NCI-H460 cell (5).

B. Mutation in NCI-H460 lung cancer cell line. RNA was extracted from NCI-H460 cells, RT-PCR was performed and sequence analysis was done with the primers GCAGCTGGGCATGTTCAC and CAATCAGCTGACAGAAGTACC.

C. western blot analysis of LKB1 in different human lung cancer cell lines with wild-type LKB1 gene (H358), that expressed both FL-LKB1 and ΔN-LKB1, a homozygous Q37X mutation leading to the expression of ΔN-LKB1 isoform (H460) or an inactivating (p.E199X) LKB1 mutations (H1993).

D. Growth curves analyses of NCI-H460 and NCI-H358 lung cancer cell lines. Viable cells were scored by staining with crystal violet.

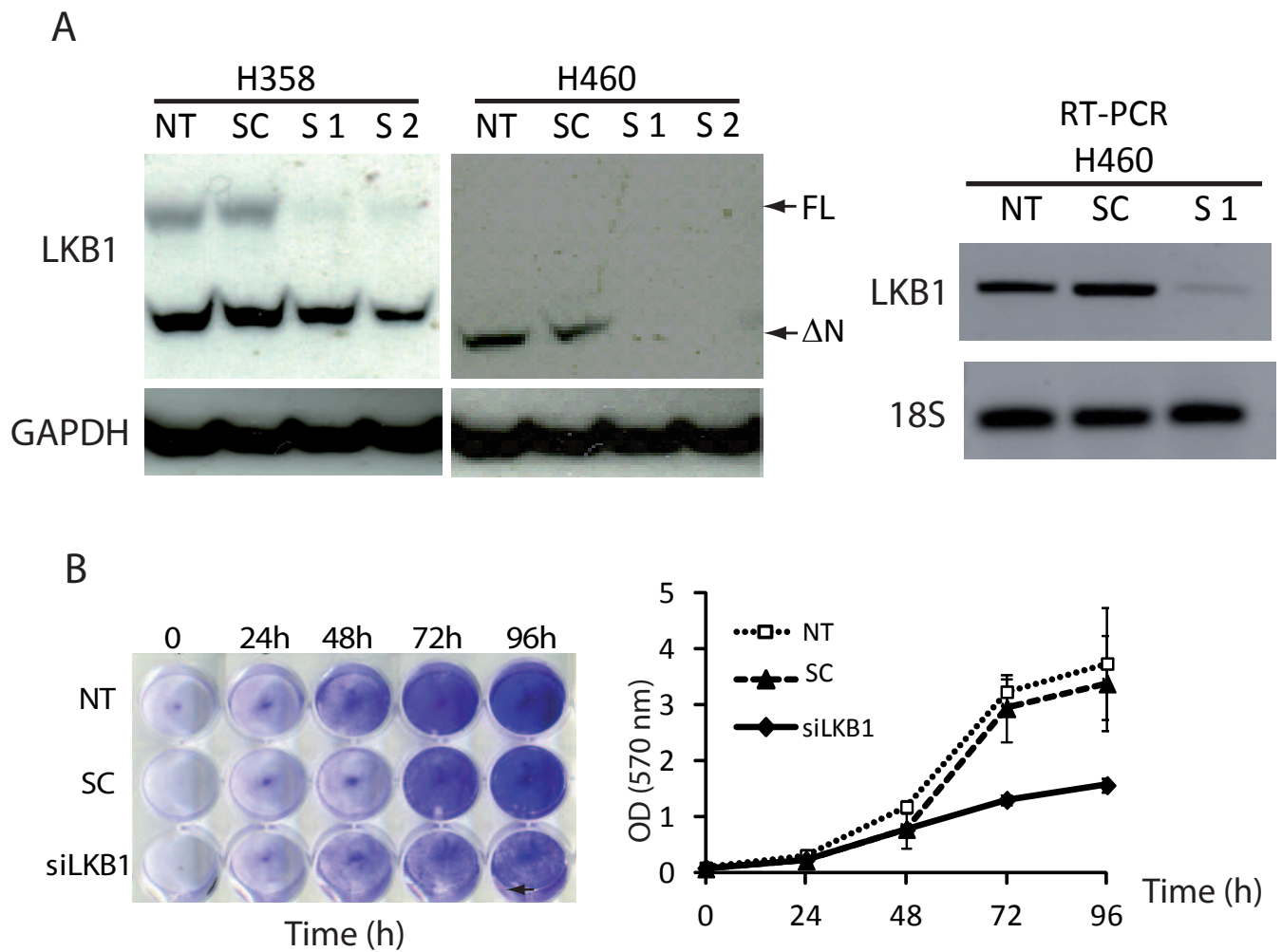


Figure 16. LKB1 depletion in NCI-H460 cells decreased cell growth

A. Western blot analysis of NCI-H358 and NCI-H460 cells treated for 48h by siRNAs against LKB1 (S1, S2) and controls. RT-PCR analysis of NCI-H460 cells after siRNA treatment.

B. Growth curve analyses of NCI-H460 cells after siRNA treatment. Viable cells were scored by staining with crystal violet (n =3). NT: untransfected, SC: transfection with a scrambled siRNA.

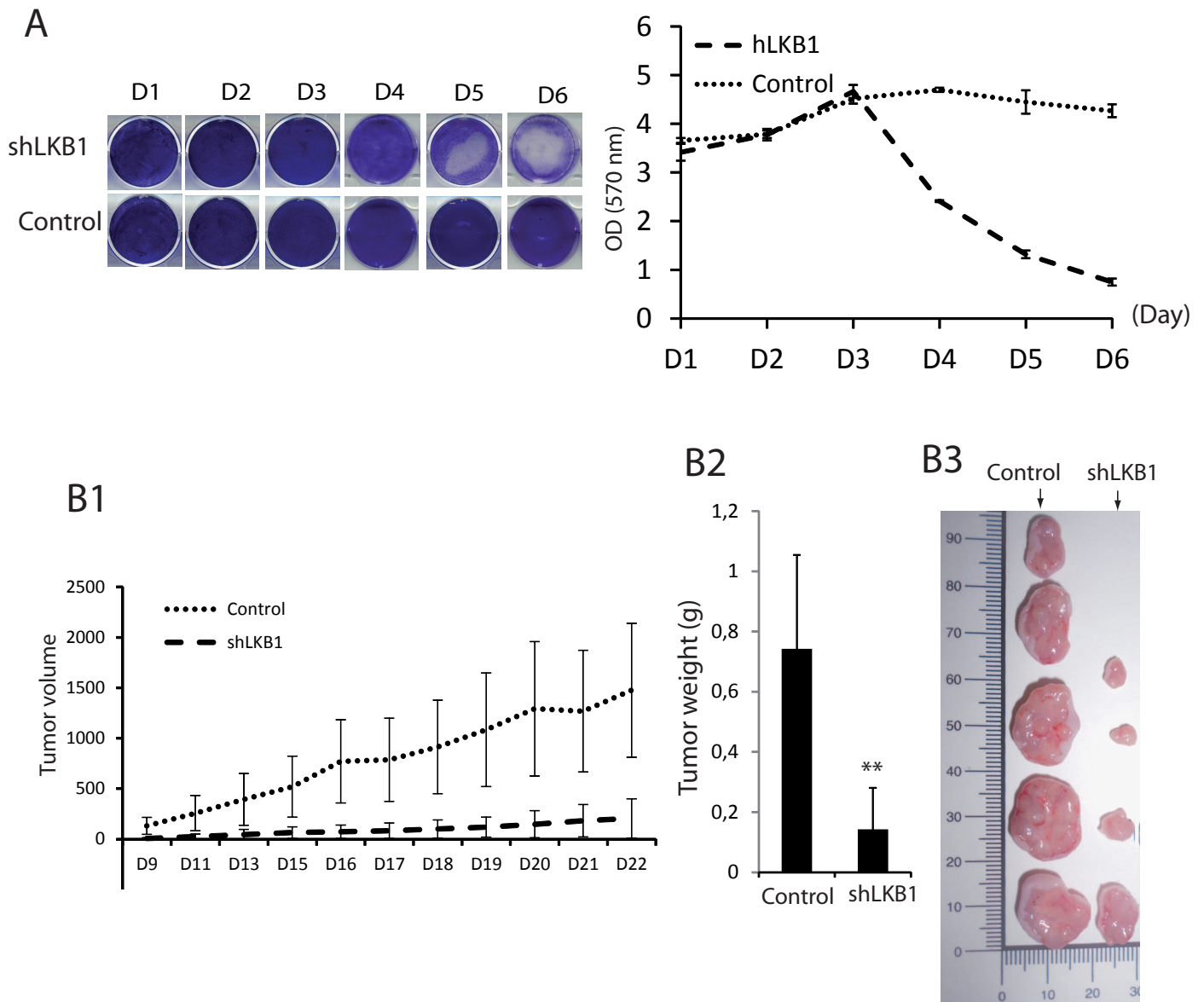


Figure 17: Δ N-LKB1 exhibits intrinsic oncogenic property in tumor xenograft

A. *In vivo* tumorigenicity of NCI-H460 cells. NCI-H460 cells were infected with a lentiviral vector transducing a LKB1 shRNA (SH1) or the empty vector (control), and selected for puromycin resistance. Viable cells were scored by staining with crystal violet. Cell death was significantly observed four days after doxycyclin expression (n=3).

B. Subcutaneous tumors in nude mice engrafted with NCI-H460 cells expressing either LKB1 shRNA (SH LKB1) or empty vector (control) that were previously treated for three days by doxyxcylin. Tumors weight was monitored from day 9 (B1). On day 23, tumors associated with LKB1-depleted NCI-H460 cells or control NCI-460 cells were removed and weighted (B2). From five mice, only four tumors developed from LKB1-depleted cells (B3). Bars represented means \pm SE (n=5). ** P<0.01.

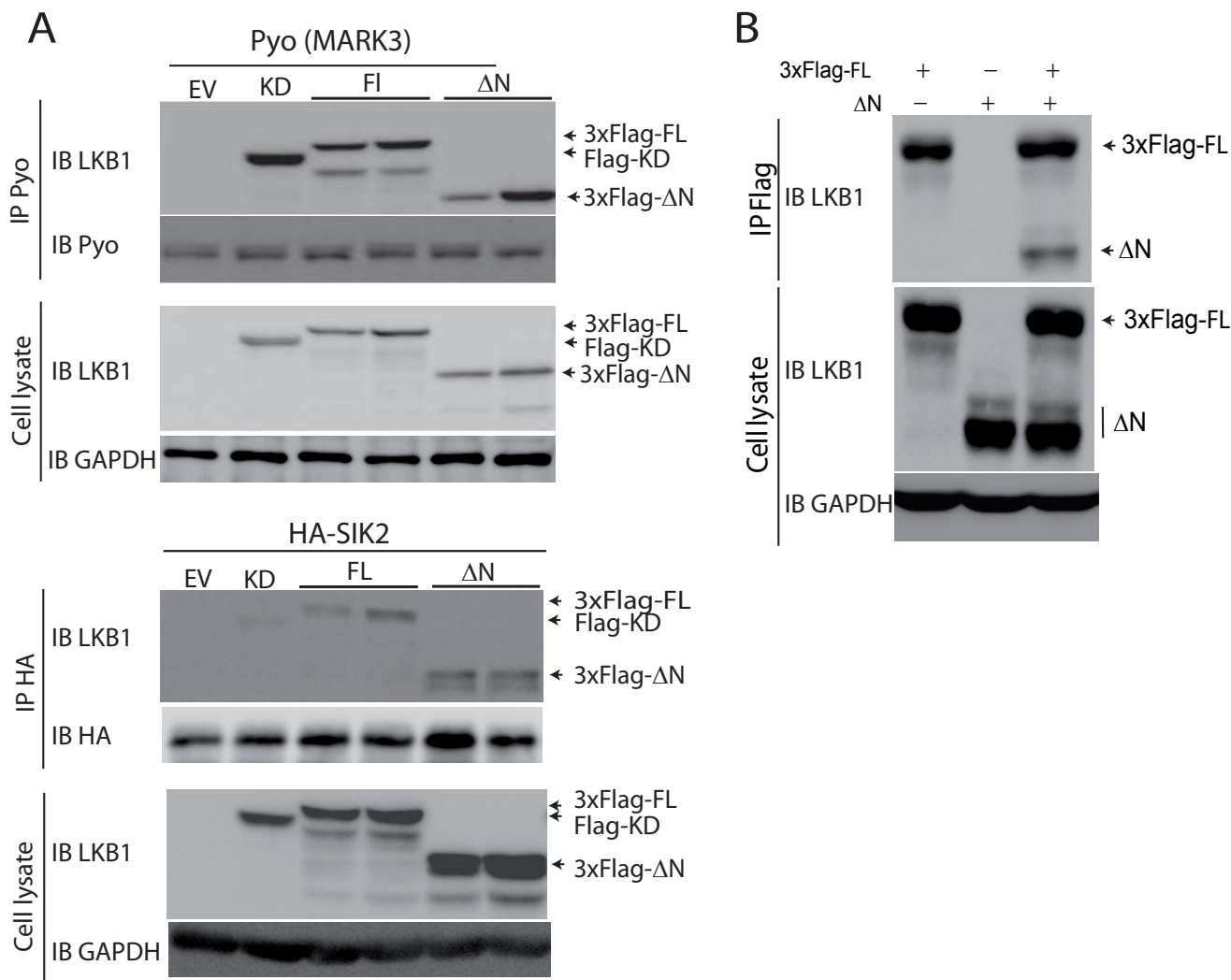


Figure 18. Binding of ΔN-LKB1 to monomeric LKB1 substrates

A. HeLa cells were transfected with the indicated vectors together with plasmids encoding STRAD α and either the Pyo-tagged MARK3 or HA-tagged SIK2 substrates. 48 post-transfection cells were lysed and immunoprecipitated (200 μ g of cell lysate) using the appropriate tag antibody.

B. Δ N-LKB1 is present in the complex containing FL-LKB1. HeLa cells were transfected with the indicated vectors. 48 hours after transfection cells were lysed and immunoprecipitated using an antibody against Flag. The immunoprecipitate were analysed by western blotting using anti-LKB1 antibody (D60C5 Cell signalling).

MATERIALS AND METHODS

❖ Materials and reagents

Protease-inhibitor cocktail were obtained from Roche Diagnostics, (Basel, Switzerland). Doxycyclin and metformin were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Protein A coupled to sepharose beads were purchased from (Life Technologies, Carlsbad, CA). Anti- β -catenin was from BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ), anti-LKB1 (D60C5), anti-AMPK, anti-phospho AMPK α T172 (2531), anti-ACC (3662), anti-phospho-ACC S79 (3661), anti-Myc-tag (2276), anti-MO25 α (2716), and secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were purchased from Cell Signalling Technology (Beverly, MA). Anti-MARK1/2 (Anti-C-TAK1, 05-680) was purchased from (Millipore, Upstate, Billerica, MA). Antibody anti-Flag-tag M2 (F1804) was purchased from Sigma. Antibody anti-LKB1 (clone Ley 37D/G6) and anti-Strad α (clone N-13) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa-Cruz, CA), and anti-LKB1 N-ter (AP7229a) and anti-LKB1 C-ter (AP7239b) from Abgent (United Kingdom).

The vectors encoding kinase-dead (KD) (Flag-K78A-LKB1) has been previously described (32). Flag-Strad α was provided by H. Clevers (Utrecht, Netherland). Vectors encoding Myc-AMPK α 2, myc-CA AMPK α 2 and myc-AMPK2- Δ AID, were provided by M Foretz and B Viollet (Inserm U1016, Paris, France), those encoding SIK2 by R Dentin (Inserm U1016, Paris, France), and the Pio-MARK3/4 by J. Müller (University of Warwick, UK). Recombinant adenoviruses encoding for Δ N-LKB1 were generated and produced by Genecust (Dudelange, Luxembourg) using the Flag- Δ N-LKB1 vector as template.

❖ Construction of expression vectors

To construct pcDNA3-FL-LKB1 and pcDNA3- Δ N-LKB1, total RNA from human HUH6 cells and mouse testis were reverse-transcribed using the Transcriptor First Strand cDNA synthesis (Roche diagnostic); the cDNAs were amplified by PCR using primers containing EcoR1 site (underlined on the sequence) and Phusion high fidelity DNA polymerase (Finnzimes). The forward primers used to clone mouse Δ N-LKB1 overlapped the junction between exon 1 and exon 2 resulting from the 5' alternative splice event (Figure 2A and Figure 2C).

The following primers were used:

- Human FL-LKB1, forward primer: [ACTGGAATTCGTCCAGCATGGAGGTGGTG](#); and reverse primer : [CAGTGAATTCAGCCTCACTGCTGCTTGC](#);
- Mouse FL-LKB1, forward primer: [ACTGGAATTCAGGGGACGAGGACAAAGAGTG](#); reverse primer : [CAGTGAATTCGATCCTGATGACACACTGTAGGC](#);
- Human Δ N-LKB1, forward primer : [ACTGGAATTCACTCCACCGAGGGAATTTCA](#), reverse primer ; [CAGTGAATTCGCCAGCCTCACTGCTGCTT](#);
- Mouse Δ N-LKB1, forward primer: [ACTGGAATTCTCCACCGAGGGAGATCCA](#), reverse primer: [CAGTGAATTCCTGTAGGCCTCAGTCACTGCT](#).

The products were purified by agarose gel electrophoresis, digested by EcoR1 and cloned into pcDNA3 mammalian expression vector (Life Technologies). Insert sequences was checked by DNA sequencing.

To construct the human triple Flag-FL-LKB1 and triple Flag- Δ N-LKB1 expression vectors, we used the Gateway technology (Life Technologies) according to manufacturer's instructions, using vectors encoding for the untagged human FL-LKB1 and Δ N-LKB1, pDONORTM/ZEO (entry clone) and pCiNeo3x-Flag-GW (destination vactory) and the following primers : for human FL-LKB1, forward sequence : ATGGAGGTGGTGGACCC; reverse sequence TCACTGCTGCTTGCAGG, for human Δ N-LKB1, forward primer : ATGTATATGGTGATGGAGTACTGC; and the same reverse primer as for human Δ NLKB1. The resulting vectors (3xFlag-FL-LKB1 and 3xFlag- Δ N-LKB1) were validated by sequencing. Hela cells were transiently transfected with these vectors to confirm protein expression by Western blotting. Because the endogenous ATG start site codon was not removed, both the major band corresponding to the 3xFlag LKB1 protein and a minor faster migrating band corresponding to initiation at the endogenous ATG start site were detected in transfection experiments .

The GFP-FL-LKB1 and GFP- Δ N LKB1 constructs were obtained by subcloning EcoR1-digested human FL-LKB1 and Δ N-LKB1 inserts in peGFP-C1 vector (Clontech). The others vectors GFP-KD-LKB1 and Flag-Lkb1 have been previously described (32).

Supplementary methods are available online.

❖ RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted from diverse mouse tissues with Trizol Reagent (Life technologies) according to manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed from 1 µg of total RNA using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) and random hexamer as primers. PCR amplification was performed using LKB1 primers specific for each mouse LKB1 isoforms:

- Full-length LKB1 isoform (FL) : forward 5'-CTGATTGACGGCCTGGAATA-3', reverse 5'-TCCAGTCCATTGGCAATCTC-3';
- Testis isoform (T): forward 5'-CCACCAAGCCCAGACACTAA-3', reverse 5'-CACCAGGCACTGTGAAGTCC-3';
- The 5'alternative splice transcript (AS) ΔN-LKB1: forward 5'-CATCGACTCCACCGAGGGAG-3', reverse 5'-CATCTCCTGCATGCCACATA-3';
- The alternative mouse promoter transcript (P) ΔN-LKB1: forward 5'-GCGCCCTACGTATATGGTGA-3', reverse 5'-TATTCCAGGCCGTCAATCAG-3'.

The reaction included a 10min denaturation step, followed by 30 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 57°C and 45 s at 72°C, and a final elongation step for 7 min at 72°C. PCR products were resolved and analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel.

❖ Cell culture, transfection assay

Hela cells, Huh6 cells and the human non-small cell lung cancer NCI-H460, NCI-H358 and H1993, were grown in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) with 4.5g/L glucose supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 100U/ml penicillin/streptomycin at 37°C in 5% CO₂. LS174T TR1-6 human cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 10ug/mL blasticidin and 500 ug/mL zeocin at 37°C in 5% CO₂.

For plasmid transfection, Hela cells were seeded in 6-well plate (0.5x10⁶ cells per well) and transfected with a total of 4 µg of the indicated vectors using the Lipofectamine 2000 method according to manufacturer's protocol (Life Technologies).

For siRNA transfections, NCI-H460 and NCI-H358 were seeded in 6-well plate (0.3x10⁶ cells per well) and cells were reverse-transfected with 100 pmol of siRNA in the presence of Lipofectamine RNAimax reagent (Life Technologies), according to the procedure provided by the manufacturer. The siRNA obtained from Life Technologies

were, for LKB1 (NM_000455) *Stealth Selected RNAiTM* siRNA named HSS110329 and HSS110331 (referred as S1 and S2 respectively). *StealthTM* RNAi negative control duplex (referred as SC) was used as negative control for sequence independent effect.

For LKB1 shRNA experiments, Huh6 cells were seeded in 12-well plate (2×10^5 cells per well), incubated overnight and transduced with lentiviral vectors at an approximate multiplicity of infection (MOI) of 10 for 4 hours. The cells were then incubated overnight in fresh growth medium, and 24 hours after transduction, cells were seeded at 30% confluency in 6 well plates; 24 hours later, the cells were subjected or not to doxycycline (Sigma-Aldrich) treatment ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) for a further 72h. The cells were then lysed and the efficiency of the LKB1 silencing was verified by Western blotting. The sequence of the shRNAs against LKB1 were:

SH1: 5'-GCCAACGTGAAGAAGGAAATT-3'

SH2: 5'-CATCTACACTCAGGACTTCAC-3'

❖ Cell lysis and immunoblot analysis.

Total protein extracts from various mouse and human tissues were obtained from 20 mg of frozen tissue that was bead-mill homogenized in $400 \mu\text{L}$ of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM Na pyrophosphate, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 mM AEBSF, 1% Triton X-100, supplemented with a mixture of protease inhibitors) with a TissueLyser disruption system (Qiagen, Hilden, Germany). HeLa cells were washed in ice-cold PBS and lysed in lysis buffer. Samples were centrifuged at $13,000 \text{ g}$ for 10min at 4°C and supernatant was collected and kept at -80°C until analysis. Proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and blocked with 5% BSA. Blots were incubated with specific primary antibodies overnight at 4°C , washed, incubated with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and developed by enhanced chemiluminescence (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Images were recorded using a super CCD camera of 3.2 megapixels and ImageQuantTM LAS 4000 mini (GE Healthcare) was used for quantification.

❖ Immunoprecipitation for binding assays

Samples of 200 µg of proteins from HeLa cells transiently transfected with the various plasmids were immunoprecipitated with the appropriate antibody (5µg anti-LKB1, a gift from G Hardie (Dundee, UK), and 5µg for anti-Flag, anti-Myc, anti-HA, anti-Pyo, anti-MO25 or anti-Strad α antibody) in the presence of 20µL of protein A coupled to Sepharose beads (Invitrogen) overnight at 4°C. Immune complexes were washed four times with lysis buffer and eluted in Laemmli buffer, resolved by SDS PAGE and analysed by western blotting.

❖ Immunoprecipitation for kinase assay

LKB1 activity was measured by a two steps procedure. Samples of 200 µg of proteins from HeLa cells transiently transfected with the various plasmids were immunoprecipitated with 5µg of anti-Flag antibodies. Each LKB1 immunoprecipitate was washed four times with lysis buffer and twice with kinase assay buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 10 mM β -glycerophosphate). LKB1 immunoprecipitates were then incubated in the presence of 200µM of recombinant AMPK heterotrimer (α 1, β 2, γ 1) with 200 µM cold ATP, 5 mM MgCl₂ and at 30 C° for 20 min. The AMPK activity was then performed in 200 µM ³²PATP (3000Ci/mmol), 5 mM MgCl₂, 200 µM AMP and 200µM AMARA peptide (AMPK substrate) for 20 min at 30°C. The reaction mixture was then applied onto P81 phosphocellulose paper, washed in phosphoric acid and incorporation of ³²P-phosphate into the AMARA peptide was quantified using a scintillation counter. Each point of kinase assay was performed in triplicate.

Endogeneous AMPK, NUA1, NUA2, MARK4 activities were measured after immunoprecipitation with appropriate antibodies (kindly gift of G Hardie and S Hawley, Dundee) (500 µg of HeLa cell lysate). After extensive washing, kinase activity was determined by ³²P incorporation into the AMARA peptide as described above.

❖ Polarization of LS174T cells

LS174T TR1-6 cells expressed the STRAD α cDNA upon doxycycline induction and were described previously (34). Cells were seeded on laminin (Invitrogen)-coated cover slips (2µg/cm²) at 7000 cells / cm². They were then transfected as previously described (35) with lipofectamine 2000 and vectors encoding for the different GFP-LKB1 isoforms.

24h after transfection cells were either not treated or subjected to doxycycline treatment (1 μ g/mL) for a further 24h. Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized in 0.1% Triton X-100. The actin cytoskeleton was stained with TRITC-labeled phalloidin (Sigma-Aldrich) used at a 1:1000 dilution and staining was visualized under an epifluorescence microscope (Leica DMRD). The polarizing activity was determined as the percentage of polarized cells displaying an actin cap formation in cells transfected with pEGFP-C1 (GFP) and the various LKB1-GFP-constructs in both doxycyclin treated and untreated conditions. Only GFP-positive cells were counted. To study the effect of GFP- Δ N-LKB1 on the polarizing activity of FL-LKB1, cells were co-transfected with both GFP or GFP- Δ N-LKB1 and a vector encoding Flag WT LKB1 (Flag-LKB1 (35)); they were subjected to the doxycyclin treatment described below and polarizing activity evaluated. Flag-LKB1 staining was revealed by an immunostaining with an anti-Flag antibody coupled to an AMCA-conjugated secondary antibody. Only cells that co-expressed GFP or GFP- Δ N-LKB1 together with Flag-LKB1 (and thus emitting a green and blue signal) were counted. Epifluorescence was analyzed with a microscope LEICA DMRD with a magnification of x400.

❖ **Colony formation assay**

Hela cells were co-transfected with constructs encoding Flag-STRAD α and the various LKB1 isoforms or with empty vector (EV); 24 hours post-transfection, the cells were trypsinized, divided into two equal parts: one cultured for another 24 hours and LKB1 proteins were assayed by western blotting. The other part was seeded at 30% confluence and treated with G418 (0.8mg/mL) for 15 days. Colonies on each plate were counted after their coloration by crystal violet (0.5% crystal violet, 20% methanol for 10 minutes at room temperature). Plates were then washed 2 times with PBS and incubated in 1% SDS solution until the dye was completely solubilized and absorbance was read at 570 nm. Experiments in each set of plates were done in duplicate.

❖ **Soft agar assay**

The protocol of transfection was similar to that for the clonogenic assay. After 72 hours of selection with G418, each well were trypsinized and 2000 cells were plated in 35 mm Petri dishes containing 1 ml methylcellulose based medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 20% fetal bovine serum (PAA) and 0,3% bovine serum albumin

(PAA). Petri dishes were then placed in an incubator at 37°C under humidified atmosphere containing 5% of CO₂. Colonies of more than 50 cells were numbered after 15 days of culture.

❖ **Adenoviral infection of mice and fatty acid metabolism**

C57BL/6 mice were anesthetized with ketamine/xylazine and injected with adenovirus encoding for Δ N-LKB1 or adenovirus encoding for GFP ($5 \cdot 10^8$ PFU/mice). Seven days later, fasted mice were anesthetized and livers were removed for FA oxidation measurement (36). Briefly, mouse liver pieces ($\approx 1,5 \text{ mm}^3$ and 200 mg/flask) were incubated in duplicate at 37°C in 25 ml conical flasks sealed with rubber caps containing plastic centre wells in a final volume of 3 ml of Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (pH 7.4) in the presence of 1 mM carnitine and 0.3 mM [¹⁴C]oleate (0.5 Ci/mol) bound to 1% (w/v) defatted BSA. After 1 h, 300 μ L of 30% (v/v) perchloric acid were added through the rubber caps to the incubation medium. Released [¹⁴C]CO₂ was trapped in hyamine hydroxide added in the plastic centre wells, and neutralized perchloric acid extracts were analyzed for [¹⁴C]acid-soluble products (ASP). ASP consists mainly of shortened acyl-carnitines, Krebs cycle intermediates, and acetyl-CoA.

After centrifugation for 10 min at 1500g at 4°C, the lower organic phase corresponding to 5 mg of liver was collected, dried, and resolubilized in chloroform/methanol. Lipid classes were separated by TLC on silica-gel plates by using petroleum ether/diethyl ether/acetic acid (85:15:0.5, v/v/v) as the mobile phase. Lipids were visualized with iodine vapour. Bands were scraped and TG was extracted from silica in acetone. After centrifugation for 10 min at 3000g at 4°C to precipitate silica, and evaporation, TG were measured using a triglyceride FS kit (Diasys).

Conflict of interest: No

Acknowledgements

We warmly thank Graham Hardie and Simon Hawley (University of Dundee, UK) for their helpful comments and valuable scientific input into our work and also for their kindness in providing us with different antibodies and reagents to measure the LKB1-controlled AMPK activity and to test the role of Δ N-LKB1 on different ARKs. We are also grateful to Christelle Forcet, Nicolas Aznar and Maya Ghawitian from Billaud's laboratory, for their help with analysis of LKB1-induced polarizing activity. We are indebted to Benoit Viollet and Marc Foretz for providing us with AMPK plasmids and helpful discussions. We thank Pascal Maire (from Inserm U1016, PARIS, FRANCE) and all people of the team for helpful discussions, suggestions and critical reading of the manuscript. We are grateful to H el ene Blons (HEGP, Paris, FRANCE) and Sylvie Grazzeri (Inserm U 823, Grenoble, FRANCE) for providing the lung cancer cell lines and some lung tumors, respectively. We also thank V eronique Lenoir and Catherine Esnous for technical help in fatty-acid oxidation experiments, and animal facility of Institut Cochin for maintenance of mouse colonies. Core fundings came from INSERM, grants from LNCC (France) "Equipe lab el is ee Ligue Nationale Contre le Cancer", INCA grants and LABEX "Who am I?". R D was funded by a LNCC fellowship.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

References

1. Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR. LKB1-dependent signaling pathways. Annual review of biochemistry. 2006;75:137-63. PubMed PMID: 16756488.
2. Jansen M, Ten Klooster JP, Offerhaus GJ, Clevers H. LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. Physiological reviews. 2009 Jul;89(3):777-98. PubMed PMID: 19584313.
3. Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. Nature reviews Cancer. 2009 Aug;9(8):563-75. PubMed PMID: 19629071. Pubmed Central PMCID: 2756045.
4. Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. Gastroenterology. 2000 Dec;119(6):1447-53. PubMed PMID: 11113065.
5. Sanchez-Cespedes M. A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome. Oncogene. 2007 Dec 13;26(57):7825-32. PubMed PMID: 17599048.
6. Wingo SN, Gallardo TD, Akbay EA, Liang MC, Contreras CM, Boren T, et al. Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. PloS one. 2009;4(4):e5137. PubMed PMID: 19340305. Pubmed Central PMCID: 2660434.
7. Baas AF, Kuipers J, van der Wel NN, Batlle E, Koerten HK, Peters PJ, et al. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. Cell. 2004 Feb 6;116(3):457-66. PubMed PMID: 15016379.
8. Hong SP, Leiper FC, Woods A, Carling D, Carlson M. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003 Jul 22;100(15):8839-43. PubMed PMID: 12847291. Pubmed Central PMCID: 166400.
9. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, et al. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. Current biology : CB. 2003 Nov 11;13(22):2004-8. PubMed PMID: 14614828.
10. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. Journal of biology. 2003;2(4):28. PubMed PMID: 14511394. Pubmed Central PMCID: 333410.
11. Rose AJ, Alsted TJ, Jensen TE, Kobbero JB, Maarbjerg SJ, Jensen J, et al. A Ca²⁺-calmodulin-eEF2K-eEF2 signalling cascade, but not AMPK, contributes to the

suppression of skeletal muscle protein synthesis during contractions. *The Journal of physiology*. 2009 Apr 1;587(Pt 7):1547-63. PubMed PMID: 19188248. Pubmed Central PMCID: 2678225.

12. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012 Apr;13(4):251-62. PubMed PMID: 22436748.

13. Zeqiraj E, Filippi BM, Goldie S, Navratilova I, Boudeau J, Deak M, et al. ATP and MO25alpha regulate the conformational state of the STRADalpha pseudokinase and activation of the LKB1 tumour suppressor. *PLoS biology*. 2009 Jun 9;7(6):e1000126. PubMed PMID: 19513107. Pubmed Central PMCID: 2686265.

14. Vaahtomeri K, Makela TP. Molecular mechanisms of tumor suppression by LKB1. *FEBS letters*. 2011 Apr 6;585(7):944-51. PubMed PMID: 21192934.

15. Kottakis F, Bardeesy N. LKB1-AMPK axis revisited. *Cell Res*. 2013 Dec;22(12):1617-20. PubMed PMID: 22801477.

16. Hardie DG, Alessi DR. LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC Biol*. 2013;11:36. PubMed PMID: 23587167.

17. Liang J, Mills GB. AMPK: A Contextual Oncogene or Tumor Suppressor? *Cancer Res*. 2013 May 3. PubMed PMID: 23644529.

18. Partanen JI, Tervonen TA, Myllynen M, Lind E, Imai M, Katajisto P, et al. Tumor suppressor function of Liver kinase B1 (Lkb1) is linked to regulation of epithelial integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012 Feb 14;109(7):E388-97. PubMed PMID: 22308451. Pubmed Central PMCID: 3289385.

19. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Mar 9;101(10):3329-35. PubMed PMID: 14985505. Pubmed Central PMCID: 373461.

20. Jeon SM, Chandel NS, Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*. 2012 May 31;485(7400):661-5. PubMed PMID: 22660331. Pubmed Central PMCID: 3607316.

21. Towler MC, Fogarty S, Hawley SA, Pan DA, Martin DM, Morrice NA, et al. A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for spermiogenesis. *The Biochemical journal*. 2008 Nov 15;416(1):1-14. PubMed PMID: 18774945.
22. Denison FC, Hiscock NJ, Carling D, Woods A. Characterization of an alternative splice variant of LKB1. *The Journal of biological chemistry*. 2009 Jan 2;284(1):67-76. PubMed PMID: 18854309.
23. Ikeda Y, Sato K, Pimentel DR, Sam F, Shaw RJ, Dyck JR, et al. Cardiac-specific deletion of LKB1 leads to hypertrophy and dysfunction. *The Journal of biological chemistry*. 2009 Dec 18;284(51):35839-49. PubMed PMID: 19828446. Pubmed Central PMCID: 2791013.
24. Zeqiraj E, Filippi BM, Deak M, Alessi DR, van Aalten DM. Structure of the S-LKB1TRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science*. 2009 Dec 18;326(5960):1707-11. PubMed PMID: 19892943. Pubmed Central PMCID: 3518268.
25. Carling D, Mayer FV, Sanders MJ, Gamblin SJ. AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nature chemical biology*. 2011 Aug;7(8):512-8. PubMed PMID: 21769098.
26. Winder WW, Hardie DG. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *The American journal of physiology*. 1996 Feb;270(2 Pt 1):E299-304. PubMed PMID: 8779952.
27. Richter EA, Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *The Biochemical journal*. 2009 Mar 1;418(2):261-75. PubMed PMID: 19196246. Pubmed Central PMCID: 2779044.
28. Friedrichsen M, Mortensen B, Pehmoller C, Birk JB, Wojtaszewski JF. Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: role in glucose uptake and insulin sensitivity. *Molecular and cellular endocrinology*. 2013 Feb 25;366(2):204-14. PubMed PMID: 22796442.
29. Matsumoto S, Iwakawa R, Takahashi K, Kohno T, Nakanishi Y, Matsuno Y, et al. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene*. 2007 Aug 30;26(40):5911-8. PubMed PMID: 17384680. Pubmed Central PMCID: 3457639.
30. Neu-Yilik G, Amthor B, Gehring NH, Bahri S, Paidassi H, Hentze MW, et al. Mechanism of escape from nonsense-mediated mRNA decay of human beta-globin

transcripts with nonsense mutations in the first exon. *Rna*. 2011 May;17(5):843-54. PubMed PMID: 21389146. Pubmed Central PMCID: 3078734.

31. Shackelford DB, Abt E, Gerken L, Vasquez DS, Seki A, Leblanc M, et al. LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin. *Cancer cell*. 2013 Feb 11;23(2):143-58. PubMed PMID: 23352126. Pubmed Central PMCID: 3579627.

32. Forcet C, Etienne-Manneville S, Gaude H, Fournier L, Debilly S, Salmi M, et al. Functional analysis of Peutz-Jeghers mutations reveals that the LKB1 C-terminal region exerts a crucial role in regulating both the AMPK pathway and the cell polarity. *Human molecular genetics*. 2005 May 15;14(10):1283-92. PubMed PMID: 15800014.

33. Bardeesy N, Sinha M, Hezel AF, Signoretti S, Hathaway NA, Sharpless NE, et al. Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature*. 2002 Sep 12;419(6903):162-7. PubMed PMID: 12226664.

34. Baas AF, Kuipers J, van der Wel NN, Batlle E, Koerten HK, Peters PJ, et al. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell*. 2004 Feb 6;116(3):457-66. PubMed PMID: 15016379.

35. Forcet C, Etienne-Manneville S, Gaude H, Fournier L, Debilly S, Salmi M, et al. Functional analysis of Peutz-Jeghers mutations reveals that the LKB1 C-terminal region exerts a crucial role in regulating both the AMPK pathway and the cell polarity. *Human molecular genetics*. 2005 May 15;14(10):1283-92. PubMed PMID: 15800014.

36. Monsenego J, Mansouri A, Akkaoui M, Lenoir V, Esnous C, Fauveau V, et al. Enhancing liver mitochondrial fatty acid oxidation capacity in obese mice improves insulin sensitivity independently of hepatic steatosis. *Journal of hepatology*. 2012 Mar;56(3):632-9. PubMed PMID: 22037024.

2. Conclusion de l'article

Ce travail de thèse a abouti à la caractérisation d'une nouvelle isoforme du gène suppresseur de tumeur *LKB1* qui avait été identifiée dans l'équipe. Cette nouvelle isoforme de 42 kDa, appelée LKB1-deltaN (Δ N-LKB1), est délétée de 125 acides aminés de sa partie N-terminale incluant une partie de son domaine kinase.

Cette nouvelle isoforme est générée par transcription alternative et initiation interne de la traduction de l'ARNm LKB1 à partir d'un ATG situé sur l'exon 3, elle est fortement exprimée dans les tissus à fort métabolisme oxydatif (cœur, muscle squelettique) et possède une activité duelle sur les trois fonctions cellulaires contrôlées par LKB1 classique, le métabolisme, la polarité et la croissance cellulaire.

Bien que la protéine Δ N-LKB1 soit catalytiquement inactive suite à la perte d'une partie de son domaine kinase, elle potentialise l'effet activateur de la protéine LKB1 classique sur sa cible principale l'APMK. Cet effet dominant positif est associé à une interaction directe entre cette isoforme et le domaine d'auto-inhibition de la sous unité alpha de l'AMPK. Du point de vue fonctionnel, j'ai montré que sa surexpression chez la souris dans un contexte nutritionnel de jeûne, est associée à une augmentation de l'oxydation des acides gras.

La protéine LKB1 classique contrôle également la polarité et la croissance cellulaire en induisant la première et inhibant la deuxième. La protéine Δ N-LKB1 interfère négativement avec cette capacité de LKB1 car elle exerce un effet dominant négatif sur la capacité de LKB1 classique à induire la polarité cellulaire et stimule très fortement la croissance cellulaire.

Contrairement à la protéine LKB1 classique, la nouvelle isoforme Δ N-LKB1 n'interagit ni avec la pseudokinase STRAD ni avec la protéine d'échafaudage MO25, et possède un comportement différent vis-à-vis des différents substrats de LKB1 pouvant expliquer son effet duel.

Enfin, Δ N-LKB1, qui est exprimée dans la lignée NCI-H460 issue du cancer du poumon, possède une propriété oncogène intrinsèque. En effet, l'inhibition de l'expression de Δ N-LKB1 dans cette lignée cellulaire induit une diminution de la

survie de ces cellules et inhibe leur pouvoir oncogénique quand elles sont greffées dans la souris Nude.

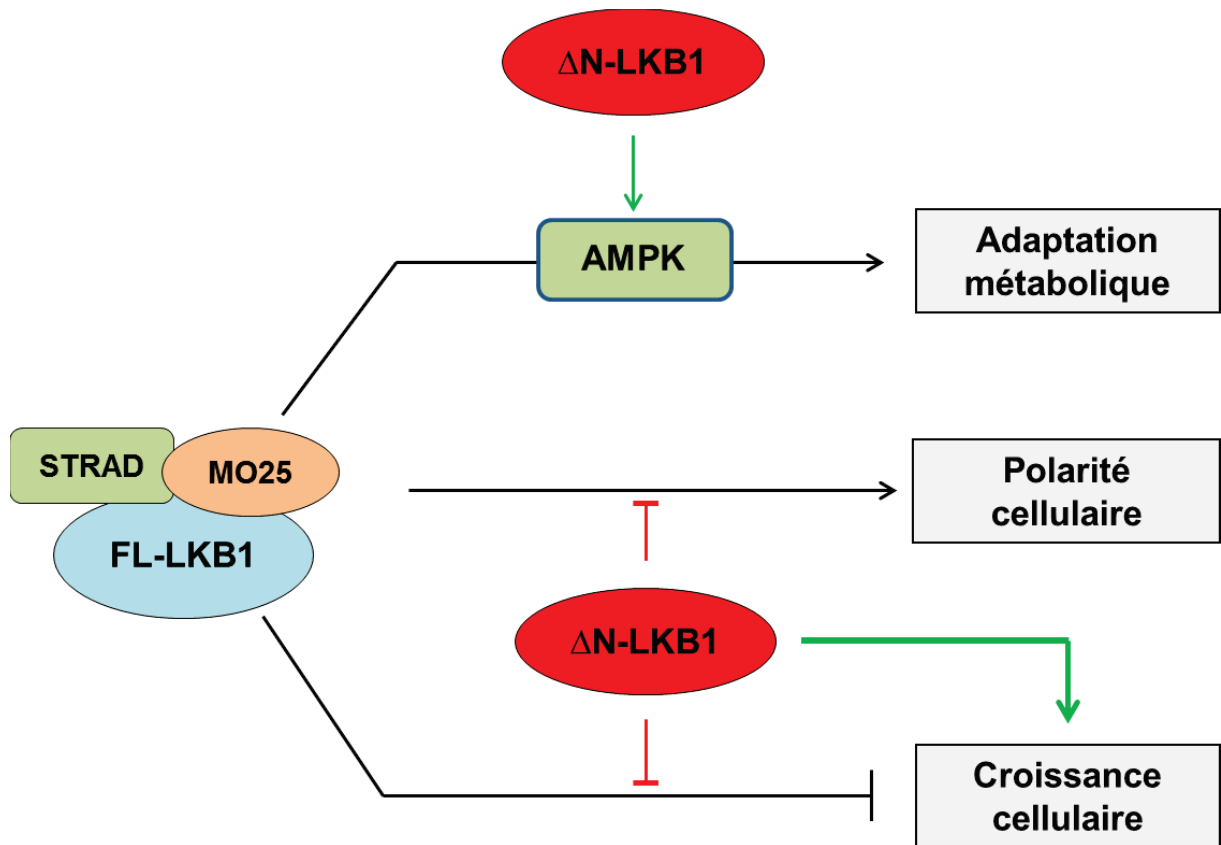


Figure 27: Schéma récapitulatif du rôle de l'isoforme ΔN -LKB1 sur les trois fonctions majeures de LKB1. Dans un premier temps, ΔN -LKB1 potentialise l'effet activateur de la protéine LKB1 classique (FL-LKB1) sur sa cible principale l'AMPK, donc elle a un effet dominant positif sur la capacité de FL-LKB1 à permettre une adaptation métabolique en cas de stress. Ensuite, ΔN -LKB1 interfère négativement avec la capacité de la protéine LKB1 classique (FL-LKB1) à induire la polarité cellulaire. Enfin, ΔN -LKB1 stimule très fortement la croissance cellulaire qui est normalement inhibée par la protéine LKB1 classique (FL-LKB1).

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Expression de l'isoforme Δ N-LKB1

La nouvelle isoforme que nous avons identifiée est déletée de sa partie N-terminale comprenant une partie du domaine kinase de LKB1. Nous avons identifié trois mécanismes possibles à l'origine de l'expression de cette nouvelle isoforme. Deux mécanismes sont transcriptionnels et impliquent soit un épissage alternatif dans le premier exon responsable d'un décalage du cadre de lecture, soit l'utilisation d'un promoteur alternatif (seulement pour le gène murin, car pas de promoteur alternatif pour le gène humain), qui vont conduire à l'utilisation de codons d'initiation de la traduction (ATG) situés en phase, en aval du gène, dans l'exon 3. Le troisième mécanisme est post-transcriptionnel et implique l'utilisation alternative de codon d'initiation de la traduction. La comparaison du profil d'expression des ARNm par RT-PCR, à l'aide d'amorces spécifiques pour chaque type d'ARNm, à celui de la protéine, par western-blot, montre que l'utilisation de site d'initiation interne (sur l'exon 3) de la traduction est le mécanisme permettant d'expliquer la forte expression observée dans le muscle squelettique et le cœur.

Chez les eucaryotes, deux processus, permettent d'expliquer l'utilisation, à partir d'un même ARNm, de différents sites d'initiation de la traduction. Le premier est associé à la séquence du mRNA pour lequel la séquence « Kozak », permettant la reconnaissance des sous-unités du ribosome, n'est pas consensus pour le premier ATG, alors qu'elle l'est pour l'ATG situé en aval du gène (on parle de « leaky scanning ») (Kochetov 2008). Le deuxième processus implique l'utilisation d'un site IRES « Internal Ribosome Entry Site » (Komar and Hatzoglou 2011). L'analyse de la séquence n'est pas en faveur de la première hypothèse, le contexte « Kozak » du premier ATG étant parfait pour toutes les espèces que nous avons analysées (AnnAUGn ou GnnAUGG). Il est donc probable qu'un site IRES soit présent dans l'ARNm codant LKB1 et soit responsable de l'initiation interne de la traduction. L'utilisation d'IRES « cellulaire » est encore peu décrite, alors que c'est un processus fréquent utilisé par les virus (Mokrejs, Masek et al. 2010). Il n'existe pas de séquences consensus pour les IRES, et des expériences réalisées *in vitro* doivent être faites afin de tester si le messenger codant LKB1 a une activité IRES. Les ARN cellulaires pour lesquels un IRES a été décrit codent des gènes impliqués dans la

gestion du stress cellulaire, comme *TP53* (Grover, Candeias et al. 2009) (Yin, Stephen et al. 2002) , *c-Myc* (Spotts, Patel et al. 1997) (Thoma, Fraterman et al. 2008), des facteurs de croissance tel que *FGF2* (Gonzalez-Herrera, Prado-Lourenco et al. 2006), facteurs angiogéniques ou contrôlant l'apoptose comme *BCL2* (Willimott and Wagner 2010). Ce processus permet la traduction de protéines régulatrices, même lors des conditions peu favorables (mitose, anoxie, mort cellulaire).

Quel serait la fonction d'un IRES pour l'isoforme Δ N-LKB1? Celle-ci est fortement exprimée dans le muscle squelettique et le cœur, tissus qui peuvent subir, en fonction de l'effort demandé, des stress métaboliques importants demandant une réponse adaptative rapide qui pourrait être apportée par ce processus de traduction.

De façon surprenante, alors que nous avons détecté la présence de l'isoforme Δ N-LKB1 dans différentes lignées hépatomateuses, nous ne détectons pas d'expression de cette isoforme dans le foie, ni dans les tumeurs hépatiques que nous avons analysées. Une explication peut être émise, les conditions de traduction entre la cellule hépatomateuse cultivée *in vitro*, sont très différentes de celle ayant lieu dans le tissu, tout particulièrement pour l'hépatocyte au niveau du foie qui possède une polarité hépatocytaire complexe. Une fonction de LKB1 différente selon que la protéine soit exprimée dans un contexte 2D correspondant à la boîte de culture *in vitro*, soit dans un contexte de culture 3D, a déjà été décrit. Il s'agit de la lignée de cancer mammaire MCF10A qui révèle un rôle de LKB1 pour la survie et la prolifération cellulaire, uniquement lorsque l'oncogène *c-myc* est exprimé dans un contexte de culture 3D, les cellules étant organisées alors sous forme d'acini. Si *c-myc* est exprimé dans les cellules étalées sur la boîte de culture, LKB1 n'est pas requis pour la survie des cellules (Partanen, Nieminen et al. 2007).

2. Fonctions physiologiques de l'isoforme Δ N-LKB1

Bien que catalytiquement inactive, puisque délétée d'une partie de son domaine kinase, nos résultats ont montré que Δ N-LKB1 est capable de moduler les différentes fonctions de LKB1. Elle exerce un effet dominant positif sur l'activité AMPK contrôlée par LKB1, alors qu'elle exerce un effet dominant négatif sur la polarité cellulaire contrôlée par LKB1. Le test de polarité que nous avons utilisé

permet de tester la capacité de LKB1 à induire un signal de polarité de façon cell-autonome, indépendamment d'un contact avec une autre cellule ou un contact avec la matrice extra-cellulaire.

La forte expression de Δ N-LKB dans le muscle squelettique et le cœur, deux tissus ayant un métabolisme oxydatif, couplé au fait qu'elle est capable lorsqu'elle est surexprimée par une approche adénovirale, d'augmenter la β -oxydation des acides gras dans le foie de souris à jeun, est en accord avec son rôle potentialisateur de l'AMPK. Nos résultats ont permis de décrire une activation de l'AMPK par un processus non classique, indépendant d'un stress énergétique. Quelle pourrait-être la fonction physiologique de Δ N-LKB? Le fait que Δ N-LKB1 soit plus fortement exprimé dans les muscles glycolytiques que dans les muscles oxydatifs souligne le rôle crucial joué par l'AMPK dans l'homéostasie musculaire, qui contrôle positivement non seulement l'oxydation mitochondriale du glucose et des lipides, mais aussi la glycolyse afin de fournir l'énergie nécessaire à la contraction musculaire, que le muscle soit dans une condition aérobie ou anaérobie. Nos résultats utilisant différents mutants de la sous unité α de l'AMPK, suggèrent fortement que Δ N-LKB1 serait capable de se lier au domaine auto-inhibiteur localisé en aval du domaine kinase. Bien que nous ne l'ayons pas démontré, il est probable que la fixation de Δ N-LKB1 sur le domaine auto-inhibiteur de la sous unité α de l'AMPK entraîne un changement de conformation du complexe de l'AMPK rendant le site actif de la sous unité α plus à même d'être phosphorylé par LKB1 ou le protégeant d'une déphosphorylation par une phosphatase. Ce mécanisme apporterait un niveau supplémentaire de contrôle qui s'ajouterait à celui apporté par la sous unité γ qui est le senseur du statut énergétique de la cellule. L'effet potentialisateur apporté par Δ N-LKB1 permettrait à la cellule musculaire de s'adapter aux variations de stress énergétique qu'elle soit constante comme pour le cœur, ou lors d'effort comme pour le muscle squelettique.

Cet effet dominant positif sur l'activité de l'AMPK est à mettre en rapport avec le fait que l'AMPK est le seul substrat de LKB1 qui est non monomérique, mais trimérique. Nous avons analysé l'interaction entre Δ N-LKB1 et deux substrats monomériques de LKB1 (SIK2 et MARK2/3) et n'avons pas observé de différences d'interactions entre les substrats monomériques de LKB1 et soit Δ N-LKB1, soit le

LKB1 classique, suggérant que LKB1 classique et son isoforme Δ N-LKB1 liaient avec une même affinité les substrats monomériques. L'effet dominant négatif observé pour l'effet « polarité » peut peut-être s'expliquer par une titration par Δ N-LKB1 des substrats monomériques, les rendant inaccessibles à LKB1.

Qu'en est-il de la régulation de la polarité dans la cellule musculaire ? Est-ce que Δ N-LKB1 pourrait avoir un rôle régulateur ? Rien n'est connu à ce sujet. Les cellules musculaires squelettiques sont multi-nucléées avec une position des noyaux bien précise. Il est donc possible que Δ N-LKB1 puisse avoir un effet sur la position du noyau dans cette cellule géante multi-nucléée, mais nous n'avons aucun argument expérimental qui infirme ou valide cette hypothèse.

3. LKB1, gène suppresseur de tumeur ou oncogène?

Alors qu'il ne fait aucun doute que LKB1 soit un gène suppresseur de tumeur, des fonctions pro-oncogéniques lui ont été conférées (Hardie 2013). Les premiers arguments expérimentaux ont été apportés lors de l'étude de la transformation des cellules de fibroblastes embryonnaires (MEF) par différents oncogènes. En effet, ces expériences ont montré que les MEF qui étaient invalidées pour LKB1 (MEF, KO LKB1), étaient résistantes à la transformation par différents oncogènes (TSV40, H-Ras) alors que l'on se serait attendu à l'inverse si LKB1 avait uniquement une fonction de gène suppresseur de tumeur. Il a été montré par la suite que LKB1 était nécessaire pour la survie de cellules cancéreuses placées dans un contexte de stress métabolique (privation en glucose) (Shaw, Kosmatka et al. 2004) (Jeon, Chandel et al. 2012). En effet, l'activation de la voie LKB1/AMPK va permettre l'utilisation d'un autre substrat que le glucose pour la production d'énergie.

Cette propriété peut être utilisée en thérapeutique. En effet, une étude récente, montre que la stimulation par la phenformine (un analogue de la metformine capable d'activer l'AMPK), induit une régression tumorale seulement dans les tumeurs du poumon induite par Ras qui sont inactivées pour LKB1 (Shackelford, Abt et al. 2013).

Le rôle de l'isoforme Δ N-LKB1 dans la tumorigenèse va dépendre du contexte génétique. Dans un contexte génétique normal (WT) pour le gène LKB1, la

surexpression de Δ N-LKB1 devrait avoir un rôle positif sur le développement tumoral, puisqu'il va déstabiliser l'architecture épithéliale par son effet dominant négatif sur la polarité cellulaire, de plus, l'effet dominant positif sur l'AMPK va permettre à la cellule de résister à un stress énergétique. Ainsi une surexpression de Δ N-LKB1 devrait avoir un effet pro-tumoral surtout lors de l'initiation du processus tumoral.

Dans un contexte génétique mutant pour LKB1, l'expression de Δ N-LKB1 a clairement un effet pro-oncogénique qui est indépendant de LKB1. Le modèle que nous avons utilisé est celui des cellules de cancer du poumon qui présentent une mutation homozygote Q37X dans le premier exon, permettant l'expression de Δ N-LKB1 à partir de site ATG localisé dans l'exon 3. Cette isoforme, exprimée seule, est fortement oncogénique puisque son inactivation induit l'apoptose et inhibe le développement tumoral développé en souris Nude. Il serait intéressant de regarder dans une collection de tumeur du poumon ou du col de l'utérus, pour lesquels des mutations inactivatrices de LKB1 sont fréquentes, s'il y a expression de cette isoforme de LKB1 et de le corrélérer au grade de la tumeur afin de tester si cette isoforme a une valeur pronostic pour ces tumeurs.

Enfin, il est original de souligner que nous avons mis en évidence l'expression d'une isoforme oncogénique traduite à partir d'un ARN messager issu de la transcription d'un gène suppresseur de tumeur.

V. BIBLIOGRAPHIE

- Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert and R. Kemler (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." EMBO J **16**(13): 3797-3804.
- Alessi, D. R., K. Sakamoto and J. R. Bayascas (2006). "LKB1-dependent signaling pathways." Annu Rev Biochem **75**: 137-163.
- Alonso, L. and E. Fuchs (2003). "Stem cells in the skin: waste not, Wnt not." Genes Dev **17**(10): 1189-1200.
- Amarapurkar, D. N., M. Dharod, S. Gautam and N. Patel (2013). "Risk of development of hepatocellular carcinoma in patients with NASH-related cirrhosis." Trop Gastroenterol **34**(3): 159-163.
- Andreu, P., S. Colnot, C. Godard, S. Gad, P. Chafey, M. Niwa-Kawakita, P. Laurent-Puig, A. Kahn, S. Robine, C. Perret and B. Romagnolo (2005). "Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine." Development **132**(6): 1443-1451.
- Asada, N., K. Sanada and Y. Fukada (2007). "LKB1 regulates neuronal migration and neuronal differentiation in the developing neocortex through centrosomal positioning." J Neurosci **27**(43): 11769-11775.
- Ashida, K., T. Terada, Y. Kitamura and N. Kaibara (1998). "Expression of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and CD44 (standard and variant isoforms) in human cholangiocarcinoma: an immunohistochemical study." Hepatology **27**(4): 974-982.
- Audard, V., G. Grimber, C. Elie, B. Radenen, A. Audebourg, F. Letourneur, O. Soubrane, M. C. Vacher-Lavenu, C. Perret, C. Cavard and B. Terris (2007). "Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying beta-catenin mutations." J Pathol **212**(3): 345-352.
- Baas, A. F., J. Boudeau, G. P. Sapkota, L. Smit, R. Medema, N. A. Morrice, D. R. Alessi and H. C. Clevers (2003). "Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD." EMBO J **22**(12): 3062-3072.
- Baas, A. F., J. Kuipers, N. N. van der Wel, E. Batlle, H. K. Koerten, P. J. Peters and H. C. Clevers (2004). "Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD." Cell **116**(3): 457-466.
- Bardeesy, N., M. Sinha, A. F. Hezel, S. Signoretti, N. A. Hathaway, N. E. Sharpless, M. Loda, D. R. Carrasco and R. A. DePinho (2002). "Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation." Nature **419**(6903): 162-167.

- Barth, A. I., I. S. Nathke and W. J. Nelson (1997). "Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways." Curr Opin Cell Biol **9**(5): 683-690.
- Bateman, A. (1997). "The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein." Trends Biochem Sci **22**(1): 12-13.
- Benedicto, I., F. Molina-Jimenez, L. Garcia-Buey, V. Gondar, M. Lopez-Cabrera, R. Moreno-Otero and P. L. Majano (2012). "Role of tight junctions in hepatitis C virus infection." Rev Esp Enferm Dig **104**(5): 255-263.
- Bhanot, P., M. Brink, C. H. Samos, J. C. Hsieh, Y. Wang, J. P. Macke, D. Andrew, J. Nathans and R. Nusse (1996). "A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor." Nature **382**(6588): 225-230.
- Bienz, M. (2002). "The subcellular destinations of APC proteins." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(5): 328-338.
- Billaud, M. and B. Viollet (2010). "Close encounters of a novel kind: a multi-targeted cancer drug meets a metabolic sensor." Cancer Biol Ther **10**(1): 77-78.
- Boudeau, J., A. F. Baas, M. Deak, N. A. Morrice, A. Kieloch, M. Schutkowski, A. R. Prescott, H. C. Clevers and D. R. Alessi (2003). "MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm." EMBO J **22**(19): 5102-5114.
- Boudeau, J., J. W. Scott, N. Resta, M. Deak, A. Kieloch, D. Komander, D. G. Hardie, A. R. Prescott, D. M. van Aalten and D. R. Alessi (2004). "Analysis of the S-LKB1TRAD-MO25 complex." J Cell Sci **117**(Pt 26): 6365-6375.
- Boyault, S., D. S. Rickman, A. de Reynies, C. Balabaud, S. Rebouissou, E. Jeannot, A. Herault, J. Saric, J. Belghiti, D. Franco, P. Bioulac-Sage, P. Laurent-Puig and J. Zucman-Rossi (2007). "Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets." Hepatology **45**(1): 42-52.
- Brown, K. A., N. I. Hunger, M. Docanto and E. R. Simpson (2010). "Metformin inhibits aromatase expression in human breast adipose stromal cells via stimulation of AMP-activated protein kinase." Breast Cancer Res Treat **123**(2): 591-596.
- Brown, K. A., K. J. McInnes, K. Takagi, K. Ono, N. I. Hunger, L. Wang, H. Sasano and E. R. Simpson (2011). "LKB1 expression is inhibited by estradiol-17beta in MCF-7 cells." J Steroid Biochem Mol Biol **127**(3-5): 439-443.
- Buchet-Poyau, K., H. Mehenni, U. Radhakrishna and S. E. Antonarakis (2002). "Search for the second Peutz-Jeghers syndrome locus: exclusion of the STK13, PRKCG, KLK10, and PSCD2 genes on chromosome 19 and the STK11IP gene on chromosome 2." Cytogenet Genome Res **97**(3-4): 171-178.

- Buendia, M. A. (2002). "Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects." Med Pediatr Oncol **39**(5): 530-535.
- Cao, H., K. Maeda, C. Z. Gorgun, H. J. Kim, S. Y. Park, G. I. Shulman, J. K. Kim and G. S. Hotamisligil (2006). "Regulation of metabolic responses by adipocyte/macrophage Fatty Acid-binding proteins in leptin-deficient mice." Diabetes **55**(7): 1915-1922.
- Carling, D. (2004). "The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control." Trends Biochem Sci **29**(1): 18-24.
- Carretero, J., T. Shimamura, K. Rikova, A. L. Jackson, M. D. Wilkerson, C. L. Borgman, M. S. Buttarazzi, B. A. Sanofsky, K. L. McNamara, K. A. Brandstetter, Z. E. Walton, T. L. Gu, J. C. Silva, K. Crosby, G. I. Shapiro, S. M. Maira, H. Ji, D. H. Castrillon, C. F. Kim, C. Garcia-Echeverria, N. Bardeesy, N. E. Sharpless, N. D. Hayes, W. Y. Kim, J. A. Engelman and K. K. Wong (2010). "Integrative genomic and proteomic analyses identify targets for Lkb1-deficient metastatic lung tumors." Cancer Cell **17**(6): 547-559.
- Chan, E. F., U. Gat, J. M. McNiff and E. Fuchs (1999). "A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin." Nat Genet **21**(4): 410-413.
- Chen, W., D. ten Berge, J. Brown, S. Ahn, L. A. Hu, W. E. Miller, M. G. Caron, L. S. Barak, R. Nusse and R. J. Lefkowitz (2003). "Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4." Science **301**(5638): 1391-1394.
- Chen, Y. M., Q. J. Wang, H. S. Hu, P. C. Yu, J. Zhu, G. Drewes, H. Piwnica-Worms and Z. G. Luo (2006). "Microtubule affinity-regulating kinase 2 functions downstream of the PAR-3/PAR-6/atypical PKC complex in regulating hippocampal neuronal polarity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(22): 8534-8539.
- Chen, Y. W., Y. M. Jeng, S. H. Yeh and P. J. Chen (2002). "P53 gene and Wnt signaling in benign neoplasms: beta-catenin mutations in hepatic adenoma but not in focal nodular hyperplasia." Hepatology **36**(4 Pt 1): 927-935.
- Cheng, H., P. Liu, Z. C. Wang, L. Zou, S. Santiago, V. Garbitt, O. V. Gjoerup, J. D. Iglehart, A. Miron, A. L. Richardson, W. C. Hahn and J. J. Zhao (2009). "SIK1 couples LKB1 to p53-dependent anoikis and suppresses metastasis." Sci Signal **2**(80): ra35.
- Cheung, P. C., I. P. Salt, S. P. Davies, D. G. Hardie and D. Carling (2000). "Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding." Biochem J **346 Pt 3**: 659-669.
- Chia, I. V. and F. Costantini (2005). "Mouse axin and axin2/conductin proteins are functionally equivalent in vivo." Mol Cell Biol **25**(11): 4371-4376.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." Cell **127**(3): 469-480

- Clevers, H. and R. Nusse (2012). "Wnt/beta-catenin signaling and disease." Cell **149**(6): 1192-1205.
- Collins, S. P., J. L. Reoma, D. M. Gamm and M. D. Uhler (2000). "LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo." Biochem J **345 Pt 3**: 673-680.
- Conde, E., A. Suarez-Gauthier, E. Garcia-Garcia, F. Lopez-Rios, A. Lopez-Encuentra, R. Garcia-Lujan, M. Morente, L. Sanchez-Verde and M. Sanchez-Cespedes (2007). "Specific pattern of LKB1 and phospho-acetyl-CoA carboxylase protein immunostaining in human normal tissues and lung carcinomas." Hum Pathol **38**(9): 1351-1360.
- Cong, F. and H. Varmus (2004). "Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2882-2887.
- Corton, J. M., J. G. Gillespie, S. A. Hawley and D. G. Hardie (1995). "5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?" Eur J Biochem **229**(2): 558-565.
- Crute, B. E., K. Seefeld, J. Gamble, B. E. Kemp and L. A. Witters (1998). "Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **273**(52): 35347-35354.
- Dahmani, R., P. A. Just and C. Perret (2011). "The Wnt/beta-catenin pathway as a therapeutic target in human hepatocellular carcinoma." Clin Res Hepatol Gastroenterol **35**(11): 709-713.
- Dahmen, R. P., A. Koch, D. Denkhaus, J. C. Tonn, N. Sorensen, F. Berthold, J. Behrens, W. Birchmeier, O. D. Wiestler and T. Pietsch (2001). "Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas." Cancer Res **61**(19): 7039-7043.
- Dann, C. E., J. C. Hsieh, A. Rattner, D. Sharma, J. Nathans and D. J. Leahy (2001). "Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains." Nature **412**(6842): 86-90.
- Davidson, G., W. Wu, J. Shen, J. Bilic, U. Fenger, P. Stanek, A. Glinka and C. Niehrs (2005). "Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction." Nature **438**(7069): 867-872.
- de La Coste, A., B. Romagnolo, P. Billuart, C. A. Renard, M. A. Buendia, O. Soubrane, M. Fabre, J. Chelly, C. Beldjord, A. Kahn and C. Perret (1998). "Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8847-8851.

- Decaens, C., M. Durand, B. Grosse and D. Cassio (2008). "Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity?" Biol Cell **100**(7): 387-398.
- Decaens, T., C. Godard, A. de Reynies, D. S. Rickman, F. Tronche, J. P. Couty, C. Perret and S. Colnot (2008). "Stabilization of beta-catenin affects mouse embryonic liver growth and hepatoblast fate." Hepatology **47**(1): 247-258.
- Denison, F. C., N. J. Hiscock, D. Carling and A. Woods (2009). "Characterization of an alternative splice variant of LKB1." J Biol Chem **284**(1): 67-76.
- Dowling, R. J., M. Zakikhani, I. G. Fantus, M. Pollak and N. Sonenberg (2007). "Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells." Cancer Res **67**(22): 10804-10812.
- El-Mir, M. Y., V. Nogueira, E. Fontaine, N. Averet, M. Rigoulet and X. Leverve (2000). "Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I." J Biol Chem **275**(1): 223-228.
- Eng, C., H. Hampel and A. de la Chapelle (2001). "Genetic testing for cancer predisposition." Annu Rev Med **52**: 371-400.
- Evans, J. M., L. A. Donnelly, A. M. Emslie-Smith, D. R. Alessi and A. D. Morris (2005). "Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients." BMJ **330**(7503): 1304-1305.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.
- Fenton, H., B. Carlile, E. A. Montgomery, H. Carraway, J. Herman, F. Sahin, G. H. Su and P. Argani (2006). "LKB1 protein expression in human breast cancer." Appl Immunohistochem Mol Morphol **14**(2): 146-153.
- Fiedler, M., C. Mendoza-Topaz, T. J. Rutherford, J. Mieszczanek and M. Bienz (2011). "Dishevelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating beta-catenin." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(5): 1937-1942.
- Fodde, R., J. Kuipers, C. Rosenberg, R. Smits, M. Kielman, C. Gaspar, J. H. van Es, C. Breukel, J. Wiegant, R. H. Giles and H. Clevers (2001). "Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability." Nat Cell Biol **3**(4): 433-438.
- Forcet, C., S. Etienne-Manneville, H. Gaude, L. Fournier, S. Debilly, M. Salmi, A. Baas, S. Olschwang, H. Clevers and M. Billaud (2005). "Functional analysis of Peutz-Jeghers mutations reveals that the LKB1 C-terminal region exerts a crucial role in regulating both the AMPK pathway and the cell polarity." Hum Mol Genet **14**(10): 1283-1292.
- Fodde, R. and T. Brabletz (2007). "Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 150-158.

- Foretz, M., N. Ancellin, F. Andreelli, Y. Saintillan, P. Grondin, A. Kahn, B. Thorens, S. Vaulont and B. Viollet (2005). "Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver." Diabetes **54**(5): 1331-1339.
- Fu, D., Y. Wakabayashi, Y. Ido, J. Lippincott-Schwartz and I. M. Arias (2010). "Regulation of bile canalicular network formation and maintenance by AMP-activated protein kinase and LKB1." J Cell Sci **123**(Pt 19): 3294-3302.
- Fujii, N., M. F. Hirshman, E. M. Kane, R. C. Ho, L. E. Peter, M. M. Seifert and L. J. Goodyear (2005). "AMP-activated protein kinase alpha2 activity is not essential for contraction- and hyperosmolarity-induced glucose transport in skeletal muscle." J Biol Chem **280**(47): 39033-39041.
- Gadalla, A. E., T. Pearson, A. J. Currie, N. Dale, S. A. Hawley, M. Sheehan, W. Hirst, A. D. Michel, A. Randall, D. G. Hardie and B. G. Frenguelli (2004). "AICA riboside both activates AMP-activated protein kinase and competes with adenosine for the nucleoside transporter in the CA1 region of the rat hippocampus." J Neurochem **88**(5): 1272-1282.
- Giles, R. H., J. H. van Es and H. Clevers (2003). "Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer." Biochim Biophys Acta **1653**(1): 1-24.
- Glinka, A., W. Wu, H. Delius, A. P. Monaghan, C. Blumenstock and C. Niehrs (1998). "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction." Nature **391**(6665): 357-362.
- Gonzalez-Herrera, I. G., L. Prado-Lourenco, F. Pileur, C. Conte, A. Morin, F. Cabon, H. Prats, S. Vagner, F. Bayard, S. Audigier and A. C. Prats (2006). "Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism." FASEB J **20**(3): 476-478.
- Gregorieff, A., D. Pinto, H. Begthel, O. Destree, M. Kielman and H. Clevers (2005). "Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine." Gastroenterology **129**(2): 626-638.
- Grover, R., M. M. Candeias, R. Fahraeus and S. Das (2009). "p53 and little brother p53/47: linking IRES activities with protein functions." Oncogene **28**(30): 2766-2772.
- Gurumurthy, S., A. F. Hezel, E. Sahin, J. H. Berger, M. W. Bosenberg and N. Bardeesy (2008). "LKB1 deficiency sensitizes mice to carcinogen-induced tumorigenesis." Cancer Res **68**(1): 55-63.
- Gwinn, D. M., D. B. Shackelford, D. F. Egan, M. M. Mihaylova, A. Mery, D. S. Vasquez, B. E. Turk and R. J. Shaw (2008). "AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint." Mol Cell **30**(2): 214-226.

- Hardie, D. G. (2004). "AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise." Med Sci Sports Exerc **36**(1): 28-34.
- Hardie, D. G., F. A. Ross and S. A. Hawley (2012). "AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(4): 251-262.
- Hardie, D. G. (2013). "The LKB1-AMPK pathway-friend or foe in cancer?" Cancer Cell **23**(2): 131-132.
- Hartmann, C. (2006). "A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis." Trends Cell Biol **16**(3): 151-158.
- Hawley, S. A., J. Boudeau, J. L. Reid, K. J. Mustard, L. Udd, T. P. Makela, D. R. Alessi and D. G. Hardie (2003). "Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade." J Biol **2**(4): 28.
- Hawley, S. A., M. Davison, A. Woods, S. P. Davies, R. K. Beri, D. Carling and D. G. Hardie (1996). "Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **271**(44): 27879-27887.
- Hawley, S. A., F. A. Ross, C. Chevtzoff, K. A. Green, A. Evans, S. Fogarty, M. C. Towler, L. J. Brown, O. A. Ogunbayo, A. M. Evans and D. G. Hardie (2010). "Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation." Cell Metab **11**(6): 554-565.
- Hayashi, T., M. F. Hirshman, N. Fujii, S. A. Habinowski, L. A. Witters and L. J. Goodyear (2000). "Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism." Diabetes **49**(4): 527-531.
- Hayashi, T., M. F. Hirshman, E. J. Kurth, W. W. Winder and L. J. Goodyear (1998). "Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport." Diabetes **47**(8): 1369-1373.
- Hearle, N., A. Lucassen, R. Wang, W. Lim, F. Ross, R. Wheeler, I. Moore, J. Shipley and R. Houlston (2004). "Mapping of a translocation breakpoint in a Peutz-Jeghers hamartoma to the putative PJS locus at 19q13.4 and mutation analysis of candidate genes in polyp and STK11-negative PJS cases." Genes Chromosomes Cancer **41**(2): 163-169.
- Hearle, N., V. Schumacher, F. H. Menko, S. Olschwang, L. A. Boardman, J. J. Gille, J. J. Keller, A. M. Westerman, R. J. Scott, W. Lim, J. D. Trimbath, F. M. Giardiello, S. B. Gruber, G. J. Offerhaus, F. W. de Rooij, J. H. Wilson, A. Hansmann, G. Moslein, B. Royer-Pokora, T. Vogel, R. K. Phillips, A. D. Spigelman and R. S. Houlston (2006). "Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome." Clin Cancer Res **12**(10): 3209-3215.

- Hemminki, A., D. Markie, I. Tomlinson, E. Avizienyte, S. Roth, A. Loukola, G. Bignell, W. Warren, M. Aminoff, P. Hoglund, H. Jarvinen, P. Kristo, K. Pelin, M. Ridanpaa, R. Salovaara, T. Toro, W. Bodmer, S. Olschwang, A. S. Olsen, M. R. Stratton, A. de la Chapelle and L. A. Aaltonen (1998). "A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome." Nature **391**(6663): 184-187.
- Hemminki, A., I. Tomlinson, D. Markie, H. Jarvinen, P. Sistonen, A. M. Bjorkqvist, S. Knuutila, R. Salovaara, W. Bodmer, D. Shibata, A. de la Chapelle and L. A. Aaltonen (1997). "Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis." Nat Genet **15**(1): 87-90.
- Hezel, A. F., S. Gurumurthy, Z. Granot, A. Swisa, G. C. Chu, G. Bailey, Y. Dor, N. Bardeesy and R. A. Depinho (2008). "Pancreatic LKB1 deletion leads to acinar polarity defects and cystic neoplasms." Mol Cell Biol **28**(7): 2414-2425.
- Hinoi, T., H. Yamamoto, M. Kishida, S. Takada, S. Kishida and A. Kikuchi (2000). "Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and axin facilitates glycogen synthase kinase-3 beta-dependent phosphorylation of beta-catenin and down-regulates beta-catenin." J Biol Chem **275**(44): 34399-34406.
- Huang, H., H. Fujii, A. Sankila, B. M. Mahler-Araujo, M. Matsuda, G. Cathomas and H. Ohgaki (1999). "Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection." Am J Pathol **155**(6): 1795-1801.
- Huang, L. and S. K. Muthuswamy (2010). "Polarity protein alterations in carcinoma: a focus on emerging roles for polarity regulators." Curr Opin Genet Dev **20**(1): 41-50.
- Huelsken, J., R. Vogel, B. Erdmann, G. Cotsarelis and W. Birchmeier (2001). "beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin." Cell **105**(4): 533-545.
- Hussain, S. Z., T. Sneddon, X. Tan, A. Micsenyi, G. K. Michalopoulos and S. P. Monga (2004). "Wnt impacts growth and differentiation in ex vivo liver development." Exp Cell Res **292**(1): 157-169.
- Iseli, T. J., J. S. Oakhill, M. F. Bailey, S. Wee, M. Walter, B. J. van Denderen, L. A. Castelli, F. Katsis, L. A. Witters, D. Stapleton, S. L. Macaulay, B. J. Mitchell and B. E. Kemp (2008). "AMP-activated protein kinase subunit interactions: beta1:gamma1 association requires beta1 Thr-263 and Tyr-267." J Biol Chem **283**(8): 4799-4807.
- Iseli, T. J., M. Walter, B. J. van Denderen, F. Katsis, L. A. Witters, B. E. Kemp, B. J. Mitchell and D. Stapleton (2005). "AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270)." J Biol Chem **280**(14): 13395-13400.

- Janda, C. Y., D. Waghray, A. M. Levin, C. Thomas and K. C. Garcia (2012). "Structural basis of Wnt recognition by Frizzled." Science **337**(6090): 59-64.
- Jansen, M., J. P. Ten Klooster, G. J. Offerhaus and H. Clevers (2009). "LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism." Physiol Rev **89**(3): 777-798.
- Jenne, D. E., H. Reimann, J. Nezu, W. Friedel, S. Loff, R. Jeschke, O. Muller, W. Back and M. Zimmer (1998). "Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase." Nat Genet **18**(1): 38-43.
- Jeon, S. M., N. S. Chandel and N. Hay (2012). "AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress." Nature **485**(7400): 661-665.
- Jishage, K., J. Nezu, Y. Kawase, T. Iwata, M. Watanabe, A. Miyoshi, A. Ose, K. Habu, T. Kake, N. Kamada, O. Ueda, M. Kinoshita, D. E. Jenne, M. Shimane and H. Suzuki (2002). "Role of Lkb1, the causative gene of Peutz-Jegher's syndrome, in embryogenesis and polyposis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8903-8908.
- Kang, Y. K., W. H. Kim, H. W. Lee, H. K. Lee and Y. I. Kim (1999). "Mutation of p53 and K-ras, and loss of heterozygosity of APC in intrahepatic cholangiocarcinoma." Lab Invest **79**(4): 477-483.
- Karuman, P., O. Gozani, R. D. Odze, X. C. Zhou, H. Zhu, R. Shaw, T. P. Brien, C. D. Bozzuto, D. Ooi, L. C. Cantley and J. Yuan (2001). "The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death." Mol Cell **7**(6): 1307-1319.
- Katajisto, P., T. Vallenius, K. Vaahtomeri, N. Ekman, L. Udd, M. Tiainen and T. P. Makela (2007). "The LKB1 tumor suppressor kinase in human disease." Biochim Biophys Acta **1775**(1): 63-75.
- Kato, M., M. S. Patel, R. Levasseur, I. Lobov, B. H. Chang, D. A. Glass, 2nd, C. Hartmann, L. Li, T. H. Hwang, C. F. Brayton, R. A. Lang, G. Karsenty and L. Chan (2002). "Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor." J Cell Biol **157**(2): 303-314.
- Kemphues, K. J., J. R. Priess, D. G. Morton and N. S. Cheng (1988). "Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos." Cell **52**(3): 311-320.
- Kinzler, K. W., M. C. Nilbert, L. K. Su, B. Vogelstein, T. M. Bryan, D. B. Levy, K. J. Smith, A. C. Preisinger, P. Hedge, D. McKechnie and et al. (1991). "Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21." Science **253**(5020): 661-665.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-170.

- Kobe, B. and B. E. Kemp (1999). "Active site-directed protein regulation." Nature **402**(6760): 373-376.
- Koch, A., D. Denkhaus, S. Albrecht, I. Leuschner, D. von Schweinitz and T. Pietsch (1999). "Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene." Cancer Res **59**(2): 269-273.
- Koch, A., N. Weber, A. Waha, W. Hartmann, D. Denkhaus, J. Behrens, W. Birchmeier, D. von Schweinitz and T. Pietsch (2004). "Mutations and elevated transcriptional activity of conductin (AXIN2) in hepatoblastomas." J Pathol **204**(5): 546-554.
- Kochetov, A. V. (2008). "Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs." Bioessays **30**(7): 683-691.
- Koh, H. J., D. E. Arnolds, N. Fujii, T. T. Tran, M. J. Rogers, N. Jessen, Y. Li, C. W. Liew, R. C. Ho, M. F. Hirshman, R. N. Kulkarni, C. R. Kahn and L. J. Goodyear (2006). "Skeletal muscle-selective knockout of LKB1 increases insulin sensitivity, improves glucose homeostasis, and decreases TRB3." Mol Cell Biol **26**(22): 8217-8227.
- Korinek, V., N. Barker, P. J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and H. Clevers (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma." Science **275**(5307): 1784-1787.
- Korinek, V., N. Barker, K. Willert, M. Molenaar, J. Roose, G. Wagenaar, M. Markman, W. Lamers, O. Destree and H. Clevers (1998). "Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse." Mol Cell Biol **18**(3): 1248-1256.
- Komar, A. A. and M. Hatzoglou (2011). "Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states." Cell Cycle **10**(2): 229-240.
- Kubo, F., M. Takeichi and S. Nakagawa (2003). "Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone." Development **130**(3): 587-598.
- Kuhnert, F., C. R. Davis, H. T. Wang, P. Chu, M. Lee, J. Yuan, R. Nusse and C. J. Kuo (2004). "Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(1): 266-271.
- Laderoute, K. R., K. Amin, J. M. Calaoagan, M. Knapp, T. Le, J. Orduna, M. Foretz and B. Viollet (2006). "5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments." Mol Cell Biol **26**(14): 5336-5347.

- Lan, F., J. M. Cacicedo, N. Ruderman and Y. Ido (2008). "SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation." J Biol Chem **283**(41): 27628-27635.
- Laurent-Puig, P. and J. Zucman-Rossi (2006). "Genetics of hepatocellular tumors." Oncogene **25**(27): 3778-3786.
- Lee, E., A. Salic, R. Kruger, R. Heinrich and M. W. Kirschner (2003). "The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway." PLoS Biol **1**(1): E10.
- Lee, J. H., H. Koh, M. Kim, Y. Kim, S. Y. Lee, R. E. Karess, S. H. Lee, M. Shong, J. M. Kim, J. Kim and J. Chung (2007). "Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase." Nature **447**(7147): 1017-1020.
- Lee, J. H., H. Koh, M. Kim, J. Park, S. Y. Lee, S. Lee and J. Chung (2006). "JNK pathway mediates apoptotic cell death induced by tumor suppressor LKB1 in Drosophila." Cell Death Differ **13**(7): 1110-1122.
- Lee, J. S., I. S. Chu, J. Heo, D. F. Calvisi, Z. Sun, T. Roskams, A. Durnez, A. J. Demetris and S. S. Thorgeirsson (2004). "Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling." Hepatology **40**(3): 667-676.
- Lee, M. and V. Vasioukhin (2008). "Cell polarity and cancer--cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor." J Cell Sci **121**(Pt 8): 1141-1150.
- Lee, W. K., N. A. Wolff and F. Thevenod (2009). "Organic cation transporters: physiology, toxicology and special focus on ethidium as a novel substrate." Curr Drug Metab **10**(6): 617-631.
- Linher-Melville, K., S. Zantinge and G. Singh (2012). "Liver kinase B1 expression (LKB1) is repressed by estrogen receptor alpha (ERalpha) in MCF-7 human breast cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **417**(3): 1063-1068.
- Leyns, L., T. Bouwmeester, S. H. Kim, S. Piccolo and E. M. De Robertis (1997). "Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer." Cell **88**(6): 747-756.
- Li, V. S., S. S. Ng, P. J. Boersema, T. Y. Low, W. R. Karthaus, J. P. Gerlach, S. Mohammed, A. J. Heck, M. M. Maurice, T. Mahmoudi and H. Clevers (2012). "Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex." Cell **149**(6): 1245-1256.
- Li, X., Y. Zhang, H. Kang, W. Liu, P. Liu, J. Zhang, S. E. Harris and D. Wu (2005). "Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling." J Biol Chem **280**(20): 19883-19887.
- Liang, J., S. H. Shao, Z. X. Xu, B. Hennessy, Z. Ding, M. Larrea, S. Kondo, D. J. Dumont, J. U. Gutterman, C. L. Walker, J. M. Slingerland and G. B. Mills (2007). "The

energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis." Nat Cell Biol **9**(2): 218-224.

- Liu, B. Y., S. P. McDermott, S. S. Khwaja and C. M. Alexander (2004). "The transforming activity of Wnt effectors correlates with their ability to induce the accumulation of mammary progenitor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4158-4163.
- Liu, J., J. Stevens, C. A. Rote, H. J. Yost, Y. Hu, K. L. Neufeld, R. L. White and N. Matsunami (2001). "Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein." Mol Cell **7**(5): 927-936.
- Liu, W., X. Dong, M. Mai, R. S. Seelan, K. Taniguchi, K. K. Krishnadath, K. C. Halling, J. M. Cunningham, L. A. Boardman, C. Qian, E. Christensen, S. S. Schmidt, P. C. Roche, D. I. Smith and S. N. Thibodeau (2000). "Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling." Nat Genet **26**(2): 146-147.
- Lizcano, J. M., O. Goransson, R. Toth, M. Deak, N. A. Morrice, J. Boudeau, S. A. Hawley, L. Udd, T. P. Makela, D. G. Hardie and D. R. Alessi (2004). "LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1." EMBO J **23**(4): 833-843.
- Lo Celso, C., D. M. Prowse and F. M. Watt (2004). "Transient activation of beta-catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours." Development **131**(8): 1787-1799.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 781-810.
- Londesborough, A., K. Vaahtomeri, M. Tiainen, P. Katajisto, N. Ekman, T. Vallenius and T. P. Makela (2008). "LKB1 in endothelial cells is required for angiogenesis and TGFbeta-mediated vascular smooth muscle cell recruitment." Development **135**(13): 2331-2338.
- Lowry, W. E., C. Blanpain, J. A. Nowak, G. Guasch, L. Lewis and E. Fuchs (2005). "Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells." Genes Dev **19**(13): 1596-1611.
- Luukko, K., A. Ylikorkala, M. Tiainen and T. P. Makela (1999). "Expression of LKB1 and PTEN tumor suppressor genes during mouse embryonic development." Mech Dev **83**(1-2): 187-190.
- Mahlapuu, M., C. Johansson, K. Lindgren, G. Hjalm, B. R. Barnes, A. Krook, J. R. Zierath, L. Andersson and S. Marklund (2004). "Expression profiling of the gamma-

subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(2): E194-200.

- Mao, B., W. Wu, G. Davidson, J. Marhold, M. Li, B. M. Mechler, H. Delius, D. Hoppe, P. Stannek, C. Walter, A. Glinka and C. Niehrs (2002). "Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling." Nature **417**(6889): 664-667.
- Mao, J., J. Wang, B. Liu, W. Pan, G. H. Farr, 3rd, C. Flynn, H. Yuan, S. Takada, D. Kimelman, L. Li and D. Wu (2001). "Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway." Mol Cell **7**(4): 801-809.
- Martin, S. G. and D. St Johnston (2003). "A role for Drosophila LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity." Nature **421**(6921): 379-384.
- Matsuzawa, S. I. and J. C. Reed (2001). "Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses." Mol Cell **7**(5): 915-926.
- McCarthy, A., C. J. Lord, K. Savage, A. Grigoriadis, D. P. Smith, B. Weigelt, J. S. Reis-Filho and A. Ashworth (2009). "Conditional deletion of the Lkb1 gene in the mouse mammary gland induces tumour formation." J Pathol **219**(3): 306-316.
- McGee, S. L., K. F. Howlett, R. L. Starkie, D. Cameron-Smith, B. E. Kemp and M. Hargreaves (2003). "Exercise increases nuclear AMPK alpha2 in human skeletal muscle." Diabetes **52**(4): 926-928.
- Merritt, A. J., C. S. Potten, C. J. Kemp, J. A. Hickman, A. Balmain, D. P. Lane and P. A. Hall (1994). "The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice." Cancer Res **54**(3): 614-617.
- Milburn, C. C., J. Boudeau, M. Deak, D. R. Alessi and D. M. van Aalten (2004). "Crystal structure of MO25 alpha in complex with the C terminus of the pseudo kinase STE20-related adaptor." Nat Struct Mol Biol **11**(2): 193-200.
- Miller, J. R. (2002). "The Wnts." Genome Biol **3**(1): REVIEWS3001.
- Miller, J. R. and R. T. Moon (1996). "Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis." Genes Dev **10**(20): 2527-2539.
- Mirouse, V. and M. Billaud (2011). "The LKB1/AMPK polarity pathway." FEBS Lett **585**(7): 981-985.
- Moon, R. T., A. D. Kohn, G. V. De Ferrari and A. Kaykas (2004). "WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies." Nat Rev Genet **5**(9): 691-701.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." Science **275**(5307): 1787-1790.

- Mokrejs, M., T. Masek, V. Vopalensky, P. Hlubucek, P. Delbos and M. Pospisek (2010). "IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D131-136.
- Munemitsu, S., I. Albert, B. Souza, B. Rubinfeld and P. Polakis (1995). "Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(7): 3046-3050.
- Muroyama, Y., M. Fujihara, M. Ikeya, H. Kondoh and S. Takada (2002). "Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord." Genes Dev **16**(5): 548-553.
- Musi, N., M. F. Hirshman, J. Nygren, M. Svanfeldt, P. Bavenholm, O. Rooyackers, G. Zhou, J. M. Williamson, O. Ljunqvist, S. Efendic, D. E. Moller, A. Thorell and L. J. Goodyear (2002). "Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes." Diabetes **51**(7): 2074-2081.
- Nakau, M., H. Miyoshi, M. F. Seldin, M. Imamura, M. Oshima and M. M. Taketo (2002). "Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in Lkb1 gene knockout mice." Cancer Res **62**(16): 4549-4553.
- Nath-Sain, S. and P. A. Marignani (2009). "LKB1 catalytic activity contributes to estrogen receptor alpha signaling." Mol Biol Cell **20**(11): 2785-2795.
- Nusse, R., H. Theunissen, E. Wagenaar, F. Rijsewijk, A. Gennissen, A. Otte, E. Schuurig and A. van Ooyen (1990). "The Wnt-1 (int-1) oncogene promoter and its mechanism of activation by insertion of proviral DNA of the mouse mammary tumor virus." Mol Cell Biol **10**(8): 4170-4179.
- Oda, H., Y. Imai, Y. Nakatsuru, J. Hata and T. Ishikawa (1996). "Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas." Cancer Res **56**(14): 3320-3323.
- Ohashi, K., N. Ouchi, A. Higuchi, R. J. Shaw and K. Walsh (2010). "LKB1 deficiency in Tie2-Cre-expressing cells impairs ischemia-induced angiogenesis." J Biol Chem **285**(29): 22291-22298.
- Orford, K., C. Crockett, J. P. Jensen, A. M. Weissman and S. W. Byers (1997). "Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin." J Biol Chem **272**(40): 24735-24738.
- Owen, M. R., E. Doran and A. P. Halestrap (2000). "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain." Biochem J **348 Pt 3**: 607-614.
- Pan, J., M. Li, Y. Jin, X. M. Zhang, M. Zhu and S. Q. Chen (2013). "[Clinical characteristics and mutation analysis of the LKB1 gene in a Peutz-Jeghers syndrome pedigree]." Zhonghua Er Ke Za Zhi **51**(2): 145-149.

- Pang, T., B. Xiong, J. Y. Li, B. Y. Qiu, G. Z. Jin, J. K. Shen and J. Li (2007). "Conserved alpha-helix acts as autoinhibitory sequence in AMP-activated protein kinase alpha subunits." J Biol Chem **282**(1): 495-506.
- Partanen, J. I., A. I. Nieminen, T. P. Makela and J. Klefstrom (2007). "Suppression of oncogenic properties of c-Myc by LKB1-controlled epithelial organization." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14694-14699.
- Partanen, J. I., T. A. Tervonen, M. Myllynen, E. Lind, M. Imai, P. Katajisto, G. J. Dijkgraaf, P. E. Kovanen, T. P. Makela, Z. Werb and J. Klefstrom (2012). "Tumor suppressor function of Liver kinase B1 (Lkb1) is linked to regulation of epithelial integrity." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(7): E388-397.
- Pearson, H. B., A. McCarthy, C. M. Collins, A. Ashworth and A. R. Clarke (2008). "Lkb1 deficiency causes prostate neoplasia in the mouse." Cancer Res **68**(7): 2223-2232.
- Polakis, P. (2002). "Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect." Curr Biol **12**(14): R499-R501.
- Powell, S. M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, T. M. Bryan, S. R. Hamilton, S. N. Thibodeau, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1992). "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis." Nature **359**(6392): 235-237.
- Qanungo, S., S. Haldar and A. Basu (2003). "Restoration of silenced Peutz-Jeghers syndrome gene, LKB1, induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells." Neoplasia **5**(4): 367-374.
- Rashid, A. (2002). "Cellular and molecular biology of biliary tract cancers." Surg Oncol Clin N Am **11**(4): 995-1009.
- Reya, T. and H. Clevers (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." Nature **434**(7035): 843-850.
- Ross, S. E., N. Hemati, K. A. Longo, C. N. Bennett, P. C. Lucas, R. L. Erickson and O. A. MacDougald (2000). "Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling." Science **289**(5481): 950-953.
- Rossi, D. J., A. Ylikorkala, N. Korsisaari, R. Salovaara, K. Luukko, V. Launonen, M. Henkemeyer, A. Ristimaki, L. A. Aaltonen and T. P. Makela (2002). "Induction of cyclooxygenase-2 in a mouse model of Peutz-Jeghers polyposis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12327-12332.
- Rowan, A., M. Churchman, R. Jefferey, A. Hanby, R. Poulson and I. Tomlinson (2000). "In situ analysis of LKB1/STK11 mRNA expression in human normal tissues and tumours." J Pathol **192**(2): 203-206.

- Sabina, R. L., D. Patterson and E. W. Holmes (1985). "5-Amino-4-imidazolecarboxamide riboside (Z-ribose) metabolism in eukaryotic cells." J Biol Chem **260**(10): 6107-6114.
- Sakamoto, K., A. McCarthy, D. Smith, K. A. Green, D. Grahame Hardie, A. Ashworth and D. R. Alessi (2005). "Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction." EMBO J **24**(10): 1810-1820.
- Salahshor, S. and J. R. Woodgett (2005). "The links between axin and carcinogenesis." J Clin Pathol **58**(3): 225-236.
- Salt, I., J. W. Cellier, S. A. Hawley, A. Prescott, A. Woods, D. Carling and D. G. Hardie (1998). "AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform." Biochem J **334** (Pt 1): 177-187.
- Sanchez-Cespedes, M. (2007). "A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome." Oncogene **26**(57): 7825-7832.
- Sanli, T., G. R. Steinberg, G. Singh and T. Tsakiridis (2014). "AMP-activated protein kinase (AMPK) beyond metabolism: a novel genomic stress sensor participating in the DNA damage response pathway." Cancer Biol Ther **15**(2): 156-169.
- Sapkota, G. P., J. Boudeau, M. Deak, A. Kieloch, N. Morrice and D. R. Alessi (2002). "Identification and characterization of four novel phosphorylation sites (Ser31, Ser325, Thr336 and Thr366) on LKB1/STK11, the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome." Biochem J **362**(Pt 2): 481-490.
- Sapkota, G. P., A. Kieloch, J. M. Lizcano, S. Lain, J. S. Arthur, M. R. Williams, N. Morrice, M. Deak and D. R. Alessi (2001). "Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90(RSK) and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys(433), is essential for LKB1 to suppress cell growth." J Biol Chem **276**(22): 19469-19482.
- Schwarz-Romond, T., M. Fiedler, N. Shibata, P. J. Butler, A. Kikuchi, Y. Higuchi and M. Bienz (2007). "The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization." Nat Struct Mol Biol **14**(6): 484-492.
- Sebbagh, M., M. J. Santoni, B. Hall, J. P. Borg and M. A. Schwartz (2009). "Regulation of LKB1/STRAD localization and function by E-cadherin." Curr Biol **19**(1): 37-42.
- Semenov, M., K. Tamai and X. He (2005). "SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor." J Biol Chem **280**(29): 26770-26775.
- Shackelford, D. B. and R. J. Shaw (2009). "The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression." Nat Rev Cancer **9**(8): 563-575.

- Shackelford, D. B., D. S. Vasquez, J. Corbeil, S. Wu, M. Leblanc, C. L. Wu, D. R. Vera and R. J. Shaw (2009). "mTOR and HIF-1 α -mediated tumor metabolism in an LKB1 mouse model of Peutz-Jeghers syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(27): 11137-11142.
- Shaw, R. J. (2009). "LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth." Acta Physiol (Oxf) **196**(1): 65-80.
- Shaw, R. J., K. A. Lamia, D. Vasquez, S. H. Koo, N. Bardeesy, R. A. Depinho, M. Montminy and L. C. Cantley (2005). "The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin." Science **310**(5754): 1642-1646.
- Shackelford, D. B., E. Abt, L. Gerken, D. S. Vasquez, A. Seki, M. Leblanc, L. Wei, M. C. Fishbein, J. Czernin, P. S. Mischel and R. J. Shaw (2013). "LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin." Cancer Cell **23**(2): 143-158.
- Shaw, R. J., M. Kosmatka, N. Bardeesy, R. L. Hurley, L. A. Witters, R. A. DePinho and L. C. Cantley (2004). "The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3329-3335.
- Shaw, R. J., N. Bardeesy, B. D. Manning, L. Lopez, M. Kosmatka, R. A. DePinho and L. C. Cantley (2004). "The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling." Cancer Cell **6**(1): 91-99.
- Shen, Z., X. F. Wen, F. Lan, Z. Z. Shen and Z. M. Shao (2002). "The tumor suppressor gene LKB1 is associated with prognosis in human breast carcinoma." Clin Cancer Res **8**(7): 2085-2090.
- Shu, Y., S. A. Sheardown, C. Brown, R. P. Owen, S. Zhang, R. A. Castro, A. G. Ianculescu, L. Yue, J. C. Lo, E. G. Burchard, C. M. Brett and K. M. Giacomini (2007). "Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action." J Clin Invest **117**(5): 1422-1431.
- Spicer, J., S. Rayter, N. Young, R. Elliott, A. Ashworth and D. Smith (2003). "Regulation of the Wnt signalling component PAR1A by the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1." Oncogene **22**(30): 4752-4756.
- Spotts, G. D., S. V. Patel, Q. Xiao and S. R. Hann (1997). "Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins." Mol Cell Biol **17**(3): 1459-1468.
- Stamatoglou, S. C. and R. C. Hughes (1994). "Cell adhesion molecules in liver function and pattern formation." FASEB J **8**(6): 420-427.

- Sugimachi, K., K. Taguchi, S. Aishima, S. Tanaka, M. Shimada, K. Kajiyama, K. Sugimachi and M. Tsuneyoshi (2001). "Altered expression of beta-catenin without genetic mutation in intrahepatic cholangiocarcinoma." Mod Pathol **14**(9): 900-905.
- Takeda, H., S. Lyle, A. J. Lazar, C. C. Zouboulis, I. Smyth and F. M. Watt (2006). "Human sebaceous tumors harbor inactivating mutations in LEF1." Nat Med **12**(4): 395-397.
- Taliaferro-Smith, L., A. Nagalingam, D. Zhong, W. Zhou, N. K. Saxena and D. Sharma (2009). "LKB1 is required for adiponectin-mediated modulation of AMPK-S6K axis and inhibition of migration and invasion of breast cancer cells." Oncogene **28**(29): 2621-2633.
- Tamai, K., M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J. P. Saint-Jeannet and X. He (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." Nature **407**(6803): 530-535.
- Taniguchi, K., L. R. Roberts, I. N. Aderca, X. Dong, C. Qian, L. M. Murphy, D. M. Nagorney, L. J. Burgart, P. C. Roche, D. I. Smith, J. A. Ross and W. Liu (2002). "Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas." Oncogene **21**(31): 4863-4871.
- Tang, X. X., H. Chen, S. Yu, L. Zhang, M. J. Caplan and H. C. Chan (2010). "Lymphocytes accelerate epithelial tight junction assembly: role of AMP-activated protein kinase (AMPK)." PLoS One **5**(8): e12343.
- Thoma, C., S. Fraterman, M. Gentzel, M. Wilm and M. W. Hentze (2008). "Translation initiation by the c-myc mRNA internal ribosome entry sequence and the poly(A) tail." RNA **14**(8): 1579-1589.
- Thornton, C., M. A. Snowden and D. Carling (1998). "Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle." J Biol Chem **273**(20): 12443-12450.
- Tiainen, M., K. Vaahtomeri, A. Ylikorkala and T. P. Makela (2002). "Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1)." Hum Mol Genet **11**(13): 1497-1504.
- Tiainen, M., A. Ylikorkala and T. P. Makela (1999). "Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9248-9251.
- Timm, T., X. Y. Li, J. Biernat, J. Jiao, E. Mandelkow, J. Vandekerckhove and E. M. Mandelkow (2003). "MARKK, a Ste20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARK/PAR-1." EMBO J **22**(19): 5090-5101.
- Torre, C., C. Perret and S. Colnot (2010). "Molecular determinants of liver zonation." Prog Mol Biol Transl Sci **97**: 127-150.

- Towler, M. C., S. Fogarty, S. A. Hawley, D. A. Pan, D. M. Martin, N. A. Morrice, A. McCarthy, M. N. Galardo, S. B. Meroni, S. B. Cigorruga, A. Ashworth, K. Sakamoto and D. G. Hardie (2008). "A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for spermiogenesis." Biochem J **416**(1): 1-14.
- Turnley, A. M., D. Stapleton, R. J. Mann, L. A. Witters, B. E. Kemp and P. F. Bartlett (1999). "Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system." J Neurochem **72**(4): 1707-1716.
- van Es, J. H., N. Barker and H. Clevers (2003). "You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway." Curr Opin Genet Dev **13**(1): 28-33.
- Viollet, B., Y. Athes, R. Mounier, B. Guigas, E. Zarrinpashneh, S. Horman, L. Lantier, S. Hebrard, J. Devin-Leclerc, C. Beauloye, M. Foretz, F. Andreelli, R. Ventura-Clapier and L. Bertrand (2009). "AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals." Front Biosci (Landmark Ed) **14**: 19-44.
- Volikos, E., J. Robinson, K. Aittomaki, J. P. Mecklin, H. Jarvinen, A. M. Westerman, F. W. de Rooji, T. Vogel, G. Moeslein, V. Launonen, I. P. Tomlinson, A. R. Silver and L. A. Aaltonen (2006). "LKB1 exonic and whole gene deletions are a common cause of Peutz-Jeghers syndrome." J Med Genet **43**(5): e18.
- Wang, L. and J. L. Boyer (2004). "The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes." Hepatology **39**(4): 892-899.
- Warden, S. M., C. Richardson, J. O'Donnell, Jr., D. Stapleton, B. E. Kemp and L. A. Witters (2001). "Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization." Biochem J **354**(Pt 2): 275-283.
- Wehrli, M., S. T. Dougan, K. Caldwell, L. O'Keefe, S. Schwartz, D. Vaizel-Ohayon, E. Schejter, A. Tomlinson and S. DiNardo (2000). "arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling." Nature **407**(6803): 527-530.
- Wei, Y., M. Fabre, S. Branchereau, F. Gauthier, G. Perilongo and M. A. Buendia (2000). "Activation of beta-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas." Oncogene **19**(4): 498-504.
- Weinberg, A. G. and M. J. Finegold (1983). "Primary hepatic tumors of childhood." Hum Pathol **14**(6): 512-537.
- Wiechens, N., K. Heinle, L. Englmeier, A. Schohl and F. Fagotto (2004). "Nucleocytoplasmic shuttling of Axin, a negative regulator of the Wnt-beta-catenin Pathway." J Biol Chem **279**(7): 5263-5267.
- Willert, K. and K. A. Jones (2006). "Wnt signaling: is the party in the nucleus?" Genes Dev **20**(11): 1394-1404.

- Willimott, S. and S. D. Wagner (2010). "Post-transcriptional and post-translational regulation of Bcl2." Biochem Soc Trans **38**(6): 1571-1575.
- Winckler, B. (2007). "BDNF instructs the kinase LKB1 to grow an axon." Cell **129**(3): 459-460.
- Wingo, S. N., T. D. Gallardo, E. A. Akbay, M. C. Liang, C. M. Contreras, T. Boren, T. Shimamura, D. S. Miller, N. E. Sharpless, N. Bardeesy, D. J. Kwiatkowski, J. O. Schorge, K. K. Wong and D. H. Castrillon (2009). "Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression." PLoS One **4**(4): e5137.
- Woods, A., A. J. Heslegrave, P. J. Muckett, A. P. Levene, M. Clements, M. Mobberley, T. A. Ryder, S. Abu-Hayyeh, C. Williamson, R. D. Goldin, A. Ashworth, D. J. Withers and D. Carling (2011). "LKB1 is required for hepatic bile acid transport and canalicular membrane integrity in mice." Biochem J **434**(1): 49-60.
- Woodward, W. A., M. S. Chen, F. Behbod and J. M. Rosen (2005). "On mammary stem cells." J Cell Sci **118**(Pt 16): 3585-3594.
- Wullschleger, S., R. Loewith and M. N. Hall (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." Cell **124**(3): 471-484.
- Xiao, B., R. Heath, P. Saiu, F. C. Leiper, P. Leone, C. Jing, P. A. Walker, L. Haire, J. F. Eccleston, C. T. Davis, S. R. Martin, D. Carling and S. J. Gamblin (2007). "Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase." Nature **449**(7161): 496-500.
- Xie, Z., Y. Dong, J. Zhang, R. Scholz, D. Neumann and M. H. Zou (2009). "Identification of the serine 307 of LKB1 as a novel phosphorylation site essential for its nucleocytoplasmic transport and endothelial cell angiogenesis." Mol Cell Biol **29**(13): 3582-3596.
- Yin, Y., C. W. Stephen, M. G. Luciani and R. Fahraeus (2002). "p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products." Nat Cell Biol **4**(6): 462-467.
- Ylikorkala, A., D. J. Rossi, N. Korsisaari, K. Luukko, K. Alitalo, M. Henkemeyer and T. P. Makela (2001). "Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice." Science **293**(5533): 1323-1326.
- Yost, C., M. Torres, J. R. Miller, E. Huang, D. Kimelman and R. T. Moon (1996). "The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3." Genes Dev **10**(12): 1443-1454.
- Young, R. H. (2005). "Sex cord-stromal tumors of the ovary and testis: their similarities and differences with consideration of selected problems." Mod Pathol **18** **Suppl 2**: S81-98.

- Woodward, W. A., M. S. Chen, F. Behbod and J. M. Rosen (2005). "On mammary stem cells." J Cell Sci **118**(Pt 16): 3585-3594.
- Zechner, D., Y. Fujita, J. Hulsken, T. Muller, I. Walther, M. M. Taketo, E. B. Crenshaw, 3rd, W. Birchmeier and C. Birchmeier (2003). "beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system." Dev Biol **258**(2): 406-418.
- Zeng, L., F. Fagotto, T. Zhang, W. Hsu, T. J. Vasicek, W. L. Perry, 3rd, J. J. Lee, S. M. Tilghman, B. M. Gumbiner and F. Costantini (1997). "The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation." Cell **90**(1): 181-192.
- Zeng, P. Y. and S. L. Berger (2006). "LKB1 is recruited to the p21/WAF1 promoter by p53 to mediate transcriptional activation." Cancer Res **66**(22): 10701-10708.
- Zeng, X., K. Tamai, B. Doble, S. Li, H. Huang, R. Habas, H. Okamura, J. Woodgett and X. He (2005). "A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation." Nature **438**(7069): 873-877.
- Zeqiraj, E., B. M. Filippi, M. Deak, D. R. Alessi and D. M. van Aalten (2009). "Structure of the S-LKB1TRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation." Science **326**(5960): 1707-1711.
- Zeqiraj, E., B. M. Filippi, S. Goldie, I. Navratilova, J. Boudeau, M. Deak, D. R. Alessi and D. M. van Aalten (2009). "ATP and MO25alpha regulate the conformational state of the STRADalpha pseudokinase and activation of the LKB1 tumour suppressor." PLoS Biol **7**(6): e1000126.
- Zhang, L., J. Li, L. H. Young and M. J. Caplan (2006). "AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(46): 17272-17277.
- Zheng, B. and L. C. Cantley (2007). "Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 819-822.
- Zhou, G., R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear and D. E. Moller (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." J Clin Invest **108**(8): 1167-1174.
- Zhuang, Z. G., G. H. Di, Z. Z. Shen, J. Ding and Z. M. Shao (2006). "Enhanced expression of LKB1 in breast cancer cells attenuates angiogenesis, invasion, and metastatic potential." Mol Cancer Res **4**(11): 843-849.
- Zong, H., J. M. Ren, L. H. Young, M. Pypaert, J. Mu, M. J. Birnbaum and G. I. Shulman (2002). "AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal

muscle in response to chronic energy deprivation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 15983-15987.

- Zurawel, R. H., S. A. Chiappa, C. Allen and C. Raffel (1998). "Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations." Cancer Res **58**(5): 896-899.

ANNEXES

ORIGINAL ARTICLE

A novel LKB1 isoform enhances AMPK metabolic activity and displays oncogenic properties

R Dahmani^{1,2,3,4,8}, P-A Just^{1,2,3,4,8}, A Delay⁵, F Canal^{1,2,3,4}, L Finzi^{1,2,3,4}, C Prip-Buus^{1,2,3}, M Lambert^{1,2,3}, P Sujobert^{1,2,3}, K Buchet-Poyau⁵, E Miller⁶, C Cavard^{1,2,3,4}, S Marmier^{1,2,3,4}, B Terris^{1,2,3,4,7}, M Billaud⁵ and C Perret^{1,2,3,4}

The *LKB1* tumor suppressor gene encodes a master kinase that coordinates the regulation of energetic metabolism and cell polarity. We now report the identification of a novel isoform of LKB1 (named Δ N-LKB1) that is generated through alternative transcription and internal initiation of translation of the LKB1 mRNA. The Δ N-LKB1 protein lacks the N-terminal region and a portion of the kinase domain. Although Δ N-LKB1 is catalytically inactive, it potentiates the stimulating effect of LKB1 on the AMP-activated protein kinase (AMPK) metabolic sensor through a direct interaction with the regulatory autoinhibitory domain of AMPK. In contrast, Δ N-LKB1 negatively interferes with the LKB1 polarizing activity. Finally, combining *in vitro* and *in vivo* approaches, we showed that Δ N-LKB1 has an intrinsic oncogenic property. Δ N-LKB1 is expressed solely in the lung cancer cell line, NCI-H460. Silencing of Δ N-LKB1 decreased the survival of NCI-H460 cells and inhibited their tumorigenicity when engrafted in nude mice. In conclusion, we have identified a novel LKB1 isoform that enhances the LKB1-controlled AMPK metabolic activity but inhibits LKB1-induced polarizing activity. Both the *LKB1* tumor suppressor gene and the oncogene Δ N-LKB1 are expressed from the same locus and this may account for some of the paradoxical effects of LKB1 during tumorigenesis.

Oncogene advance online publication, 7 July 2014; doi:10.1038/onc.2014.182

INTRODUCTION

LKB1 (also known as *STK11*) is a tumor suppressor gene whose germline mutations are responsible for an inherited cancer disorder called the Peutz–Jeghers syndrome.^{1–3} Somatic mutations of *LKB1* are prevalently found in non-small-cell lung carcinomas and uterine cervical neoplasms.^{4–6} *LKB1* has two prominent functions, the control of cell polarity and the coordination of cell division, with the regulation of cellular energy metabolism.^{3,7} The control of metabolism by *LKB1* is mainly relayed by a master sensor of cellular energy, AMP-activated protein kinase (AMPK).^{8–10} In response to various cellular stresses, AMPK activates catabolic pathways and inhibits energy-consuming biosynthetic pathways.^{11,12} The active form of *LKB1* is part of a heterotrimeric complex encompassing two accessory proteins, the pseudokinase Ste20-Related Adaptor protein (STRAD) and the scaffolding protein mouse protein 25.¹ Formation of this complex regulates the stability, the subcellular localization and the kinase activity of *LKB1*.¹³ However, the mechanism by which *LKB1* activates its different substrates (AMPK α and AMPK-related kinases, ARK) appears context specific and cell-type dependent.^{2,3,14}

Although *LKB1* was defined as a tumor suppressor gene, the role of the *LKB1*/AMPK pathway during carcinogenesis is complex, and both tumor suppressor and oncogenic roles have been described.^{15–17} *LKB1*-mediated tumor suppression can partly be explained by the positive role of *LKB1* on the control of cell polarity and the negative role of the *LKB1*–AMPK axis on mTOR signaling.^{3,18} The *LKB1*/AMPK pathway is also required for tumor

cell survival in condition of energy stress, conditions to which tumor cells are frequently subjected, and thus may exert pro-oncogenic function.^{19,20}

Two *LKB1* isoforms have been described previously, the classical full-length *LKB1* isoform (named FL-*LKB1* in the text) and a 3' alternative spliced isoform that produces a shorter protein, mostly expressed in the testis.^{21,22} Here, we report the identification of a novel isoform of *LKB1* (Δ N-*LKB1*), deleted of its N-terminal domain. This isoform is mainly expressed in the heart and skeletal muscle and enhances AMPK metabolic activity. However, we showed that this novel *LKB1* isoform exerts a dual role regarding *LKB1* function with a dominant-negative effect on the *LKB1* polarizing activity. In addition, our results showed that Δ N-*LKB1* has oncogenic properties. The novel Δ N-*LKB1* isoform may account for some of the paradoxical effects of *LKB1* during tumorigenesis.

RESULTS

Identification and characterization of a novel *LKB1* isoform

Western blot using the Ley37D/G6 *LKB1* antibody detected the classical FL-*LKB1* at 50 kDa in various mouse tissues, the 48 kDa isoform in the testis^{21,22} and an abundant fast migrating band around 42 kDa in the skeletal muscle and heart (Figure 1a). Silencing of *LKB1* expression in a human cell line with an inducible short hairpin RNA (shRNA) led to the disappearance of the 42 kDa band (Figure 1b), showing that the 42 kDa was encoded by the *LKB1* gene. Specific deletion of *LKB1* gene in the heart using a conditional *LKB1* mouse model²³ resulted in a strong decrease in

¹Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France; ²Cnrs, UMR8104, Paris, France; ³Université Paris Descartes, Paris, France; ⁴Equipe labellisée LNCC, Paris, France; ⁵Institut Albert Bonniot, CRI Inserm/UJF U823, Rond Point de la Chantourne, La Tronche, France; ⁶Section of Cardiology, Boston University School of Medicine, Boston, MA, USA and ⁷Pathology Unit, Hôpital Cochin, Paris, France. Correspondence: Dr M Billaud, Institut Albert Bonniot, CRI Inserm/UJF U823, Rond Point de la Chantourne, La Tronche 38706, France or Dr C Perret, Inserm U1016, Institut Cochin, 24 rue du Faubourg Saint-Jacques, Paris 75014 France.

E-mail: Marc.Billaud@ujf-grenoble.fr or christine.perret@inserm.fr

⁸These authors contributed equally to this work.

Received 30 June 2013; revised 28 April 2014; accepted 16 May 2014

Δ N-LKB1 protein expression (Figure 1d). Expression studies of LKB1 in human tissues also revealed a prominent expression of the 42 kDa isoform in the human skeletal muscle and in the colon (Figure 1c).

We then used *in silico* analyses to search for a potential open reading frame in the mouse and human *LKB1* genes that could encode for a 42 kDa protein. Using Genomatix tools, we found two mouse *LKB1* transcripts: transcript (GXT_21812449) results from a 5' alternative splicing event in mouse *LKB1* exon 1 leading to the use of downstream in-frame translation initiation codons (ATG) located in exon 3 (Supplementary Figures S1A and S2A) and transcript (GXT_12975809) is generated by an alternative promoter in intron 2 (Supplementary Figures S1C and S2A). The alternative promoter was not found in human *LKB1* gene. The two alternative transcripts would generate an N terminally truncated LKB1 protein, which we named Δ N-LKB1 (deleted of 125 amino acids) (Figure 1f and Supplementary Figure S2A). We confirmed the existence of the human 5' alternative splicing *LKB1* transcript using two inducible LKB1 shRNAs targeting either both isoforms (FL-LKB1 and Δ N-LKB1) or specifically FL-LKB1 and not Δ N-LKB1

(Figure 1b). Using primers specific for each mouse *LKB1* transcripts, we confirmed by reverse transcription-PCR the expression of these different mRNA species in mouse tissues. However, we did not observe any accumulation of the two mouse alternative *LKB1* transcripts in the mouse skeletal muscle and heart (Figure 1a and Supplementary Figure S2B), indicating that the strong expression of the Δ N-LKB1 protein is also probably regulated at the translational level. The presence of several in-frame ATG start site codons (Supplementary Figures S1A, B and S2A) suggests that Δ N-LKB1 is produced following internal initiation of translation. Accordingly, cloned human and mouse FL-LKB1 cDNAs expressed in HeLa cells (which do not express LKB1) produced both the full-length isoform and a faster migrating protein that comigrated with Δ N-LKB1 protein expressed from the cloned untagged Δ N-LKB1 cDNAs (Supplementary Figure S2C). In addition, Δ N-Lkb1 from the heart and skeletal muscle comigrated with untagged protein expressed in HeLa cells (Figure 1e) and Δ N-LKB1 protein in the skeletal muscle resolved into a doublet, indicating that the two start codons were used for translation initiation (Supplementary Figure S2D). These various results indicate that Δ N-LKB1 protein is not a degradation product of the FL-LKB1, but is produced by the initiation of translation at downstream ATG start site codons either by leaky scanning or by the initiation of internal translation.

The predicted protein encoded by Δ N-LKB1 lacks the N-terminal-regulated domain, the nuclear localization signal and part of the kinase domain (Figure 1e). Human FL-LKB1 and Δ N-LKB1 vectors were constructed with the addition of a Flag epitope tag fused at the N termini and expressed in HeLa cells. The products (flagged and unflagged) were probed with anti-LKB1 antibodies specific for either the C- or the N-terminal LKB1 domains and confirmed that Δ N-LKB1 was truncated from its N-terminal domain (Figure 2A). We then analyzed the interaction of Δ N-LKB1 with the binding partners of the holoenzyme complex by co-immunoprecipitation. We found that Δ N-LKB1 was not able to bind either STRAD α or MO-25 (Figure 2B). It was thus anticipated that Δ N-LKB1 was cytosolic and catalytically inactive.

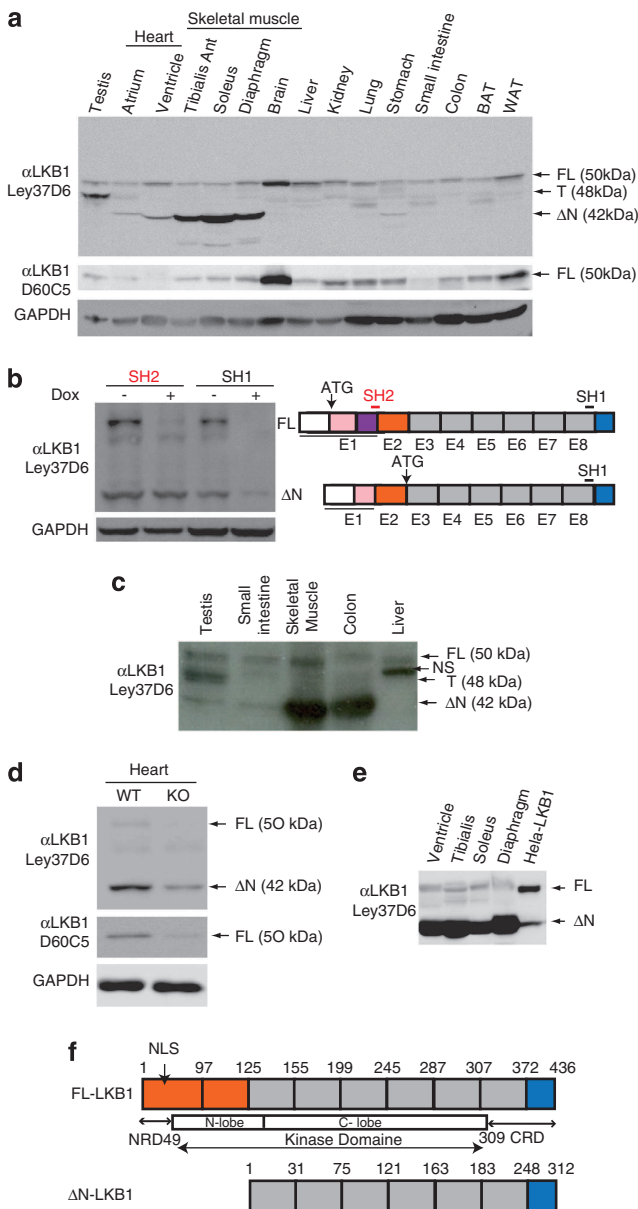


Figure 1. Identification of a novel LKB1 isoform strongly expressed in the heart and skeletal muscle. **(a)** Tissue distribution of LKB1 isoforms in mouse tissues. Various mouse tissues were extracted for western blot analysis with anti-LKB1 antibodies (Ley37D/G6 and D60CS) revealing the FL-LKB1 50 kDa isoform (FL), the 48 kDa testis isoform (T) and a 42 kDa isoform (Δ N). BAT, brown adipose tissue; WAT, white adipose tissue. **(b)** Evidence for Δ N-LKB1 using LKB1 shRNAs. (Right part) Location of the different LKB1 sh-RNAs used. SH1 located in exon 8 of human LKB1 gene targeted both FL-LKB1 and Δ N-LKB1; SH2 located in the part of LKB1 exon 1 deleted after the 5' alternative splicing event, targeted only FL-LKB1. (Left part) Huh6 cells were transduced with inducible lentiviruses encoding either SH1 or SH2 and selected for puromycin resistance. The selected cells were then induced or not by doxycycline for 5 days before analysis by western blotting. FL: FL-LKB1; Δ N: Δ N-LKB1. **(c)** Δ N-LKB1 expression studies with human samples. Various human tissues were extracted for western blot analysis with the Ley37D/G6 anti-LKB1 antibody. **(d)** Loss of Δ N-LKB1 expression in the heart of mice bearing a heart-specific deletion of LKB1 (KO)(23) with wild-type (WT) samples for controls ($n=4$). Heart extracts were subjected to western blotting with the Ley37D/G6 and D60CS LKB1 antibodies. The *LKB1* gene was deleted in the heart using conditional LKB1 mice that deleted most of the *LKB1* gene.³³ **(e)** Comigration of the Δ N-LKB1 isoform present in the heart and skeletal muscle extracts with the cloned Δ N-LKB1 expressed in HeLa cells. Mouse protein extracts and lysate of HeLa cells transfected with vectors encoding the FL-LKB1 and Δ N-LKB1 isoforms (HeLa-LKB1) were analysed by western blotting using the Ley37D/G6 LKB1 antibody. **(f)** Structure of the human FL-LKB1 and the predicted N terminally truncated (Δ NLKB1) proteins, from Alessi *et al.*¹ CRD, C-terminal-regulated domain; NLS, nuclear localization signal; NRD, N-terminal-regulated domain.

Accordingly, we observed that, in contrast to FL-LKB1 and the testis LKB1 isoform that relocated from the nucleus to the cytosol when overexpressed with STRAD α , Δ N-LKB1 remained cytosolic (Figure 2C). Immunokinase assay measuring LKB1 activity revealed that Δ N-LKB1 was catalytically inactive (Figure 3a).

Δ N-LKB1 has a dominant-positive effect on LKB1-induced AMPK activity

Δ N-LKB1 is catalytically inactive but may affect one or more of FL-LKB1 functions, namely, the control of energetic metabolism, cell polarity and cell growth. We used an immunokinase assay to test, *in vitro*, the effect of the LKB1 isoforms on induction of AMPK

activity by LKB1. Surprisingly, the LKB1-induced activity of the recombinant AMPK heterotrimer (comprising the α -, β - and γ -subunit) was increased by Δ N-LKB1 (Figure 3a). Consistently, the Δ N-LKB1 isoform enhanced, in a dose-dependent manner, the basal and metformin-induced AMPK activity of HeLa cells expressing FL-LKB1 (Figure 3b and Supplementary Figure S3A). Cotransfection experiment showed that Δ N-LKB1 potentiated AMPK activity induced by FL-LKB1 (Figure 3c and Supplementary Figure S3B). No AMPK activation was observed when Δ N-LKB1 was coexpressed with a kinase-dead LKB1 mutant (KD-LKB1) (Figure 3d), demonstrating that the stimulation of AMPK activity by Δ N-LKB1 required a functional LKB1 catalytic activity. We next tested whether the positive effect of Δ N-LKB1 on LKB1-induced AMPK activation was also observed for other LKB1 substrates. We assayed the endogenous kinase activity of AMPK α and several ARKs in immune complexes isolated from HeLa cell extracts transfected with the different LKB1 constructs. The dominant-positive effect of Δ N-LKB1 was specific to AMPK and was not observed for other ARKs, such as NUAK1, NUAK2 and MARK4 (Supplementary Figure S4A).

We then investigated the mechanisms underlying the positive effect of Δ N-LKB1 on AMPK activation. AMPK is a heterotrimeric complex comprising a catalytic α -subunit and two regulatory β - and γ -subunit (Figure 3e). The γ -subunit carries the regulatory nucleotide-binding sites. AMPK activation results from conformational changes in the AMPK heterotrimeric complex induced by an increase in AMP and/or ADP levels that, depending of the level of energy stress, affect the extent of AMPK α phosphorylation in its T loop.¹² Deletion of the regulatory region following the kinase domain results in an AMPK α subunit that is constitutively active (CA-AMPK α) (Figure 3e). To investigate how Δ N-LKB1 affects AMPK activation, we analyzed the binding of Δ N-LKB1 to the catalytic AMPK α subunit. Δ N-LKB1 interacted more strongly with AMPK α 2 than FL-LKB1 or KD-LKB1 (Figure 3f). To determine which domain of AMPK α interacts with Δ N-LKB1, we used two AMPK α mutants deleted from part of the regulatory domain (Figure 3e). Our results showed that Δ N-LKB1 did not bind the AMPK α kinase domain but bound instead to the regulatory autoinhibitory domain (AID) (Figure 3f). Considering findings of different studies,^{12,24,25} these

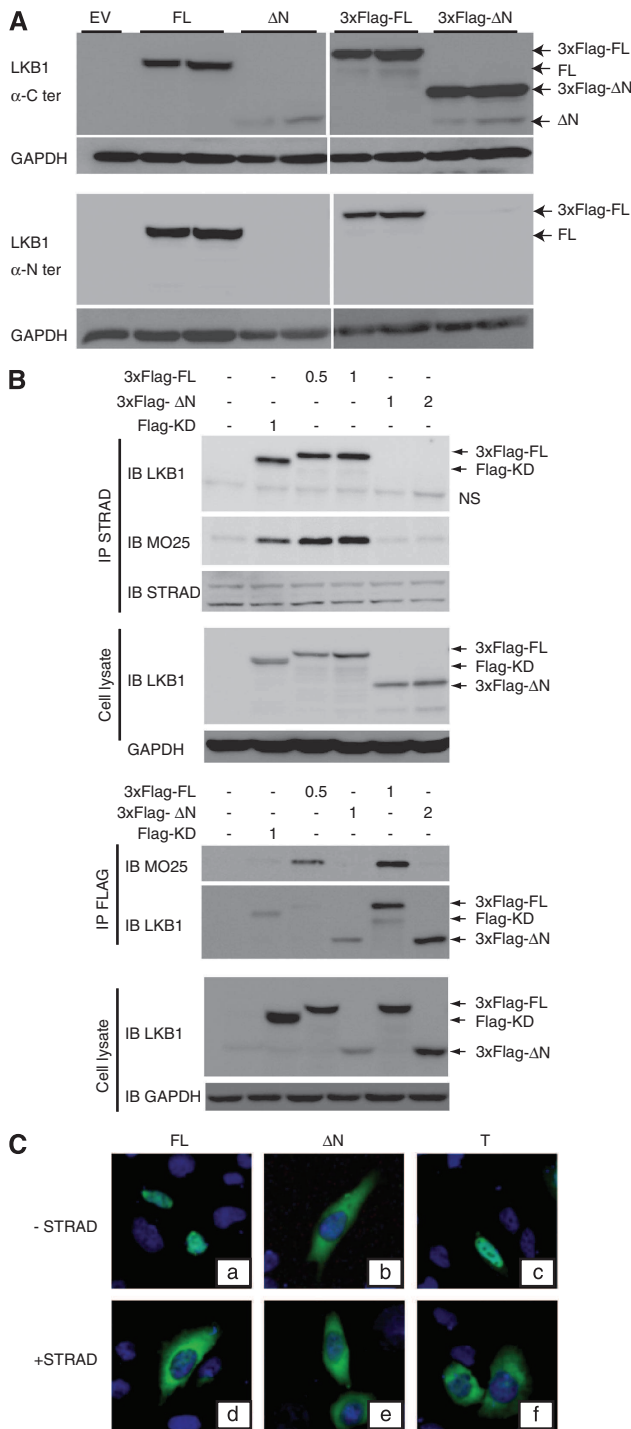


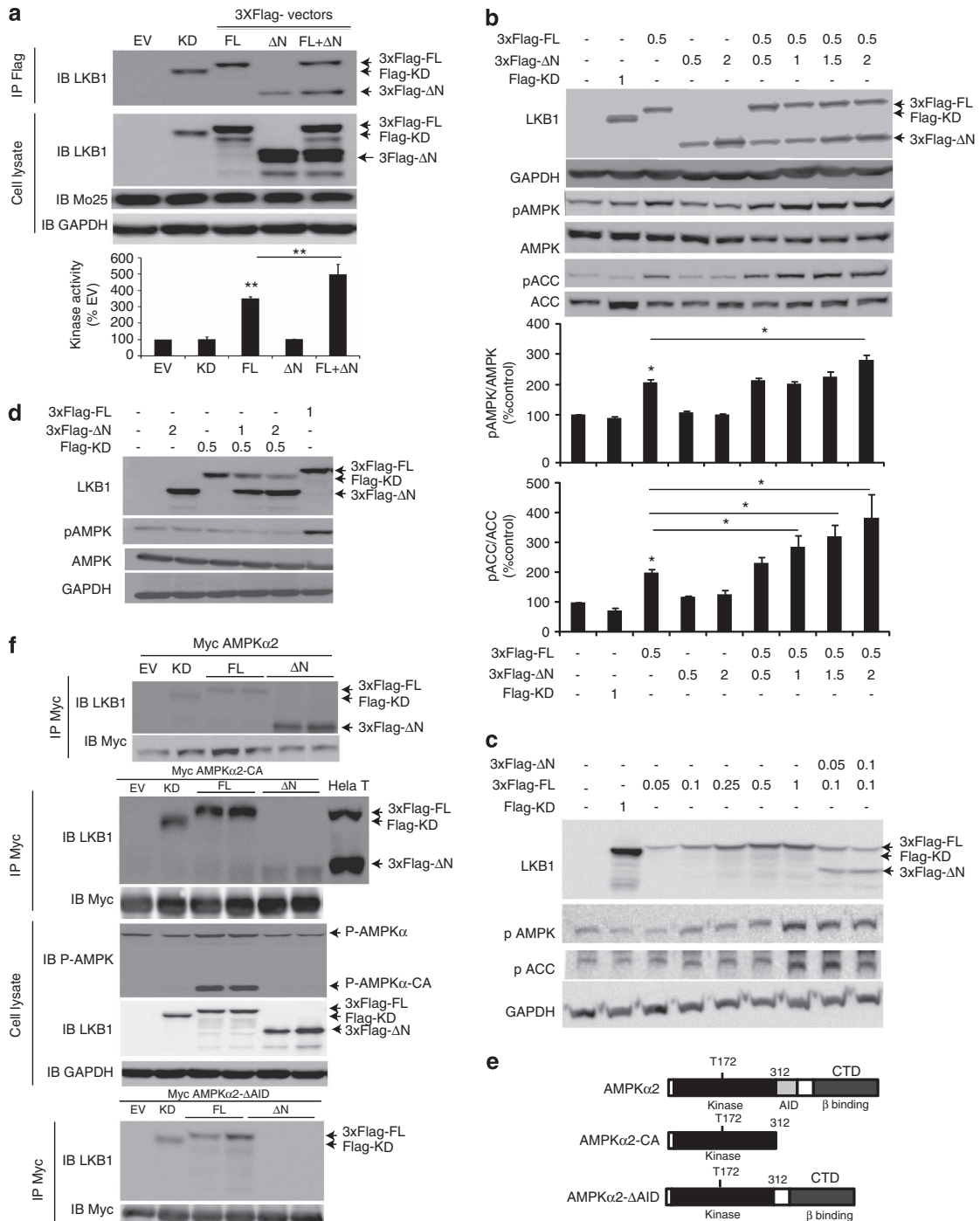
Figure 2. Δ N-LKB1 is N terminally truncated and does not interact with the partners of the LKB1 complex. **(A)** Expression in HeLa cells of untagged and tagged cDNAs encoding for human FL-LKB1 and Δ N-LKB1. Cells were transfected with the empty vector (EV) and human-untagged or Flag-tagged LKB1 isoforms (1 and 2 μ g). Cell lysates were analyzed by western blotting using antibodies directed against either the N-terminal or the C-terminal parts of LKB1. Blotting with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) showed that equal amount of protein was loaded in each lane. **(B)** Δ N-LKB1 did not interact with partners of the LKB1 complex. (Upper panel) HeLa cells were transfected with STRAD α expression vector and plasmids corresponding to the EV, the kinase dead vector (KD), the flagged-FL-LKB1 (FL) and flagged- Δ N-LKB1 (Δ N) isoforms for 48 h. Cells were then harvested and lysates were immunoprecipitated with an antibody against STRAD α and analyzed by western blotting using anti-LKB1 (D60C5; Cell Signaling), anti-MO-25 and anti-STRAD α antibodies. Cell lysates were immunoblotted with anti-LKB1 (D60C5; Cell Signaling) and GAPDH antibodies as controls of transfection efficiency. (Lower panel) Same experimental design except that cell lysates were immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody and analyzed by western blotting with an anti-MO-25 and anti-LKB1 antibodies. **(C)** Subcellular localization of Δ N-LKB1. HeLa cells were transfected with vectors encoding the different LKB1 isoforms fused to GFP in the absence (**a–c**) or presence of vector expressing STRAD α (**d–f**). Cells were fixed 24 h after transfection, mounted in 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-containing Vectashield mounting medium and LKB1 isoforms were visualized with GFP (green) using an epifluorescence (Leica DMRD, Nanterre, France) with a \times 400 magnification. Δ N, Δ N-LKB1; FL, FL-LKB1; T, testis isoform.

results suggest that the binding of ΔN-LKB1 to the AID of AMPKα induces a conformational change in the heterotrimeric AMPK complex, resulting in an increased phosphorylation at Thr 172 that enhances AMPK activity. This mechanism reveals a noncanonical mechanism for AMPK activation mediated by ΔN-LKB1.

ΔN-LKB1 is expressed in oxidative and glycolytic muscle and increases liver fatty acid oxidation in fasted mice

ΔN-Lkb1 is abundant in mouse heart and skeletal muscle, two tissues with high oxidative metabolism that uses lipid as a major fuel for energy metabolism. Skeletal muscle is a well-established physiologic site of AMPK activation.²⁶ AMPK controls both glucose

transport and fatty acid oxidation in the skeletal muscle.²⁶ However, the precise role of the LKB1/AMPK pathways in the regulation of the muscle physiology is still unclear.^{27,28} We examined the distribution of ΔN-Lkb1 protein expression in the different muscle types. Skeletal muscles are composed of a heterogeneous population of fiber types with different contractile and metabolic properties. Basal AMPK activity, as reflected by AMPK phosphorylation, was higher in red oxidative muscles than white glycolytic muscles (Figure 4a). However, ΔN-Lkb1 was more abundant in mouse quadriceps and gastrocnemius (predominantly fast-twitch glycolytic muscle), which have a weaker basal AMPK activity than the soleus and diaphragm (predominantly slow-twitch oxidative muscle) (Figure 4a).



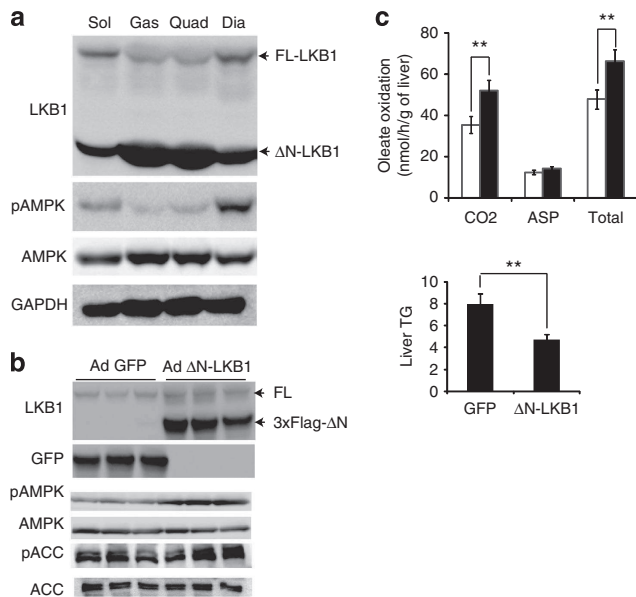


Figure 4. Physiologic role of Δ N-LKB1: expression studies in the skeletal muscle and control of oleate oxidation in fasted liver. **(a)** Distribution of Δ N-LKB1 in mouse muscle. Extracts from different skeletal muscles as indicated were analyzed by western blotting using LKB1 (Ley37D/G6) and AMPK antibodies (pAMPK T172 and total AMPK). Dia: diaphragm; Gas: gastrocnemius; Quad: quadriceps; Sol: soleus. **(b)** Δ N-LKB1 increases oleate oxidation in the liver of fasted mice. Adenovirus-mediated expression of Δ N-LKB1 (Ad Δ N-LKB1) or control GFP (Ad-GFP). Seven days later, liver from fasted mice were analyzed by western blotting using an anti-LKB1 (D60C5; Cell Signalling), anti-GFP, anti-p-172-AMPK, anti-p79-ACC, anti-AMPK and anti-ACC antibodies. **(c)** Oleate oxidation into CO_2 , acid-soluble products (ASP) and their sum (Total). The oleate oxidation rate was measured in the livers of Ad-GFP- (white bars) and Ad- Δ N-LKB1- (black bars) infected animals (see Materials and methods) (mean \pm s.d., $n=6$, $**P < 0.01$ versus Ad-GFP). Liver triglyceride content in Ad-GFP- and Ad- Δ N-LKB1-infected livers (see Materials and methods available online in Supplementary Information) (mean \pm s.d., $**P < 0.01$ versus Ad-GFP).

The skeletal muscle distribution of Δ N-Lkb1 suggested that it may impact both the glycolytic and oxidative capacity of this tissue. To analyze the Δ N-Lkb1 function, *in vivo*, we studied its effect on fatty acid oxidation in the liver where Δ N-Lkb1 is not found (Figure 1a and Supplementary Figure S5A). We used an adenovirus to produce Δ N-Lkb1 in the liver of C57Bl6 mice. Seven days after adenovirus injection, the concentration of Δ N-Lkb1 protein in the liver markedly increased to levels similar to values observed physiologically in the heart and skeletal muscle (Figure 4b). The oleate oxidation capacity in the liver of fasted mice was significantly higher following injection with Ad- Δ N-Lkb1 than with Ad-GFP (controls), leading to decreased liver triglyceride content (Figure 4b). This increased fatty acid oxidation rate was also associated with an increase in AMPK phosphorylation and ACC phosphorylation (Figure 4b).

Δ N-LKB1 exerts a dominant-negative effect on LKB1-induced apical polarization

To analyze the role of Δ N-LKB1 in cell polarity, we used a model described previously, in which cellular polarization of the colorectal LS174T TR1-6 cancer cell line is induced through the coexpression of LKB1 with a doxycycline-inducible STRAD α .⁷ Induction of STRAD α expression promotes activation of LKB1 and leads to full-cell polarization with the formation of brush border-like structures and apical actin caps.

We transfected LS174T TR1-6 cells with vectors expressing GFP-tagged LKB1 isoforms; 24 h later, the cells were treated or not with doxycycline to induce STRAD α expression. As expected, activation of GFP-FL-LKB1 by STRAD α induced actin cytoskeleton reorganization with the formation of an actin cap, visualized by staining with tetramethylrhodamine-conjugated phalloidin (Figure 5a). The polarizing activity of the different LKB1 isoforms was quantified by counting the GFP-expressing cells that developed an actin cap at one pole of the cell. FL-LKB1 increased by fourfold the polarizing activity, whereas neither Δ N-LKB1 nor KD LKB1 exhibited any polarizing activity (Figures 5a and b). More importantly, when Δ N-LKB1 was co-transfected with FL-LKB1, we observed a significant reduction of the number of polarized cells showing that Δ N-LKB1 exerts a dominant-negative effect on LKB1 polarizing activity (Figure 5c).

Figure 3. Δ N-LKB1 exerts a dominant-positive effect on the LKB1-induced AMPK activity. **(a)** Immunokinase assay of AMPK activity upon transfection of HeLa cells with the vectors encoding the various LKB1 isoforms. Cells were transfected with the EV (4 μ g), Flag-KD (1 μ g), Flag-FL (0.5 μ g), Flag- Δ N (1 μ g) and Flag-FL (0.5 μ g) co-transfected with Flag- Δ N (1 μ g). Immunoprecipitation (200 μ g cell lysate) was carried out using an anti-Flag antibody 48 h after transfection. LKB1 activity was measured by activation of the recombinant α , β , γ AMPK complex as described in Materials and methods available online in Supplementary Information. (Upper panel) Immunoprecipitated proteins and an aliquot of cell lysates were subjected to western blot analysis with LKB1 and mouse protein 25 (MO25) antibodies, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as loading controls. (Lower panel) Results of kinase activity are expressed relative to the value for EV that was settled at 100 (each point in triplicate, $n=2$, mean \pm s.d., $**P < 0.01$). **(b)** Δ N-LKB1 induced a dose-dependent increase in LKB1-controlled basal AMPK activity. HeLa cells were transfected with both STRAD α expression vector and various amounts (μ g) of the different vectors as indicated. AMPK activity was revealed 48 h after transfection by western blot analysis to determine activation of AMPK and acetyl-coA-carboxylase using pAMPK T172 and pACC S79 antibodies. **(c)** Images were recorded using a super CCD camera of 3.2 megapixels and quantification was performed using ImageQuant LAS 4000 mini (mean \pm s.d., $n=3$, $*P < 0.05$). **(d)** Δ N-LKB1 potentiated LKB1-controlled basal AMPK activity. HeLa cells were transfected with both STRAD α expression vector and various amounts (μ g) of the different vectors as indicated and then analysed by western blotting as in **(b)**. **(e)** The dominant-positive effect of Δ N-LKB1 on LKB1-induced AMPK activity required LKB1 as an upstream kinase. Experimental design and western blotting were carried out as in **(b)** but co-transfection in HeLa cells was performed with the kinase-dead LKB1 mutant (KD). **(f)** AMPK α 2 catalytic subunit structure with a conventional kinase domain at the N terminus, followed by a regulatory region containing an AID, an extended linker region and a carboxy-terminal domain (CTD), which binds the β/γ -subunits (from Hardie *et al.*¹²). The structures of both AMPK α 2 mutants used to analyze the interaction between Δ N-LKB1 and AMPK α are also represented. **(g)** Interaction of Δ N-LKB1 with AMPK α . Δ N-LKB1 bound strongly to the whole AMPK α subunit. HeLa cells were transfected with both the STRAD α expression vector and the various vectors as indicated; 48 h later, cells were harvested and cell lysates (200 μ g) were immunoprecipitated with anti-c-myc antibody and analyzed by western blotting analysis using anti-LKB1 (D60C5; Cell Signaling) and anti-myc antibodies. The quantity of cell lysate for immunoprecipitation of KD- and FL-transfected samples was fourfold greater than that for Δ N-transfected samples. **(h)** Δ N-LKB1 does not bind to the kinase domain but does bind to the AID domain of AMPK α subunit. HeLa cells were transfected with the indicated vectors together with plasmids encoding STRAD α and two AMPK α mutant (myc-tagged CA-AMPK α 2 and myc-tagged AMPK α 2 Δ AID); 48 h after transfection, cells were lysed and immunoprecipitated with anti-c-myc antibody and analyzed by western blotting analysis using anti-LKB1 (D60C5; Cell Signaling) and anti-myc antibodies.

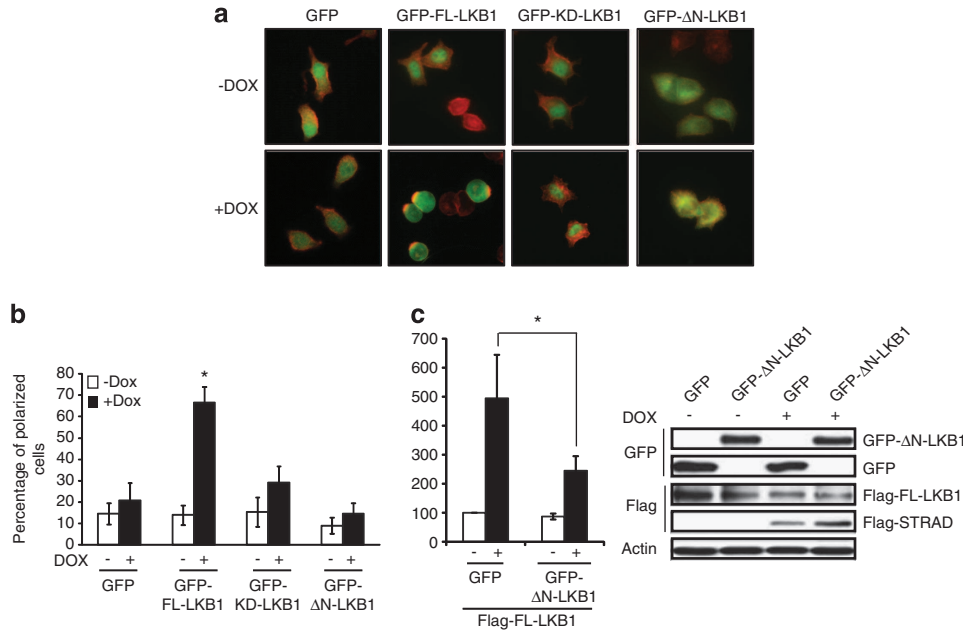


Figure 5. Δ N-LKB1 exerts a dominant-negative effect on the LKB1-induced cell polarization. **(a)** Fluorescent microphotograph of the LS174TR1-6 cells transfected with the different GFP-fused LKB1 isoforms. Cells were transfected with the vectors as indicated. Actin cytoskeleton reorganization (formation of an actin cap) was only observed upon induction of STRAD α expression by doxycycline (+Dox) in cells transfected with FL-LKB1 (GFP-FL-LKB1). The actin cytoskeleton was visualized by phalloidin-tetramethylrhodamine (TRITC) staining (red) and LKB1 expression by GFP fluorescence. **(b)** Polarizing activity of the various LKB1 isoforms. Bar diagram of the percentage of GFP-expressing cells showing an actin cap (see Materials and methods) measured in the presence or absence of doxycycline (mean \pm s.d., $n = 9$, $*P < 0.05$). **(c)** Δ N-LKB1 effect on LKB1-induced polarizing activity. Cells were co-transfected together with FL-LKB1 and either GFP or Δ N-LKB1, and polarization was evaluated (see Supplementary Methods) available online. On the right is the western blot analysis indicating the protein quantities.

Δ N-LKB1 inhibits LKB1-induced cell growth inhibition and has intrinsic oncogenic properties

We used two *in vitro* approaches to examine the role of Δ N-LKB1 on LKB1-mediated cell growth control: the clonogenic assay and the anchorage-independent cell growth assay. HeLa cells were transfected with the vectors expressing the different LKB1 isoforms, seeded at low density and subjected to G418 selection for at least 15 days (Figure 6a). As expected, in the clonogenic assay, the number of colonies following transfection with FL-LKB1 was reduced by half compared with controls (vector alone or KD-LKB1) (Figure 6b). The effect was even more marked when tested in anchorage-independent growth assay (Figure 6c). The coexpression of FL-LKB1 and Δ N-LKB1 almost completely reversed the FL-LKB1-induced inhibition of cell proliferation in the clonogenic assay, and partially reduced the FL-LKB1 effect in the anchorage-independent growth assay. These results revealed that Δ N-LKB1 interferes negatively with the growth-suppressive function of FL-LKB1 (Figures 6b and c). Surprisingly, Δ N-LKB1 enhanced the formation of cell colonies in the clonogenic assay and potentiated anchorage-independent cell growth when solely expressed in HeLa cells, indicating that Δ N-LKB1 has intrinsic transforming property (Figures 6b and c).

The intrinsic oncogenic property of Δ N-LKB1 was studied in lung tumors in which several somatic LKB1 mutations have been described.²⁹ Western blotting revealed that the lung cancer cell line NCI-H460 carrying a homozygous LKB1 Q37X mutation⁵ produced only Δ N-LKB1 and not FL-LKB1, whereas the wild-type LKB1 H358 lung cancer cell line expressed both FL-LKB1 and Δ N-LKB1 (Figures 7a and b). Reverse transcription-PCR was performed to analyze the sequence of the mutated RNA in NCI-H460 cells. The mutation c.109C > T (p.Q37X) was found in the transcript showing that, in this cell line, the nonsense mutation located in the first exon did not lead to the degradation of the

mRNA by nonsense-mediated decay (NMD) (Supplementary Figure 6). The mechanism of escape from nonsense-mediated decay may be linked to the ability to reinitiate translation at downstream start codon, such a mechanism has already been described for the β -globin gene.³⁰ In accordance with our *in vitro* studies using HeLa cells, we observed that the growth of NCI-H460 cells expressing solely Δ N-LKB1 was faster than those of NCI-358 cells that expressed both FL-LKB1 and Δ N-LKB1 (Figure 7c). Using siRNAs that knock down both FL-LKB1 and Δ N-LKB1, we observed a strong decrease in the survival of NCI-H460 cells after Δ N-LKB1 depletion supporting the intrinsic pro-growth property of Δ N-LKB1 (Figures 7d and e).

We then investigated whether extinction of Δ N-LKB1 expression affected tumor growth *in vivo*. NCI-H460 cells were transduced with either doxycycline-inducible sh-LKB1 or an empty vector (control). As expected, we observed a strong decrease in the survival of sh-LKB1-transduced NCI-H460 cells that was obvious at day 4 after doxycycline treatment, when compared with control cells (Figure 7f). Transduced cells were subcutaneously implanted into doxycycline-treated nude mice, and tumor growth was monitored. Mice grafted with control NCI-H460 cells showed a rapid tumor growth, whereas mice grafted with LKB1-knockdown NCI-H460 cells showed slow or no tumor growth (Figure 7g). Therefore, Δ N-LKB1 conferred tumorigenicity, *in vivo*, to the lung cancer cell line NCI-H460.

DISCUSSION

In this report, we describe a novel isoform of LKB1 (named Δ N-LKB1) with an N-terminal truncation of LKB1 that deletes from part of the kinase domain. As expected, Δ N-LKB1 is catalytically inactive, but it exerts a dual effect on the LKB1 functions. It potentiates the stimulating impact of LKB1 on AMPK activity and exerts a dominant-negative effect on LKB1 polarizing activity. Our

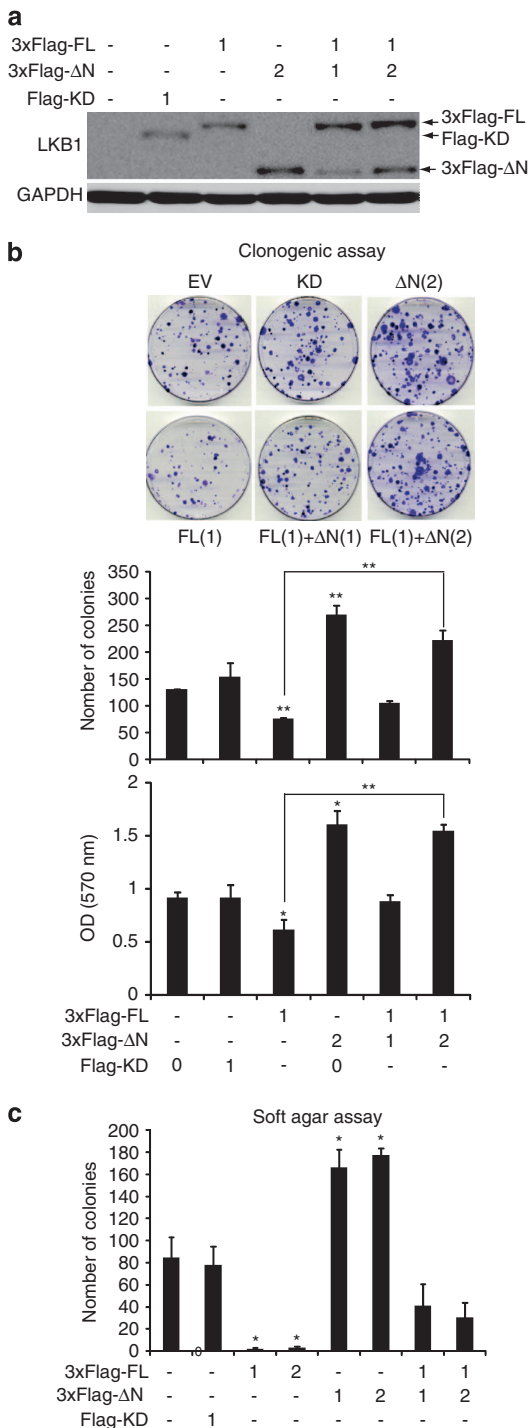


Figure 6. ΔN-LKB1 exerts a dominant-negative effect on the LKB1-induced cell growth inhibition. (a) Western blot analysis illustrating the abundance of the various LKB1 isoforms in each transfected sample. (b) Clonogenic assay. HeLa cells were seeded at 30% confluence and treated with G418 for 15 days. Cells were then fixed and stained with 0.5% crystal violet for colony scoring and the absorbance of the extracted dye was determined. Results are the mean ± s.d., $n=3$, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. (c) Soft agar assay. Seventy-two hours after transfection with the indicated vectors, HeLa cells were proceeded as explained in Materials and methods available online in Supplementary Information. Results are the mean ± s.d., $n=2$, * $P < 0.05$.

results suggest that the dominant-positive effect of ΔN-LKB1 on AMPK activity involves a 'noncanonical' mechanism independent of energy stress or Ca^{2+} signals.¹² ΔN-LKB1 binds to the AMPKα regulatory region and may thereby induce a conformational change of the AMPK complex, resulting in increased AMPK phosphorylation and subsequent AMPK activation. The positive role of ΔN-LKB1 on AMPK activation required FL-LKB1 and was not observed with an LKB1-KD mutant. Furthermore, ΔN-LKB1 was immunoprecipitated with FL-LKB1 when coexpressed in HeLa cells, indicating that these proteins interact (see Supplementary Figure S4C). Furthermore, we provide evidence that ΔN-LKB1 specifically increases the activity of AMPK but not of other ARKs, implying that ΔN-LKB1 does not modify the constitutive LKB1 activity. The dominant-positive role of ΔN-LKB1 on AMPK activity may be linked to the structure of the LKB1 substrates. Indeed, AMPK is the only substrate of LKB1 that is active in a heterotrimeric complex, the other ARKs being monomeric.¹ In favor of this hypothesis, there was no significant difference in the binding between ΔN-LKB1 and FL-LKB1 with two monomeric ARK substrates (SIK2 and MARK2/3), in contrast to the results we obtained for AMPKα (Supplementary Figure S4B). Although it remains to be tested, the dominant-negative effect we observed for the LKB1-induced polarizing activity may be due to the titration of substrates by ΔN-LKB1.

During our study of the physiologic functions of ΔN-LKB1, we found that this isoform stimulates the hepatic fatty acid oxidation capacity in fasted mice. However, in the liver of refed mice, ΔN-LKB1 did not increase oleate oxidation (Supplementary Figure S4), suggesting that the role of ΔN-LKB1 was mostly revealed under energy stress conditions. ΔN-LKB1 is abundant in the skeletal muscle and heart, both of which are oxidative tissues. However, ΔN-LKB1 is not expressed in all oxidative tissues. ΔN-LKB1 expression was not detected in brown adipose tissue (Figure 1) and was not even induced by fasting in mouse liver (Supplementary Figure S5B), thus suggesting that the role of ΔN-LKB1 is not solely related to the tissue oxidative capacity. Interestingly, one of the best studied physiologic process that activates AMPK, *in vivo*, is exercise in the skeletal muscle, where AMPK stimulates glucose uptake and fatty acid oxidation.²⁶ The skeletal muscle is composed of myofibers that differ in their metabolic and contractile properties. Oxidative slow-twitch myofibers preferentially express enzymes that oxidize fatty acids. Fast-twitch glycolytic fibers preferentially metabolize glucose. ΔN-LKB1 expression in oxidative skeletal muscles may be involved in maintaining their high basal AMPK activity. However, ΔN-LKB1 is more abundant in glycolytic than in oxidative muscle, suggesting an involvement of ΔN-LKB1 also during an acute exercise. Thus, ΔN-LKB1 may exert metabolic function in the skeletal muscle, both at rest and during exercise. ΔN-LKB1 activates AMPK in a noncanonical way and is highly expressed in the heart and skeletal muscle, these observations suggest that ΔN-LKB1 enhances AMPK activity in tissues with high energy demand to promote tolerance of metabolic stress.

We found that ΔN-LKB1 (solely expressed) has oncogenic properties. This is, to our knowledge, the first demonstration that an oncogene can originate from a tumor suppressor gene. The mechanism by which ΔN-LKB1 has intrinsic oncogenic property required further experiments. Nevertheless, our findings indicate that ΔN-LKB1 acts independently of the LKB1 pathway because all the *in vitro* and *in vivo* studies were carried out in LKB1-deficient cells.³¹ In addition to the intrinsic oncogenic property of ΔN-LKB1, the novel LKB1 isoform may impact the tumor suppressor function of LKB1. Indeed, by exerting a dominant-positive role on LKB1-controlled AMPK activity and a dominant-negative role on LKB1-induced polarizing activity, ΔN-LKB1 is expected to have a supporting role during tumorigenesis, specifically during the initiation stage of tumorigenesis. The LKB1/AMPK axis has a tumor suppressor role; however, in some contexts, it has been

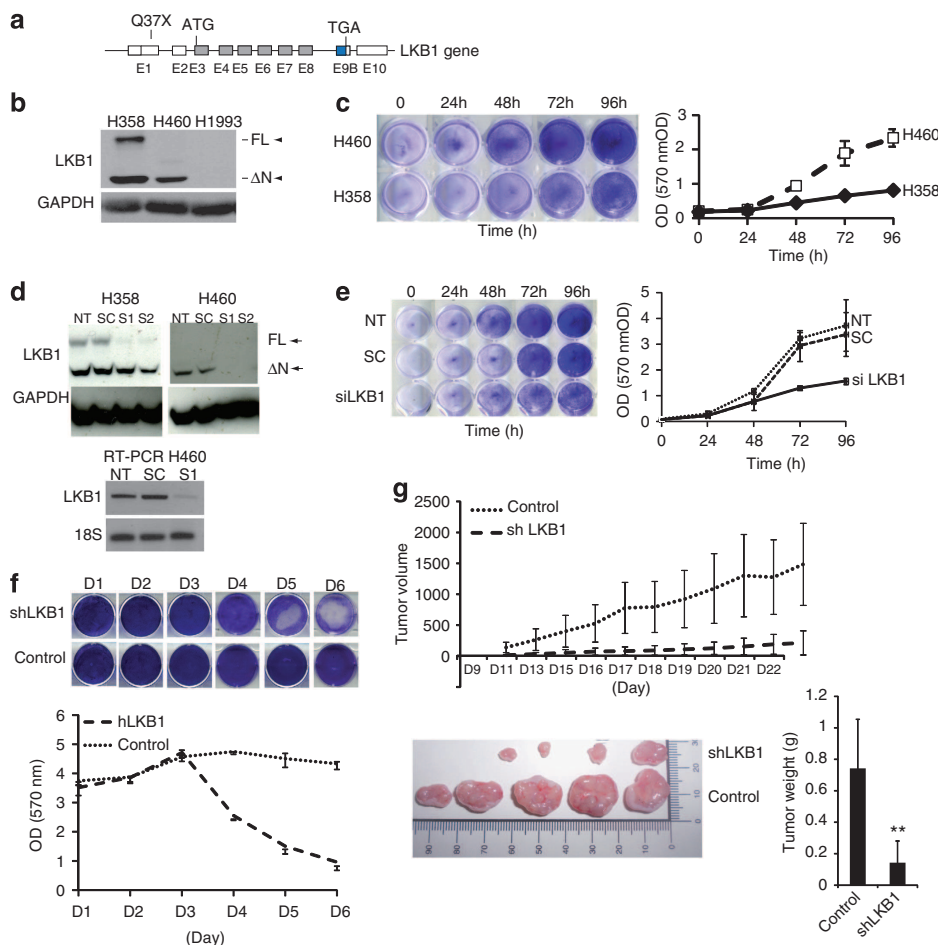


Figure 7. Δ N-LKB1 exhibits intrinsic oncogenic property in tumor xenograft. **(a–c)** Δ N-LKB1 isoform expression in lung cancer cell lines. **(a)** Structure of the human *LKB1* gene showing the position of LKB1 mutation (Q37X) found in NCI-H460 cell.⁵ **(b)** Western blot analysis of LKB1 in different human lung cancer cell lines with wild-type LKB1 gene (H358) that expressed both FL-LKB1 and Δ N-LKB1, a homozygous Q37X mutation leading to the expression of Δ N-LKB1 isoform (H460) or an inactivating (p.E199X) LKB1 mutations (H1993). **(c)** Growth curves analyses of NCI-H460 and NCI-358 lung cancer cell lines. Viable cells were scored by staining with crystal violet. **(d and e)** LKB1 depletion in NCI-460 cells decreased cell growth. **(d)** Western blot analysis of NCI-358 and NCI-H460 cells treated for 48 h by siRNAs against LKB1 (S1 and S2) and controls. Reverse transcription–PCR analysis of NCI-460 cells after siRNA treatment. **(e)** Growth curve analyses of NCI 460 cells after siRNA treatment. Viable cells were scored by staining with crystal violet ($n = 3$). NT, untransfected; SC, transfection with a scrambled siRNA. **(f and g)** *In vivo* tumorigenicity of NCI-H460 cells. **(f)** NCI-H460 cells were infected with a lentiviral vector transducing an LKB1 shRNA (SH1) or the empty vector (control), and selected for puromycin resistance. Viable cells were scored by staining with crystal violet. Cell death was significantly observed 4 days after doxycycline expression ($n = 3$). **(g)** Subcutaneous tumors in nude mice engrafted with NCI-H460 cells expressing either LKB1 shRNA (sh-LKB1) or empty vector (control) that were previously treated for 3 days by doxycycline. Tumors weight was monitored from day 9. On day 23, tumors associated with LKB1-depleted NCI-H460 cells or control NCI-460 cells were removed and weighted. From five mice, only four tumors developed from LKB1-depleted cells. Bars represent means \pm s.e., $n = 5$, $**P < 0.01$.

documented that LKB1/AMPK axis may exert an effect favoring tumor development.^{15–17} Indeed, activation of LKB1/AMPK pathway in glucose-deprived tumor cells contributes to the survival of these cells by restoring ATP level and by inhibiting fatty acid synthesis, thereby sparing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, which is required for protection against oxidative stress.²⁰ It would be thus of interest to determine the molecular pathways that regulate Δ N-LKB1 expression to identify tumors in which this novel LKB1 isoform may contribute to the paradoxical positive role of LKB1 during tumorigenesis. Δ N-LKB1 has oncogenic property whose mechanism differs depending on the presence or not of the full-length LKB1 isoform in LKB1-wild-type or LKB1-mutated cancers, respectively.

In conclusion, we have identified a novel LKB1 isoform that impacts in a dual manner the LKB1 function on AMPK metabolic and cell polarity. We also provide strong evidence that this novel isoform

has oncogenic property, and that these findings may explain some of the paradoxical role of LKB1 during tumorigenesis.

MATERIALS AND METHODS

Materials and reagents

Protease inhibitor cocktail were obtained from Roche Diagnostics (Basel, Switzerland). Doxycycline and metformin were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Protein A coupled to sepharose beads were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Anti- β -catenin was from BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ, USA), anti-LKB1 (D60C5), anti-AMPK, anti-phospho-AMPK α T172 (2531), anti-ACC (3662), anti-phospho-ACC S79(3661), anti-Myc-tag (2276), anti-mouse protein 25a (2716) and secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were purchased from Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-MARK1/2 (anti-C-TAK1, 05-680) was purchased from (Millipore/

Upstate, Billerica, MA, USA). Antibody anti-Flag-tag M2 (F1804) was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Antibody anti-LKB1 (clone Ley37D/G6) and anti-STRADa (clone N-13) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), and anti-LKB1 N-terminal (AP7229a) and anti-LKB1 C-terminal (AP7239b) were from Abgent (Abingdon, UK).

The vectors encoding KD (Flag-K78A-LKB1) has been described previously.³² Flag-STRADa was provided by H Clevers (Utrecht, The Netherlands). Vectors encoding Myc-AMPKa2 myc-CA AMPKa2 and myc-AMPK2-ΔAID were provided by M Foretz and B Viollet (Inserm U1016, Paris, France), those encoding SIK2 by R Dentin (Inserm U1016, Paris, France) and the Pio-MARK3/4 by J Müller (University of Warwick, Coventry, UK). Recombinant adenoviruses encoding for ΔN-LKB1 were generated and produced by Genecust (Dudelange, Luxembourg) using the Flag-ΔN-LKB1 vector as template.

Construction of expression vectors

To construct pcDNA3-FL-LKB1 and pcDNA3-ΔN-LKB1, total RNA from human HUH6 cells and mouse testis were reverse-transcribed using the Transcriptor First Strand cDNA synthesis (Roche Diagnostic); the cDNAs were amplified by PCR using primers containing *Eco*R1 site (underlined on the sequence) and Phusion high-fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Vantaa, Finland). The forward primers used to clone mouse ΔN-LKB1 overlapped the junction between exons 1 and exon 2 resulting from the 5' alternative splice event (Supplementary Figures S2A–C). The following primers were used: human FL-LKB1, forward primer—ACTGGAATTCGTCAGCATGGAGTGGTG; and reverse primer—CAGTGAATTCAGCCTCATGCTGCTTGC; mouse FL-LKB1, forward primer—ACTGGAATTCAGGGGACGAGGACAAGAGATG; reverse primer—CAGTGAATTCGATCCTGATGACACTGTAGGC; human ΔN-LKB1, forward primer—ACTGGAATTCCTCCACCGAGGAAATTTCAACT; reverse primer—CAGTGAATTCGCCAGCCTCACTGCTT; mouse ΔN-LKB1, forward primer—ACTGGAATTCCTCCACCGAGGAGATCCA; reverse primer—CAGTGAATTCCTGTAGGCCTCAGTCACTGCT.

The products were purified by agarose gel electrophoresis, digested by *Eco*R1 and cloned into pcDNA3 mammalian expression vector (Life Technologies). Insert sequences was checked by DNA sequencing.

To construct the human triple Flag-FL-LKB1 and triple Flag-ΔN-LKB1 expression vectors, we used the Gateway technology (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions, using vectors encoding for the untagged human FL-LKB1 and ΔN-LKB1, pDONOR/ZEO (entry clone) and pCIneo3×Flag-GW (destination vector), and the following primers: for human FL-LKB1, forward sequence—ATGGAGGTGGTGGACCC; reverse sequence—TCACTGCTGCTTGAGG; for human ΔN-LKB1, forward primer—ATGTATATGGTGGTGGAGTACTGC; and the same reverse primer as for human ΔN-LKB1. The resulting vectors (3×Flag-FL-LKB1 and 3×Flag-ΔN-LKB1) were validated by sequencing. HeLa cells were transiently transfected with these vectors to confirm protein expression by western blotting. Because the endogenous ATG start site codon was not removed, both the major band corresponding to the 3×Flag LKB1 protein and a minor faster migrating band corresponding to initiation at the endogenous ATG start site were detected in transfection experiments (Figures 1f, h and Supplementary Figures S2B and S4B).

The GFP-FL-LKB1 and GFP-ΔN-LKB1 constructs were obtained by subcloning *Eco*R1-digested human FL-LKB1 and ΔN-LKB1 inserts in pEGFP-C1 vector (Clontech, Mountain View, CA, USA). However, the other vectors, GFP-KD-LKB1 and Flag-Lkb1, have been described previously.³²

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Graham Hardie and Simon Hawley (University of Dundee, Dundee, UK) for their helpful comments and valuable scientific input into our work and also for their kindness in providing us with different antibodies and reagents to measure the LKB1-controlled AMPK activity and to test the role of ΔN-LKB1 on different ARKs. We are also grateful to Christelle Forcet, Nicolas Aznar and Maya Ghawitian from Billaud's laboratory for their help with the analysis of LKB1-induced polarizing activity. We are indebted to Benoit Viollet and Marc Foretz for providing us with AMPK plasmids and helpful discussions. We thank Pascal Maire (from Inserm U1016, Paris, France) and all people of the team for helpful discussions, suggestions and critical reading of the manuscript. We are grateful to Hélène Blons (HEGP, Paris, France) and Sylvie Grazeri (Inserm U823, Grenoble, France) for providing the lung cancer cell lines and some lung tumors, respectively. We also thank Véronique Lenoir and Catherine Esnous for technical help in fatty acid oxidation experiments, and animal facility of Institut

Cochin for maintenance of mouse colonies. Core fundings came from INSERM, grants from LNCC (France) 'Equipe labélisée Ligue Nationale Contre le Cancer', INCA grants and LABEX Who aml?. RD was funded by an LNCC fellowship.


REFERENCES

- 1 Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR. LKB1-dependent signaling pathways. *Annu Rev Biochem* 2006; **75**: 137–163.
- 2 Jansen M, Ten Klooster JP, Offerhaus GJ, Clevers H. LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. *Physiol Rev* 2009; **89**: 777–798.
- 3 Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 563–575.
- 4 Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV *et al*. Very high risk of cancer in familial Peutz–Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 2000; **119**: 1447–1453.
- 5 Sanchez-Cespedes M. A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz–Jeghers syndrome. *Oncogene* 2007; **26**: 7825–7832.
- 6 Wang SN, Gallardo TD, Akbay EA, Liang MC, Contreras CM, Boren T *et al*. Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. *PLoS ONE* 2009; **4**: e5137.
- 7 Baas AF, Kuipers J, van der Wel NN, Batlle E, Koerten HK, Peters PJ *et al*. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* 2004; **116**: 457–466.
- 8 Hong SP, Leiper FC, Woods A, Carling D, Carlson M. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 8839–8843.
- 9 Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D *et al*. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 2003; **13**: 2004–2008.
- 10 Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP *et al*. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2003; **2**: 28.
- 11 Rose AJ, Alsted TJ, Jensen TE, Kobbero JB, Maarbjerg SJ, Jensen J *et al*. A Ca(2+)-calmodulin-eEF2K-eEF2 signalling cascade, but not AMPK, contributes to the suppression of skeletal muscle protein synthesis during contractions. *J Physiol* 2009; **587**(Part 7): 1547–1563.
- 12 Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**: 251–262.
- 13 Zeqiraj E, Filippi BM, Goldie S, Navratilova I, Boudeau J, Deak M *et al*. ATP and MO25alpha regulate the conformational state of the STRADalpha pseudokinase and activation of the LKB1 tumour suppressor. *PLoS Biol* 2009; **7**: e1000126.
- 14 Vaahtomeri K, Makela TP. Molecular mechanisms of tumor suppression by LKB1. *FEBS Lett* 2011; **585**: 944–951.
- 15 Kottakis F, Bardeesy N. LKB1–AMPK axis revisited. *Cell Res* 2013; **22**: 1617–1620.
- 16 Hardie DG, Alessi DR. LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link—ten years after. *BMC Biol* 2013; **11**: 36.
- 17 Liang J, Mills GB. AMPK: a contextual oncogene or tumor suppressor? *Cancer Res* 2013; **73**: 2929–2935.
- 18 Partanen JI, Tervonen TA, Myllynen M, Lind E, Imai M, Katajisto P *et al*. Tumor suppressor function of Liver kinase B1 (Lkb1) is linked to regulation of epithelial integrity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: E388–E397.
- 19 Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA *et al*. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 3329–3335.
- 20 Jeon SM, Chandel NS, Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* 2012; **485**: 661–665.
- 21 Towler MC, Fogarty S, Hawley SA, Pan DA, Martin DM, Morrice NA *et al*. A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for spermiogenesis. *Biochem J* 2008; **416**: 1–14.
- 22 Denison FC, Hiscock NJ, Carling D, Woods A. Characterization of an alternative splice variant of LKB1. *J Biol Chem* 2009; **284**: 67–76.
- 23 Ikeda Y, Sato K, Pimentel DR, Sam F, Shaw RJ, Dyck JR *et al*. Cardiac-specific deletion of LKB1 leads to hypertrophy and dysfunction. *J Biol Chem* 2009; **284**: 35839–35849.
- 24 Zeqiraj E, Filippi BM, Deak M, Alessi DR, van Aalten DM. Structure of the LKB1–STRAD–MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science* 2009; **326**: 1707–1711.
- 25 Carling D, Mayer FV, Sanders MJ, Gamblin SJ. AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nat Chem Biol* 2011; **7**: 512–518.

- 26 Winder WW, Hardie DG. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* 1996; **270** (Part 1): E299–E304.
- 27 Richter EA, Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochem J* 2009; **418**: 261–275.
- 28 Friedrichsen M, Mortensen B, Pehmoller C, Birk JB, Wojtaszewski JF. Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: role in glucose uptake and insulin sensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 2013; **366**: 204–214.
- 29 Matsumoto S, Iwakawa R, Takahashi K, Kohno T, Nakanishi Y, Matsuno Y *et al*. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene* 2007; **26**: 5911–5918.
- 30 Neu-Yilik G, Amthor B, Gehring NH, Bahri S, Paidassi H, Hentze MW *et al*. Mechanism of escape from nonsense-mediated mRNA decay of human beta-globin transcripts with nonsense mutations in the first exon. *RNA* 2011; **17**: 843–854.
- 31 Shackelford DB, Abt E, Gerken L, Vasquez DS, Seki A, Leblanc M *et al*. LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin. *Cancer Cell* 2013; **23**: 143–158.
- 32 Forcet C, Etienne-Manneville S, Gaude H, Fournier L, Debilly S, Salmi M *et al*. Functional analysis of Peutz–Jeghers mutations reveals that the LKB1 C-terminal region exerts a crucial role in regulating both the AMPK pathway and the cell polarity. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 1283–1292.
- 33 Bardeesy N, Sinha M, Hezel AF, Signoretti S, Hathaway NA, Sharpless NE *et al*. Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature* 2002; **419**: 162–167.

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)



Available online at
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

www.em-consulte.com/en



MINI REVIEW

The Wnt/ β -catenin pathway as a therapeutic target in human hepatocellular carcinoma

Rajae Dahmani¹, Pierre-Alexandre Just¹, Christine Perret*

U.1016 Inserm, Institut Cochin, CNRS UMR8104, University Paris-Descartes, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France

Available online 21 July 2011

Summary Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third most common cause of cancer-related death worldwide. However, targeted therapies are still at their beginning for the treatment of this poor-prognosis tumor. Among the signaling cascades deregulated in HCC, the Wnt/ β -catenin signaling pathway plays a key role in hepatic oncogenesis. Although it has been shown, using HCC cell lines, that inhibition of the β -catenin signaling has anti-tumoral effect, no molecules targeting the Wnt pathway are currently tested in clinical trials for the treatment of HCC. Here we review our current knowledge about the role of the Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma pathogenesis and the benefits and limits of targeting this pathway in HCC.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Primary liver cancer is the sixth most common cancer and the third cause of cancer-related death worldwide [1]. Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for about 85% of primary liver cancers and its incidence has been increasing dramatically since 20 years. There are huge geographical variations in the incidence and risk factors. For instance, in Sub-Saharan Africa and in Asia, chronic viral hepatitis B is the main risk factor of HCC while in Europe and in the USA the incidence is lower, but continuously increasing as a result of higher prevalences of chronic viral hepatitis C, alcoholic cirrhosis and metabolic liver diseases [1]. The main curative treatment is surgery, but most patients have

inoperable HCC. Until now, systemic therapies only demonstrated a limited impact on patient prognosis and sorafenib, the anti-angiogenic and Ras-Raf-MAPK inhibitor, is the single targeted molecule that has shown to significantly improve survival of patients with advanced HCC [2]. To develop more specific and targeted therapies, it is mandatory to understand the cellular and molecular mechanisms involved in the pathogenesis of HCC. Analyses of different genetic alterations have led to the identification of several major oncogenic pathways that are deregulated in HCC, including the p53, the Rb and the Wnt/ β -catenin pathways and, to a lesser extent, the TGF β and the MET-HGF pathways [3].

Mutations affecting the Wnt/ β -catenin pathway appear to be the most frequent genetic event in human HCC [3]. Interestingly, recent data showed that the Wnt/ β -catenin signaling pathway exert a critical role in many aspects of liver development and physiology [4–7]. It is tightly controlled by multiple factors and understanding such regulation opens a unique field for the development of targeted treatments. This review will discuss some of the potential

* Corresponding author. Tel.: +33 1 44 41 25 64;
fax: +33 1 44 41 24 21.

E-mail address: christine.perret@inserm.fr (C. Perret).

¹ Equal authors.

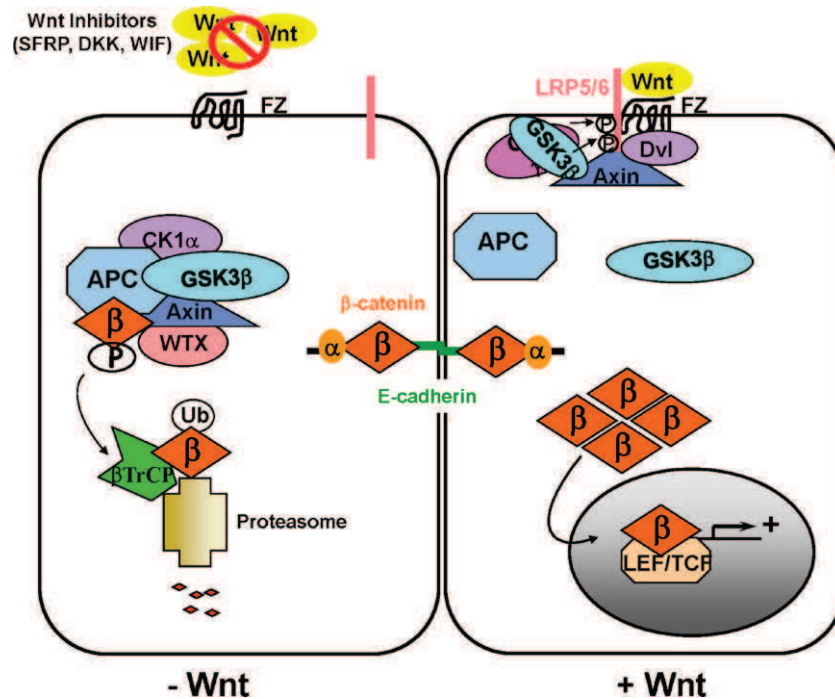


Figure 1 Scheme of activation of the Wnt/ β -catenin signaling. β -catenin is a structural protein involved in the adherens junction complexes with E-cadherin. It is also the key transducer of the Wnt pathway. In the absence of Wnt signal, β -catenin is destabilized by a multiprotein complex containing APC, Axin, WTX, and two kinases that phosphorylate β -catenin. It is then ubiquitinated and degraded by the proteasome. When Wnt binds to its cell surface receptor [consisting of Frizzled (FZ) and LRP5/6], the phosphorylation of β -catenin is suppressed and β -catenin accumulates in the cytosol and is translocated to the nucleus where it binds to the LEF/TCF factors to control the expression of target genes. At the cell surface the accessibility of the Wnt ligands to their receptors is controlled by different Wnt inhibitors \ominus .

molecular factors among these components that may be useful for the development of targeted treatments for HCC.

The Wnt/ β -catenin signaling pathway in normal liver development and physiology

The Wnt/ β -catenin pathway is a key developmental pathway also involved in the formation of multiple types of cancer, [8] for review. It controls tissue development in embryos and tissue maintenance in adults, through a genetic program induced in specific temporal, spatial and tissue contexts. This genetic program controls various critical cell processes such as cell proliferation, cell fate, epithelial-mesenchymal transitions and cell death and different biological responses are observed in the different tissues targeted by the Wnt/ β -catenin pathway. Aberrant constitutive activation of the Wnt pathway leads to uncontrolled cell proliferation, growth and survival, promoting the development of cancer.

A general diagram of the Wnt pathway is shown in Fig. 1. The Wnt pathway is activated by the binding of secreted growth factors of the Wnt family to Frizzled (Fzd) receptors at the surface of target cells, leading to the activation of different signal transduction pathways: the canonical and non-canonical Wnt pathways, [9] for review. Herein, we exclusively focus on the canonical Wnt/ β -catenin pathway, which is yet described to be the most relevant of both pathways in cancer biology. In the canonical Wnt signaling, β -catenin is the key transduction partner. Its concentration

in the cytoplasm of unstimulated cells is kept very low through phosphorylation by two kinases, CK1 and GSK3 β , functioning in a multiprotein complex including the products of two tumor suppressor genes, the adenomatous polyposis coli (APC) and Axins genes. Phosphorylated β -catenin is then ubiquitinated, resulting in its proteasomal degradation. Accessibility of the Wnt ligands to the Fzd receptors is controlled by different Wnt inhibitors present in the extracellular compartment that prevent illegitimate β -catenin transduction signaling. In the activation state, when Wnt ligands bind to Fzd-LRP5/6 (Fzd-low-density lipoprotein receptor-related protein5/6) receptor complexes, a series of events preventing the cytosolic degradation of β -catenin occurs, inducing β -catenin accumulation in the cytosol and its translocation to the nucleus. β -catenin then interacts with the Tcf/Lcf transcription factors to ensure the efficient regulation of Wnt target gene transcription. β -catenin is also involved in adherent junctions, in which it interacts with the cytoplasmic domain of E-cadherin. β -catenin is thus a multifunctional protein with both adhesive and transcriptional activation functions. The role of β -catenin in adhesion implies the membranous structural pool of this protein, whereas the Wnt signaling function of β -catenin involves the dynamic cytosolic and nuclear pools of the protein.

The Wnt/ β -catenin pathway is a central regulatory system in normal liver cells. It is involved in all steps of liver development, including early specification, control of cell proliferation and control of the cell fate of the hepatoblast progenitor cells [4–6]. It is also essential for adult

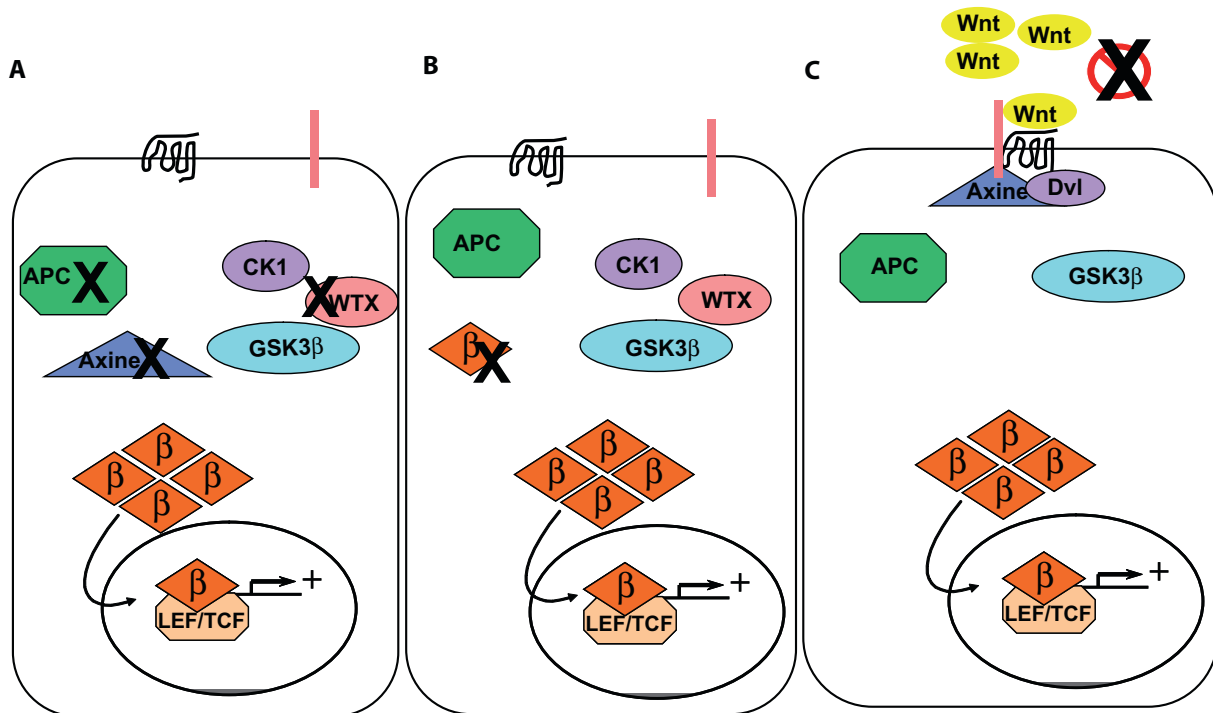


Figure 2 The road towards cancer. The scheme represents three way of activation of the Wnt/β-catenin pathway, (A) by loss of function of the tumor suppressor genes, *APC*, *AXIN*, (B) by gain of function of *CNNTB1*, (C) by an autocrine mechanism resulting either from a loss of function of Wnt inhibitors, or up-regulation of Wnt ligands or receptors.

liver homeostasis, being a master controller of the metabolic zonation within the liver lobule [7].

Aberrant activation of the Wnt/β-catenin pathway in hepatocellular carcinoma

Hepatocarcinogenesis is a multi-step process with accumulation of genetic and epigenetic events during tumor progression. In this context, the aberrant activation of the β-catenin signaling has been shown to play a major role in the pathogenesis of HCC.

Various molecular and genetic factors participate to such aberrant activation of the Wnt/β-catenin pathway (Fig. 2). Firstly, mutations are frequently identified in genes encoding for the main actors of the pathway. Gain-of-function mutations of *CTNNB1* (encoding for β-catenin) are encountered in about one third of HCCs [10] and define *CTNNB1* as the most frequently mutated gene in HCCs. Conversely, loss-of-function mutations of negative regulators of the pathway are also observed, namely mutations of the *AXIN1* and *AXIN2* genes (< 5%) and of the *APC* gene (exceptional) [3]. Beside such mutational events, the Wnt/β-catenin pathway can be also activated in HCCs as a consequence of a deregulated dialogue between the tumor cells and their microenvironment. For instance, an autocrine Wnt stimulation loop can be established following epigenetic events that change the expression profiles of the ligands, the extracellular inhibitors and the receptors of the Wnt family [11]. A modified cross-talk with other signaling pathways such as HGF or TGF-β can also account for the aberrant activation of the Wnt/β-catenin pathway in HCCs [12, 13].

Several studies based on genomic and transcriptomic profiling have led to the identification of two main subclasses of HCCs [14, 15]. Interestingly, these two subgroups of HCCs highlight the involvement of two different oncogenic pathways, which imply different oncogenic events and risk factors and define two distinct groups of patients with different outcomes. The first group comprises HCCs with high levels of chromosomal instability and frequent *TP53* and *AXIN1* mutations. This group is closely linked to an HBV history and a poor prognosis. The second group comprises HCCs with low genomic instability and frequent *CTNNB1* mutations. This group is associated with a better patient prognosis [16].

Surprisingly, our works showed that *CTNNB1*- and *AXIN1*-mutated HCCs have very different transcriptional programs [17], explaining their opposite categorization within the molecular classification exposed above. We also showed that *CTNNB1*-mutated HCCs constitute a very homogeneous group of well-differentiated tumors with distinctive morphological, metabolic and molecular features [18]. Oppositely, other studies have shown that the Wnt/β-catenin pathway can also be activated in a subgroup of HCCs with progenitor features. Interestingly, such tumors are characterized by a low differentiation, a poor prognosis and the absence of *CTNNB1* mutation [19]. Even if the molecular events that conduce to the activation of the Wnt/β-catenin signaling in such tumors are currently unknown, this subgroup of HCCs, as well as we observed for the *AXIN1*-mutated HCCs, displays a clearly divergent Wnt signature from the one of *CTNNB1*-mutated HCCs.

Altogether, these data suggest that if the activation of the Wnt/β-catenin pathway seems to be a recurrent event

in HCCs, it appears to have very divergent molecular consequences according to the causative activating event. In our mind, the success of therapies that target the Wnt/ β -catenin pathway relies on the definition of different working and robust Wnt signatures that would reflect the large heterogeneity of the HCCs phenotype according to the implied event that activates the Wnt/ β -catenin pathway.

Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma

In light of the different genetic events at the origin of an aberrant activation of the Wnt pathway, several strategies can be proposed:

- targeting the interaction between the Wnt ligand and the Fzd receptor;
- targeting the destruction complex;
- the most interesting but most difficult issue, targeting the β -catenin/Lef-Tcf transcriptional complex.

Targeting the interaction between the Wnt/Fzd ligand/receptor complex

Therapeutic monoclonal antibodies are useful for neutralizing extracellular targets such as ligands or extracellular domain of receptors. Therefore, Wnt and Fzd proteins are good candidates for this type of therapeutic approach, and should target HCCs that display an autocrine Wnt activation loop. Antibodies against Wnt-1, Wnt-2, Fzd-1 and Fzd-2 have been raised and showed some therapeutic impact in different tumoral contexts, [20] for review. Recently, an anti-Wnt-1 antibody was shown to inhibit the β -catenin signaling and induce apoptosis in two different HCC cell lines, and to decrease tumor growth when the cells are xenografted in nude mice [21]. Another strategy consists in the use of soluble Fzd receptors that will quench the Wnts molecules within the pericellular matrix. Soluble Fzd-8 was firstly shown to inhibit the tumor growth of the colorectal HTC116 [22] and, recently, soluble Fzd-7 was also shown to inhibit Wnt signaling and to sensitize to doxorubicin treatment several HCC cell lines [23]. Finally, Dishevelled (Dvl), the molecular transducer of the Wnt/Fzd interaction, can also constitute an interesting target. In this optic, a competitive peptide inhibiting the Fzd/Dvl interaction has been designed and showed to decrease the β -catenin signaling and to induce apoptosis of the HuH7 cancer cell line [24].

Targeting the β -catenin destruction complex

Axin is one of the major components of the destruction complex. Transfection of HCC cell lines with adenoviruses encoding for Axin 1 inhibits cell proliferation and induce apoptosis [25]. Different studies, performed on colon cancer cells, have identified molecules that are able to inhibit the Wnt/ β -catenin signaling by stabilizing Axin, leading to a reduced cell proliferation and viability [26,27]. These compounds may have a promising outcome in HCC therapy.

Targeting the β -catenin/Lef-Tcf transcriptional complex

The shared end-point of the aberrant activations of the Wnt/ β -catenin signaling is the formation of β -catenin/ Lef-Tcf complexes in the nuclei that lead to the constitutive activation of a genetic program promoting cancer development. Thus, drugs designed to disrupt the Lef-Tcf binding of β -catenin appear to be the best approach for inhibiting cancer development induced by an aberrant activation of the Wnt pathway. Several molecules have been identified using high-throughput screening programs. In colon cancer cells, some molecules were identified as inhibitors of the interaction between Tcf4 and β -catenin, resulting in a reduced proliferation rate [28]. However, such experiments were counterbalanced by a much more limited impact on tumor growth in xenograft models [29]. It has been proposed that these molecules lack specificity and may also alter β -catenin-dependant cell adhesion [20]. Another molecule, which binds to the histone acetyltransferase CBP and could thus inhibit the transcriptional activity of β -catenin/Lef-Tcf complexes, has also been tested and was shown to promote apoptosis in colon cancer cells [30]. However the efficiency of these molecules in vivo remains to be evaluated. Furthermore, the potential toxicity of such inhibitors should be high regarding the broad range of CBP involvement on general transcriptional regulation.

In fact, although disruption of the β -catenin/Lef-Tcf complex is theoretically the best therapeutic strategy to inhibit HCCs associated to an aberrant Wnt signaling, the complexity of the transcriptional regulation of the Wnt target genes [31] suggests that much knowledge is still required before such drugs could be tested in clinical trials.

Conclusion and perspectives

Rationale to develop drugs that block the effects of constitutive Wnt/ β -catenin signaling in HCCs is based on the knowledge of this signaling pathway, and drugs are designed to target different levels of the pathway. HCC with autocrine stimulation may be targeted with an antibody-based inhibition of the receptor-ligand interaction at the cell surface or with small inhibitors of essential upstream events such as the Fzd-Dvl complex formation. Drugs developed to block aberrant β -catenin/Lef-Tcf transcriptional activity have the better potential therapeutic effect, and are supposed to target HCC with either CTNNB1 or *AXIN* mutations. Moreover, it should be effective in the numerous cancers bearing a constitutive activation of the pathway. However, the complexity of the β -catenin-dependant transcription mechanisms makes the challenge ambitious. Furthermore, such drugs may have important side effects in organs such as intestine where the Wnt/ β -catenin signaling is crucial for tissue renewal. The key for such strategy to reach the clinical practice is the identification of new molecules that would be effective only in tumor cell bearing an aberrant β -catenin signaling.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Funding: C. Perret's group is supported by Inserm, CNRS, Université Paris-Descartes, Ligue Nationale contre le Cancer (Équipe labellisée), ANR and INCA.

References

- [1] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557–76.
- [2] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378–90.
- [3] Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene* 2006;25:3778–86.
- [4] Ober EA, Verkade H, Field HA, Stainier DY. Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification. *Nature* 2006;442:688–91.
- [5] Tan X, Yuan Y, Zeng G, Apte U, Thompson MD, Cieply B, et al. Beta-catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development. *Hepatology* 2008;47:1667–79.
- [6] Decaens T, Godard C, de Reynies A, Rickman DS, Tronche F, Couty JP, et al. Stabilization of beta-catenin affects mouse embryonic liver growth and hepatoblast fate. *Hepatology* 2008;47:247–58.
- [7] Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moinard C, et al. Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell* 2006;10:759–70.
- [8] Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;127:469–80.
- [9] Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781–810.
- [10] de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8847–51.
- [11] Bengochea A, de Souza MM, Lefrancois L, Le Roux E, Galy O, Chemin I, et al. Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2008;99:143–50.
- [12] Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M, Chan JA, Brunet JP, Chiang DY, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009;69:7385–92.
- [13] Monga SP, Mars WM, Padiaditakis P, Bell A, Mule K, Bowen WC, et al. Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes. *Cancer Res* 2002;62:2064–71.
- [14] Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2001;120:1763–73.
- [15] Lee JS, Chu IS, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 2004;40:667–76.
- [16] Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 2007;45:42–52.
- [17] Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C, Boyault S, Grimber G, Balabaud C, et al. Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2007;26:774–80.
- [18] Audard V, Grimber G, Elie C, Radenen B, Audebourg A, Letourneur F, et al. Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying beta-catenin mutations. *J Pathol* 2007;212:345–52.
- [19] Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:1451–61.
- [20] Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:997–1014.
- [21] Wei W, Chua MS, Grepper S, So SK. Blockade of Wnt-1 signaling leads to anti-tumor effects in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer* 2009;8:76.
- [22] Laverge E, Hendaoui I, Coulouarn C, Ribault C, Leseur J, Eliat PA, et al. Blocking Wnt signaling by SFRP-like molecules inhibits in vivo cell proliferation and tumor growth in cells carrying active beta-catenin. *Oncogene* 2011;30:423–33.
- [23] Wei W, Chua MS, Grepper S, So SK. Soluble Frizzled-7 receptor inhibits Wnt signaling and sensitizes hepatocellular carcinoma cells towards doxorubicin. *Mol Cancer* 2011;10:16.
- [24] Nambotin SB, Lefrancois L, Sainsily X, Berthillon P, Kim M, Wands JR, et al. Pharmacological inhibition of Frizzled-7 displays anti-tumor properties in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2011;54:288–99.
- [25] Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 2000;24:245–50.
- [26] Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan CW, et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol* 2009;5:100–7.
- [27] Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signaling. *Nature* 2009;461:614–20.
- [28] Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, et al. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* 2004;5:91–102.
- [29] Wei W, Chua MS, Grepper S, So S. Small molecule antagonists of Tcf4/beta-catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2010;126:2426–36.
- [30] Emami KH, Nguyen C, Ma H, Kim DH, Jeong KW, Eguchi M, et al. A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:12682–7.
- [31] Mosimann C, Hausmann G, Basler K. Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:276–86.